

การเพาะเลี้ยงเซลล์ความเข้มข้นสูงด้วยการเพาะเลี้ยงแบบหลายกะเป็นลำดับต่อเนื่อง

High-Cell-Density Cultivation with Multiple Sequential Batch Cultivation

ขวัญฤทัย มาลัยเรือง (Kwanruthai Malairuang)* ดร.เศรษฐวัชร น้าศาสตร์ (Dr.Seathawat Chamsart)**

บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้เพื่อศึกษาการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์คั้นแบบ 2 ชนิดให้ได้เซลล์ความเข้มข้นสูง ด้วยอาหารสูตร Batch Production Medium (BPM) โดยใช้โอลิโกเมอร์ของกลูโคสจากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง (เดกซ์ทริน) ความเข้มข้นสูงเป็นแหล่งคาร์บอน และมีการพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบกะไปสู่เทคนิคแบบหลายกะเป็นลำดับต่อเนื่อง ที่ศักยภาพสูงกว่า เพื่อให้สามารถขยายขนาดในระดับอุตสาหกรรมได้ ทั้งนี้พบว่าการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์คั้นแบบทั้งสอง ชนิดด้วยเทคนิคดังกล่าว 3 ครั้งต่อเนื่องกัน ทำให้มีอัตราผลิตเซลล์ *E. coli* ได้ถึง 2.88 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงโดยใช้ เดกซ์ทรินที่ระดับความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร และมีอัตราการผลิตเซลล์ *S. cerevisiae* เท่ากับ 1.06 กรัมต่อลิตรต่อ ชั่วโมง ด้วยเดกซ์ทรินที่ระดับความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีประสิทธิภาพเทียบเคียงได้กับการเพาะเลี้ยงแบบเดิมกะ (fed-batch cultivation) ที่มีวิธีการที่ยุ่งยากมากกว่า

ABSTRACT

This research was to study the high-cell-density cultivation of 2-strain model microorganisms with the BPM medium using glucose oligomer (dextrin) from cassava starch hydrolysis as carbon source at high concentrations and improve batch technique to the multiple sequential batch technique that has higher potential than normal batch technique for industrial scalability. The cultivation of model microorganisms with 3-time sequential batches using dextrin at a concentration of 100 g/l as carbon source gave a high production rate of 2.88 g/l/h for *E. coli* cells and that of 60 g/l gave a production rate of 1.06 g/l/h for *S. cerevisiae*.

คำสำคัญ: การเพาะเลี้ยงเซลล์ความเข้มข้นสูง เดกซ์ทริน เอสเชอริเชีย โคไล แแซ็กคาไรมัยซิส ซีรีวิซีย

Key Words: High-Cell-Density cultivation, Dextrin, *E. coli*, *S. cerevisiae*

*นิสิต หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

**ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

บทนำ

การเพาะเลี้ยงเซลล์ความเข้มข้นสูง (High-Cell-Density cultivation) เป็นเทคนิคที่พัฒนาขึ้นมาเพื่อสร้างมวลเซลล์ในปริมาณสูง (Riesenberg & Guthke, 1991) มีความสำคัญสำหรับการผลิตรีคอมบิแนนซ์โปรตีนจากจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ซึ่งมีอัตราการเจริญเติบโตเพิ่มมากขึ้นทุกๆ ปี ประมาณ 10-15 เปอร์เซ็นต์ต่อปี (Werner, 2004) มีการใช้ประโยชน์ทั้งด้านอุตสาหกรรมเกษตร อาหาร การแพทย์ และอื่นๆ การเพาะเลี้ยงเซลล์ความเข้มข้นสูงส่วนใหญ่นิยมใช้การเพาะเลี้ยงแบบเดิมกะ หรือแบบต่อเนื่องเท่านั้น เนื่องจากการเพาะเลี้ยงแบบกะนั้น มักประสบปัญหาการก่อกวนของสารตั้งต้น ซึ่งเป็นการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้

การวิจัยครั้งนี้ทำเพื่อศึกษาการผลิตเซลล์จุลินทรีย์ต้นแบบ 2 ชนิด ได้แก่ *Escherichia coli* และ *Saccharomyces cerevisiae* ความเข้มข้นสูง ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญทางอุตสาหกรรมในการผลิตผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพต่างๆ มากมาย ทั้งจากสายพันธุ์ดั้งเดิม เช่น กรดอะซิติก เอทานอล เป็นต้น และจากสายพันธุ์ที่ได้รับการดัดแปลงพันธุกรรม (recombinant) เช่น อินเตอเฟอรอน และฮอร์โมนเจริญเติบโต เป็นต้น (Shojaosadati et al, 2008) จุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิด เลือกมาเพื่อเป็นต้นแบบสำหรับกลุ่มแบคทีเรีย และยีสต์ เนื่องจากเป็นสายพันธุ์ที่ได้รับการยอมรับ มีการนำมาใช้อย่างแพร่หลาย และมีข้อมูลพื้นฐานสนับสนุนมากมาย ทั้งในระดับห้องปฏิบัติการและอุตสาหกรรม ดังนั้นผลการพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงครั้งนี้จึงสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับจุลินทรีย์อื่นๆ ได้อย่างครอบคลุม

การวิจัยครั้งนี้ศึกษาการผลิตเซลล์ของ *E. coli* และ *S. cerevisiae* ให้ได้ความเข้มข้นสูง ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบกะ ซึ่งเป็นเทคนิคที่ไม่ยุ่งยาก ซับซ้อน โดยใช้สูตรอาหารที่ทราบองค์ประกอบแน่นอน (defined medium) สามารถควบคุมได้ง่าย และราคาไม่แพง รวมไปถึงเลือกใช้โพลิโกเมอร์ของ

กลูโคสที่ความเข้มข้นสูงเป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยง เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาการก่อกวนของแหล่งคาร์บอนในการผลิตเซลล์ความเข้มข้นสูง ที่ในการเพาะเลี้ยงแบบปกติจะยับยั้งการเจริญของเซลล์ นอกจากนี้ยังศึกษาเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบหลายกะเป็นลำดับต่อเนื่อง (multiple sequential batches) เพื่อช่วยลดระยะเวลาการเพาะเลี้ยงและการเตรียมอุปกรณ์ต่างๆ โดยเริ่มต้นการเพาะเลี้ยงแบบกะครั้งแรก เมื่อเพาะเลี้ยงครบตามระยะเวลาที่กำหนดจึงเก็บเกี่ยวน้ำหมักที่ได้ เหลือไว้บางส่วนเพื่อเป็นหัวเชื้อของการเพาะเลี้ยงครั้งต่อไป จากนั้นเติมอาหารใหม่ตามปริมาตรการทำงาน (working volume) โดยสามารถทำได้ติดต่อกันหลายครั้ง ผลการวิจัยครั้งนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้กับอุตสาหกรรมการผลิตสารชีวภาพต่างๆ ได้แทนการเพาะเลี้ยงแบบเดิมกะ (fed-batch)

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์ความเข้มข้นสูง โดยการใช้โพลิโกเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับจุลินทรีย์ต้นแบบ 2 ชนิด เพื่อให้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้กับจุลินทรีย์อื่นในระดับอุตสาหกรรมแทนการเพาะเลี้ยงแบบเดิมกะ

วิธีการวิจัย

สายพันธุ์จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ต้นแบบที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้มี 2 ชนิด ได้แก่ *E. coli* ATCC 33849/DH1 (สายพันธุ์ดั้งเดิม) และ *S. cerevisiae* SB1 (สายพันธุ์ดั้งเดิม) ซึ่งเก็บรักษาบนอาหารวุ้นเอียงที่อุณหภูมิ -4 องศาเซลเซียส

การเตรียมหัวเชื้อ

เตรียมอาหารสำหรับหัวเชื้อ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในบัฟเฟอร์ฟอสเฟตขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่า ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมงสำหรับ *E. coli* และที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง สำหรับ *S. cerevisiae*

สูตรอาหาร

สูตรอาหาร Nutrient Broth (NB) ใช้เป็นอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ *E. coli* ประกอบด้วย (ต่อลิตร) เปปโตน 5 กรัม และสารสกัดจากเนื้อสัตว์ 3 กรัม

สูตรอาหาร Yeast extract-Peptone-Dextrose (YEPD) ใช้เป็นอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ *S. cerevisiae* ประกอบด้วย (ต่อลิตร) กลูโคส 20 กรัม เปปโตน 20 กรัม และสารสกัดจากยีสต์ 10 กรัม

สูตรอาหาร Batch Production Medium (BPM) เป็นสูตรอาหารสำหรับเพาะเลี้ยง ประกอบด้วย (ต่อลิตร) แหล่งคาร์บอน 20 กรัม $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.2 กรัม KH_2PO_4 1.5 กรัม Na_2HPO_4 1.8 กรัม $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 กรัม สารละลาย trace element 1 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย (ต่อลิตร) NH_3SO_4 0.003 กรัม CaCl_2 0.01 กรัม BoCl_2 0.0003 กรัม Co_3Cl_3 0.0002 กรัม ZnSO_4 0.0001 กรัมต่อลิตร MnCl_2 0.00003 กรัม Na_2MoO_4 0.00003 กรัม NiSO_4 0.00002 กรัม และ CuSO_4 0.00001 กรัม

การเพาะเลี้ยงแบบกะ (batch) และหลายกะต่อเนื่อง (Multiple equential batches)

การเพาะเลี้ยงแบบกะดำเนินการในถังหมัก ขนาดบรรจุ ปริมาตร 5 ลิตร (Biostat B, ประเทศเยอรมัน) ปริมาตรการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 3 ลิตร โดยเตรียมอาหาร BPM ที่ใช้เดกซ์ทรินเป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาตร 2,850 มิลลิลิตร เติมห่วงเชื้อความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรโดยปริมาตร) ควบคุมความเร็วใบพัด 500-700 รอบต่อนาที อัตราการเติมอากาศ 1-3 ลิตรของอากาศต่อปริมาตรอาหาร 1 ลิตรต่อเวลาที่ตามความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เพิ่มขึ้น ส่วนค่าพีเอชควบคุมเท่ากับ 7.0 สำหรับเพาะเลี้ยง *E. coli* และ เท่ากับ 5.5 สำหรับ *S. cerevisiae*

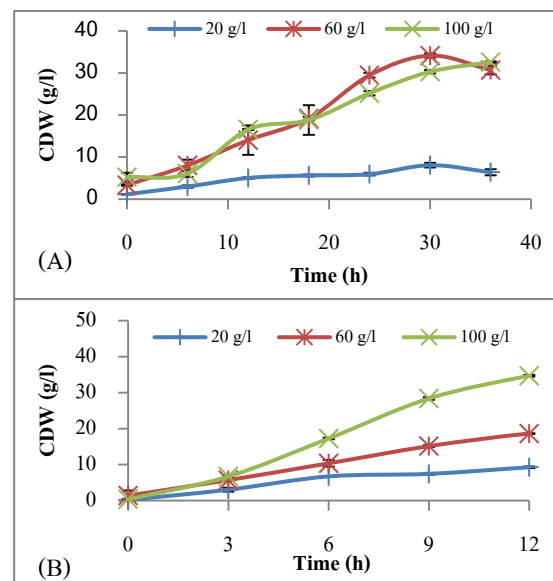
สำหรับการเพาะเลี้ยงแบบหลายกะต่อเนื่อง เริ่มต้นด้วยการเพาะเลี้ยงแบบกะ ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น การเพาะเลี้ยงแบบกะครั้งที่ 2 จะเริ่มต้นขึ้นเมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบกะครั้ง 1 โดยทำการถ่ายน้ำหมักออก จนเหลือปริมาณน้ำหมักในถัง

เพียง 150 มิลลิลิตร เพื่อเป็นหัวเชื้อในการเพาะเลี้ยงครั้งต่อไป จากนั้นจึงเติมอาหารที่เตรียมใหม่ ปริมาตร 2,850 มิลลิลิตร ทำการเพาะเลี้ยงจนครบตามระยะเวลาการเพาะเลี้ยง ในการทดลองครั้งนี้ทำติดต่อกัน 3 ครั้ง

ผลการวิจัย

ความเข้มข้นเดกซ์ทรินที่เหมาะสม

การทดสอบความสามารถของจุลินทรีย์ชนิดแบบ 2 ชนิดในการใช้เดกซ์ทรินเป็นแหล่งคาร์บอนในสูตรอาหาร BPM ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน ได้แก่ 1 เท่า (เดกซ์ทริน 20 กรัมต่อลิตร) 3 เท่า (เดกซ์ทริน 60 กรัมต่อลิตร) และ 5 เท่า (เดกซ์ทริน 1,000 กรัมต่อลิตร) ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร พบว่า *E. coli* สามารถเจริญในอาหารที่มีเดกซ์ทรินได้เป็นอย่างดี ปริมาณเซลล์แห้ง (cell dry weigh, CDW) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)



ภาพที่ 1 การเจริญของจุลินทรีย์ชนิดแบบในเดกซ์ทริน

ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน (A) *E. coli* และ (B) *S. cerevisiae*

เมื่อความเข้มข้นของเดกซ์ทรินมากขึ้น โดยเดกซ์ทรินที่ระดับความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตเซลล์ได้สูงสุด มีค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง

เท่ากับ 34.60 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ เดกซ์ทรินระดับความเข้มข้น 20 และ 60 กรัมต่อลิตร มีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 9.27 และ 18.63 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 1 A)

ขณะที่การเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* ด้วยเดกซ์ทริน (มีการเติมเอนไซม์กลูโคสไมเลส ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรโดยน้ำหนัก) พบว่าการใช้เดกซ์ทรินที่ระดับความเข้มข้น 60 และ 100 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณเซลล์แห้งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เท่ากับ 34.13 และ 32.60 กรัมต่อลิตร และที่ระดับความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร มีปริมาณเซลล์แห้งเท่ากับ 6.40 กรัมต่อลิตร ดังนั้นเดกซ์ทรินที่ระดับความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตรจึงมีความเหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* มากที่สุด

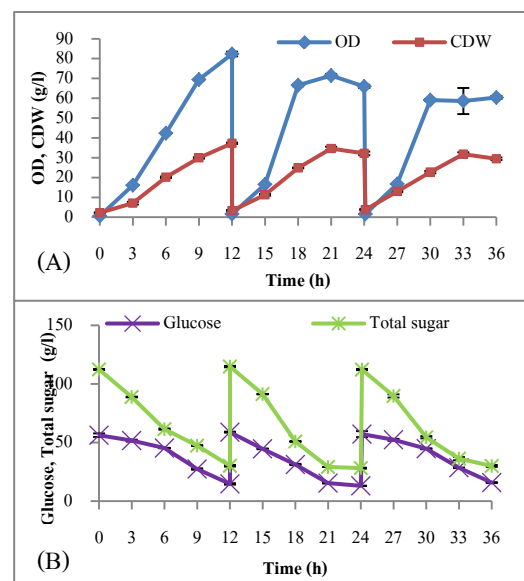
เทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบหลายกะเป็นลำดับต่อเนื่อง (Multiple sequential batches)

การเพาะเลี้ยงแบบหลายกะเป็นลำดับต่อเนื่องสำหรับ *E. coli* ทำการเพาะเลี้ยงด้วยสูตรอาหาร BPM ความเข้มข้น 5 เท่า ติดต่อกัน 3 ครั้ง ควบคุมความเร็วใบพัด 700 รอบต่อนาที เติมน้ำอากาศ 3 ลิตรต่อปริมาตรอาหาร 1 ลิตรต่อนาที พบว่าการเจริญมีอัตราลดลงเล็กน้อย (ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ) ในทุกการเพาะเลี้ยงแบบกะที่ต่อเนื่องกัน และมีช่วงการเจริญแบบทวีคูณ (log phase) ที่แตกต่างกัน คือ การเพาะเลี้ยงแบบกะครั้งที่ 1 log phase อยู่ในช่วง 0-12 ชั่วโมง เซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 37.30 กรัมต่อลิตร ในขณะที่การเพาะเลี้ยงแบบกะครั้งที่ 1 และ 2 มีช่วง log phase ในช่วง 0-6 ชั่วโมงแรก มีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 34.67 และ 31.80 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 2A)

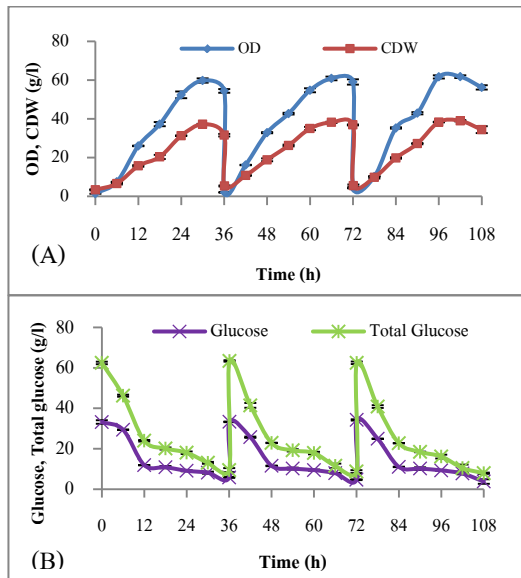
ส่วนการเพาะเลี้ยงแบบหลายกะเป็นลำดับต่อเนื่องสำหรับ *S. cerevisiae* เลือกการเพาะเลี้ยงด้วยสูตรอาหาร BPM ความเข้มข้น 3 เท่า ความเร็วใบพัด 600 รอบต่อนาที เติมน้ำอากาศ 2 ลิตรต่อปริมาตรอาหาร 1 ลิตรต่อนาที พบว่าในแต่ละการเพาะเลี้ยงแบบกะทั้ง 3 ครั้ง มีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งไม่แตกต่างกันอย่างมี

นัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เท่ากับ 37.27, 38.23 และ 39.30 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 3A)

และเมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์คองเหลือและปริมาณน้ำตาลคองเหลือทั้งหมดจากการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ต้นแบบทั้ง 2 ชนิด (ภาพที่ 2B และ 3B) ด้วยเดกซ์ทริน พบว่ามีแนวโน้มคล้ายคลึงกัน คือ ในช่วงเริ่มต้นการเพาะเลี้ยงระดับน้ำตาลทั้ง 2 มีความแตกต่างกันอย่างมาก แต่เมื่อระยะเวลาการเพาะเลี้ยงผ่านไปนานขึ้น ระดับของน้ำตาลทั้ง 2 ชนิดจะยิ่งมีค่าใกล้เคียงกัน ทั้งนี้กล่าวได้ว่าในช่วงเริ่มต้นสายเดกซ์ทรินมีความยาวมาก ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี DNS และการหาปริมาณ total sugar จึงมีความแตกต่างกันมาก แต่เมื่อระยะเวลาการการเพาะเลี้ยงผ่านไป สายเดกซ์ทรินสั้นลงจากการที่เชื้อสลายและนำไปใช้ ค่าที่วิเคราะห์ได้จึงแตกต่างกันน้อยลง



ภาพที่ 2 การเจริญของ *E. coli* ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบกะ-ต่อเนื่อง (A) แสดงค่าความขุ่นและน้ำหนักเซลล์แห้ง (B) แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์คองเหลือและปริมาณน้ำตาลคองเหลือทั้งหมด



ภาพที่ 3 การเจริญของ *S. cerevisiae* ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบกะ-ต่อเนื่อง (A) แสดงค่าความขุ่น และ น้ำหนักเซลล์แห้ง (B) แสดงปริมาณน้ำตาล ริดิซังกลูโคสและปริมาณน้ำตาลกลูโคสทั้งหมด

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

จุลินทรีย์ดัดแปลงทั้ง 2 ชนิดสามารถเจริญและได้เซลล์ที่มีความเข้มข้นสูงด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบหลายกะเป็นลำดับต่อเนื่องที่พัฒนาขึ้นในการวิจัยครั้งนี้ ซึ่งพบว่าความเข้มข้นของจุลินทรีย์ดัดแปลง คือ *E. coli* มีอัตราการผลิตมวลเซลล์เท่ากับ 2.88 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และ *S. cerevisiae* มีอัตราการผลิตมวลเซลล์เท่ากับ 1.06 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง สามารถเทียบเท่าได้กับการเพาะเลี้ยงแบบเดิมกะของ Lee & Chang (1993) ที่มีอัตราการผลิตมวลเซลล์ *E. coli* ได้ 2.92 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และ Kim et al. (2007) ที่มีอัตราการผลิตเซลล์ *S. cerevisiae* ได้ 9.87 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

นอกจากนี้ผลจากงานวิจัยพบว่า จุลินทรีย์ดัดแปลงทั้ง 2 ชนิดมีความสามารถในการใช้декซ์ทรินที่ระดับความเข้มข้นสูงเป็นแหล่งคาร์บอนได้ดีกว่าการใช้กลูโคส โดย *E. coli* และ *S. cerevisiae* สามารถใช้декซ์ทรินได้มากถึง 100 และ 60 กรัมต่อลิตร

ตามลำดับ ด้วยการเพาะเลี้ยงแบบกะ ในขณะที่ Riesenber & Guthke (1991) และ Shiloach & Fass (2005) รายงานว่า พบการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนได้สูงสุดเพียง 50 และ 30 กรัมต่อลิตร ตามลำดับเท่านั้น

เอกสารอ้างอิง

- Kim, H.Y., Kang, S.W., Lee, J.H., Chang, H.I., Yum, C.W., Paik, H.D., Kang, C.W., Kim, S.W. 2007. High cell density fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* JUL3 in fed-batch culture for the production in beta-glucan. *Journal of Industrial and Engineering*. 13(1):153-158
- Lee, S.Y. and Chang, H.N. 1993. High cell density cultivation of *Escherichia coli* W using sucrose as a carbon source. *Biotechnology Letters*. 15:971-974.
- Riesenber, D. and Guthke, R. 1991. High cell density cultivation of microorganism. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 51: 422-430.
- Shiloach, J. and Fass, R. 2005. Growing *E. coli* to high cell density – A historical perspective on method development. *Biotechnology Advance*. 23: 345-357.
- Shojaosadati, S.A., Kolaei S.M.V., Balaeipour, V., & Farroul, A.M. 2008. Recent advances in high cell density cultivation for production of recombinant protein. *Iranian Journal of Biotechnology*. 6: 63-83.
- Werner, R.G. 2004. Economic aspect of commercial manufacture of biopharmaceuticals. *Journal of Biotechnology*. 113: 171-182.