การเพาะเลี้ยงเซลล์ความหนาแน่นสูงโดยกระบวนการหมักแบบเฟ็ด-แบตช์

High cell density cultures by fed-batch fermentation

กัลทิมา พิชัย

Kaltima Phichai

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

Department of Biology, Faculty of Science and Technology

E-mail: kaltima@cmru.ac.th

บทคัดย่อ

การเพาะเลี้ยงเซลล์ความหนาแน่นสูงมีบทบาทในการผลิตเซลล์จุลินทรีย์บนพื้นฐานของความประหยัดและคุ้มค่า ปัจจุบันเซลล์ความหนาแน่นสูงจะได้จากแบคทีเรีย *Escherichia coli* เป็นส่วนมาก แต่ไม่ได้หมายความว่าเซลล์ชนิดอื่นจะไม่สามารถเพาะเลี้ยงให้ได้เซลล์ความหนาแน่นสูง ทั้งนี้กระบวนการที่เข้ามามีบทบาทในการเพาะเลี้ยงเซลล์ความหนาแน่นสูงคือกระบวนการหมัก โดยเฉพาะการหมักแบบเฟ็ด-แบตช์ บทความนี้จึงนำเสนอกระบวนการหมักแบบเฟ็ด-แบตช์ เพื่อที่จะเพิ่มผลผลิตด้วยการเพิ่มความหนาแน่นของเซลล์และ/หรือผลผลิตจำเพาะ

คำสำคัญ: การเพาะเลี้ยงเซลล์ความหนาแน่นสูง การหมักแบบเฟ็ด-แบตช์ *Escherichia coli*

Abstract

High cell density cultures offer an efficient means for the economical and valuable production of microorganisms. Most high cell density cultures are associated with *Escherichia coli*. However, other microorganisms have the potential to be grown at high density and need further investigation. This review focuses on fed-batch culture associated with high cell density cultures and increasing productivity via increasing cell density and/or specific productivity.

Keywords: High cell density cultures, Fed-batch fermentation, *Escherichia coli*

บทนำ

การเพาะเลี้ยงเซลล์ความหนาแน่นสูง (High cell density culture) เป็นวิธีการที่จะทำให้ได้มวลเซลล์ปริมาณมากในเวลาที่แน่นอน เนื่องจากมีการรายงานว่าหากเพาะเลี้ยงเซลล์ได้มวลเซลล์มากก็จะได้ผลิตภัณฑ์ความหนาแน่นสูงตามมา (Shojaosadati, Kolaei, Babaeipour, & Farnoud, 2008) อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าเซลล์ที่ได้ปริมาณมากก็ไม่ได้หมายความว่าจะเป็นตัวแทนของเซลล์ความหนาแน่นสูงเสมอไป เนื่องจากมีรายงานว่า แม้จะได้ปริมาณเซลล์เพียง 50 กรัมต่อลิตร (Shokri & Larsson, 2004) หรือแม้แต่ได้เซลล์เพียง 20 กรัมต่อลิตร ก็ยังถือว่าเป็นเซลล์ความหนาแน่นสูงได้เช่นกัน (Rozkov, 2001)

ปัจจุบันเซลล์ความหนาแน่นสูงในการค้าจะได้จากแบคทีเรีย *E.coli* ซึ่งส่วนมากจะเป็นการผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนต์ (Recombinant protein) ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้นี้ ถือว่ามีคุณสมบัติเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีปริมาตรน้อยคุณค่ามาก (Low-volume-high-value) (Riesenberg,1991) ยิ่งไปกว่านั้น ยังใช้ *E. coli* เป็นฐานของการผลิตผลิตภัณฑ์อย่างอื่นด้วย เช่น การผลิตพอลิไฮดรอกซี-บิวทิเรต กรดซัคซินิก กรดออกทาโนอิก สารประกอบอะโรมาติก แอลกอฮอล์ อะซีโตน และอื่น ๆ (Lee, 1996)

ผลิตภัณฑ์ปริมาณน้อยคุณค่ามากจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ความหนาแน่นสูง มีส่วนช่วยในการลดค่าใช้จ่ายในการลงทุนและการดำเนินงานเพื่อให้ได้หลักเกณฑ์และวิธีการที่ดีของการผลิต (Good Manufacturing Practice; GMP) การลดค่าใช้จ่ายของต้นทุนการผลิตส่วนนี้จะเป็นการลดขนาดของเครื่องมือในกระบวนการหมัก เครื่องมือสำหรับการเก็บเกี่ยวผลผลิต ไม่ว่าจะเป็น ลดการใช้น้ำบริสุทธิ์สำหรับล้างเครื่องมือ นึ่งอาหาร หรือเตรียมอาหาร ลดการใช้อากาศที่เป็นออกซิเจนบริสุทธิ์ ลดการใช้ห้องปฏิบัติการ ลดขนาดของกระบวนการเก็บเกี่ยวผลผลิต เช่น การปั่นเหวี่ยง เครื่องกรอง เครื่องมือการทำให้บริสุทธ์ ล้วนแต่ถูกลดขนาดและลดความถี่ในการใช้ ดังนั้น การผลิตเซลล์ความหนาแน่นสูงจึงเป็นวัตถุประสงค์หลักของกระบวนการที่อยู่บนฐานของการใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์

การศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์ความหนาแน่นสูง เริ่มทำกับยีสต์ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว เอทานอล และชีวมวล ซึ่งเน้นตัวเซลล์ให้มีปริมาณมาก เพื่อประโยชน์ในการผลิตผลิตภัณฑ์นั้น ๆ ต่อมา ได้มีการศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์ความหนาแน่นสูงกับแบคทีเรีย โดยเฉพาะ *Escherichia coli* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีข้อมูลพื้นฐานหลายด้านรองรับ ไม่ว่าจะเป็นทางด้านสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา รวมทั้งข้อมูลทางด้านพันธุกรรมระดับโมเลกุล จึงเป็นเหตุให้แบคทีเรียตัวนี้ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวาง

ในช่วงแรก ๆ ของการศึกษาการผลิตเซลล์ความหนาแน่นสูงของ *E. coli* มีทั้งการศึกษาถึงข้อจำกัดของการเจริญของแบคทีเรียนี้ในอาหารเหลว (Hestrin, Avineri-Shapiro, & Aschner, 1943; Gorelick, Mead, & Kelly, 1951; Vinet & Fredette, 1951; Tyrell, Mac Donald, &

Gerhardt, 1957; Gerhardt & Gallup, 1963) และการศึกษาทางชีวเคมีเพื่อให้ได้ปริมาณเซลล์ในช่วงการเจริญของแบคทีเรียขั้นการเจริญอย่างรวดเร็ว (exponential phase) (Bauer & Shiloach, 1974; Bauer & Ziv, 1976) ในช่วงปี ค.ศ. 1980 เมื่อมีข้อมูลเกี่ยวกับพันธุศาสตร์และสรีรวิทยาของแบคทีเรียมากขึ้น *E. coli* จึงถูกนำมาศึกษากันอย่างมากเพื่อผลิตโปรตีน (Lee, 1996) และเทคนิคต่าง ๆ ก็ถูกนำมาใช้เพื่อให้ได้เซลล์ความหนาแน่นสูงของจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ด้วย การผลิตเซลล์ความหนาแน่นสูง สามารถทำได้ทั้งในแบคทีเรีย (Shiloach & Fass, 2005) สาหร่าย (Chen, 1996; Wu & Shi, 2007) ยีสต์ (Li, Zhao, & Bai, 2007) รา (El-Rahim, Mostafa,b & Moawada, 2016) ตารางที่ 1 แสดงการเพาะเลี้ยงเซลล์ความหนาแน่นสูงของเซลล์ชนิดต่าง ๆ

ตารางที่ 1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ความหนาแน่นสูงของเซลล์ชนิดต่าง ๆ

ชนิดของเซลล์	แหล่งอ้างอิง
แบคทีเรีย	
Bacillus subtilis	Vuolanto, von Weymarn, Kerovuo, Ojamo, & Leisola, 2001
Lactobacillus plantarum	Barreto, Melo, Moreira, & Carrondo, 1991
Lactobacillus rhamnosus	Li, Lu, Zhao, Xiao, & Tan, 2010
Methylobacterium extorquens	Bélanger et al., 2004
Pseudomonas putida	Lee, Wong, Choi, Lee, Lee, & Han, 2000
Ralstonia eutropha	Srinivasan, Barnard, & Gerngross, 2003
ยีสต์	
Hansenula polymorpha	Moon et al., 2004
Kluyveromyces marxianus	Hensing, Vrouwenvelder, Hellinga, Baartmans, & van Dijken, 1994
Pichia pastoris	Daly, & Hearn, 2005
Saccharomyces cerevisiae	Shang, Wen, Wang, & Tan, 2006
Trigonopsis variabilis	Kim, Lee, Kim, & Oh, 1997
เชื้อรา	
Aspergillus tubigenesis	El-Rahim, Mostafa,b & Moawada, 2016
Penicillium chrysogenum	Goldrick. Ştefan, Lovett, Montague, & Lennox, 2015
เซลล์แมลง	
Spodoptera frugiperda	Elias, Zeiser, Bedard, & Kamen, 2000
เซลล์สัตว์	
Chinese hamster ovary cells	Lim et al., 2006

ไดอะตอม	
Nitzschia laevis	Wen, Jiang, & Chen, 2002
โพรโทซัว	
Colpidium campylum	Scheidgen-Kleyboldt, Kuchta, & Kiy, 2003
Tetrahymena thermophila	Kiy, & Tiedtke, 1992
เซลล์พืช	
Panax notoginseng	Zhong, Chen, Hu, 1999
สาหร่าย	
Galdieria sulphuraria	Schmidt, Wiebe, & Eriksen, 2005

จากตารางที่ 1 จะเห็นว่า เซลล์ความหนาแน่นสูงสามารถทำได้กับเซลล์ทุกชนิด แต่ส่วนมากแล้วจะทำกับจุลินทรีย์เป็นส่วนใหญ่ และอาศัยกระบวนการหมักเป็นพื้นฐาน ดังนั้นในบทความนี้จะได้กล่าวถึงหลักการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์บนพื้นฐานของกระบวนการหมักแบบเฟ็ด-แบตช์

กระบวนการหมัก

กระบวนการหมัก เกิดขึ้นเมื่อมีวัตถุดิบ ซับสเตรต จุลินทรีย์รวมทั้งสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม โดยมีการปล่อยให้จุลินทรีย์เจริญโดยใช้ซับสเตรต หรือทำปฏิกิริยากับซับสเตรตภายใต้สภาวะที่ควบคุม ภายในระยะที่กำหนด ก็จะได้ผลผลิตออกมา กระบวนการหมักขนาดเล็กแบบธรรมดามักไม่มีปัญหา แต่ถ้าหากกระบวนการหมักมีขนาดใหญ่ขึ้น ซับซ้อนมากขึ้น ปัญหาก็จะมีมากขึ้น จึงต้องมีการพัฒนากระบวนการหมักรวมทั้งเครื่องมือที่ใช้ในการหมักอยู่ตลอดเวลา ในช่วงแรก มีการแบ่งการหมักเป็น 3 แบบ โดยอาศัยความสัมพันธ์ของการใช้ซับสเตรต และการสร้างผลผลิตของจุลินทรีย์เป็นเกณฑ์

แบบแรกเป็นการสร้างผลผลิตที่เกิดโดยตรงกับการใช้แหล่งคาร์โบไฮเดรต เช่น การผลิตเอทานอล กรดกลูโคนิก และ กรดแลกติก เป็นต้น แบบที่สอง เป็นการสร้างผลผลิตที่เกิดโดยทางอ้อมกับการใช้แหล่งคาร์โบไฮเดรต เช่น การสร้างกรดซิตริก กรดอิทาโคนิก และกรดอะมิโนบางชนิด และแบบสุดท้ายเป็นการสร้างผลผลิตที่ไม่เกี่ยวข้องกับการใช้แหล่งคาร์โบไฮเดรต เช่น การสังเคราะห์สารปฏิชีวนะ เป็นต้น และต่อมาได้มีการเสนอรูปแบบการหมักหลากหลายแบบขึ้นตามเกณฑ์ที่ใช้

รูปแบบการหมัก

ในการหมักจะต้องอาศัยระบบถังหมัก ที่เหมาะสมต่อกระบวนการหมักแต่ละชนิด ระบบการหมักจะมีสองชนิดด้วยกัน ชนิดแรกจะเป็นกระบวนการหมักที่ไม่จำเป็นจะต้องทำให้ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์อื่น นอกเหนือจากจุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการหมัก กระบวนการหมักชนิดนี้ใช้กับการ

ผลิตเบียร์ และการผลิตยีสต์ขนมปัง ส่วนระบบการหมักชนิดที่สอง จำเป็นจะต้องทำให้ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ใด ๆ ที่ไม่ใช่จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการหมัก ใช้ในการผลิตสารประกอบต่าง ๆ เช่น ยาปฏิชีวนะ วัคซีน กรดอะมิโน พอลิแซ็กคาไรด์ และโปรตีนเซลล์เดียว นอกจากนี้ ระบบการหมักยังแบ่งได้ตามรูปแบบการหมักเป็นสามประเภท คือ แบบแรกเป็นการหมักแบบแบตช์ (Batch fermentation) ซึ่งอาจจะทำได้ทั้งในฟลาสก์หรือในถังหมัก แบบที่สองเป็นการหมักแบบต่อเนื่อง (continuous fermentation) และแบบสุดท้ายเป็นการหมักแบบเฟ็ด-แบตช์ (Fed-batch fermentation) (Yamane & Shimizu, 1984; Yee & Blanch, 1992) ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างการหมักจะมีสองแบบด้วยกัน คือ กระบวนการหมักที่ใช้ออกซิเจนและไม่ใช้ออกซิเจน อาหารเพาะเลี้ยงที่ใช้ในกระบวนการหมักอาจเป็นได้ทั้งอาหารแข็งและอาหารเหลว และสามารถเลี้ยงเซลล์ในอาหารเหลวแบบที่ไม่มีการกวนเพื่อให้อากาศ (Static culture) หรือแบบที่มีการกวนให้อากาศ (submerged culture) ซึ่งไม่ว่าจะเป็นกระบวนการหมักแบบใดก็ตาม จุดประสงค์ของกระบวนการหมักในอุตสาหกรรมก็คือ ผลผลิตที่ได้ในปริมาณมากภายใต้สภาวะที่มีการควบคุม ซึ่งจำเป็นต้องมีองค์ประกอบอย่างอื่นมาเกี่ยวข้องอีกด้วย เช่น อาหารที่ใช้เลี้ยง การทำเชื้อให้บริสุทธิ์เพื่อทำเป็นเชื้อเริ่มต้น การฆ่าเชื้ออาหาร และอุปกรณ์อื่น ๆ การเจริญของเชื้อระหว่างการหมัก รวมถึงการสกัดและแยกสารที่ได้จากกระบวนการหมัก (Stanbury, Whitaker, & Hall, 2017)

การหมักแบบเฟ็ด-แบตช์

การหมักในอาหารเหลวแบบเฟ็ด-แบตช์นี้ ดัดแปลงมาจากการหมักในอาหารเหลวแบบแบตช์ เป็นการหมักที่มีการเติมวัตถุดิบและสารอาหารลงไปในถังหมักเป็นระยะ ๆ โดยไม่มีการถ่ายเทอาหารเก่าออกจากถังหมัก การหมักแบบนี้ก็ยังคงเป็นระบบปิดเช่นเดียวกับการหมักแบบแบตช์ เนื่องจากไม่มีการไหลออกของอาหารอย่างต่อเนื่อง ผลผลิตที่ได้จากการหมักแบบนี้จะดีกว่าการหมักแบบแบตช์ การหมักแบบนี้จะใช้ในอุตสาหกรรม เช่น การผลิตยีสต์ขนมปัง โปรตีน พอลิเมอร์อื่น ๆ และการผลิตยาปฏิชีวนะเพนิซิลลิน (Yoshida, Yamane, & Nakamoto, 1973) ระบบการหมักแบบนี้ได้รับการยอมรับว่ามีประสิทธิภาพ เนื่องจากสามารถให้ความเจือจางที่ต่ำ เติมในถังหมัก เมื่อเทียบกับการหมักแบบต่อเนื่อง (Xie & Wang, 1996) จึงนิยมใช้การหมักแบบนี้ในการแก้ปัญหา เรื่องอาหารเริ่มต้นมีความเข้มข้นมากเกินไป หรือกระบวนการเมแทบอลิซึมสูงเกินไป ยิ่งไปกว่านั้น ปัญหาการเติมอาหารในถังหมักมากหรือน้อยเกินไป ก็เป็นปัญหาในการหมักแบบต่อเนื่อง ก็สามารถแก้ไขได้โดยใช้รูปแบบการเติมสารอาหารที่เหมาะสม ซึ่งก็ได้มีการพัฒนารูปแบบการเติมอาหารเพื่อที่จะควบคุมความเข้มข้นให้เหมาะสม ถือได้ว่าการหมักแบบนี้สามารถทำให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์สูง (High cell density) และได้มีการนำไปใช้กับจุลินทรีย์หลายชนิดทำให้ได้ผลิตผลตามต้องการ (Lee, Lee, Park, & Middelberg, 1999) การหมักแบบเฟ็ด-แบตช์ แบ่งได้เป็นสองแบบ คือ แบบควบคุมป้อนกลับ (Feedback control) และแบบควบคุมไม่ป้อนกลับ (No feedback control) (Lee, 1996)

1. การเติมอาหารโดยการควบคุมแบบป้อนกลับ

การเติมอาหารวิธีนี้แบ่งได้เป็นสองแบบคือ

1.1 การเติมอาหารโดยการควบคุมแบบป้อนกลับโดยอ้อม (indirect feedback control) วิธีนี้ทำควบคู่ไปกับ การวัดค่าความเปลี่ยนแปลงของพารามิเตอร์บางตัวภายในถังหมัก ได้แก่

1.1.1 ค่าพีเอช (pH-stat) เป็นการเติมอาหารเมื่อค่าพีเอชของอาหารในถังหมักสูงกว่าจุดที่กำหนด (Set point) นั่นหมายถึงอาหารที่เป็นแหล่งคาร์บอนถูกใช้หมดไป ตัวควบคุมค่าพีเอช (Controller) จะส่งสัญญาณไปที่เครื่องป้อนเพื่อให้เติมอาหารเข้าไปในถังหมัก ค่าพีเอชก็จะลดลงมาที่จุดกำหนด และเครื่องสูบก็จะหยุดเมื่อค่าพีเอชต่ำลงมาที่จุดกำหนด เป็นเช่นนี้เรื่อยไป จองและลี (Jeong & Lee, 1999) ใช้วิธีนี้ควบคุมความเข้มข้นของกลูโคสที่ 0.7 กรัมต่อลิตร และสามารถได้เซลล์แห้งถึง 60.5 กรัมต่อลิตร เช่นเดียวกับ ชอยและลี (Choi & Lee, 1999) ใช้วิธีนี้ร่วมกับการให้ออกซิเจนกับกรดอะซิติกและให้กรดโอลิอิกเพิ่มเติมทำให้ได้เซลล์แห้งถึง 203.1 กรัมต่อลิตร

1.1.2 ค่าการละลายของออกซิเจน (DO-stat) เมื่อค่าการละลายของออกซิเจนสูงกว่าจุดที่กำหนด ตัวควบคุมค่าการละลายของออกซิเจน จะส่งสัญญาณไปที่เครื่องป้อนเพื่อให้เติมอาหารเข้าไปในถังหมัก ค่าการละลายของออกซิเจน ก็จะลดลงมาที่จุดกำหนด และเครื่องสูบก็จะหยุดเมื่อค่าการละลายของออกซิเจนต่ำลงมาที่จุดกำหนด เช่นเดียวกับค่าพีเอช เกาและแทน (Gao & Tan, 2003) ใช้วิธีนี้ในการผลิตเออร์โกสเทอรอลได้ถึง 1,064 มิลลิกรัมต่อลิตร

1.1.3 ค่าอัตราการผลิตคาร์บอนไดออกไซด์ (Carbon dioxide evolution rate; CER) เนื่องจากไม่สามารถวัดค่าของคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นในถังหมักได้โดยตรง จึงต้องวัดทางอ้อมโดยดูสัดส่วนของอัตราการใช้แหล่งคาร์บอน โดยนำอาหารในถังหมักออกมาวัดด้วยเครื่องแมสสเปกโทรมิเตอร์ (mass spectrometer) หากมีการใช้แหล่งคาร์บอนไปก็จะมีการเติมอาหารเข้าไปทดแทน

1.1.4 ความเข้มข้นของเซลล์ (Cell concentration) วิธีนี้จะเติมอาหารเข้าถังหมักโดยดูจากความเข้มข้นของเซลล์โดยการวัดด้วยเครื่องเลเซอร์เทอร์บิดิมิเตอร์ (Laser turbidimeter)

1.2 การเติมอาหารโดยการควบคุมแบบป้อนกลับโดยตรง (Direct feedback control) การเติมอาหารแบบนี้ควบคุมการเติมด้วยความเข้มข้นของสารอาหาร โดยดูจากความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนหลัก จากการวัดของเครื่องวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส (Glucose analyzer) ที่อยู่ภายในถังหมัก

2. การเติมอาหารโดยการควบคุมแบบไม่ป้อนกลับ

การเติมอาหารแบบนี้จะมีการคำนวณอัตราการเติมอาหารไว้ล่วงหน้า โดยไม่ได้ใช้สัญญาณป้อนกลับใด ๆ จากพารามิเตอร์ภายในถังหมัก ซึ่งการเติมอาหารแบบนี้มีด้วยกันหลายแบบ ได้แก่

2.1 การเติมอาหารแบบเป็นระยะ (Intermittent feeding) วิธีนี้เป็นการเติมอาหารในปริมาตรที่กำหนด ที่เวลาต่าง ๆ ในกระบวนการหมัก มีรายงานว่าเมื่อใช้วิธีนี้เติมกลูโคสความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 300 มิลลิลิตร 4 ครั้ง เมื่อค่าการละลายของออกซิเจนเพิ่มขึ้นทำให้การเจริญของ E. coli ได้น้ำหนักเซลล์แห้ง (Dry cell weight) ถึง 38 กรัม/ลิตร (Bauer & Shiloach, 1974) จะเห็นได้ว่าการเติมกลูโคสความหนาแน่นสูงถึง 50 เปอร์เซ็นต์ เช่นนี้ คงทำไม่ได้ในการหมักแบบแบตช์ที่ต้องเติมสารอาหารทุกอย่างครั้งเดียวตอนเริ่มต้น อีกทั้ง E. coli ก็ไม่สามารถที่จะเจริญได้ที่ความเข้มข้นของกลูโคสมากกว่า 50 กรัม/ลิตร (Riesenberg, 1991)

2.2 การเติมอาหารแบบคงที่ (Constant feeding) วิธีการเติมอาหารแบบนี้ถือเป็นวิธีที่ง่ายวิธีหนึ่ง โดยเติมอาหารในอัตราคงที่ ตลอดกระบวนการหมัก เช่น เติมอาหารปริมาตร 50 มิลลิลิตร ทุก ๆ 30 นาที เป็นต้น การเติมอาหารแบบนี้ มีข้อเสียตรงที่ การเติมอาหารไม่ได้สอดคล้องกับมวลเซลล์ เช่น ณ ช่วงเวลาที่มีอัตราเจริญสูงขึ้น แต่ปริมาณของอาหารที่เติมไม่ได้สูงตามมวลเซลล์ ดังนั้นการเจริญก็จะไม่เป็นแบบลอการิทึม (Logarithm) หรือ เอกซ์โพเนนเชียล (Exponential) อย่างไรก็ตาม เมื่อใช้วิธีนี้ก็สามารถทำให้ได้มวลเซลล์แห้งมากกว่า 40 กรัม/ลิตร (Anderson, Strandberg, Haggstrom, & Enfors, 1994)

2.3 การเติมอาหารแบบเอกซ์โพเนนเชียล (Exponential feeding) เป็นการเติมอาหารให้กับเชื้อที่มีการเจริญแบบเอกซ์โพเนนเชียล ด้วยอัตราการเติมแบบเอกซ์โพเนนเชียลเช่นกัน ดังนั้นการเติมอาหารแบบนี้ การให้ซับสเตรตจึงเท่ากับความต้องการซับสเตรตของเชื้อ แต่การเติมแบบนี้ก็ไม่มีการป้อนกลับ จึงอาจมีตัวแปรหลายตัวเข้ามาเกี่ยวข้องกับสภาวะของเชื้อ อย่างไรก็ตามมีการรายงานว่าวิธีการนี้ทำให้ได้เซลล์มากกว่าวิธีการเติมอาหารแบบคงที่ (Matar et. al., 2009) และทำให้การเลี้ยงเซลล์เพื่อให้ได้เชื้อที่มีความเข้มข้นของเซลล์สูงสำเร็จอย่างมากมาย เช่น การเลี้ยง E. coli ได้ถึง 80 กรัม/ลิตร (Pan, Rhee, & Lebeault, 1987) และเมื่อมีการเติมอาหารแบบนี้ร่วมกับการเติมอาหารที่กำหนดค่าความเปลี่ยนแปลงของพีเอช (pH-stat) สามารถได้เซลล์ความหนาแน่นสูงถึง 101 กรัม/ลิตร (Kim, Lee, Lee, Chang, & Chang, 2004)

ประโยชน์ของการหมักแบบเฟ็ด-แบตช์ในระดับอุตสาหกรรมคือ

1. ควบคุมการใช้แหล่งคาร์บอนของจุลินทรีย์และช่วยรักษาปริมาณออกซิเจนในถังหมัก ตัวอย่าง เช่น อาหารเพาะเลี้ยงยีสต์ที่มีข้าวมอลต์มากเกินไปจะมีผลทำให้เชื้อยีสต์เจริญได้มากและใช้ออกซิเจนในการเจริญเป็นปริมาณมาก ยังผลให้เกิดสภาพไม่มีออกซิเจนขึ้นภายใน

ถังหมัก และผลที่ตามมาก็คือจะมีการสร้างเอทานอลขึ้นแทนการผลิตเซลล์ยีสต์ ดังนั้นจึงควรเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีสารอาหารที่เจือจาง และมีการเติมสารอาหารลงไปในอัตราที่น้อยกว่าที่จุลินทรีย์จะนำมาใช้ได้ ในปัจจุบันจะใช้กระบวนการหมักแบบเฟ็ด-แบตช์ ในการผลิตยีสต์ขนมปังโดยมีการเติมกากน้ำตาลลงไปในอัตราส่วนที่จะไม่ทำให้เกิดการผลิตเอทานอลแทนการผลิตยีสต์ หรือการผลิตยีสต์เพื่อทำไวน์ก็สามารถควบคุม ปริมาณน้ำตาลในระดับต่ำได้ตลอดกระบวนการผลิต ส่งผลให้ลดความเครียดของเซลล์ ทำให้ปริมาณสารที่ไม่ต้องการ เช่น สารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิลดลง (Dabros, Genasci, Blanchard, Unterhofer, Vorlet, Heidinger, & Bourgeois, 2016)

2. ควบคุมไม่ให้สารพิษที่เป็นองค์ประกอบในอาหารเพาะเลี้ยงมีผลต่อการผลิตของจุลินทรีย์การหมักแบบเฟ็ด-แบตช์จะใช้ในกรณีที่ส่วนประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงเป็นพิษต่อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก ตัวอย่างเช่น การผลิตเพนิซิลลิน ซึ่งจะมีโซเดียมฟีนิลอะซีเทต (Sodium phenylacetate) เป็นสารตั้งต้นของโมเลกุลเพนนิซิลลินสารนี้จะเป็นพิษต่อเชื้อรา Penicillium chrysogenum ดังนั้นในระหว่างกระบวนการหมักจะต้องให้โซเดียมฟีนิลอะซีเทตอยู่ในระดับต่ำจนไม่มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อรา โดยการเติมสารนี้ลงไปทีละน้อย หรือเติมลงไปอย่างต่อเนื่องตลอดเวลา (Goldrick, Ştefan, Lovett, Montague, & Lennox, 2015)

สรุป

การเพาะเลี้ยงเซลล์ความหนาแน่นสูงสามารถทำได้กับเซลล์ทุกชนิด โดยนิยมทำกับแบคทีเรียเป็นส่วนใหญ่ และแบคทีเรียที่มีบทบาทมาก คือ *E.coli* โดยกระบวนการหมักบนพื้นฐานของการหมักแบบเฟ็ด-แบตช์

เอกสารอ้างอิง

Anderson, L., Strandberg, L., Haggstrom, L., & Enfors, S. O. (1994). Modeling of high cell density fed batch cultivation. *FEMS Microbiology Reviews, 14*, 39–44.

Barreto, M. T. O., Melo, E. P., Moreira, J. L., & Carrondo, M. J. T. (1991). High cell density reactor for the production of *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 7*(1), 63–69.

Bauer, S., & Shiloach, J. (1974). Maximal exponential growth rate and yield of E. coli obtainable in a bench-scale fermentor. *Biotechnology and Bioengineering, 16*(7), 933–941.

Bauer, S., & Ziv, E. (1976). Dense growth of aerobic bacteria in a bench-scale fermentor. *Biotechnology and Bioengineering, 18*(1), 81–94.

Bélanger, L., Figueira, M. M., Bourque, D., Morel, L., Béland, M., Laramée, L., ... Míguez, C. B. (2004). Production of heterologous protein by *Methylobacterium extorquens* in high cell density fermentation. *FEMS Microbiology Letters, 231*(2),197-204.

Chen, F. (1996). High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth. *Trends in Biotechnology, 14*(11), 421–426.

Choi, J. I., & Lee, S. Y. (1999). High–level production of poly (3–hydroxybutyrate–co=3–hydroxyvalerate) by fed–batch culture of recombinant Escherichia coli. *Applied and Environmental Microbiology, 65*(10), 4363–4368.

Dabros, M., Genasci, G., Blanchard, L., Unterhofer, S., Vorlet, O., Heidinger, R. M. O., & Bourgeois, J. P. (2016). On–line monitoring and control of fed–batch fermentations in wine making. *CHIMIA International Journal for Chemistry, 70*(12), p. 900–901.

Daly, R., & Hearn, M. T. (2005). Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: A useful experimental tool in protein engineering and production. *Journal of Molecular Recognition, 18*(2), 119–138.

El–Rahim, W. M. A., Mostafa, E. M. & Moawada, H. (2016). High cell density cultivation of six fungal strains efficient in azo dye bioremediation. *Biotechnology reports (Amsterdam, Netherlands), 12*, 1–5.

Elias, C. B., Zeiser, A., Bedard, C., & Kamen, A. A. (2000). Enhanced growth of Sf–9 cells to a maximum density of 5.2×10^7 cells per mL and production of β–Galactosidase at high cell density by fed batch culture. *Biotechnology and Bioengineering, 68*(4), 381–388.

Gao, H., & Tan, T. (2003). Fed–batch fermentation for ergosterol production. *Process Biochemistry, 39*(3), 345–350.

Gerhardt, P., & Gallup, D. M. (1963). Dialysis flask for concentrated culture of microorganisms. *Journal of Bacteriology, 86*, 919–929.

Goldrick. S., Ştefan, A., Lovett, D., Montague, G., & Lennox, B. (2015). The development of an industrial–scale fed–batch fermentation simulation. *Journal of Biotechnology, 193*, 70–82.

Gorelick, A. N., Mead, D. D., & Kelly, E. H. (1951). The growth of bacteria in a charcoal–cellophane system. *Journal of Bacteriology, 61*, 507–513.

Hensing, M., Vrouwenvelder, H., Hellinga, C., Baartmans, R., & van Dijken, H. (1994). Production of extracellular inulinase in high–cell–density fed–batch cultures of

Kluyveromyces marxianus. Applied Microbiology and Biotechnology, 42(4), 516–521.

Hestrin, S., Avineri-Shapiro, S., & Aschner, M. (1943). The enzyme production of levan. *Biochemical Journal, 37*(4), 450–456.

Jeong, K. J., & Lee, S. Y. (1999). High-level production of human leptin by fed-batch cultivation of recombinant *Escherichia coli* and its purification. *Applied and Environmental Microbiology, 65*, 3027–3032.

Kim, B. S., Lee, S. C., Lee, S. Y., Chang, Y. K., & Chang, H. N. (2004). High cell density fed-batch cultivation of *Escherichia coli* using exponential feeding combined with pH-stat. *Bioprocess and biosystems engineering, 26*(3), 147–150.

Kim, S. Y., Lee, K. H., Kim, J. H., & Oh, D. K. (1997). Erythritol production by controlling osmotic pressure in *Trigonopsis variabilis. Biotechnology Letters, 19*, 727–729.

Kiy, T., & Tiedtke, A. (1992). Continuous high-cell-density fermentation of the ciliated protozoon Tetrahymena in a perfused bioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology, 38*(2), 141–146.

Lee, J., Lee, S. Y., Park, S., & Middelberg, A. P. J. (1999). Control of fed-batch fermentations. *Biotechnology Advances, 17*(1), 29–48.

Lee, S. Y. (1996). High cell-density culture of *Escherichai coli. Trends in Biotechnology, 14*(3), 98–105.

Lee, S. Y., Wong, H. H., Choi, J., Lee, S. H., Lee, S. C., & Han, C. S. (2000). High cell-density cultivation of *Pseudomonas putida* under phosphorus limitation. *Biotechnology and Bioengineering, 68*(4), 466–470.

Li, Y., Zhao, Z., & Bai, F. (2007). High density cultivation of oleaginous yeast *Rhodosporidium toruloides* Y4 in fed-batch culture. *Enzyme and Microbial Technology, 41*(3), 312–317.

Li, Z., Lu, J. K., Zhao, L., Xiao, K., & Tan, T. (2010). Improvement of l-lactic acid production under glucose feedback controlled culture by *Lactobacillus rhamnosus. Applied biochemistry and biotechnology, 162*(6), 1762–1767.

Lim, S. F., Chuan, K. H., Liu, S., Loh, S. O. H., Chung, B. Y. F., Ong, C. C., & Song, Z. (2006). RNAi suppression of Bax and Bak enhances viability in fed-batch cultures of CHO cells. *Metabolic engineering, 8*(6), 509–522.

Matar, S. M., El-Kazzaz, S. A., Wagih, E. E., El-Diwany, A. I., Moustafa, H. E., El-Saadani, M. A., ...Hafez, E. E. (2009). Bioprocessing and scaling-up cultivation of *Bacillus subtilis* as a Potential Antagonist to certain plant pathogenic fungi, III. *Biotechnology, 8*(1), 138-143.

Moon, H., Kim, S. W., Lee, J., Rhee, S. K., Choi, E. S., Kang, H. A., ...Hong, S. I. (2003). Independent exponential feeding of glycerol and methanol for fed-batch culture of recombinant *Hansenula polymorpha* DL-1. *Applied Biochemistry and Biotechnology, 111*(2), 65-79.

Pan, J. G., Rhee, J. S., & Lebeault, J. M. (1987). Physiological constraints in increasing biomass concentration of *Escherichia coli* B in fed-batch culture. *Biotechnology Letters, 9*(2), 89-94.

Riesenberg, D. (1991). High-cell-density cultivation of *Escherichia coli. Current Opinion in Biotechnology, 2*(3), 380-384.

Rozkov, A., Han, L., Haggstrom, L., Enfors, S. O. (2001). *Effects of addition of amino acids on growth of E. coli and production of recombinant protein* (Doctoral dissertation). Dept of Biotechnology, Royal Institute of Technology, Sweden.

Scheidgen-Kleyboldt, G., Kuchta, K., & Kiy, T. (2003). Production of secreted hydrolytic enzymes by continuous high-cell-density cultivation of *Colpidium campylum. European Journal of Protistology, 39*(4), 455-460.

Schmidt, R. A., Wiebe, M. G., & Eriksen, N. T. (2005). Heterotrophic high cell-density fed-batch cultures of the phycocyanin producing red alga *Galdieria sulphuraria. Biotechnology and Bioengineering, 9*(1), 77-84.

Shang, F., Wen, S., Wang, X., & Tan, T. (2006). High-cell-density fermentation for ergosterol production by *Saccharomyces cerevisiae. Journal of Bioscience and Bioengineering, 101*(1), 38-41.

Shiloach, J., & Fass, R. (2005). Growing *E. coli* to high cell density – A historical perspective on method development. *Biotechnology Advances, 23*(5), 345-357.

Shojaosadati, S. A., Kolaei, S. M. V., Babaeipour, V., & Farnoud, A. M. (2008). Recent advances in high cell density cultivation for production of recombinant protein. *Iranian Journal of Biotechnology, 6*(2), 63-84.

Shokri, A., & Larsson, G. (2004). Characterization of *E. coli* membrane structure and function during fed-batch cultivation. *Microbial Cell Factories, 3*, 9-21.

Srinivasan, S., Barnard, G. C., & Gerngross, T. U. (2003). Production of recombinant proteins using multiple-copy gene integration in high-cell-density fermentations of *Ralstonia eutropha*. *Biotechnology and Bioengineering, 84*(1), 114-120.

Stanbury, P. F., Whitaker, A., & Hall, S. J. (2017). *Principles of fermentation technology* (3rd ed.). Oxford: Elservier Science.

Tyrell, E. A., Mac Donald, R. E., & Gerhardt, P. (1957). Biphasic system for growing bacteria in concentrated culture. *Journal Bacteriology, 75*, 1-4.

Vinet, G., & Fredette, V. (1951). Apparatus for the culture of bacteria in cellophane tubes. *Science, 114*, 549-550.

Vuolanto, A., von Weymarn, N., Kerovuo, J., Ojamo, H., & Leisola, M. (2001). Phytase production by high cell density culture of recombinant *Bacillus subtilis*. *Biotechnology Letters, 23*, 761-766.

Wen, Z. Y., Jiang, Y., & Chen, F. (2002). High cell density culture of the diatom *Nitzschia laevis* for eicosapentaenoic acid production: fed-batch development. *Process Biochemistry, 37*(12), 1447-1453.

Wu, Z. & Shi, X. (2007). Optimization for high-density cultivation of heterotrophic Chlorella based on a hybrid neural network model. *Letters in Applied Microbiology 44*, 13-18.

Xie, L., & Wang, D. I. C. (1996). High cell density and high monoclonal antibody production through medium design and rational control in a bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering, 51*(6), 725-729.

Yamane, T. & Shimizu S. (1984). Fed-batch techniques in microbial processes. In *Bioprocess Parameter Control. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* (vol. 30, pp147-194). Berlin, Heidelberg: Springer.

Yee, L., & Blanch, H. W. (1992). Recombinant protein expression in high cell density fed-batch cultures of *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology, 10,* 1550-1556.

Yoshida, F., Yamane, T., & Nakamoto, K. (1973). Fed-batch hydrocarbon fermentation with colloidal emulsion feed. *Biotechnology and Bioengineering, 15*(2), 257-270.

Zhong, J. J., Chen, F., Hu, W. W. (1999). High density cultivation of *Panax notoginseng* cells in stirred bioreactors for the production of ginseng biomass and ginseng saponin. *Process Biochemistry, 35*(5), 491- 496.