การผลิตมวลเซลล์ *Bacillus* sp. ที่ความเข้มข้นสูงโดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์พิเศษแทนวิธีเฟดแบตช์

The production of *Bacillus* sp. cell biomass at high concentration by special batch cultivation technique instead of fed-batch mode

จตุพร สุขหนา[1], ขวัญฤทัย มาลัยเรือง[2], เศรษฐวัชร ฉ่ำศาสตร์[3*]
Jatuporn Sukna[1], Kwanruthai Malairuang[2], Seathawat Chamsart[3*]

Received: 18 July 2020 ; Revised: 25 August 2020 ; Accepted: 16 September 2020

บทคัดย่อ

การผลิตเซลล์ของ *Bacillus* sp. ที่ความเข้มข้นสูง ด้วยอาหารที่ทราบองค์ประกอบแน่นอน (defined medium) โดยการใช้เดกซทริน ซึ่งเป็นโอลิโกเมอร์ของกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง ที่ความเข้มข้นสูงเป็นแหล่งคาร์บอน ร่วมกับเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์พิเศษ (Special batch) ซึ่งเป็นการเพาะเลี้ยงอย่างง่ายและราคาถูก จากการศึกษาในระดับฟลาสก์พบว่า อาหารสูตร Batch Production Medium (BPM) ที่ใช้เดกซ์ทรินเป็นแหล่งคาร์บอน มีประสิทธิภาพดี โดยผลิตมวลเซลล์ได้ 12.93 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังพบว่า การเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ระดับถังหมัก 5 ลิตร สามารถใช้เดกซ์ทรินที่ความเข้มข้นได้สูงถึง 100 กรัมต่อลิตร โดยไม่เกิดการยับยั้งการเจริญของเซลล์ (ซึ่งไม่สามารถทำได้หากใช้น้ำตาลเป็นวัตถุดิบ) โดยพบว่าผลผลิตมวลเซลล์สูงถึง 31.98 กรัมต่อลิตร ต่อมาศึกษาขยายขนาดการเพาะเลี้ยงที่ระดับถังหมัก 30 และ 300 ลิตร เพื่อศึกษาความเป็นไปได้สำหรับการขยายขนาดการผลิตไปสู่ระดับอุตสาหกรรม ให้ผลปรากฏชัดว่า มีความเป็นไปได้สูง เนื่องจากเซลล์มีการเจริญดีมาก และผลิตมวลเซลล์ที่ความเข้มข้นสูงถึง 43.45 และ 47.03 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ที่อัตราการผลิต (productivities) สูงสุดถึง 2.94 และ 3.72 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งเป็นค่าที่สูงมาก แสดงถึงประสิทธิภาพการผลิต โดยสามารถพัฒนาไปสู่ระดับอุตสาหกรรม และใช้แทนการเพาะเลี้ยงแบบเฟดแบตช์ (Fed-batch) ซึ่งเป็นวิธีการที่ซับซ้อนยุ่งยากและต้นทุนสูงได้

คำสำคัญ: เซลล์ความเข้มข้นสูง เดกซ์ทริน การเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ บาซิลัส

Abstract

This work describes production of *Bacillus sp.* cell biomass at high concentration with defined medium, using dextrin (glucose oligomer) from cassava starch hydrolysis, at high concentrations as the carbon source together with a special batch cultivation technique which is simple and inexpensive. The study in flask using Batch Production Medium (BPM) with dextrin as the carbon source showed an efficient biomass yield of 12.93 g/l. Furthermore, in 5-liter fermenter cultivation, dextrin could be used at a very high concentration up to 100 g/l without growth inhibition (this cannot be done, if using sugar as the carbon source) and enhanced cell biomass concentration to 31.98 g/l. Further scaled-up studies of the cultivation in 30 and 300-liter fermenters were carefully performed in order to test the feasibility for production at an industrial scale. They clearly generated excellent results because of good cell growths and producing biomass yields at the very high concentrations of 43.45 and 47.03 g/l with the maximum cell productivities (cell production rates) at 3.11 and 3.92 g/l/h, respectively. The results of this study importantly demonstrate highly effective production which is able to be developed to industrial scales and substitute the usual fed-batch cultivation technique which is a complicated method and high cost.

Keywords: High-Cell-Density Cultivation, HCDC, Dextrin, Batch Cultivation, *Bacillus* sp.

---

[1] นิสิตปริญญาโท คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี 20130
[2] นิสิตปริญญาเอก คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี 20130
[3] ผู้ช่วยศาสตราจารย์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี 20130
[1] Master degree student, Faculty of Science, Muang District, Chon Buri, 20130.
[2] Doctoral student, Faculty of Science, Muang District, Chon Buri, 20130.
[3] Assist. Prof., Faculty of Science, Muang District, Chon Buri, 20130.
* Corresponding author ; Seathawat Chamsart, Faculty of Science, Muang Chonburi District, Chon Buri, 20130.

บทนำ

การเพาะเลี้ยงเซลล์จุลินทรีย์ให้ได้ความเข้มข้นสูง (High-Cell-Density Cultivation, HCDC) เป็นเทคนิคการเพาะเลี้ยงที่มีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มผลผลิตมวลเซลล์ (cell biomass yield) และเพิ่มอัตราการการผลิต (production rate หรือ productivity) ของจุลินทรีย์ (Lee, 1996 ; Shojaosadati *et al*., 2008) โดยทั่วไป เทคนิคการเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตเซลล์ความเข้มข้นสูงจะนิยมใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบเฟดแบตช์ (Fed-batch) ซึ่งมีข้อเสียหลายประการ คือ เป็นวิธีการที่ซับซ้อน ควบคุมยาก ใช้เวลาเพาะเลี้ยงนาน โอกาสการปนเปื้อนสูง รวมทั้งต้นทุนที่สูง ส่วนเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ (Batch) แม้เป็นเทคนิคการเพาะเลี้ยงที่มีวิธีการไม่ซับซ้อนง่ายต่อการควบคุม โอกาสในการปนเปื้อนน้อย ใช้เวลาสั้น และต้นทุนต่ำ แต่มีข้อจำกัด คือไม่สามารถใช้แหล่งของคาร์บอนที่มีความเข้มข้นสูงได้ เพราะจะทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ (Crebtree effect) คือ น้ำตาลคั่งในเซลล์ ในขณะที่ระบบไม่สามารถให้อากาศได้เพียงพอ ทำให้จุลินทรีย์ผลิตสารพิษ เช่น อะซีเตท กรณีที่เป็นแบคทีเรีย หรือเอทานอล กรณีที่เป็นยีสต์ออกมา เป็นผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญของเซลล์ ปัญหานี้สามารถแก้ไขได้โดยการใช้เดกซ์ทริน (โอลิโกเมอร์ของน้ำตาลกลูโคส) เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งสามารถใช้ที่ความเข้มข้นสูงได้ถึง 100 กรัมต่อลิตรในการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ ซึ่งปกติถ้าใช้น้ำตาลกลูโคสหรือซูโครสจะไม่สามารถใช้ได้ที่ความเข้มข้นสูงเช่น เกินกว่า 40 กรัมต่อลิตร

จากผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าสามารถผลิตมวลเซลล์ด้วยการเพาะเลี้ยงแบบกะในถังหมักขนาด 5 ลิตร ซึ่งให้อัตราการผลิตเซลล์ที่ดีกว่าการเพาะเลี้ยงแบบเฟดแบตช์ถึง 16 เท่า (Zhu and Xu, 2010) ปัจจัยที่สำคัญในการผลิตเซลล์ความเข้มข้นสูงประกอบไปด้วย สูตรอาหารที่มีประสิทธิภาพโดยส่วนใหญ่จะใช้อาหารสังเคราะห์ที่ทราบองค์ประกอบทางเคมีทั้งชนิดและปริมาณ (defined medium) ที่แน่นอน และสามารถปรับปรุงให้เหมาะสมกับวัตถุประสงค์ของการเพาะเลี้ยงได้ดี สำหรับ *Bacillus* sp. เป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญทางด้านอุตสาหกรรมชีวภาพเป็นอย่างมาก เนื่องจากสามารถใช้ผลิตผลิตภัณฑ์ได้หลากหลายชนิด เช่น เอนไซม์โปรติเอส อะไมเลส ไลเพส ไคติเนส เป็นต้น (เสาวนีย์ ธรรมสถิติ, 2547) นอกจากนี้ยังใช้ประโยชน์อย่างกว้างขว้างในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมการเกษตร และการแพทย์

Bacillus sp. เป็นแบคทีเรียแกรมบวก สามารถเจริญได้ทั้งที่มีอากาศและไม่มีอากาศ เพาะเลี้ยงได้ง่าย ระยะเวลาในการเจริญไม่นาน สามารถใช้แหล่งคาร์บอนจากอาหารเพาะเลี้ยงได้หลากหลายชนิด (Rosovitz *et al*., 1998) ในการทดลองนี้มีความตั้งใจใช้ *Bacillus* sp. เพื่อมาศึกษาวิธีการการผลิตเซลล์ให้ได้ความเข้มข้นสูง โดยใช้สูตรอาหารสังเคราะห์ที่ทราบองค์ประกอบแน่นอนโดยมีโอลิโกเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง (เดกซ์ทริน) เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งผลิตได้เอง ผลิตง่ายราคาถูก และสามารถใช้ได้ที่ความเข้มข้นสูงโดยไม่ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญของเซลล์จากการคั่งของน้ำตาลภายในเซลล์ เนื่องจากสายเดกซ์ทรินซึ่งเป็นโอลิโกเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสจะค่อยๆ ถูกตัดและทยอยลำเลียงเข้าเซลล์ เสมือนว่าเป็นการทำการเพาะเลี้ยงแบบเฟดแบตช์ที่ระดับเซลล์ (Fed-Batch at Cell Level, FBC) (Malairuang *et al*., 2020) เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์ให้ได้ความเข้มข้นสูงนี้สามารถขยายขนาดการผลิตเซลล์ชีวมวลขึ้นสู่ระดับโรงงานต้นแบบ และระดับอุตสาหกรรมได้

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการใช้เดกซ์ทรินจากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง ที่ความเข้มข้นสูงสำหรับการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. ด้วยวิธีแบบแบตช์พิเศษเพื่อผลิตมวลเซลล์ให้ได้ความเข้มข้นสูงแทนการใช้น้ำตาลเป็นวัตถุดิบและแทนวิธีการเพาะเลี้ยงแบบเฟดแบตช์ที่ใช้กันทั่วไป โดยศึกษาถึงระดับโรงงานต้นแบบโดยการใช้ถังหมักขนาด 30 และ 300 ลิตร

วิธีการวิจัย

สายพันธุ์จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัยนี้ ได้แก่ *Bacillus* sp. ที่คัดแยกจากดิน และเก็บรักษาในอาหารเหลวที่มีกลี เซอรอล ความเข้มข้นร้อยละ 20 ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ภายในหน่วยวิจัยวิศวกรรมชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

การเตรียมหัวเชื้อ

เตรียมอาหารสำหรับหัวเชื้อ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในบัฟเฟิลฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เทเชื้อจากหลอดเก็บใส่ลงในบัฟเฟิลฟลาสก์ที่มีอาหาร จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงโดยการบ่มบนเครื่องเขย่า ด้วยความเร็วที่ 200 รอบต่อนาทีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

สูตรอาหาร

สูตรอาหาร Nutrient Broth (NB) ประกอบด้วย (ต่อลิตร) เพปโตน 5 กรัม และสารสกัดจากเนื้อสัตว์ (beef extract) 3 กรัม ใช้เป็นอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ

สูตรอาหาร Batch Production Medium (BPM) (ขวัญฤทัย มาลัยเรือง, 2561) ประกอบด้วย (ต่อลิตร) แหล่งคาร์บอน 20 กรัม $(NH_4)_2SO_4$ 2.2 กรัม KH_2PO_4 1.5 กรัม Na_2HPO_4 1.8 กรัม $MgSO_4.7H_2O$ 0.2 กรัม สารละลาย trace elements 1 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย (ต่อลิตร) NH_3SO_4 3 มิลลิกรัม $CaCl_2$ 10 มิลลิกรัม $BoCl_2$ 0.3 มิลลิกรัม Co_3Cl_3

0.2 มิลลิกรัม $ZnSO_4$ 0.1 มิลลิกรัม $MnCl_2$ 0.03 มิลลิกรัม Na_2MoO_4 0.03 มิลลิกรัม $NiSO_4$ 0.02 มิลลิกรัม และ $CuSO_4$ 0.01 มิลลิกรัม

การศึกษาประสิทธิภาพการใช้เดกซ์ทรินเป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงระดับฟลาสก์

เตรียมอาหารสูตร BPM โดยแทนที่แหล่งคาร์บอนในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน 3 แหล่งแก่ด้วย กลูโคสทางการค้า (Sigma-Aldrich) กลูโคสจากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง และเดกซ์ทรินจากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง ปรับ pH เท่ากับ 6.5 ใส่ลงในบัฟเฟิลฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 95 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่ออาหารเย็น เติมหัวเชื้อที่เตรียมไว้ร้อยละ 5 ของปริมาตรอาหาร จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 36 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส อัตราเขย่า 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุกๆ 6 ชั่วโมง และนำไปวิเคราะห์ผลและทำการทดลอง 3 ซ้ำ

การศึกษาการใช้เดกซ์ทรินที่ความเข้มข้นสูงในการเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบกะในถังหมักขนาด 5 ลิตร

เตรียมอาหารสูตร BPM โดยใช้เดกซ์ทรินเป็นแหล่งคาร์บอนที่เข้มข้นที่ต่างกัน 3 ความเข้มข้นแก่คือ 20, 40 และ 100 กรัมต่อลิตร (เพื่อให้เร็วสำหรับการขยายขนาดการเพาะเลี้ยงขึ้นสู่ระดับโรงงานต้นแบบ จากประสบการณ์ จึงข้ามไปที่ความเข้มข้นสูงก่อน เพราะเมื่อประสบความสำเร็จจึงไม่จำเป็นที่จะต้องลงมาทำการทดลองที่ความเข้มข้นต่ำๆ ซ้ำอีก) เตรียมอาหารสูตร BPM ใส่ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ปริมาตรการทำงาน 3 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำการต่ออุปกรณ์ต่างๆ ของระบบควบคุมเข้ากับถังหมักและตั้งค่าต่างๆ สำหรับสภาวะเพาะเลี้ยง โดยให้ค่า pH เท่ากับ 6.5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และปรับอัตราการกวนของใบพัด (impeller speeds) เป็น 500, 600 และ 700 รอบต่อนาที และอัตราการเติมอากาศเป็น 1, 2 และ 3 ปริมาตรของอากาศต่อปริมาตรของอาหารต่อนาที (vvm) อัตราทั้งสองสูงขึ้นตามค่าความเข้มข้นของเดกซ์ทริน ตามลำดับ และเติมหัวเชื้อร้อยละ 5 ของปริมาตรต่อปริมาตรอาหารเพาะเลี้ยง เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุกๆ 6 ชั่วโมง และนำไปวิเคราะห์ผลและทำการทดลอง 3 ซ้ำ

การศึกษาการขยายขนาดการเพาะเลี้ยงแบบกะในถังหมักขนาด 30 ลิตร

เตรียมอาหารสูตร BPM ลงในถังหมักขนาด 30 ลิตร โดยใช้เดกซ์ทรินความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาตรอาหาร 13.5 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยระบบฆ่าเชื้อในตัวที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อนึ่งฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้ว ทำการต่ออุปกรณ์ระบบควบคุมต่างๆ เข้ากับถังหมักและตั้งค่าสภาวะเพาะเลี้ยง ให้ค่า pH เท่ากับ 6.5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เติมหัวเชื้อปริมาตร 1.5 ลิตร ลงในถังหมัก จากนั้นปรับให้อัตราการกวนของใบพัดที่ 500 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศเท่ากับ 2 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 16 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุกๆ 2 ชั่วโมง และนำไปวิเคราะห์ผลและทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ

การศึกษาการขยายขนาดการเพาะเลี้ยงแบบกะในถังหมักขนาด 300 ลิตร

เตรียมอาหารเหลวสูตร BPM ซึ่งมีเดกซ์ทรินเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 180 ลิตร ลงในถังหมักขนาด 300 ลิตร แล้วนึ่งฆ่าเชื้อด้วยระบบฆ่าเชื้อในตัว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นต่ออุปกรณ์ระบบควบคุมต่างๆ เข้ากับถังหมักและตั้งค่าสภาวะเพาะเลี้ยงให้ค่า pH เท่ากับ 6.5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เติมหัวเชื้อปริมาตร 20 ลิตร (จากถังหมักกล้าเชื้อ 30 ลิตร) ลงในถังหมัก ปรับอัตราการกวนของใบพัดที่ 300 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศเท่ากับ 2 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารเพาะเลี้ยงต่อนาที เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุกๆ 2 ชั่วโมง และนำไปวิเคราะห์ผลและทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ

การวิเคราะห์ผลการทดลอง

การวัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance)

เมื่อเก็บตัวอย่างจากแต่ละการหมักมาแล้ว นำน้ำหมักมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเปรียบเทียบ และนำไปคำนวณค่าการดูดกลืนแสง

การวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง (Dry Cell Weight)

ทำการชั่งหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 1.5 มิลลิลิตร เป็นค่าน้ำหนักหลอดเปล่า จากนั้นนำตัวอย่างน้ำหมักใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยงที่ผ่านการชั่งน้ำหนักมาแล้ว ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่อัตรา 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วนำหลอดที่มีตะกอนเซลล์ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วนำมาชั่งน้ำหนักอีกครั้ง หลังจากนั้นนำมาคำนวณค่าน้ำหนักเซลล์แห้งตามสูตรดังนี้

น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) = [((น้ำหนักเซลล์ (กรัม) + น้ำหนักหลอด (กรัม)) - น้ำหนักหลอด (กรัม)) x 1,500)]/1.5

การวิเคราะห์ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์คงเหลือ

1. การทำกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส นำสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร เจือจางให้มีความเข้มข้นเป็น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 กรัมต่อลิตร เติมสารละลาย DNS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที และนำไปแช่น้ำเย็น 5 นาที จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐานกับความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานกับค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ จากนั้นหาค่าความชันของกราฟ

2. การวัดน้ำตาลคงเหลือ นำตัวอย่างส่วนใสของน้ำหมักที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงมาเจือจางให้เหมาะสม จากนั้นนำ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองและเติมสารละลาย DNS 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที จากนั้นนำไปแช่น้ำเย็นต่ออีก 5 นาที เติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงแสงที่ได้มาคำนวณเป็นปริมาณน้ำตาลคงเหลือโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสจากสูตร

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์คงเหลือ (กรัมต่อลิตร) = (ค่าการดูดกลืนแสง x ค่าการเจือจาง) / ความชันของกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one-way analysis of variance;วน 3 ซ้ำทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของชุดการทดลองแต่ละชุดด้วยวิธี Tukey's Range Test ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Minitab version 17 ที่ระดับนัยสำคัญ *p*-value 0.05

ผลการวิจัย

ผลการศึกษาประสิทธิภาพการใช้เดกซ์ทรินเป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงในระดับฟลาสก์

การศึกษาประสิทธิภาพการใช้เดกซ์ทรินจากการย่อยแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน โดยเปรียบเทียบกับแหล่งคาร์บอนอื่น ได้แก่ กลูโคสทางการค้า (Sigma-Aldrich) และกลูโคสจากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง โดยใช้อาหารสูตร BPM พบว่า *Bacillus* sp. มีการเจริญได้ดีในอาหารที่มีเดกซ์ทรินเป็นแหล่งคาร์บอน โดยการเจริญสูงสุดที่ 18 ชั่วโมง มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด เท่ากับ 12.93 กรัมต่อลิตร ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด 24.47 และน้ำตาลคงเหลือเท่ากับเท่ากับ 2.09 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงสุดท้ายของการเพาะเลี้ยง (Figure 1) และเมื่อพิจารณาแหล่งคาร์บอนจากกลูโคสทางการค้า พบว่า การเจริญสูงสุดที่ 9 ชั่วโมง ให้ผลน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 5.13 กรัมต่อลิตร ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 8.10 และปริมาณน้ำตาลคงเหลือในชั่วโมงสุดท้ายเท่ากับ 10.05 กรัมต่อลิตร และพิจารณาการใช้กลูโคสจากการย่อยแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า การเจริญสูงสุดที่ 9 ชั่วโมง ให้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 4.70 กรัมต่อลิตร ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 6.29 และปริมาณน้ำตาลคงเหลือเท่ากับ 5.94 กรัมต่อลิตร

ซึ่งเมื่อเทียบเทียบค่าตัวแปรทางจลนพลศาสตร์การเจริญที่ได้จากการคำนวณ (Table 1) พบว่า การใช้เดกซ์ทรินเป็นแหล่งคาร์บอนมีประสิทธิภาพสูงสุดสำหรับการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. ให้ผลการเจริญดีที่สุดโดยมีค่ามวลเซลล์ (x) เท่ากับ 12.93 กรัมต่อลิตร อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เท่ากับ 0.18 ต่อชั่วโมง ผลผลิตของมวลเซลล์ต่อการใช้น้ำตาล ($Y_{x/s}$) เท่ากับ 0.57 กรัมต่อกรัม อัตราการสร้างมวลเซลล์ (r_x) เท่ากับ 0.72 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และอัตราการใช้น้ำตาล (r_s) เท่ากับ 0.99 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง รองลงมาเป็นการใช้แหล่งคาร์บอน

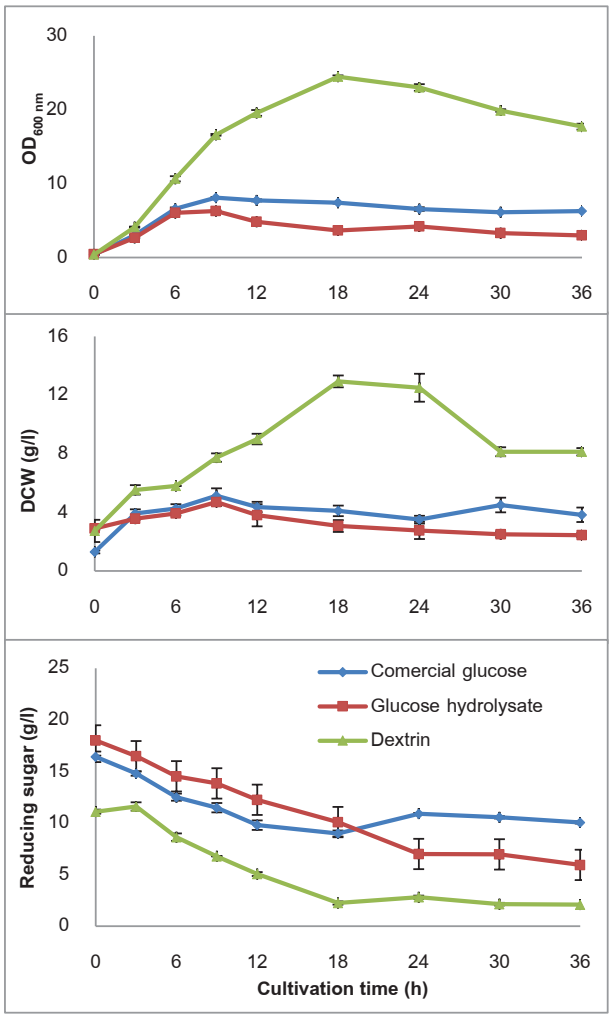

Figure 1. Growth, dry cell weight, and reducing sugar during cultivations of *Bacillus* sp. With different carbon sources

จากกลูโคสทางการค้า ซึ่งมีค่ามวลเซลล์ (x) เท่ากับ 5.13 กรัมต่อลิตร อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เท่ากับ 0.15 ต่อชั่วโมง

ผลผลิตของมวลเซลล์ต่อการใช้น้ำตาล ($Y_{x/s}$) เท่ากับ 0.45 กรัมต่อกรัม อัตราการสร้างมวลเซลล์ (r_x) เท่ากับ 0.57 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และอัตราการใช้น้ำตาล (r_s) เท่ากับ 0.94 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงและลำดับสุดท้ายเป็นการใช้แหล่งคาร์บอนจากกลูโคสจากการย่อยแป้ง โดยมีค่ามวลเซลล์ (x) เท่ากับ 4.70 กรัมต่อลิตร อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เท่ากับ 0.05 ต่อชั่วโมง ผลผลิตของมวลเซลล์ต่อการใช้น้ำตาล ($Y_{x/s}$) เท่ากับ 0.29 กรัมลำดับ

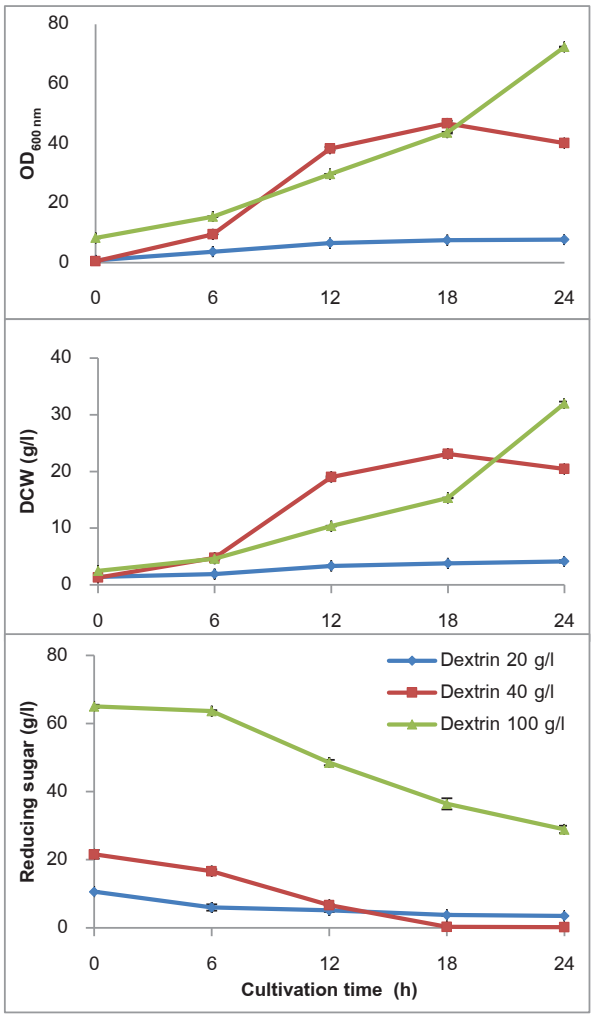

Figure 2. Growth, dry cell weight, and reducing sugar during cultivation of *Bacillus* sp. with dextrin at concentrations of 20, 40 and 100 g/l

อัตราการสร้างมวลเซลล์ (r_x) เท่ากับ 0.52 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และอัตราการใช้น้ำตาล (r_s) เท่ากับ 0.68 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ

ผลการศึกษาการใช้เดกซ์ทรินที่ความเข้มข้นสูงในการเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบกะในถังหมักขนาด 5 ลิตร

จากผลการศึกษาข้างบน แสดงให้เห็นชัดเจนว่าเดกซ์ทรินใช้เป็นแหล่งคาร์บอนที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด โดยดีกว่าการใช้น้ำตาลกลูโคสจากทั้งสองแหล่ง ดังนั้นจึงทำการศึกษาต่อมา เพื่อหาระดับความเข้มข้นที่สูงและเหมาะสมของเดกซ์ทรินต่อการเจริญของ *Bacillus* sp. โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารสูตร BPM ผสมเดกซ์ทรินที่ความเข้มข้น 20, 40 และ 100 กรัมต่อลิตร ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่ควบคุมสภาวะ พบว่าการใช้เดกซ์ทรินที่ความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ให้ผลการผลิตเซลล์ความเข้มข้นสูงได้ดีที่สุดและเป็นความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่มากที่สุดและมากกว่าความเข้มข้นของการเพาะเลี้ยงแบบกะโดยใช้น้ำตาลโดยทั่วไป ซึ่งแสดงให้เห็นว่า *Bacillus* sp. มีความสามารถในการใช้ทั้งน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากการสลายเด็กซ์ทรินก่อนแล้วและเดกซ์ทรินที่เหลือเป็นแหล่งคาร์บอนได้ดี โดยที่ 24 ชั่วโมง โดยให้ความเข้มข้นของน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 31.98 กรัมต่อลิตร ค่าการดูดกลืน 72.42 ถัดมาเป็นการใช้เดกซ์ทรินที่ความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร ซึ่งการเจริญสูงสุดที่ 18 ชั่วโมง ให้ความเข้มข้นของน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 23.10 กรัมต่อลิตร ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 46.75 ที่ความเข้มข้นของการใช้เดกซ์ทริน 40 กรัมต่อลิตร ช่วงก่อน 24 ชั่วโมง ให้ผลการเจริญดีกว่าที่ความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร เพราะช่วงแรกขอการเจริญ น้ำตาลที่ความเข้มข้นต่ำกว่าย่อมก่อให้เกิดความเครียดของเซลล์ (cell stress) น้อยกว่า ลำดับสุดท้ายเป็นการใช้เดกซ์ทรินความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ซึ่งให้ผลการเจริญสูงสุดที่ 24 ชั่วโมง ความเข้มข้นของน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 4.13 กรัมต่อลิตร ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 7.74 (Figure 2)

เมื่อคำนวณค่าตัวแปรทางจลนพลศาสตร์การเจริญของ *Bacillus* sp. (Table 2) พบว่าการเพาะเลี้ยงที่ใช้เดกซ์ทรินความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร มีประสิทธิภาพมากที่สุดโดยให้ค่าเข้มข้นมวลเซลล์ (x) เท่ากับ 31.98 กรัมต่อลิตร อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เท่ากับ 0.19 ต่อชั่วโมง สัมประสิทธิ์มวลเซลล์ต่อการใช้น้ำตาล ($Y_{x/s}$) เท่ากับ 0.45 กรัมต่อกรัม อัตราการผลิตมวลเซลล์ (r_x) เท่ากับ 1.33 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และอัตราการใช้น้ำตาล (r_s) เท่ากับ 2.96 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ลำดับถัดมาเป็นการใช้เดกซ์ทรินที่ระดับความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร ให้ค่าความเข้มข้นของมวลเซลล์ (x) เท่ากับ 23.10 กรัมต่อลิตร อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เท่ากับ 0.16 ต่อชั่วโมง สัมประสิทธิ์มวลเซลล์ต่อการใช้น้ำตาล ($Y_{x/s}$) เท่ากับ 0.58 กรัมต่อกรัม อัตราการผลิตมวลเซลล์ (r_x) เท่ากับ 1.29 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และอัตราการใช้น้ำตาล (r_s) เท่ากับ 2.21 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และลำดับสุดท้าย ได้แก่ การใช้เดกซ์ทรินความ

เข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ซึ่งให้ค่าความเข้มข้นของมวลเซลล์ (x) เท่ากับ 4.13 กรัมต่อลิตร อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เท่ากับ 0.04 ต่อชั่วโมง สัมประสิทธิ์มวลเซลล์ต่อการใช้น้ำตาล ($Y_{x/s}$) เท่ากับ 0.25 กรัมต่อกรัม อัตราการผลิตมวลเซลล์ (r_x) เท่ากับ 0.17 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และอัตราการใช้น้ำตาล (r_s) เท่ากับ 0.69 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ

ผลการศึกษาการขยายขนาดการเพาะเลี้ยงแบบกะในถังหมักขนาด 30 ลิตร

จากผลการศึกษาความเข้มข้นของเดกซ์ทรินที่มีประสิทธิภาพสูงสุดสำหรับการผลิตเซลล์ความเข้มข้นสูง ซึ่งพบว่าที่ระดับความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตเซลล์ความเข้มข้นสูงได้ดีที่สุดในถังหมักขนาด 5 ลิตร จากนั้นจึงนำสภาวะดังกล่าวมาขยายขนาดการผลิตที่ถังหมักขนาด 30 ลิตร ผลปรากฏชัดว่า *Bacillus* sp. มีการเจริญสูงสุดที่ 14 ชั่วโมง โดยให้ความเข้มข้นของน้ำหนักเซลล์แห้งสูงถึง 43.45 กรัมต่อลิตร ที่ค่าการดูดกลืนแสง 96.55 (Figure 3) ซึ่งเมื่อพิจารณาค่าตัวแปรทางจลนพลศาสตร์ของการเจริญ พบว่าค่าความเข้มข้นของมวลเซลล์ (x) เท่ากับ 43.45 กรัมต่อลิตร อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เท่ากับ 0.21 ต่อชั่วโมง ค่าสัมประสิทธิ์ของมวลเซลล์ต่อการใช้น้ำตาล ($Y_{x/s}$) เท่ากับ 0.85 กรัมต่อกรัม อัตราการผลิตมวลเซลล์ (r_x) เท่ากับ 3.11 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และอัตราการใช้น้ำตาล (r_s) เท่ากับ 3.63 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

ผลการศึกษาการขยายขนาดการเพาะเลี้ยงแบบกะในถังหมักขนาด 300 ลิตร

ผลจากการศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ระดับถังหมักขนาด 30 ลิตร ผลปรากฏชัดว่า ระบบนี้สามารถผลิตเซลล์ที่ความเข้มข้นสูงได้อย่างมีประสิทธิภาพ จากนั้นจึงได้ขยายขนาดการผลิตเพื่อศึกษาแนวทางและความเป็นไปได้สำหรับการผลิตเซลล์ที่ระดับอุตสาหกรรม โดยทำการศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์ในถังหมักขนาด 300 ลิตร ที่ควบคุมสภาวะ ผลจากการศึกษาปรากฏว่า เซลล์การเจริญสูงสุดที่ 12 ชั่วโมง ซึ่งถือว่าใช้เวลาสั้นมากเมื่อเทียบกับเวลาการเพาะเลี้ยงปกติที่ผ่านมา โดยให้ค่าความเข้มข้นของน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดถึง 47.03 กรัมต่อลิตร ที่ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 104.50 (Figure 4) และเมื่อพิจารณาค่าตัวแปรทางจลนพลศาสตร์ของการเจริญ พบว่า ให้ความเข้มข้นของมวลเซลล์ (x) เท่ากับ 47.03 กรัมต่อลิตร อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เท่ากับ 0.25 ต่อชั่วโมง สัมประสิทธิ์การผลิตมวลเซลล์ต่อการใช้น้ำตาล ($Y_{x/s}$) เท่ากับ 0.63 กรัมต่อกรัม อัตราการผลิตมวลเซลล์ (r_x) เท่ากับ 3.92 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (โดยยังไม่มีการพบจากรายงานการวิจัยอื่นที่ให้ค่าสูงกว่านี้มาก่อน) (ขวัญฤทัย มาลัยเรือง และเศรษฐวัชร ฉ่ำศาสตร์, 2557 ; ขวัญฤทัย มาลัยเรือง, 2561 ; Lee, 1996 ; Rosovitz *et al*., 1998 ; Gill and Kaur, 2004 ; Kunamneni and Singh, 2006 ; Shojaosadati *et al*., 2008 ; Kulpreecha *et al*., 2009 ; Zhu and Xu, 2010 ; Barros *et al*., 2013 ; Raul *et al*., 2014 ; Malairuang *et al*., 20) และอัตราการใช้น้ำตาล (r_s) เท่ากับ 6.26 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

วิจารณ์และสรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาการผลิตเซลล์ *Bacillus* sp. เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสูง ซึ่งวิธีการผลิตเซลล์ความเข้มข้นสูงนั้นจะต้องใช้อาหารสังเคราะห์ (defined medium) ที่ทราบองค์ประกอบและความเข้มข้นที่แน่นอน ซึ่งสามารถนำไปปรับปรุงดัดแปลงได้ง่ายเพื่อให้เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์แบคทีเรีย (Shojaosadati *et al*., 2008) โดยอาหารสูตร BPM ซึ่งเป็นอาหารพื้นฐานมีองค์ประกอบอย่างง่ายราคาถูกเหมาะสำหรับการผลิตเซลล์ในระดับอุตสาหกรรม (ขวัญฤทัย มาลัยเรือง และเศรษฐวัชร ฉ่ำศาสตร์, 2557 ; ขวัญฤทัย มาลัยเรือง, 2561) และได้รายงานการใช้เพื่อผลิตเซลล์ความเข้มข้นสูงทั้งในการเพาะเลี้ยง *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* และ *Aspergillus oryzae* ซึ่งประสบความสำเร็จอย่างสูง (ขวัญฤทัย มาลัยเรือง และเศรษฐวัชร ฉ่ำศาสตร์, 2557 ; ขวัญฤทัย มาลัยเรือง, 2561) ซึ่งเมื่อใช้อาหารสูตร BPM โดยมีเดกซ์ตรินจากการย่อยแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าให้ผลผลิตเซลล์สูงกว่าการใช้กลูโคสทางการค้า (Sigma-Aldrich) และกลูโคสจากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง ซึ่งให้ค่าความเข้มข้นของมวลเซลล์ 12.93 กรัมต่อลิตร และอัตราการผลิตมวลเซลล์ 0.72 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

การเลือกใช้แหล่งคาร์บอนนั้นเป็นปัจจัยสำคัญที่จะทำให้การผลิตเซลล์ความเข้มข้นสูงประสบความสำเร็จ จากการค้นพบนี้ชัดเจนว่า เดกซ์ทรินจากการย่อยแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีประสิทธิภาพสูงสุด เนื่องจากเดกซ์ทรินเป็นองค์ประกอบของกลูโคสหลายๆ โมเลกุล (ไม่เกิน 10 โมเลกุล) เรียงต่อกันเป็นสาย ทำให้การเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตเซลล์สามารถผลิตได้ในปริมาณที่สูง ซึ่งการเพาะเลี้ยงโดยทั่วไปนิยมใช้แหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลกลูโคส ซึ่งนอกจากจะมีราคาสูงแล้วยังมักก่อให้เกิดการคั่งของกลูโคสภายในเซลล์ ส่งผลให้ยับยั้งการเจริญของเซลล์เนื่องจากในสภาวะนี้เซลล์จะผลิตอะซีเตทหรือ เอทานอลออกมา (Crebtree effect) (Kanjanachumpol *et al*., 2013 ; Kulpreecha *et al*., 2009): ซึ่งจะเป็นพิษต่อเซลล์มีผลให้ยับยั้งการเจริญ แต่การใช้เดกซ์ทรินเป็นแหล่งคาร์บอน เดกซ์ทรินจะค่อยๆ ทยอยถูกย่อยให้เป็นกลูโคสโมเลกุลเดียวๆ แล้วค่อยๆ ลำเลียงเข้าเซลล์เพื่อไปใช้เพื่อการเจริญได้เรื่อยๆ อย่างต่อเนื่อง เสมือนหนึ่งว่าเป็นการทำการเพาะเลี้ยงแบบ fed-batch ที่ระดับเซลล์ (Fed-Batch at Cell Level, FBC)

Table 1. Calculated growth kinetic parameters of *Bacillus* sp. Cultivations in BPM medium with different carbon sources

Carbon sources	x (g/l)	μ (h^{-1})	$Y_{x/s}$ (g/g)	r_x (g/l/h)	r_s (g/l/h)
Commercial glucose	5.13 ± 0.50[b]	0.15 ± 0.02[a]	0.45 ± 0.05[b]	0.57 ± 0.06[b]	0.94 ± 0.05[a]
Glucose hydrolysate	4.70 ± 0.27[b]	0.05 ± 0.01[b]	0.29 ± 0.05[c]	0.52 ± 0.03[b]	0.68 ± 0.02[b]
Dextrin	12.93 ± 0.40[a]	0.18 ± 0.03[a]	0.57 ± 0.04[a]	0.72 ± 0.03[a]	0.99 ± 0.00[a]

Statistic comparisons of those mean values within their own columns (among treatments of cultivation conditions) at *p*-values of ≤0.05 show different characters, a, b, and c, which mean statically significant differences.

Table 2. Calculated growth kinetic parameters of *Bacillus* sp. Cultivations in BPM medium with dextrin at concentrations of 20, 40, and 100 g/l in 5-L fermenters, and 100 g/l of dextrin in 30-L and 300-L fermenters

Dextrin concentrations (g/l)	Fermenter volumes (L)	x (g/l)	μ (h^{-1})	$Y_{x/s}$ (g/g)	r_x (g/l/h)	r_s (g/l/h)
20	5	4.13 ± 0.21[e]	0.04 ± 0.01[d]	0.25 ± 0.01[d]	0.17 ± 0.01[d]	0.69 ± 0.00[e]
40	5	23.10 ± 0.36[d]	0.16 ± 0.01[c]	0.58 ± 0.01[b]	1.29 ± 0.02[c]	2.21 ± 0.00[d]
100	5	31.98 ± 0.34[c]	0.19 ± 0.00[b]	0.45 ± 0.01[c]	1.33 ± 0.02[c]	2.96 ± 0.04[c]
100	30	43.45 ± 0.07[b]	0.21 ± 0.00[b]	0.62 ± 0.00[a]	3.11 ± 0.02[b]	3.63 ± 0.03[b]
100	300	47.03 ± 0.15[a]	0.25 ± 0.01[a]	0.63 ± 0.00[a]	3.92 ± 0.01[a]	6.26 ± 0.03[a]

Statistic comparisons of those mean values within their own columns (among treatments of cultivation conditions) at *p*-values of ≤0.05 show different characters, a, b, c, d, and e, which mean statically significant differences.

Note x : Cell biomass concentration (g/l)
μ : Specific growth rate (h^{-1})
$Y_{x/s}$: Yield coefficient of cell biomass per unit of carbon source substrate (g/g)
r_x : Production rate of cell biomass or cell biomass productivity (g/l/h)
r_s : Rate of carbon source substrate utilization (g/l/h)

เนื่องจากในสภาวะนี้เซลล์จะผลิตอะซีเตทหรือเอทานอลออกมา (Crebtree effect) (ขวัญฤทัย มาลัยเรือง และเศรษฐวัชร ฉ่ำศาสตร์, 2557 ; ขวัญฤทัย มาลัยเรือง, 2561) ซึ่งจะเป็นพิษต่อเซลล์มีผลให้ยับยั้งการเจริญ แต่การใช้เดกซ์ทรินเป็นแหล่งคาร์บอน เดกซ์ทรินจะค่อยๆ ทยอยถูกย่อยให้เป็นกลูโคสโมเลกุลเดียวๆ แล้วค่อยๆ ลำเลียงเข้าเซลล์เพื่อไปใช้เพื่อการเจริญได้เรื่อยๆ อย่างต่อเนื่อง เสมือนหนึ่งว่าเป็นการทำการเพาะเลี้ยงแบบ fed-batch ที่ระดับเซลล์ (Fed-Batch at Cell Level, FBC) (ขวัญฤทัย มาลัยเรือง, 2561)

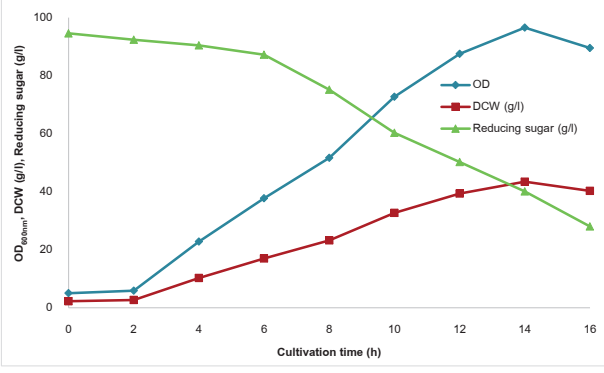

Figure 3. Growth, dry cell weight and reducing sugar during Cultivation of *Bacillus* sp. in BPM medium with 100 g/l of dextrin in 30-L fermenter

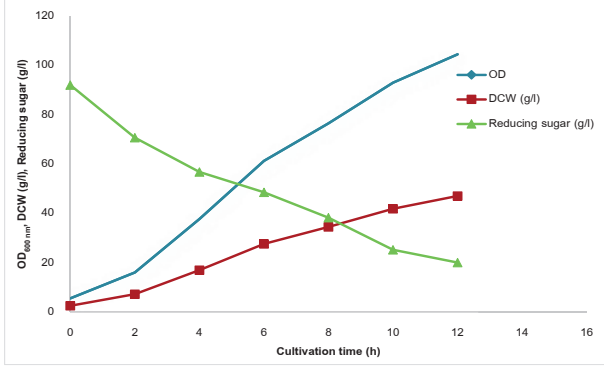

Figure 4. Optical density, dry cell weight and reducing sugar during cultivation of *Bacillus* sp. in BPM medium with 100 g/l of dextrin in 300-L fermenter

ซึ่งแสดงให้เห็นชัดเจนว่า *Bacillus* sp. มีความสามารถในการใช้เดกซ์ทรินเป็นแหล่งของคาร์บอนที่ความเข้มข้นสูงมากได้ในการเพาะเลี้ยงแบบกะที่ให้อากาศ ซึ่งโดยทั่วไปการใช้แหล่งคาร์บอนในรูปของน้ำตาล เช่น กลูโคส และซูโครส สำหรับการเพาะเลี้ยงแบบกะที่ให้อากาศ แบคทีเรียหรือจุลินทรีย์อื่นจะสามารถใช้น้ำตาลได้ที่เข้มข้นไม่เกิน 30–50 กรัมต่อลิตร เช่น การเพาะเลี้ยง *E. coil* สามารถใช้กลูโคสความเข้มข้นมากที่สุดเพียงได้ 50 กรัมต่อลิตร ซึ่งจะเกิดการยับยั้งการเจริญของเซลล์แล้ว (Raul *et al*., 2014) แต่วิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ในงานวิจัยนี้สามารถทำให้แบคทีเรีย *Bacillus* sp. ใช้แหล่งคาร์บอนราคาถูกซึ่งเป็นเดกซ์ทรินที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นสูงถึง 100 กรัมต่อลิตร เหตุผล คือ *Bacillus* sp. เป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ได้หลายชนิด เช่น อะไมเลส (Raul *et al*., 2014) กลูโคสอะไมเลส (Gill and Kaur, 2004) พลูลูลาเนส (Kunamneni and Singh, 2006) รวมไปถึงโปรติเอส และไลเพส (Barros *et al*., 2013) ซึ่งเอนไซม์สามชนิดแรกมีความสามารถย่อยเดกซ์ทรินให้เป็นกลูโคสได้ดี ซึ่งจะค่อยๆ ย่อยให้เป็นกลูโคสพร้อมกับการเจริญที่เพิ่มขึ้น และค่อยๆ ลำเลียงกลูโคสเข้าเซลล์ ซึ่งสามารถลดปัญหาการคั่งของกลูโคสภายในเซลล์ได้ และเรียกการย่อยเดกซ์ทรินเป็นกลูโคส และค่อยๆ นำกลูโคสเข้าเซลล์ว่า “การเพาะเลี้ยงแบบเฟดแบตช์ในระดับเซลล์ (FBC)” (Malairuang *et al*., 2020) ทำให้แบคทีเรียสามารถเจริญได้ดีและผลิตเซลล์ความเข้มข้นสูงเป็นสัดส่วนสัมพันธ์กับความเข้มข้นที่สูงของแหล่งคาร์บอนเดกซ์ทรินที่ใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพได้ เห็นชัดได้จากค่าสัมประสิทธิ์การผลิตมวลเซลล์ต่อการใช้น้ำตาล ($Y_{x/s}$) ที่สูงมากกว่า 0.5 กรัมต่อกรัม โดยร่วมกับการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์แบบให้อากาศและใช้อาหาร BPM ราคาถูก ซึ่งมีข้อดี คือเป็นเทคนิคที่ง่ายไม่ซับซ้อน ระบบควบคุมง่าย ใช้ระยะเวลาสั้น ลดการปนเปื้อน และที่สำคัญคือลดแรงงานและต้นทุนการผลิต ซึ่งเมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยง *B. subtilis* ที่ใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบเฟดแบตช์ (Fed-batch) ซึ่งใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสที่ความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ในถังหมักขนาด 7 ลิตร สามารถผลิตเซลล์ได้ความเข้มข้นเพียง 9.46 กรัมต่อลิตร ใช้เวลาการเพาะเลี้ยง 120 ชั่วโมง โดยคิดเป็นอัตราการผลิตมวลเซลล์เท่ากับ 0.079 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (Zhu and Xu, 2010) เมื่อเทียบกับผลงานวิจัยที่ดีที่สุดในครั้งนี้ที่ให้ค่าให้ความเข้มข้นของมวลเซลล์สูงถึง 47.03 กรัมต่อลิตร (มากกว่า 5 เท่า) และ อัตราการผลิตมวลเซลล์สูงมากถึง 3.92 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (มากกว่า 50.25 เท่า) งานวิจัยนี้บ่งบอกถึงศักยภาพและความเป็นไปได้สำหรับการขยายขนาดการผลิตขึ้นสู่ระดับอุตสาหกรรม

เห็นได้ว่าแม้การเพาะเลี้ยงแบบเฟดแบตช์จะสามารถใช้แหล่งคาร์บอนที่มีความเข้มข้นสูงได้ แต่มีข้อเสียที่สำคัญคือใช้ระยะเวลายาวนานและข้อเสียอีกหลายประการที่ได้กล่าวแล้วข้างต้น แต่การเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ด้วยวิธีการปกติที่ใช้อยู่กันทั่วไปก็ไม่สามารถใช้แหล่งคาร์บอนในรูปของน้ำตาลเข้มสูงได้ ทำให้ไม่สามารถผลิตเซลล์ที่ความเข้มข้นสูงได้ เช่น การเพาะเลี้ยง *B. megaterium* แบบกะโดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้น 25 กรัมต่อลิตร ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ให้ผลผลิตมวลเซลล์เพียง 8.24 กรัมต่อลิตร ที่ อัตราการผลิตมวลเซลล์ 0.68 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ที่เวลาเพาะเลี้ยง 12 ชั่วโมง (Kulpreecha *et al*., 2009) เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองกับผลของงานวิจัยนี้ แสดงให้เห็นชัดเจนว่า การเพาะเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียสกุล *Bacillus* sp. สามารถใช้เดกซ์ทรินเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นสูงได้ ส่งผลให้ได้ผลผลิตมวลเซลล์ที่ความเข้มข้นสูงกว่างานวิจัยอื่นๆ ที่อัตราการผลิตสูงกว่ามาก ในกรณีจุลินทรีย์ที่ไม่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งมันสำปะหลังนั้นจึงต้องมีการเติมเอนไซม์เพื่อให้กระบวนการย่อยเดกซ์ทรินให้เป็นกลูโคสและนำกลูโคสมาใช้ได้ เช่น รายงานวิจัยการผลิตเซลล์ยีสต์ *Kluyveromyces marxianus* SS106 ที่มีการผลิตเซลล์ให้มีความเข้มข้นสูงเพื่อนำไปเป็นหัวเชื้อในการผลิตเอทานอล ซึ่งโดยทั่วไปแล้วยีสต์ไม่สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้ ดังนั้นจึงมีการเติมเอนไซม์ชนิดนี้ลงไปด้วยในการเพาะเลี้ยงเพื่อให้เดกซ์ทรินถูกย่อยเป็นกลูโคสและยีสต์สามารถนำไปใช้ในการเจริญต่อไปได้ (Malairuang *et al*., 2020a) และ *S. cerevisiae* โดยระหว่างการเพาะเลี้ยงได้มีการเติมเอนไซม์ช่วยย่อยร่วมกับการเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญและสร้างผลิตภัณฑ์ได้อีกด้วย (Shi *et al*., 2019)

เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมจากวิธีการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ต่อมาจึงทำการศึกษาขยายขนาดการผลิตในระดับถึงหมักขนาด 30 ลิตร ผลการทดลองปรากฏว่า ให้ผลผลิตความเข้มข้นของน้ำหนักเซลล์แห้ง 43.45 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการผลิตมวลเซลล์ 3.11 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตรที่ผ่านมา พบว่าการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 30 ลิตร มีประสิทธิภาพสูงกว่า เนื่องจากมีระบบการกวนผสมที่ดีส่งผลให้มีปริมาณออกซิเจนที่เพียงพอและยังลดการรวมกลุ่มของเซลล์ที่ส่งผลให้เกิดตะกอน ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตเซลล์ความเข้มข้นสูงได้ เมื่อเปรียบเทียบกับรายการวิจัยที่เพาะเลี้ยงในถังหมักระดับใกล้เคียงกัน พบว่า การเพาะเลี้ยง *B. megaterium* ในถังหมักขนาด 10 ลิตร ใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร ใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบกะ สามารถผลิตเซลล์ได้ในปริมาณ 32.48 กรัมต่อลิตร ใช้เวลาการเพาะเลี้ยง 12 ชั่วโมง ผลผลิตมวลเซลล์

ที่ได้เท่ากับ 2.71 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (Kanjanachumpol *et al.,* 2013) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบแล้ว การศึกษาครั้งนี้ถือว่ามีประสิทธิภาพสูงกว่า ดังนั้นในงานวิจัยนี้ จึงทำการศึกษาการขยายขนาดการผลิตในที่ระดับโรงงานต้นแบบที่ใหญ่ขึ้น เพื่อศึกษาความเป็นไปได้สำหรับการขยายขนาดการผลิตขึ้นสู่ระดับอุตสาหกรรม โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ *Bacillus* sp. ในถังหมักขนาด 300 ลิตร ผลการทดลองปรากฏว่า ให้ความเข้มมวลเซลล์สูงถึง 47.03 กรัมต่อลิตร และอัตราการผลิตมวลเซลล์สูงสุดถึง 3.92 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงในเวลาเพียง 12 ชั่วโมง ซึ่งให้ผลดีที่สุดเมื่อเทียบกับผลงานวิจัยอื่นๆ ทั้งหมดดังที่กล่าวแล้ว

จากผลงานวิจัยนี้ สรุปได้ว่า การเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. แบบแบตช์และให้อากาศ โดยการใช้อาหารสูตร BPM ที่เป็นอาหารทราบองค์ประกอบแน่นอน (defined medium) สูตรอย่างง่ายราคาถูก โดยการใช้เดกซ์ทรินที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบที่ความเข้มข้นสูง เพื่อผลิตมวลเซลล์ให้ได้ความเข้มข้นสูงประสบความสำเร็จอย่างดีเยี่ยมและมีประสิทธิภาพสามารถพัฒนาการผลิตเซลล์แบคทีเรียความเข้มข้นสูงขึ้นสู่ระดับอุตสาหกรรมได้

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยนี้ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการวิศวกรรมชีวภาพและโรงงานต้นแบบทางวิศวกรรมทางชีวภาพ และภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่อนุเคราะห์สถานที่ห้องปฏิบัติการ และตลอดจนอำนวยความสะดวกในการวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

ขวัญฤทัย มาลัยเรือง และเศรษฐวัชร ฉ่ำศาสตร์. (2557). การเพาะเลี้ยงเซลล์ความเข้มข้นสูงด้วยการเพาะเลี้ยงแบบหลายกะเป็นลำดับต่อเนื่อง. ใน บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น (บ.ก.), *การประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา ครั้งที่15 (*น. 793-797). มหาวิทยาลัยขอ่น.

ขวัญฤทัย มาลัยเรือง. (2561). *การผลิตเซลล์ความเข้มข้นสูงด้วยการเพาะเลี้ยงแบบกะโดยใช้แหล่งคาร์บอนความเข้มข้นสูง*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร มหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยบูรพา. ชลบุรี:มหาวิทยาลัรพา.

เสาวนีย์ ธรรมสถิติ. (2547). *แบคทีเรียทางเทคโนโลยีชีวภาพ: เซลล์และผลิตภัณฑ์ของเซลล์*. นครปฐม: โรงพิมพ์สถาบันพัฒนาสาธารณสุขอาเซี่ยน มหาวิทยาลัยมหิดล.

Barros, F.F., Simiqueli, A.P., de Andrade, C.J., & Pastore, G.M. (2013). Production of Enzymes from Agroindustrial Wastes by Biosurfactant-Producing Strains of *Bacillus subtilis*. *Biotechnology Research International*, 2013, 103960. DOI: 10.1155/2013/960

Gill, R.K., & Kaur, J. A. (2004). thermostable glucoamylase from a thermophilic *Bacillus* sp.: characterization and thermostability. *Journal of Industrial and Microbiology and Biotechnology*, *31*(11), 540-543. DOI: 10.1007/s10295-004-5-y

Kanjanachumpol, P., Kulpreecha, S., Tolieng, V., & Thongchul, N. (2013). Enhancing polyhydroxybutyrate production from high cell density fed-batch fermentation of *Bacillus megaterium* BA-019. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, *36*(10), 1463-1474. DOI: 10.1007/s00449-013-5-7

Kulpreecha, S., Boonruangthavorn, A., Meksiriporn, B., & Thongchul, N. (2009). Inexpensive fed-batch cultivation for high poly(3-hydroxybutyrate) production by a new isolate of *Bacillus megaterium*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *107*(3), 240-245. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2008..006

Kunamneni, A., & Singh, S. (2006). Improved high thermalstability of pullulanase from a newly isolated thermophilic *Bacillus* sp. AN-7. *Enzyme and Microbial Technology*, *39*, 1399-1404. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.023

Lee, S.Y. (1996). High-cell-density culture of *Escherichia coli*. *Trends in Biotechnology*, *14*(3), 98-105. DOI:10.1016/0167-7799(96)809

Malairuang, K., Krajang, M., Sukna, J., & Chamsart, S. (2020). High-Cell-Density Cultivation of *Saccharomyces cerevisiae* with Intensive Multiple Sequential Batches Together with a New Technique of Fed-Batch at Cell Level. *Processes*, 8(10), 1321. https://doi.org/10.3390/pr821

Malairuang, K., Krajang, M., Rotsattarat, R., & Chamsart, S. (2020a). Intensive Multiple Sequential Batch Simultaneous Saccharification and Cultivation of *Kluyveromyces marxianus* SS106 Thermotolerant Yeast Strain for Single-Step Ethanol Fermentation from Raw Cassava Starch. *Processes*, 8, 898. https://doi.org/10.3390/pr898

Raul, D., Biswas, T., Mukhopadhyay, S., Kumar Das, S., & Gupta, S. (2014). Production and partial purification of alpha amylase from *Bacillus subtilis* (MTCC121) using solid state fermentation. *Biochemistry Research International*, 2014, 1-5. https://doi.org/10.1155/2014/41

Rosovitz, M.J., Voskuil, M.I., & Chambliss, G.H. (1998). *Bacillus*. Topley and Wilson's Microbiology and microbial infections.9th ed. *In*: *Collier J, Balows A, Sussman M, editors*. London: Edward Arnold, p. 79.

Shi, X., Liu, Y., Dai, J., Liu, X., Dou, S., Teng, L., Meng, Q., Lu, J., Ren, X., & Wang, R. A. (2019). novel integrated process of high cell-density culture combined with simultaneous saccharification and fermentation for ethanol production. *Biomass and Bioenergy*, 121,115-121. DOI:10.1016/j. biombioe.2018.10

Shojaosadati, S.A., Kolaei, S.M.V., Babaeipour, V., & Farnoud, A.M. (2008). Recent advances in Hgh cell density cultivation for production of recombinant protein. *Iranian Journal of Bioteno*, *200 ; 6*(2), 5.

Zhu, B.F., & Xu, Y. (2010). Producion of tetramethyl-pyrazine by batch culture of *Bacillus subtilis*with optimal pH control strategy. *Journal Industrial Microbiology and Biotech* . 201037(8),:815-821. DOI:10.1007/s10295-010-15-121.