

รหัสโครงการ SUT3-304-54-12-27



รายงานการวิจัย

การออกแบบถังปฏิกรณ์แบบท่อไหลสำหรับการทำบริสุทธิ์กรดดีแล็กติก

A design of plug flow reactor for purification of
D-lactic acid

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว



รายงานการวิจัย

การออกแบบถังปฏิกรณ์แบบท่อไหลสำหรับการทำบริสุทธิ์กรดดีแล็กติก

A design of plug flow reactor for purification of
D-lactic acid

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร. อภิชาติ บุญทาวัน

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2553

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

พฤศจิกายน 2557

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รองศาสตราจารย์ ดร. อภิชาติ บุญทาวิน
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อภาษาไทย

การทำบริสุทธิ์เชิงแสงของกรด D-แล็กติกจากสารละลายผสมของกรด D- และ L-แล็กติกได้ถูกศึกษาด้วยการใช้วิธีการทางชีวภาพ เชื้อยีสต์ *Yarrowia lipolytica* ได้ถูกเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของเอ็นไซม์ L-แล็กเตทออกซิเดส ซึ่งเอ็นไซม์นี้มีความเฉพาะเจาะจงกับ L-แล็กเตท โดยทำการเลี้ยงในอาหารเหลวที่มี L-แล็กเตทเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันเพื่อศึกษาถึงจลศาสตร์การเจริญ พบว่าความเข้มข้นของ L-แล็กเตทที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 20 กรัมต่อลิตรโดยให้ค่าการเจริญจำเพาะ 0.24 ต่อชั่วโมงและความเข้มข้นของเซลล์ 0.72 กรัมต่อลิตร และเมื่อทดสอบการบ่มด้วยสารละลายผสมของ L- และ D-แล็กเตท พบว่าเชื้อยีสต์จะใช้เฉพาะ L-แล็กเตทเท่านั้น โดยที่ความเข้มข้นของ D-แล็กเตทยังคงเท่าเดิม การทดลองถัดมาคือการเลี้ยงเซลล์ด้วยความเข้มข้นสูง ซึ่งได้คำนวณอัตราการป้อน L-แล็กเตทในอัตราที่สอดคล้องกับค่าอัตราการเจริญจำเพาะ โดยพบว่าได้ความเข้มข้นของเซลล์สูงสุดคือ 30.8 กรัมต่อลิตร จากนั้นได้ทำการตรึงเซลล์ด้วยแคลเซียมอัลจิเนตเพื่อใช้สำหรับการทำบริสุทธิ์เชิงแสงของ D-แล็กเตทในท่อปฏิกรณ์แบบท่อไหล โดยได้ทำการศึกษาในส่วนของอัตราการเกิดปฏิกิริยา อิทธิพลของความเข้มข้น L-แล็กเตทเริ่มต้น ความคงตัวจากการเก็บรักษาและการเสริมแหล่งไนโตรเจนเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของท่อปฏิกรณ์ จากนั้นได้นำส่วนที่ได้จาก effluent ไปทำการศึกษาการทำบริสุทธิ์ขั้นสุดท้ายด้วยเทคนิคนาโนฟิวเตรชัน โดยได้ทำการศึกษาถึงสภาวะการทำงานต่าง ๆ ต่อประสิทธิภาพการแยกเช่น ผลของความดัน ความเข้มข้นและค่าความเป็นกรด-ด่าง เป็นต้น ซึ่งผลการทดลองพบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างมีอิทธิพลสูงที่สุดในการกักกันกรดแล็กติกระหว่างสารป้อนและเพอร์มิเอท นอกจากนี้ผลการทดลองยังยืนยันว่า นาโนฟิวเตรชันสามารถใช้ในการกำจัดโปรตีนและสารโมเลกุลใหญ่ได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยได้เพอร์มิเอทที่ใส ซึ่งส่วนเพอร์มิเอทที่ได้นี้ได้ถูกนำไปทดสอบปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชันซึ่งพบว่าสามารถผลิตพอลิดีแล็กติกแอซิดได้เช่นเดียวกับพอลิแล็กติกแอซิดซึ่งผลิตจากกรดแล็กติกทางการค้า

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Optical purification of D-lactic acid from the mixture of D- and L-lactic acid was studied using biological approach. *Yarrowia lipolytica* was induced for the expression of L-lactate oxidase which is specific for L-lactate by culturing in a medium using L-lactate as the sole carbon source. Investigation on different initial L-lactate concentrations reported that the optimum concentration of 20 g.L⁻¹ resulted in the specific growth rate of 0.24 h⁻¹ and biomass concentration of 0.72 g.L⁻¹. Experiment on the incubation of mixture of D- and L-lactate revealed that only L-lactate was utilized by the yeast whilst D-lactate concentration was constant. Subsequently, an exponential feeding technique was employed for high cell density cultivation in which the highest cell concentration was obtained at 30.8 g.L⁻¹. Immobilization of the yeast cells with calcium alginate was carried out in order to study the optical purification of D-lactate in a plug flow reactor. Operating parameters on reaction were investigated in terms of initial L-lactate concentrations, stability after storage, and supplementation with nitrogenous sources, respectively. The effluent was subjected to further purification using nanofiltration. Operating conditions including trans-membrane pressure, feed concentration, and pH were investigated. Experimental results revealed that the last was the most influential parameters on rejection between the feed and permeate. In addition, this technique was proved for removal of proteins and macro-molecules. The permeate was clear and was employed for subsequent polymerization. Results found that the poly-D-lactic acid polymer was successfully produced from D-lactic acid obtained from this work as well as from commercial reagent.

สารบัญเรื่อง

กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญเรื่อง	ง
สารบัญภาพ	ฉ
สารบัญตาราง	ณ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหางานวิจัย	1
1.2 กรดแล็กติก (Lactic acid)	3
1.3 การแยกสารไครอล (Chiral separation)	5
1.3.1 การแยกสารไครอลด้วยวิธีทางกายภาพ	5
1.3.2 การแยกสารไครอลด้วยวิธีทางชีวภาพ	7
1.4 <i>Yarrowia lipolytica</i>	9
1.5 การตรึงเซลล์ (Cell immobilization)	13
1.5.1 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพสำหรับการตรึงเซลล์ (Bioreactor for immobilized cells)	14
1.6 จุดประสงค์ของโครงการวิจัย	16
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	17
2.1 อุปกรณ์และสารเคมี	17
2.2 การเลี้ยงเชื้อยีสต์ <i>Yarrowia lipolytica</i>	17
2.2.1 การเลี้ยงเซลล์เพื่อทดสอบกิจกรรมของ L-lactate oxidase	17
2.2.2 การเลี้ยงเซลล์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ	18
2.3 การเลี้ยงเชื้อยีสต์ที่ความเข้มข้นสูง	19
2.3.1 การคำนวณอัตราการป้อนสารอาหาร	19
2.4 การตรึงเซลล์	23
2.4.1 Packed column และถังปฏิกรณ์สำหรับการทำบริสุทธิ์กรด D-แล็กติก	24
2.5 การทำบริสุทธิ์กรดดีแล็กติกด้วยเทคนิคนาโนฟิวเตรชัน (Nanofiltration, NF)	26
2.6 การทดสอบปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชัน	29
2.7 การวิเคราะห์	29

บทที่ 3 ผลการทดลองและบทวิจารณ์

3.1	การศึกษาจุลศาสตร์การเจริญของเชื้อยีสต์โดยใช้ L-แล็กเตทเป็นแหล่งคาร์บอน	32
3.1.1	การเลี้ยงเชื้อ <i>Yarrowia lipolytica</i> เพื่อการทดสอบกิจกรรมของเซลล์	32
3.1.2	การเลี้ยงเชื้อแบบความเข้มข้นสูง (High cell density cultivation)	34
3.2	การทดสอบการแยกกรด D และ L-แล็กติกด้วยถังปฏิกรณ์ชีวภาพ	36
3.2.1	การศึกษาสัณฐานด้วย Scanning Electron Microscope	36
3.2.2	ปฏิกิริยาการออกซิไดซ์ L-แล็กเตทด้วยเชื้อยีสต์ที่ถูกตรึงในอัลจินต	36
3.2.3	ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเชื้อยีสต์ระหว่างการเก็บรักษา	39
3.2.4	อิทธิพลของระยะเวลาพำนัก (resident time)	41
3.3	การทำบริสุทธิ์ด้วยระบบนาโนฟิวเตรชั่น	44
3.3.1	การทดสอบระบบด้วยสารป้อนสังเคราะห์	44
3.3.2	การทดสอบระบบด้วยน้ำหมักจริง	47
3.4	ผลการสังเคราะห์พอลิแลคติกแอซิดโดยปฏิกิริยาการสังเคราะห์แบบควบแน่น (condensation polymerization) ภายใต้สภาวะบัลค์ (bulk polymerization)	51
3.4.1	กระบวนการสังเคราะห์พอลิเมอร์แบบเปิดวงแหวนแลคไทด์ (ring opening polymerization of lactide)	51
3.4.2	กระบวนการสังเคราะห์พอลิเมอร์ด้วยปฏิกิริยาแบบควบแน่นกรดแลคติกโดยตรง (direct condensation polymerization of lactic acid)	53
3.4.3	วิธีการดำเนินการวิจัยการสังเคราะห์พอลิแล็กติกแอซิด	53
3.4.4	ผลการทดลองการทำพอลิแล็กติกแอซิด	55
บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง		58
บรรณานุกรม		59
ประวัติผู้วิจัย		61

สารบัญภาพ

รูปภาพ 1.1 โครงสร้างทางเคมีและลักษณะการเกิดไอโซเมอร์ของกรด L- และ D-แล็กติก	4
รูปภาพ 1.2 การจัดการทดลองเครื่องคัพปลาริโอเล็กโทรโพเรซิสสำหรับการแยกสารโครลออกจากกัน (http://chemwiki.ucdavis.edu)	6
รูปภาพ 1.3 แสดงโครงสร้างของเอ็นไซม์ L-lactate oxidase (Umena <i>et al.</i> , 2006)	7
รูปภาพ 1.4 กลไกการออกซิไดซ์กรด L-แล็กติกไปเป็นกรดไพรูวิกและ H ₂ O ₂ (Furuichi <i>et al.</i> , 2008)	8
รูปภาพ 1.5 แสดงลักษณะรูปร่างของเซลล์ยีสต์ <i>Yarrowia lipolytica</i> ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (www.biotechnologie.de)	10
รูปภาพ 1.6 การวิเคราะห์สมมูลมวลของถังปฏิกรณ์แบบท่อไหลสำหรับการทำบริสุทธิ์กรด D-แล็กติก	14
รูปภาพ 2.1 การเลี้ยงเชื้อยีสต์ <i>Yarrowia lipolytica</i> บนอาหารวุ้น	18
รูปภาพ 2.2 การเลี้ยงเซลล์ยีสต์ที่ความเข้มข้นสูงด้วยเทคนิคการบ่อนอาหารแบบกึ่งกะ	22
รูปภาพ 2.3 การตรึงเซลล์ <i>Yarrowia lipolytica</i> ด้วยอัลจินา เม็ด bead มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง ประมาณ 2.5 มิลลิเมตร ความเข้มข้นของเซลล์คือ 100 กรัมต่อลิตรสารละลายอัลจินา	24
รูปภาพ 2.4 การจัดการทดลองท่อปฏิกรณ์ชีวภาพแบบท่อไหล	25
รูปภาพ 2.5 การใช้ระบบนาโนฟิวเตรชันในการทำบริสุทธิ์กรด D-แล็กติกที่ผลิตได้	26
รูปภาพ 2.6 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 325 นาโนเมตร (Pharmacia Biotech) ที่ใช้ในงานวิจัยนี้	30
รูปภาพ 2.7 เครื่อง HPLC (ThermoScientific) สำหรับวัดค่าความบริสุทธิ์เชิงแสงของกรดแล็กติก	31
รูปภาพ 3.1 แสดงการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของกรดแล็กติกและเซลล์ยีสต์ในระหว่างการเลี้ยงเชื้อ แบบกะในถังหมัก	33
รูปภาพ 3.2 กราฟแสดงการเจริญของ <i>Yarrowia lipolytica</i> ความเข้มข้นของ L-แล็กเตทและอัตรา การไหลโดยมวลของ L-แล็กเตทระหว่างการเลี้ยงเชื้อด้วยความเข้มข้นสูง	34
รูปภาพ 3.3 ภาพถ่าย SEM ของเชื้อยีสต์ที่ถูกตรึงในเม็ดอัลจินา	36
รูปภาพ 3.4 ออกซิเดชันของ L-แล็กเตทโดยเชื้อยีสต์ที่มีการเคลื่อนที่โดยอิสระและเชื้อยีสต์ที่ถูกตรึง	37
รูปภาพ 3.5 อิทธิพลของความเข้มข้น L-แล็กเตทเริ่มต้นต่อค่าอัตราการเกิดปฏิกิริยาเริ่มต้นระหว่าง เชื้อ ยีสต์ที่มีการเคลื่อนที่โดยอิสระและเชื้อยีสต์ที่ถูกตรึงด้วยอัลจินา	38

รูปภาพ 3.6 การสูญเสียกิจกรรมของเอ็นไซม์ L-lactate oxidase โดยเซลล์ยีสต์ที่ถูกตรึงในเม็ดอัลจิเนต ในระหว่างการเก็บรักษา ณ อุณหภูมิต่าง ๆ.....	39
รูปภาพ 3.7 อิทธิพลของการเสริมแหล่งไนโตรเจนที่มีต่อปฏิกิริยาออกซิเดชันของ L-แล็กเตทด้วยยีสต์ Yarrowia lipolytica ที่ถูกตรึงด้วยอัลจิเนตในถังปฏิกรณ์แบบท่อไหล	43
รูปภาพ 3.8 อิทธิพลของสภาวะการทดลองต่าง ๆ ต่อค่าการกักกันของสารละลายกรด D-แล็กติกโดย (A) อิทธิพลของแรงดัน (B) อิทธิพลของความเข้มข้นเริ่มต้นและ (C) อิทธิพลของค่าความเป็น กรด-ด่าง	44
รูปภาพ 3.9 ค่าคงที่ของการแตกตัวของกรดแล็กติก ณ ค่า pH ต่าง ๆ (Li et al., 2010)	46
รูปภาพ 3.10 การเปลี่ยนแปลงเพอร์มิเอทฟลักซ์ของสารป้อนสังเคราะห์และน้ำหมักในระหว่างการ กรองด้วยนาโนฟิวเตรชั่น.....	48
รูปภาพ 3.11 ภาพถ่าย SEM ด้านข้างของเมมเบรนที่ถูกอุดตันด้วยโปรตีนรวมถึงสารโมเลกุลใหญ่ต่างๆ เกิดเป็นชั้นเค้ก (A) และเมมเบรนใหม่ที่ยังไม่ผ่านการใช้งาน (B).....	48
รูปภาพ 3.12 นาโนฟิวเตรชั่นของน้ำหมักโดยใช้เทคนิคไดอะฟิวเตรชั่น	49
รูปภาพ 3.13 แสดงลักษณะใสของเพอร์มิเอทที่ได้จากนาโนฟิวเตรชั่นของน้ำหมัก (Feed NF).....	50
รูปภาพ 3.14 โครมาโตแกรมของเพอร์มิเอทที่ได้จากนาโนฟิวเตรชั่น (Permeate NF).....	51
รูปภาพ 3.15 แผนภาพแสดงขั้นตอนการผลิตพอลิแลคติกแอซิดผ่านพอลิแลคติกแอซิดน้ำหนักโมเลกุล ต่ำและ แลคไทด์.....	52
รูปภาพ 3.16 2 สเตอริโอไอโซเมอร์ของแลคไทด์ (Gruber, 2001).....	53
รูปภาพ 3.17 ปฏิกิริยาการเปิดวงแหวนแลคไทด์ด้วยกลไกการเกิดปฏิกิริยาแบบโคออร์ดิเนชัน (Nampoothiri et al., 2010).....	54
รูปภาพ 3.18 การติดตั้งอุปกรณ์สำหรับการสังเคราะห์พอลิดีแลคติกแอซิดด้วยกระบวนการสังเคราะห์ พอลิเมอร์แบบควบแน่นโดยตรง.....	56
รูปภาพ 3.19 FTIR สเปกตรัมของพอลิแลคติกแอซิดชนิดต่าง ๆ	67

สารบัญตาราง

ตาราง 2.1 องค์ประกอบของอาหารเหลวที่ใช้สำหรับการเลี้ยงเชื้อยีสต์ในแบบกะและกึ่งกะ.....	21
ตาราง 3.1 ผลกระทบของความเข้มข้น L-แล็กเตท เริ่มต้นต่อการเจริญของ <i>Yarrowia lipolytica</i> ..	32
ตาราง 3.2 อิทธิพลของ resident time ต่อประสิทธิภาพการออกซิไดซ์ L-แล็กเตทในถังปฏิกรณ์แบบ ท่อไหลโดยใช้อุณหภูมิของการทดลอง 30 องศาเซลเซียส.....	41
ตาราง 3.3 ชนิด หน้าที่ และแหล่งที่มาของวัสดุที่ใช้ในการทดสอบปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชัน.....	54



บทที่ 1 บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาทางวิจัย

ปัจจุบันพลาสติกสังเคราะห์มีบทบาทสูงมากในโลกปัจจุบัน เนื่องจากสามารถนำมาใช้ในชีวิตประจำวันได้อย่างหลากหลาย เพื่อใช้เป็นวัสดุในอุตสาหกรรมต่างๆ อาทิเช่น กล่องใส่อาหาร พลาสติกห่ออาหาร ภาชนะบรรจุเคมีภัณฑ์ อุตสาหกรรมไฟฟ้า การแพทย์และเภสัชกรรม คอมพิวเตอร์ หรือแม้กระทั่งอุตสาหกรรมยานยนต์ เป็นต้น โดยพลาสติกเหล่านี้สังเคราะห์ได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมีซึ่งก่อให้เกิดปัญหาขยะ มลพิษและสิ่งแวดล้อมโดยรวม เนื่องจากกำจัดได้ยากและไม่สามารถย่อยสลายเองได้ตามธรรมชาติหรือใช้เวลานานมาก โครงการนวัตกรรมพลาสติกชีวภาพเป็นหนึ่งในโครงการนวัตกรรมเชิงยุทธศาสตร์ที่สำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติ (สนช.) กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีมีวิสัยทัศน์ที่ชัดเจน จากการวิเคราะห์สถานการณ์ระดับโลกและปัจจัยการผลิตที่เข้มแข็งของประเทศไทย จึงได้ให้ความสำคัญอย่างยิ่งในการผลักดันให้เกิดการพัฒนาเป็นโครงการระดับชาติตั้งแต่พ.ศ. 2547 ซึ่งมีเป้าหมายในการนำเทคโนโลยีชีวภาพระดับสูง และเทคโนโลยีด้านวัสดุศาสตร์มาใช้ในการผลิตพลาสติกชีวภาพจากแป้งมันสำปะหลังหรือมันสำปะหลัง โดยได้มีการประเมินว่าประเทศไทยมีศักยภาพและความเป็นไปได้เป็นอย่างสูงที่จะผลิตพลาสติกชีวภาพจากมันสำปะหลังและน้ำตาล ซึ่งจะเป็นการสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับวัตถุดิบการเกษตรของประเทศไทย อีกทั้งเป็นการเตรียมความพร้อมให้กับอุตสาหกรรมที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมซึ่งมีศักยภาพสูงในเวทีการค้าโลก ในปัจจุบันพลาสติกชีวภาพส่วนใหญ่ได้มาจากการผลิตกรด L-แล็กติก ด้วยจุลินทรีย์ในธรรมชาติโดยใช้วัตถุดิบที่สามารถผลิตทดแทนขึ้นใหม่ได้ในธรรมชาติ (renewable resource) เช่น ข้าวโพด มันสำปะหลัง และอ้อย เป็นต้น โดยต้องผ่านกระบวนการหมัก (fermentation) ด้วยแบคทีเรียกรดแล็กติก (lactic acid bacteria) จากน้ำผ่านกระบวนการทำบริสุทธิ์ และนำกรด L-แล็กติกที่ได้นั้น ผ่านกระบวนการทางเคมีได้เป็น lactide ซึ่งมีโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวน แล้วจึงนำไปผ่าน กระบวนการพอลิเมอไรเซชัน (Polymerization) กลั่นในระบบสุญญากาศเพื่อเปลี่ยนโครงสร้างได้เป็นโพลิเมอร์เรียกว่า Poly lactic acid, PLA ซึ่งสามารถนำไปขึ้นรูปหรือผสมกับพลาสติกชนิดอื่นต่อไป โดยพลาสติกชีวภาพ (Bioplastic) สามารถย่อยสลายได้โดยธรรมชาติ เป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำ PLA มีช่วงการหลอมเหลว (melting range) 173-178 องศาเซลเซียส แต่อย่างไรก็ตามทนความร้อนได้ไม่เกิน 110 องศาเซลเซียส มีปริมาณความเป็นผลึก (Crystallinity) ประมาณ 37% และอุณหภูมิการเปลี่ยนจากสถานะคล้ายแก้ว (glass transition temperature) อยู่ระหว่าง 60-65 องศาเซลเซียส คุณสมบัติพิเศษคือมีความใส ไม่ย่อยสลายในสภาพแวดล้อมทั่วไป แต่สามารถย่อย

สลายได้เอง เมื่อนำไปฝังกลบในดินขึ้นรูป สามารถทำได้ด้วยเทคนิคการขึ้นรูปเทอร์โมพลาสติกทั่วไป เช่น กระบวนการการอัดรีด (Extrusion) กระบวนการฉีด (Injection molding) เป็นต้น จากข้อมูลข้างต้นจะเห็นได้ว่าข้อจำกัดสำคัญของ PLA คือมีการทนอุณหภูมิได้ค่อนข้างต่ำ ดังนั้นการเพิ่มสมบัติดังกล่าวจึงเป็นที่สนใจเป็นอย่างมาก ซึ่งการผลิตกรด D-แล็กติกเพื่อใช้เป็นสารเพิ่มความแข็งแรงในกระบวนการผลิตพลาสติกชีวภาพ ของ PLA นั้น กำลังได้รับความสนใจเป็นอย่างมากเนื่องจากจะทำให้สามารถปรับปรุงสมบัติของ PLA ให้สามารถใช้ทดแทนพลาสติกที่ได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมีเป็นอย่างดี อีกทั้งยังสามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม โดยพอลิเมอร์ของกรดดีแล็กติก (poly-D-lactic acid, PDLA) นั้น มีจุดหลอมเหลวที่สูงกว่าพอลิแล็กติก (PLA) ธรรมดาถึง 40 องศาเซลเซียส และมีความต้านทานความร้อนได้ดีเทียบเท่าพอลิเมอร์ชนิด polybutylene terephthalate (PBT) ที่ผลิตได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเลียม ดังนั้นพลาสติกชีวภาพจึงได้รับความสนใจและกำลังศึกษาค้นคว้าวิจัยอย่างมากในปัจจุบัน อย่างไรก็ตามการผลิตกรดแล็กติกโดยกระบวนการทางชีวภาพ (fermentation process) ที่มีการศึกษากันอย่างกว้างขวางนั้น ส่วนใหญ่มักจะเป็นเชื้อสามารถผลิตกรด L-แล็กติกได้อย่างเดียว และมี stereo-selectivity สูง ส่วนเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกที่สามารถผลิตกรด D-แล็กติกอย่างเดียว นั้น พบว่ามีปริมาณที่น้อยกว่าพวกแรก อีกทั้งยังสามารถผลิตกรด D-แล็กติกได้ในปริมาณที่น้อย และเพาะเลี้ยงยากอีกด้วย อีกปัญหาหนึ่งที่อาจพบระหว่างกระบวนการหมักคือ ในระหว่างการหมักอาจมีการปนเปื้อนจากเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตกรด L-แล็กติก ทำให้เกิดการปนเปื้อนขึ้นมาได้

นอกจากนี้ การผลิตกรดแล็กติกด้วยวิธีการทางเคมีนั้น จะได้ไอโซเมอร์ที่เป็นทั้ง D- และ L- ทำให้ต้องเสียค่าใช้จ่ายสูงในการแยกไอโซเมอร์เหล่านี้ออกจากกัน ซึ่งจำเป็นที่จะต้องทำการกำจัดออกให้หมดในระหว่างกระบวนการทำบริสุทธิ์ ทำให้กรด D-แล็กติกที่ผลิตได้ไม่บริสุทธิ์เท่าที่ควรจะเป็น ดังนั้นจึงมีความจำเป็นในการทำกรด D-แล็กติกให้บริสุทธิ์ คือการแยกไอโซเมอร์หรือไครอล (chiral) L-แล็กติกที่ปนเปื้อนออกจากระบบ ซึ่งโดยทั่ว ๆ ไปแล้ว การผลิตกรดแล็กติกบริสุทธิ์นั้นจะใช้กระบวนการ esterification และ hydrolysis ซึ่งเป็นกระบวนการเปลี่ยนโครงสร้างทางเคมีของกรดแล็กติกให้เป็นสารประเภทเอสเทอร์ซึ่งจะสามารถกลั่นแยกออกจากสิ่งเจือปนอื่น ๆ ได้โดยง่าย แต่อย่างไรก็ตาม กระบวนการดังกล่าวไม่สามารถที่จะแยกไอโซเมอร์ D- และ L- ออกจากกันได้ ทั้งนี้เนื่องจากสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของสารทั้งสองชนิดนั้นมีความคล้ายกันมากนั่นเอง ดังนั้นหากจะทำการแยกสารทั้งสองชนิดนี้ออกจากกัน จำเป็นที่จะต้องมีการพัฒนาระบบการทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีทางชีวภาพ เพื่อเกิดผลกระทบทางสิ่งแวดล้อมให้น้อยที่สุด นั่นคือ กระบวนการย่อยหรือเปลี่ยนรูปแบบของกรด L-แล็กติกด้วยเชื้อจุลินทรีย์ โดยมี

งานวิจัยที่ใช้เชื้อแบคทีเรียชนิด *Pseudomonas stutzeri* SDM (Gao *et al.*, 2009) และการใช้ยีสต์ชนิด *Yarrowia lipolytica* ซึ่งมีเอนไซม์ในการย่อย L-แล็กติก (Biryukova *et al.*, 2010) ซึ่งในงานวิจัยนี้จะศึกษาการใช้เชื้อยีสต์ดังกล่าวในการกำจัดกรด L-แล็กติกออกจากกรดผสม D- และ L-แล็กติก เพื่อให้เหลือเพียงแต่กรด D-แล็กติก ที่เป็นผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ โดยในขั้นแรกจะทำการศึกษาการเหนี่ยวนำให้เกิดเอนไซม์ L-lactate oxidase ภายในเซลล์ยีสต์ก่อน จากนั้นจะทำการศึกษาการเลี้ยงเชื้อแบบกึ่งกะ เพื่อจุดประสงค์ในการเพิ่มจำนวนเซลล์ให้ได้มาก ๆ ก่อนที่จะนำเซลล์เหล่านั้นมาตรึงในเม็ดอัลจิเนต และมีการศึกษาการออกแบบถังปฏิกรณ์แบบ plug flow และสภาวะที่เหมาะสมเพื่อที่จะให้ได้ผลการทดลองที่ดีที่สุด ในขั้นตอนสุดท้ายจะเป็นการทำบริสุทธิ์สารละลายกรด D-แล็กติกที่ได้ด้วยเทคนิคนาโนฟิวเตรชัน (Nanofiltration, NF) ก่อนที่จะนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ตอนสุดท้ายไปทดสอบปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชันต่อไป

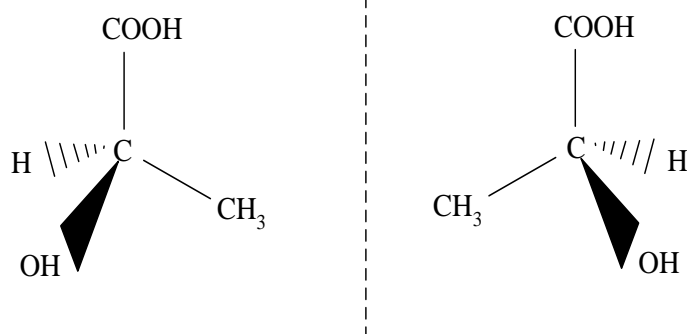
1.2 กรดแล็กติก (Lactic acid)

กรดแล็กติก (2-hydroxypropanoic acid, $\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}$) หรือกรดนม ถูกค้นพบเป็นครั้งแรกในปี 1780 โดยนักเคมีชาวสวีเดน Carl Wilhelm Scheele ในปัจจุบันกรดแล็กติก เป็นกรดอินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบสำคัญต่ออุตสาหกรรมต่าง ๆ เป็นอย่างมาก เช่น อุตสาหกรรมอาหารโดยจะทำหน้าที่เป็นตัวช่วยเพิ่มกลิ่นรสให้กับอาหารนั้น อีกทั้งยังป้องกันการเน่าเสียในอาหารหมักดองอีกด้วย นอกจากนี้กรดแล็กติกยังมีความสำคัญกับอุตสาหกรรมการผลิตพลาสติกชีวภาพที่สามารถย่อยสลายได้ในธรรมชาติ (biodegradable plastic) โดยกำลังได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในปัจจุบัน เนื่องจากสามารถนำมาเข้ากระบวนการโพลิเมอร์ไรเซชัน (polymerization) เพื่อผลิตเป็นโพลีแล็กเตต ซึ่งสามารถใช้ทดแทนพลาสติกที่ผลิตจากอุตสาหกรรมปิโตรเคมีได้เป็นอย่างดี และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม (ศิริศันสนียกุล 2547)

กรดแล็กติกสามารถผลิตได้โดยกระบวนการทางชีวภาพจากการย่อยสลายน้ำตาลของเชื้อในกลุ่มแบคทีเรียกรดแล็กติก ภายใต้สภาวะไร้อากาศ (Huang, Jin *et al.* 2005) โดยที่สามารถใช้วัตถุดิบทางการเกษตรได้หลายชนิด เช่น กากน้ำตาลอ้อย (molasses), หางนม (whey), และ น้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งชนิดต่าง ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งแป้งมันสำปะหลังซึ่งเป็นพืชทางการเกษตรหลักของจังหวัดนครราชสีมา และหลังจากนั้นขั้นตอนที่สำคัญอีกขั้นตอนหนึ่งของกระบวนการผลิตกรด D-แล็กติกคือการสกัดและการทำให้บริสุทธิ์ (downstream processing) ซึ่งจะมีหลายทางเลือกโดยขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการใช้งานเป็นสำคัญ เช่นการใช้กรด D-แล็กติกในอุตสาหกรรมพลาสติกจะผลิตให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ร้อยละ 95 โดยจะต้องเป็นกรด D-แล็กติกที่ไม่มีสีและเกือบจะไม่มีกลิ่น สำหรับข้อเสนอของโครงการวิจัยนี้ได้ให้ความสำคัญถึงการใช้กรด D-แล็กติกสำหรับการผลิตพลาสติก

ชีวภาพ ซึ่งจะต้องใช้กรด D-แล็กติกที่มีเกณฑ์ของความบริสุทธิ์สูงมากและสามารถทนต่ออุณหภูมิสูงได้ กล่าวคือสารละลายกรด D-แล็กติกที่มีความบริสุทธิ์สูง โดยอาจจะต้องทำระดับคุณภาพให้อยู่ใน pharmaceutical grade ซึ่งทำให้การทำกรด D-แล็กติกให้บริสุทธิ์จะต้องใช้กระบวนการที่มีความซับซ้อนและมีต้นทุน

แต่อย่างไรก็ตามกระบวนการต่างๆ เช่น การใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในการสกัดกรดแล็กติก (organic solvent extraction) และกระบวนการ esterification ร่วมกับ hydrolysis จะไม่สามารถแยกสารผสมกรดแล็กติกที่อยู่ในรูปของไอโซเมอร์ (enantiomer) ได้ ทั้งนี้เนื่องจากสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของกรด D- และ L-แล็กติก นั้นมีค่าเดียวกัน ทำให้การกลั่นแยกนั้นไม่สามารถทำได้ นอกจากนี้แล้วความต้องการกรดแล็กติกในรูปของไอโซเมอร์ที่เป็น D- นั้น มีสูงขึ้นเรื่อยๆ อีกทั้งราคาของกรด D-แล็กติกนั้นมีค่าสูง ดังนั้นหากทำการการแยกกรด L- และ D-แล็กติกออกจากกัน เหลือเฉพาะกรด D-แล็กติก กับสารอื่นๆที่อาจปนมาจากกระบวนการต่างๆ หลังจากนั้น ก่อนที่จะเข้าสู่กระบวนการเอสเทอริฟิเคชันและไฮโดรไลซิส ซึ่งถือว่าเป็นกระบวนการที่มีประสิทธิภาพที่ดีที่สุดในการผลิตกรดแล็กติกบริสุทธิ์จากน้ำหมักซึ่งเป็นขั้นตอนที่จะทำการแยกกรดแล็กติกออกจากกรดอินทรีย์ชนิดอื่น ๆ เจือปนอยู่ ทำให้ได้กรด D-แล็กติกบริสุทธิ์สูง เพื่อนำไปประยุกต์ใช้เป็นประโยชน์ต่อไป ด้วยเหตุนี้ในงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นในการทำบริสุทธิ์กรด D-แล็กติก ซึ่งจำเป็นที่จะต้องทำงานวิจัย พื้นฐาน เพื่อที่จะทำการแยกกรดแล็กติกทั้งสองออกจากกัน รูปภาพ 1 แสดงลักษณะการเกิด chiral ของกรดแล็กติก



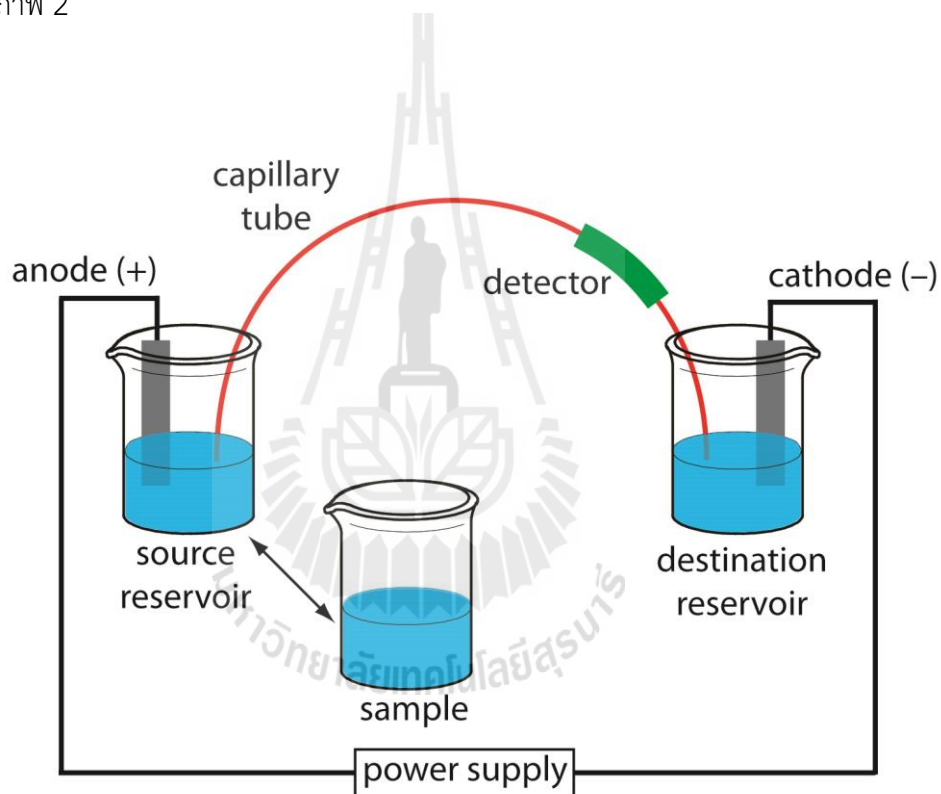
รูปภาพ 1.1 โครงสร้างทางเคมีและลักษณะการเกิดไอโซเมอร์ของกรด L- และ D-แล็กติก

1.3 การแยกสารไครอล (Chiral separation)

1.3.1 การแยกสารไครอลด้วยวิธีทางกายภาพ

การแยกสารไครอลด้วยวิธีการกายภาพมีการประยุกต์ใช้อยู่แล้วในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟี เช่น HPLC และ Gas chromatography เป็นต้น โดยเป็นการใช้ สารที่มีสมบัติในการเป็นตัวคัดเลือกสารไครอลหรือที่เรียกว่า (Chiral selector) มาใช้เป็นส่วนผสมในการผลิต packing สำหรับคอลัมน์ ซึ่งโดยทั่วไปแล้วจะใช้สารประเภทไซโคเด็คตริน (cyclodextrin) มาทำการปรับสภาพและทำการเติมหมู่ฟังก์ชันบางชนิดลงไป แต่อย่างไรก็ตามการใช้เทคนิค HPLC หรือ GC นั้นมีข้อจำกัดที่สำคัญคือ สามารถประยุกต์ใช้กับตัวอย่างในปริมาณเล็กน้อยเท่านั้น และไม่สามารถทำการแยกแบบต่อเนื่องได้ ดังนั้นจึงมีงานวิจัยงานวิจัยเกี่ยวกับการแยกโดยใช้เยื่อแผ่น (membrane separation process) ซึ่งเป็นงานวิจัยทางวัสดุศาสตร์ในการขึ้นรูปเมมเบรนหรือเยื่อแผ่น ซึ่งการแยกไอโซเมอร์ของกรดแล็กติกด้วยเมมเบรนนี้ จำเป็นที่จะต้องทำการปรับสภาพพื้นผิวของเยื่อแผ่นด้วยการใช้สารเคมีที่มีความสามารถในการคัดเลือกการเกิดพันธะเคมีกับไอโซเมอร์ชนิดใดชนิดหนึ่งได้ โดย chiral selector อาจอยู่ในรูปของ L หรือ D ก็ได้ ซึ่งสารเหล่านี้เป็นสารในกลุ่มเดียวกับที่นำมาประยุกต์ใช้ในการผลิต packing สำหรับคอลัมน์เพื่อใช้ในการแยกสารไครอลด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีหรือในเครื่อง HPLC นั่นเอง ซึ่งตำแหน่งของ chiral selector นั้น สามารถที่จะทำการปรับให้อยู่บริเวณพื้นผิวหรือในเนื้อของเมมเบรนเลยก็ได้ จากนั้นจะนำเยื่อแผ่นดังกล่าวไปทดสอบการแยกกรด D- และ L-แล็กติกต่อไป โดยอาจจะทำให้อยู่ในรูปทรงต่าง ๆ เช่นแบบแผ่นเรียบ หรือแบบท่อกลวง เป็นต้น ซึ่งมีข้อได้เปรียบที่สำคัญคือสามารถทำการขยายกำลังการผลิต (scale up) ได้ง่าย และใช้พลังงานที่ต่ำ โดยอาจจะนำไปประยุกต์ใช้ในระบบต่าง ๆ เช่น supported liquid membrane (Yang and Chung, 2007) การใช้ความต่างของความดันเป็นแรงขับเพื่อทำให้เกิดการถ่ายเทมวลเกิดขึ้น (pressure driven process) เช่นอัลตราฟิลเตรชัน เป็นต้น (Hadik et al., 2005b) และการใช้แรงขับเคลื่อนทางไฟฟ้าที่เรียกว่าคะพิลลารีอิเล็กโทรโฟเรซิส (capillary electrophoresis, CE) ก็เป็นอีกเทคนิคหนึ่งของการแยกสารในหลอดคะพิลลารีขนาดเล็กที่บรรจุสารละลายอิเล็กโทรไลต์ (background electrolyte, BGE) ภายใต้อิทธิพลของสนามไฟฟ้า กระแสตรง หลักการแยกสารในเทคนิค capillary electrophoresis อาศัยความแตกต่างของความสามารถของการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้า (electrophoretic mobility, μ) ซึ่งขึ้นกับอัตราส่วนระหว่างประจุต่อขนาดของไอออน ส่วนประกอบพื้นฐานของเครื่อง capillary electrophoresis แสดงได้ดัง Error! Reference source not found. ซึ่งส่วน ประกอบพื้นฐานที่สำคัญของระบบดังกล่าว ได้แก่ คะพิลลารีที่ใช้กันโดยทั่วไปเป็น hollow fiber capillary ที่ภายในประกอบด้วยเฟสอยู่กับที่ (stationary phase) เคลือบด้วยสาร chiral selector นอกจากนี้ยังประกอบ ด้วย

สารละลายอิเล็กโทรไลต์ หรือ BGE ซึ่งส่วนใหญ่เป็นบัฟเฟอร์บรรจุอยู่ในขวดบรรจุ ที่มีปลายทั้งสองข้างของคะพิลลารีจุ่มอยู่ เครื่องกำเนิดศักย์ไฟฟ้า (Direct current voltage source) ขั้วไฟฟ้า (electrode) ส่วนใหญ่เป็นโลหะแพลทินัม (platinum) และเครื่องตรวจวัด (detector) ซึ่งส่วนใหญ่นิยมใช้เครื่องตรวจวัดการดูดกลืนรังสียูวี-วิสิเบิล (UV-Vis) เพื่อทำการวัดการแยกไอโซเมอร์ต่าง ๆ ที่แยกกันภายในท่อโยกลวดดังกล่าว โดยที่กรดเล็กติกเมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นกลางจะกลายเป็นเล็กเตทซึ่งสามารถเคลื่อนที่ได้ภายใต้สนามไฟฟ้ากระแสตรงโดยจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วบวก (cathode) ดังแสดงในรูปภาพ 2



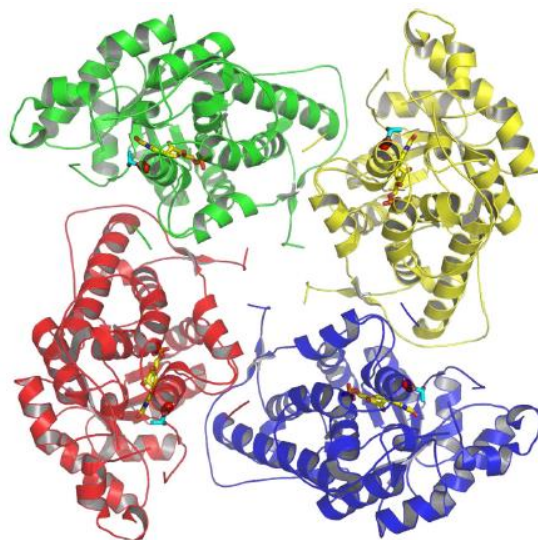
รูปภาพ 1.2 การจัดการทดลองเครื่องคะพิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิสสำหรับการแยกสารโครลออกจากกัน (<http://chemwiki.ucdavis.edu>)

แต่อย่างไรก็ตามค่าของฟลักซ์หรือการถ่ายเทมวลจำเพาะของกรดเล็กติกนั้น ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลัก 2 อย่างคือค่าสัมประสิทธิ์การแยกของเมมเบรนที่ผลิตได้และความเข้มข้นของกรดเล็กติกในด้านของสารป้อน ซึ่งหากประสิทธิภาพการแยกของเมมเบรนไม่ดีก็จะทำให้สัดส่วนของกรด D- และ L-เล็กติกในด้านของสารป้อนและด้านของส่วนที่กรองได้ (filtrate) มีค่าที่ไม่แตกต่างกันมากนัก

นอกจากนี้หากความเข้มข้นของกรดแล็กติกในด้านของสารป้อนต่ำ ก็จะทำให้อัตราการถ่ายเทมวลจำเพาะมีค่าต่ำไปด้วย

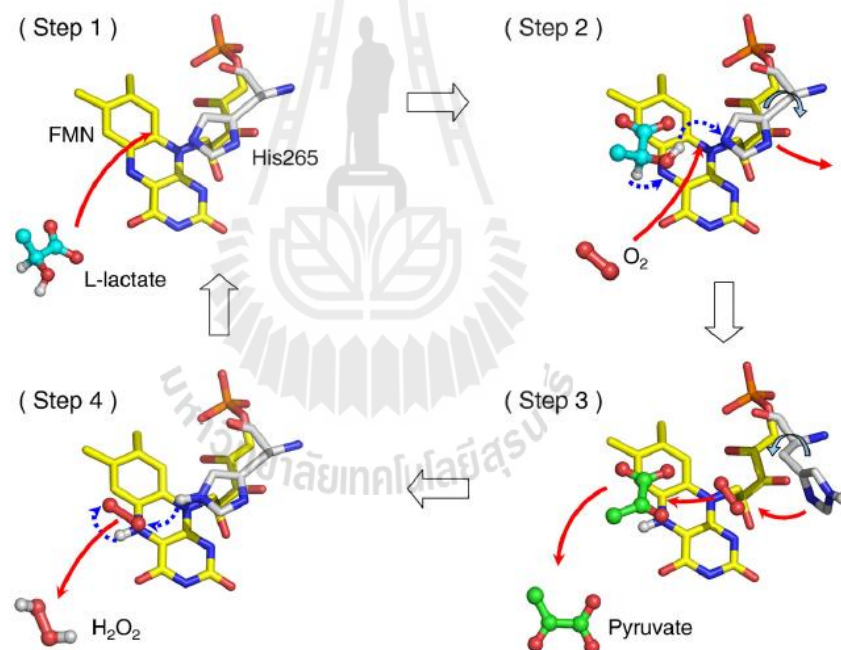
1.3.2 การแยกสารโครอลด้วยวิธีทางชีวภาพ

นอกจากการแยกสารโครอลด้วยวิธีทางกายภาพแล้ว อีกแนวความคิดหนึ่งที่มีความเป็นไปได้มากคือการใช้วิธีทางชีวภาพ (Biological methods) ซึ่งเป็นการประยุกต์ใช้เอ็นไซม์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับกรดแล็กติกชนิดใดชนิดหนึ่ง จากการที่ได้ศึกษามาก่อนหน้านี้พบว่าการผลิตกรด D-แล็กติกมีความยากมากกว่าการผลิตกรด L-แล็กติก อีกทั้งเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกส่วนมากจะผลิต กรด L-แล็กติก (Nampoothiri *et al.*, 2007) ซึ่งทำให้ทั้งกระบวนการผลิตจากการหมักและกระบวนการทำบริสุทธิ์ของกรด D-แล็กติกมีความยุ่งยากซับซ้อนมากยิ่งขึ้น ซึ่งโดยปรกติแล้วมักจะใช้เอ็นไซม์ที่เจาะจงกับกรด L-แล็กติกในการเปลี่ยนหรือย่อยสลายกรดดังกล่าว ซึ่งเอ็นไซม์ที่ได้ถูกศึกษาอย่างกว้างขวางคือ L-lactate oxidase ซึ่งเป็นเอ็นไซม์ในกลุ่มเดียวกันกับ homologous flavin mononucleotide (FMN)-dependent α -hydroxy acid-oxidizing enzymes ซึ่งเอ็นไซม์ในตระกูลนี้สามารถพบได้ทั้งในโปรคาริโอตและยูคาริโอต รวมทั้งในพืชและสัตว์ ซึ่งกลไกการทำงานของเอ็นไซม์นี้จะทำหน้าที่ในการออกซิไดซ์สารตั้งต้นที่เป็นมีหมู่ฟังก์ชันคาร์บอกซิลิกที่มีการจัดเรียงตัวในรูปแบบอัลฟา (α -hydroxy acid) ให้มีผลิตภัณฑ์เป็นกรดคีโต (keto acid) ซึ่งจะมีทั้งหมู่ฟังก์ชันคีโตนและคาร์บอกซิลิกในโมเลกุลเดียวกัน ซึ่งในกรณีของกรด L-แล็กติก กรดคีโตดังกล่าวก็คือกรดไพรูวิกนั่นเอง ในขณะที่เดียวกันฟลาวินจะถูกรีดิวซ์ให้กลายเป็นไฮโดรควิโนน ในขั้นตอนถัดมาไฮโดรควิโนนจะถูกออกซิไดซ์อีกครั้งหนึ่งด้วยตัวรับอิเล็กตรอน ซึ่งในที่นี้คือโมเลกุลของออกซิเจนซึ่งจะกลายเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide, H_2O_2)



รูปภาพ 1.3 แสดงโครงสร้างของเอ็นไซม์ L-lactate oxidase (Umena *et al.*, 2006)

Umena et al., 2006 ได้ทำการศึกษาลักษณะของเอ็นไซม์ L-lactate oxidase โดยพบว่าเอ็นไซม์ดังกล่าวประกอบไปด้วยหน่วยย่อย 4 หน่วย (sub-unit) ที่เหมือนกัน ซึ่งในแต่ละหน่วยย่อยจะมีการจัดเรียงตัวกันของกรดอะมิโนทั้งในแบบเกลียว (helix) และแบบแถบ (ribbon) โดยจะเกาะอยู่กับสาร cofactor ชนิด FMN ซึ่งตำแหน่งกัมมันต์หรือ active site จะอยู่บริเวณด้านปลายของแถบเบต้า (β -strands) ในขณะที่อาจินีน 268 (Arg268) และไทโรซีน 40 (Tyr40) จะทำหน้าที่ในการสร้างพันธะกับกลุ่มคาร์บอกซิลของกรด L-แล็กติก ในขณะที่ฮิสติดีน 265 (His265) จะทำหน้าที่ในการดึงโปรตอน ณ ตำแหน่งอัลฟา (α -proton) ของกรด L-แล็กติก ไลซีน 241 (Lys241) ทำหน้าที่ในการเพิ่มความเสถียรให้กับฟลาวิน และ ไทโรซีน 146 ทำหน้าที่ในการสร้างพันธะกับหมู่ฟังก์ชันไฮดรอกซิลของสารตั้งต้น (รูปภาพ 3)



รูปภาพ 1.4 กลไกการออกซิไดซ์กรด L-แล็กติกไปเป็นกรดไพรูวิกและ H₂O₂ (Furuichi et al, 2008)

Furuichi et al, 2008 ได้ทำการศึกษาเอ็นไซม์ L-lactate oxidase (รูปภาพ 4) โดยได้นำเสนอแนวคิดสำหรับกลไกการออกซิไดซ์กรด L-แล็กติกให้เป็นกรดไพรูวิกและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ดังนี้ ในขั้นตอนแรกนั้น กรด L-แล็กติกจะเข้าไปจับกับตำแหน่งกัมมันต์ (active site) ของเอ็นไซม์กลายเป็นสารประกอบเชิงซ้อนเอ็นไซม์กับซับสเตรท (enzyme substrate complex) โดยในขั้นตอนที่ 1 พันธะC α -H และ C α O-H ของกรด L-แล็กติกจะถูกทำให้ไม่เสถียร ในขณะเดียวกันโคแฟกเตอร์ FMN จะถูกรีดิวซ์โดยการเติมโปรตอนไปที่กรดอะมิโนฮิสติดีน (His265) ก่อนที่โมเลกุล

ของออกซิเจนจะเข้ามา ณ ตำแหน่งบริเวณที่มีการจับกรด L-แล็กติกเพื่อทำหน้าที่ในการรับโปรตอน จาก His265 กลายเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ก่อนที่จะหลุดจากตำแหน่งกัมมันต์ตามกรดไพรูวิกออกไป ในขณะเดียวกันนั้น FMN ก็อยู่ในสถานะที่ถูกออกซิไดซ์เรียบร้อยแล้วโดย His265 สูญเสียโปรตอนไป เพื่อให้มีความพร้อมสำหรับการออกซิไดซ์กรด L-แล็กติกในรอบถัดไป

ในปัจจุบันนั้นได้มีการใช้เทคนิคต่าง ๆ หลายเทคนิคเช่นการใช้เทคนิคทางชีวภาพในการผลิต D-แล็กติกจากของผสมไอโซเมอร์ D- และ L-แล็กติก ด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas stutzeri* SDM ซึ่งเชื่อกันว่ามีเอ็นไซม์ L-lactate oxidase ซึ่งจะทำให้การเปลี่ยนกรด L-แล็กติกให้กลายเป็นกรดไพรูวิก และจะเหลือแต่กรด D-แล็กติกอยู่ในน้ำหมักอย่างเดียว จากนั้นกรดไพรูวิกและ กรด D-แล็กติก สามารถแยกออกจากกันได้โดยใช้เทคนิคการแลกเปลี่ยนประจุ (ion exchange) เพียงขั้นตอนเดียว (Gao *et al.* 2009) ซึ่งการที่เชื้อแบคทีเรียดังกล่าวมีความสามารถในการใช้ L-แล็กติกเป็นแหล่งคาร์บอนได้ อย่างไรก็ตามเอ็นไซม์ L-lactate oxidase สามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์หลากหลายชนิดดังที่ได้กล่าวไป แต่มีรายงานว่าเอ็นไซม์ที่ได้จะมีความไม่คงตัว อาจเกิดการเปลี่ยนแปลงหรือเสื่อมสภาพได้ง่าย

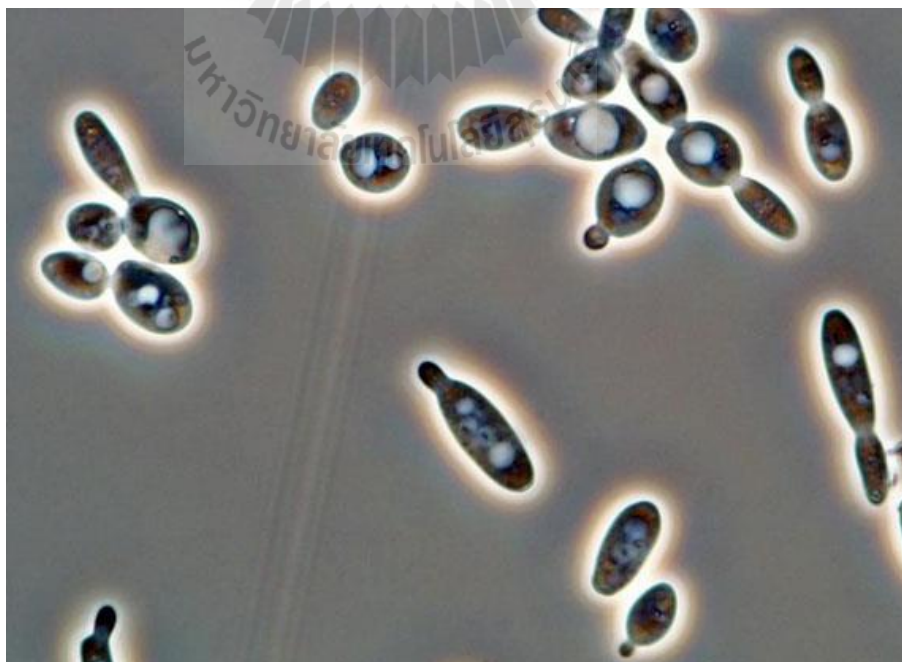
Biryukova *et al.*, 2009 ได้ทำการศึกษาถึงการแสดงออกของเอ็นไซม์ L-lactate oxidase ในยีสต์ *Yarrowia lipolytica* โดยการใช้กรด L-แล็กติกความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน โดยจากการทดลองพบว่ากิจกรรมของ L-lactate oxidase มีมากเมื่อใช้กรด L-แล็กติกเป็นแหล่งคาร์บอน (148 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein) แต่เมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ปรากฏว่าพบกิจกรรมของเอ็นไซม์ดังกล่าวเพียง (28 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein) นอกจากนี้ ยังค้นพบว่ากิจกรรมของเอ็นไซม์ดังกล่าวมีความสัมพันธ์โดยตรงกับการเจริญของเซลล์ โดยเมื่อความเข้มข้นของกรด L-แล็กติกในอาหารเหลวหมดลง เชื้อยีสต์หยุดการเจริญและกิจกรรมของเอ็นไซม์มีค่าคงที่ (เชื้อยีสต์หยุดการสังเคราะห์เอ็นไซม์) ในขั้นตอนสุดท้ายได้มีการศึกษาถึงตำแหน่งของเอ็นไซม์นี้ภายในเซลล์ยีสต์ โดยการทำเซลล์ให้แตกก่อนที่จะแยกส่วนของผนังเซลล์ออกจากส่วนของของเหลว ซึ่งผลการทดลองระบุว่าเอ็นไซม์นี้เกาะอยู่ที่ผนังเซลล์เพียงแค่อ้อยละ 5 เท่านั้น ส่วนที่เหลือทั้งหมดปรากฏอยู่ใน cytoplasm ภายในเซลล์

1.4 *Yarrowia lipolytica*

ได้มีรายงานเชื้อจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่งที่มีความสามารถในการผลิตเอ็นไซม์ดังกล่าว คือ เชื้อ *Yarrowia lipolytica* ที่เป็นยีสต์ที่สามารถหาซื้อได้ง่ายและมีการประยุกต์ใช้ในงานด้านต่าง ๆ เช่น การผลิตเอ็นไซม์ไลเปส การบำบัดน้ำเสียที่มีน้ำมันและไขมันเป็นจำนวนมาก เป็นต้น เนื่องจากเพื่อให้เกิดองค์ความรู้ใหม่ พร้อมทั้งเป็นการเปรียบเทียบ เพื่อพัฒนากระบวนการต่างๆ ได้ ดังนั้น จึงเลือก

ทำการศึกษาโดยใช้เชื้อยีสต์สายพันธุ์นี้ เนื่องจากสามารถเพาะเลี้ยงได้ง่าย และสามารถหาซื้อได้ โดยได้มีการขอรับบริการเชื้อสายพันธุ์จุลินทรีย์จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ที่มีรหัสคือ *Yarrowia lipolytica* TISTR 5621 จากนั้นทำการศึกษารายละเอียดเบื้องต้น ในด้านการเลี้ยงเชื้อ และสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อ พร้อมทั้งจะพัฒนาในการเลี้ยงเชื้อเพื่อ กระตุ้นให้เชื้อมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ L-lactate oxidase และทำการตรึงเซลล์เพื่อใช้เป็น biocatalyst ก่อนที่จะนำไปใช้ในการทำปฏิกิริยากรด D- แล็กติกจากสารละลายผสมของกรด D- และ L-แล็กติกในถังปฏิกรณ์ชีวภาพในแบบ plug flow ต่อไป

เชื้อยีสต์ *Yarrowia lipolytica* เป็นหนึ่งในเชื้อยีสต์ชนิด “non-conventional” ที่มีการศึกษากันอย่างกว้างขวาง โดยเป็นจุลินทรีย์ที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ (strictly aerobe) และสามารถผลิตสาร metabolites ที่สำคัญหลายชนิด สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น ตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพ (biocatalyst), อนุชีววิทยา และพันธุศาสตร์ศึกษา เป็นต้น ถือว่าเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค nonpathogenic อีกทั้งยังถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มที่มีความปลอดภัยในการใช้งาน (Generally Recognized As Safe, GRAS) โดยองค์การอาหารและยา (FDA สหรัฐอเมริกา) นอกจากนี้ *Y. lipolytica* ยังได้ถูกศึกษาถึงแบบจำลองการเกิดสองลักษณะ (dimorphism) ภายใต้สภาวะแวดล้อมที่แตกต่างกัน โดยที่เชื้อยีสต์นี้จะผลิตเยื่อใยเทียม (pseudo-hyphae) ในสภาวะที่มี ไนโตรเจนไม่เพียงพอ



รูปภาพ 1.5 แสดงลักษณะรูปร่างของเซลล์ยีสต์ *Yarrowia lipolytica* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

(www.biotechnologie.de)

เชื้อยีสต์ *Yarrowia lipolytica* ได้กลายเป็นเชื้อที่มีการศึกษาอย่างกว้างขวางสำหรับการแสดงออกของโปรตีนทั้งในด้านของงานวิจัยและการประยุกต์ใช้งานในอุตสาหกรรม เนื่องจากมีความสามารถในการขับโปรตีนและเอ็มไซม์ที่สูง มีการเติมน้ำตาลลงไปโมเลกุลของโปรตีนที่ต่ำ (low glycosylation) และมีผลผลิตสูง โดยหนึ่งในผลิตภัณฑ์สำคัญที่สุดของยีสต์ดังกล่าวคือเอนไซม์ไลเปส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ดึงดูดความสนใจของนักวิทยาศาสตร์และนักวิจัยอุตสาหกรรมเป็นอย่างมาก เนื่องจากสามารถนำไปสำหรับใช้งานในผงซักฟอก อาหาร ยา และสิ่งแวดล้อมอุตสาหกรรม โดยเฉพาะอย่างยิ่งการประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำเสียที่มีไขมัน นอกจากนี้แล้วยังได้มีการศึกษาการผลิตกรดซิตริกจากแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ เช่นน้ำตาล อัลเคน น้ำมันพืช แป้ง และกลีเซอรอล ซึ่งเป็นผลพวงได้หลักจากการผลิตน้ำมันไบโอดีเซลอีกด้วย

Yarrowia lipolytica มีความสามารถในการย่อยสลายสารอินทรีย์ได้หลายชนิดรวมถึงน้ำมันและไขมัน กรดไขมัน ไฮโดรคาร์บอนชนิดสายโซ่ (aliphatic) และ แบบวงแหวน (aromatic) โดยมักจะมีการสร้างสารลดแรงตึงผิว (biosurfactants) ประเภทไกลโคลิปิดบริเวณพื้นผิวด้านนอกของเยื่อหุ้มเซลล์ตามมาอยู่เสมอ ซึ่งหน้าที่หลักของสารไกลโคลิปิด คือการขนส่งแหล่งคาร์บอนที่เป็นสารประเภทที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) เข้าสู่เซลล์ ซึ่งจะมีการเปลี่ยนสถานะจาก organic phase ที่พื้นผิวด้านนอกของเยื่อหุ้มเซลล์ โดยจะมีลักษณะการสัมผัสของเม็ดน้ำมันบนเยื่อหุ้มเซลล์ที่มีไกลโคลิปิดนี้เป็นตัวช่วยประสาน นอกจากนี้ *Yarrowia lipolytica* ยังมีความสามารถที่จะใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆ เช่นน้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตสและแมนโนส โดยน้ำตาลใดหรือไตรแซคคาไรด์ จะมีการย่อยที่นอกเซลล์ก่อนที่จะมีการนำเข้าสู่เซลล์โดยอาศัยกลไกการลำเลียงแบบใช้พลังงาน (active transport) นำน้ำตาลดังกล่าวเข้าสู่เซลล์เพื่อเข้าสู่วิถีไกลโคไลซิสสำหรับกระบวนการหายใจต่อไป

Barth และ Gaillardin, 1997 ได้ศึกษาการใช้เอทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนของ *Yarrowia lipolytica* โดยได้พบว่าที่ความเข้มข้นไม่เกินร้อยละ 3 โดยน้ำหนัก เชื้อยีสต์ดังกล่าวสามารถเจริญบนอาหารที่มีเอทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนหลักได้ หากความเข้มข้นของเอทานอลสูงกว่านี้ก็จะเกิดความเป็นพิษขึ้นและยับยั้งการเจริญ โดยพบว่าการสร้างเอนไซม์ชนิด alcohol dehydrogenase ขึ้นภายในเซลล์

กลีเซอรอลอาจจะใช้เป็นแหล่งคาร์บอนภายใต้สภาวะที่มีอากาศโดยเชื้อยีสต์หลายชนิดรวมถึง *Yarrowia lipolytica* ด้วย โดยผ่านทางวิถี glycerol-3-phosphate หรือ di-hydroxyacetone ซึ่งในขั้นตอนแรกกลีเซอรอลจะถูกออกซิไดซ์ให้เป็น di-hydroxyacetone โดยเอนไซม์ glycerol dehydrogenase ก่อนที่จะมีการเติมหมู่ฟอสเฟตให้เป็น di-hydroxyacetone phosphate โดย di-hydroxyacetone kinase นอกจากนี้ Papanikolaou และคณะ (2002) ได้ศึกษาการเจริญของ *Yarrowia lipolytica* โดยใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนหลักเพื่อใช้ในการผลิตกรดซิตริก พบว่า

สามารถผลิตกรดซिटริกได้ 35 กรัมต่อลิตรโดยใช้อาหารเหลวที่มีกลีเซอรอลความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตรและมีแหล่งไนโตรเจนที่จำกัด

Rodrigues และ Pais, 1997 ค้นพบว่าเชื้อ *Yarrowia lipolytica* มีความสามารถที่จะใช้แหล่งคาร์บอนชนิดที่เป็นกรดอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ได้ เช่น กรดอะซีติก กรดแล็กติก กรดโพรปิโอนิก กรดมาลิก กรดซัคซินิก กรดซิทริกและกรดโอลลิก เป็นต้น ซึ่งตัวแปรต่าง ๆ เช่นการเจริญจำเพาะ จะขึ้นอยู่กับค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักเป็นสำคัญ อย่างไรก็ตามกรดต่าง ๆ เหล่านี้มีความเป็นพิษต่อเซลล์สูง (toxicity effect) โดยสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อยีสต์ได้ที่ความเข้มข้นที่มากกว่าร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก

เอนไซม์ L-lactate oxidase เป็นเอนไซม์ที่อยู่ในเซลล์ (intracellular enzyme) (Kupletskaya *et al.* 2007) และเอนไซม์นี้มีปริมาณที่สามารถพบได้ในส่วนอื่น ๆ ของเซลล์ เช่น membrane fraction ที่พบปริมาณเอนไซม์ประมาณ 1.5 หน่วยของเอนไซม์ต่อมิลลิลิตร และพบได้ที่ soluble fraction ประมาณ 38.5 หน่วยของเอนไซม์ต่อมิลลิลิตร ดังนั้นการย่อยสลายของกรด L-แล็กติกนั้น จะเกิดขึ้นภายในเซลล์ หากทำการตรึงเซลล์ไว้ สารตั้งต้นสำหรับเอนไซม์นี้คือ L-lactate ที่อยู่ในถังปฏิกรณ์จะแพร่เข้าสู่ภายในเซลล์ เกิดปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ภายใน ซึ่งถือเป็นผลผลิตของเอนไซม์ภายในเซลล์ นั่นคือ มีการสร้างผลผลิตหรือ metabolite ที่เกิดขึ้นจากการทำงานของเอนไซม์อยู่ภายใน ถึงแม้จะมีการแพร่ออกนอกเซลล์ แต่ถือว่ามีปริมาณไม่มากนัก เป็นการง่ายต่อการทำบริสุทธิ์กรด D-lactic ในขั้นสุดท้าย อย่างไรก็ตามหลังจากที่เชื้อ *Yarrowia lipolytica* จะนำ L-lactate ไปใช้ได้ก็ตาม ก็อาจจะมีการสร้างสารอื่น ๆ เกิดขึ้น ดังนั้นสำหรับสารปนเปื้อนในระบบสามารถทำการแยกออกจากกรด D-แล็กติกได้โดยใช้ระบบการกรองแบบนาโนฟิวเตรชัน (nanofiltration, NF) ที่มีอยู่แล้วในห้องปฏิบัติการ ทำให้ระบบมีความครอบคลุมที่จะสามารถทำบริสุทธิ์กรด D-แล็กติก ได้ตามต้องการ นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยเพิ่มเติมในการศึกษาเอนไซม์ L-lactate oxidase ในตัวเซลล์ยีสต์ *Yarrowia lipolytica* โดยมีการสกัดเอนไซม์ดังกล่าวออกมาเพื่อใช้ทางการค้า และประยุกต์ใช้ได้เกี่ยวกับ electrochemical sensor (Sztajer *et al.* 1996) เพื่อเป็นตัววัดผลได้อย่างอัตโนมัติ และสิ่งที่มีประโยชน์ที่สามารถนำมาเป็นข้อมูลสำคัญที่เชื่อมโยงในงานวิจัยนี้คือ ได้มีการศึกษาแล้วว่าเอนไซม์ L-lactate oxidase สามารถตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกิดขึ้นได้ง่าย

การคัดแยกเชื้อที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ L-lactate oxidase ได้มีการศึกษาโดยใช้อาหารวุ้นที่มี L-lactate และเกลือแร่อื่นๆเล็กน้อย เพื่อให้เพียงพอสำหรับการเจริญ เชื้อจุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์นี้ได้ จะขึ้นเป็นโคโลนีอย่างเห็นได้ชัด นั้นหมายความว่าสามารถย่อยสารตั้งต้นได้ โดยสภาวะการบ่มอยู่ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส เวลาที่ความเร็รรอบ 180 รอบต่อนาที พร้อมทั้งให้

อากาศเล็กน้อย จะเกิดเป็นโคโลนีขนาด 20 มิลลิเมตร (Kupletskaya, Sukacheva et al. 2007) สำหรับการเจริญของยีสต์สายพันธุ์นี้นั้น ได้มีการศึกษาเลี้ยงยีสต์ในอาหารที่มีกลูโคสแต่ไม่มี lactate พบว่ายีสต์ *Yarrowia lipolytica* จะไม่ผลิตเอนไซม์ lactate oxidase แต่หากเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีกลูโคส มีเพียง lactate พบว่ายีสต์สามารถสร้างเอนไซม์ขึ้นได้ ปริมาณ 15 ยูนิต (U) ต่อลิตร ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า lactate สามารถเป็นแหล่งสารอาหารให้กับยีสต์ อีกทั้งควรมีการเขย่าวงการเลี้ยงเพื่อเพิ่มการผลิตเอนไซม์ได้อีกทางหนึ่ง อีกทั้งมีข้อมูลพบว่า *Yarrowia lipolytica* จะมีการสร้างเซลล์โดยสามารถวัดความเข้มข้นของเซลล์ได้สูงและกิจกรรมของเอนไซม์ L-lactate oxidase ทำงานได้เป็นอย่างดี เมื่ออยู่ในอาหารที่มี lactate อยู่ ดังนั้นโครงการนี้ซึ่งสารละลายที่อยู่ในถังปฏิกรณ์มีทั้ง L-lactate จึงถือได้ว่าเป็นเป็นสารตั้งต้นหรือแหล่งสารอาหารอย่างดีให้กับยีสต์ นอกจากนี้ความสามารถของเอนไซม์ L-lactate oxidase นั้น พบว่า จะมีประสิทธิภาพสูงสุด เมื่อเซลล์อยู่ใน ระยะ exponential phase หลังจากนั้นทำการกระตุ้นอย่างอ่อน (Biryukova et al., 2009)

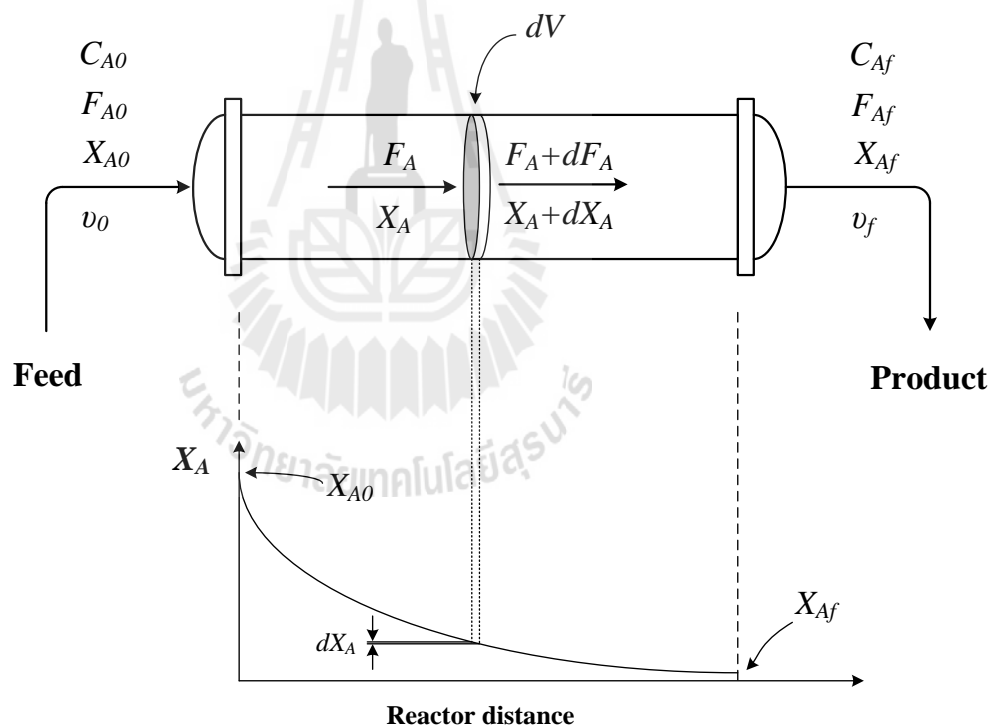
1.5 การตรึงเซลล์ (Cell immobilization)

การตรึงเซลล์หรือ cell immobilization เป็นการทำให้เซลล์จุลินทรีย์เกาะอยู่กับสารตัวกลาง แต่ยังสามารถแลกเปลี่ยนสารอาหาร ออกซิเจน และผลิตภัณฑ์ระหว่างเซลล์กับของเหลวในถังหมักได้ แต่เซลล์จะอยู่ในสภาวะสภาพแวดล้อมที่ต่างจากในของเหลวส่วนรวม เช่นไม่พบกับแรงเฉือนของใบพัด นอกจากนี้เซลล์จะไม่ไหลออกจากถังหมักในระบบต่อเนื่อง ดังนั้นจึงสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการหมักได้ เนื่องจากสามารถใช้อัตราการเจือจาง (dilution rate) ได้สูงกว่าอัตราการเจริญสูงสุด นอกจากนี้จุลินทรีย์ยังทำให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์สูง และเซลล์อาจมีการผลิตสารต่างๆ ที่แตกต่างจากสภาพอิสระ และยังช่วยลดค่าใช้จ่ายในการแยกผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมัก โดยไม่ต้องกรองเอาเซลล์ออกจากน้ำหมักแต่การตรึงเซลล์ต้องคำนึงถึงข้อจำกัดด้านการถ่ายเทมวลสาร ที่จะต้องส่งสารอาหาร ออกซิเจน และผลิตภัณฑ์ให้ถ่ายเทเข้าออกสู่อาหารเลี้ยงเชื้อได้

การตรึงเซลล์นั้น พบว่ามีข้อดีหลายประการ คือ ทำให้เอนไซม์ในตัวเซลล์มี activity สูง มีความคงตัวสามารถควบคุมระบบได้ง่าย นั่นคือ เซลล์มีการรวมกลุ่มกันไม่เกิดการกระจัดกระจายในถังปฏิกรณ์ อีกทั้งหลังจากสิ้นสุดกระบวนการสามารถแยกเซลล์ออกได้ง่าย (Lan et al., 2009) เพื่อต้องการเฉพาะกรด D-แล็กติกในถังปฏิกรณ์ อีกทั้งการตรึงเซลล์โดยใช้แคลเซียมแอลจีเนตยังมีรายงานว่านิยมใช้ในการตรึงทั้งตัวเซลล์และเอนไซม์ได้เป็นอย่างดี เนื่องจากมีความเป็นพิษต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับสารโพลีเมอร์ที่นำมาตรึง ทั้งนี้สามารถเกิดเป็นเจลได้ง่าย และมีราคาถูก (Gonzalez et al., 2001) สำหรับการตรึงเซลล์ที่มีชีวิต เพื่อทำการศึกษางานของเอนไซม์ภายใน นั้นพบว่าสามารถทำได้ง่าย แต่มีสิ่งที่จะต้องคำนึงถึงคือ การต่อต้านการถ่ายเทมวลจากสารตั้งต้นในระบบ จากการ

แพร่หรือแม้กระทั่งจากผลผลิตที่อาจก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ถูกตรึงไว้ (Wang) เม็ดเจลที่ตรึงเซลล์เอาไว้ นั้น ควรมีความระมัดระวังไม่ให้เจลแตกได้ เพราะทำให้เซลล์ที่อยู่ภายในหลุดออกมาได้ ดังนั้นจึงควรทำการควบคุมสภาวะแวดล้อมทั้งให้มีความเหมาะสมกับการเจริญของเซลล์ และเหมาะสมต่อการสร้างผลผลิตในระบบ อีกทั้งการตรึงเอนไซม์สำหรับในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ เพื่อให้เกิดการใช้ประโยชน์จากสารตั้งต้นต่างกันได้ ดังนั้นจึงถือว่ามีหลักฐานจากการทบทวนวรรณกรรมแล้วว่า มีความเป็นไปได้อย่างมากที่จะทำการตรึงเชื้อยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์นี้ สำหรับนำ L-lactate ไปใช้ประโยชน์ได้ด้วย

1.5.1 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพสำหรับการตรึงเซลล์ (Bioreactor for immobilized cells)



รูปภาพ 1.6 การวิเคราะห์สมดุลมวลของถังปฏิกรณ์แบบท่อไหลสำหรับการทำบริสุทธิ์กรด D-แล็กติก

ในถังปฏิกรณ์จะมีการเติมสารละลายผสมสังเคราะห์ D- และ L-แล็กเตท เช่นเดียวกับในระบบการหมักกรดแล็กติกจากแบคทีเรียกรดแล็กติก ในการศึกษาที่มีความสนใจใน D-แล็กติก ดังนั้นจากการทบทวนวรรณกรรมเบื้องต้น พบว่ามีเชื้อที่สามารถผลิตเฉพาะ D-แล็กติก ได้

แต่ในระหว่างกระบวนการหมักหรือการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ เชื้อแบคทีเรียที่ผลิต L- แล็กติก สามารถเกิดการปนเปื้อนได้ เพราะเชือดังกล่าวมีความสามารถในการเจริญและแข่งขันได้ดีกับเชื้อผลิต D- แล็กติก ทำให้เกิดการปนเปื้อนของระบบขึ้น การปนเปื้อนนี้ไม่สามารถที่จะแยกออกได้โดยง่าย จึงใช้เอนไซม์ ภายในเซลล์ของ *Yarrowia lipolytica* ที่ได้ทำการตรึงไว้แล้ว นำมา packed ลงใน column และใส่ลงในถังปฏิกรณ์ที่ทำการศึกษานในงานวิจัยนี้ หรือสามารถประยุกต์ใช้ในการหมัก โดยมีการดำเนินการภายหลังกระบวนการหมักสิ้นสุดลง เซลล์ที่ตรึงไว้กับสารละลายสังเคราะห์ภายในถัง จะมีการแพร่หากัน มีการสัมผัสระหว่างสารละลายกับเซลล์ เอนไซม์ L-lactate oxidase ที่สร้างขึ้น ภายในเซลล์ จะมีการใช้ L-lactate ที่แพร่เข้าไป ทั้งนี้การออกแบบถังปฏิกรณ์ต้องมีการคำนวณถึงค่า อัตราการถ่ายเทมวลระหว่างสารละลายกับเซลล์ เพื่อให้ได้ประสิทธิภาพสูงสุด ดังแสดงในรูปภาพ 1.6

สำหรับรูปภาพ 1.6 สัญลักษณ์ C_A หมายถึง ความเข้มข้นของสาร A (mole/m^3) ซึ่งในที่นี้คือ L-lactate นั้นเอง, F_A หมายถึง อัตราการไหลเชิงโมลของสาร A (mole/time), X_A คือ สัดส่วนของ สาร A ที่ถูกกำจัด, U คือ อัตราการไหลโดยปริมาตร (m^3/s) และ V คือปริมาตร (m^3) ตามลำดับ ส่วน subscript 0 และ f หมายถึง เวลาเริ่มต้นและเวลาสุดท้าย ตามลำดับ

ในการวิเคราะห์สมดุลมวลของถังปฏิกรณ์แบบท่อไหลนั้น องค์ประกอบทางเคมีของของไหล ภายในท่อจะมีการเปลี่ยนแปลงไปตามระยะทางภายในถังปฏิกรณ์ ดังนั้นหากพิจารณาสมดุลมวลของ สาร A ในปริมาตร dV จะได้ความสัมพันธ์ว่า (Levenspiel 1999)

Input = Output + disappearance by reaction ซึ่งสำหรับสมการนี้

Input คือ F_A มีหน่วยคือ โมลต่อหน่วยเวลา

Output คือ $F_A + dF_A$ มีหน่วยคือ โมลต่อหน่วยเวลา เช่นกัน

ส่วน disappearance by reaction คือ อัตราการนำ L-lactate ไปใช้โดยเซลล์ยีสต์ $= (-r_A)dV$

ดังนั้น $F_A = (F_A + dF_A) + (-r_A)dV$ เนื่องจาก $dF_A = d[F_{A0}(1-X_A)] = -F_{A0}dX_A$

ดังนั้น $F_{A0}dX_A = (-r_A)dV$ และเมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาตรของทั้งระบบโดยการจำกัดกลุ่มใหม่ ก่อนที่จะทำการอินทิเกรตได้ดังนี้

$$\int_0^V \frac{dV}{F_{A0}} = \int_0^{X_{Af}} \frac{dX_A}{-r_A} \quad \text{ดังนั้น}$$

$$\frac{V}{F_{A0}} = \frac{\tau}{C_{A0}} = \int_0^{X_{Af}} \frac{dX_A}{-r_A} \quad \text{หรือ} \quad \tau = \frac{V}{v_0} = \frac{VC_{A0}}{F_{A0}} = C_{A0} \int_0^{X_{Af}} \frac{dX_A}{-r_A} \quad 1.1$$

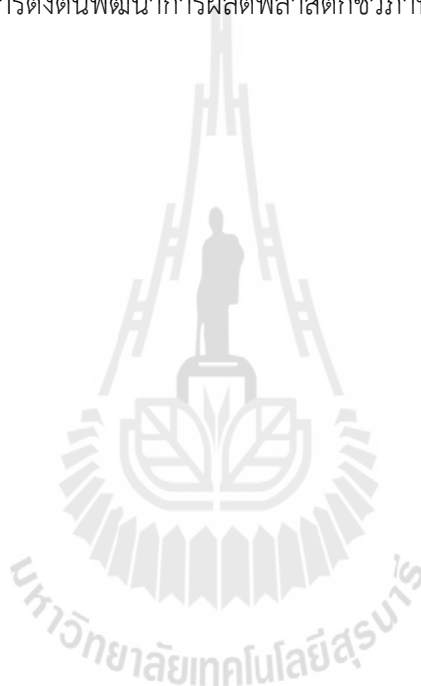
สมการนี้ สามารถที่จะนำไปประยุกต์ในการออกแบบขนาดของท่อปฏิกรณ์สำหรับประสิทธิภาพการ กำจัดสาร L-lactate และอัตราการป้อนสารละลายที่ต้องการได้

1.6 จุดประสงค์ของโครงการวิจัย

1.6.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกกรด D-แล็กติก ออกจากสารละลายสังเคราะห์โดยการกำจัดกรด L-แล็กติกที่ปนมา และการทำให้กรด D-แล็กติก มีความบริสุทธิ์สูง โดยใช้วิธีการย่อยด้วยเอนไซม์

1.6.2 ศึกษาพัฒนาเทคนิค วิธีการ รวมทั้งออกแบบถังปฏิกรณ์เพื่อทำบริสุทธิ์กรด D-แล็กติก

1.6.3 นำกรด D-แล็กติกบริสุทธิ์ที่ผลิตได้ไปศึกษาการผลิตพลาสติกชีวภาพ เพื่อเป็นแนวทางในการนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นพัฒนาการผลิตพลาสติกชีวภาพในเชิงพาณิชย์ต่อไป



บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 อุปกรณ์และสารเคมี

- อาหารเลี้ยงเชื้อต่าง ๆ เช่น เพปโตร สารสกัดจากยีสต์ น้ำตาลกลูโคส ซึ่งมาจากบริษัท Hi media โซเดียมอัลจิเนทและเกลือแร่ต่าง ๆ ใช้ของบริษัท Fluka ในขณะที่กรดผสมระหว่าง L- และ D-แล็กติก ใช้ของบริษัท Sigma
- ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (Bioreactor) ใช้ของบริษัท Sartorius
- เครื่องแก้วต่าง ๆ ใช้ของบริษัท VN supply
- บั๊มหลอดฉีดยา (Syringe pump) ใช้ของบริษัท Cole parmer
- เมมเบรนเซรามิกแบบนาโนฟิวเตรชั่นใช้ของบริษัท Fraunhofer

2.2 การเลี้ยงเชื้อยีสต์ *Yarrowia lipolytica*

2.2.1 การเลี้ยงเซลล์เพื่อทดสอบกิจกรรมของ L-lactate oxidase

ขั้นตอนแรกของการดำเนินการวิจัยคือการเลี้ยงเชื้อยีสต์ *Yarrowia lipolytica* ในขวดรูปชมพู่แบบเขย่า โดยได้ซื้อสายพันธุ์มาจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (TISTR 5621) ได้ทำการทดสอบการเจริญเบื้องต้นด้วยการเลี้ยงในอาหารอาหารเหลวชนิด yeast extract pentone dextrose (YPD) ซึ่งมีส่วนประกอบ ดังนี้ สารสกัดจากยีสต์ 1% เพปโตรน 2% น้ำตาลกลูโคส 2% และทำการปรับค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เป็น 7.0 ก่อนที่จะทำการนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นทำการลงกล้าเชื้อเพื่อให้เจริญ โดยการเลี้ยงในขวดแก้วที่มีการเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง จากนั้นจะทำการติดตามความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในน้ำหมัก ในช่วงประมาณ 3 ชั่วโมงแรก เชื้อจะมีการเจริญเพียงเล็กน้อย เนื่องจากอยู่ในช่วงของการปรับตัว (lag phase) ก่อนที่จะมีการเพิ่มขึ้นของเซลล์อย่างรวดเร็ว ซึ่งอยู่ในระยะการเจริญแบบ exponential phase จากนั้นเมื่อปริมาณของน้ำตาลหมดลง การเจริญจะอยู่ในช่วงของ stationary phase โดยไม่มีการเพิ่มจำนวนเซลล์อีก นอกจากนี้ยังได้ทำการเลี้ยงเชื้อยีสต์ดังกล่าวโดยใช้กรด L-แล็กติกความเข้มข้นร้อยละ 1.0 โดยน้ำหนัก (Sigma, Singapore) ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนหลักโดยปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ให้มีค่าเป็นกลางด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ซึ่งโดยทั่วไปในธรรมชาติ เมื่อแหล่งคาร์บอนหลัก (น้ำตาลกลูโคส) หมดลง เชื้อยีสต์จะมีการปรับตัวเพื่อให้สามารถใช้แหล่งคาร์บอนอื่นมาผลิตเป็นพลังงานให้กับเซลล์ ซึ่งในที่นี้ก็คือกรด L-แล็กติก หรือ L-แล็กเตท นั่นเอง ทั้งนี้เนื่องจากภายในเชื้อยีสต์

นั้น จะมีการสังเคราะห์เอนไซม์ L-lactate oxidase ขึ้นมา ซึ่งจะทำให้การออกซิไดซ์กรด L-แล็กติกไปเป็นกรดไพรูวิก ก่อนที่จะเข้าสู่วัฏจักรเครป (Kreb's cycle) เพื่อใช้ในการเจริญและใช้เป็นพลังงานสำหรับกิจกรรมต่าง ๆ ภายในเซลล์ต่อไป นอกจากนี้ยังได้ทำการเลี้ยงยีสต์ดังกล่าวบนอาหารวุ้นอีกด้วย โดยทำการเติม agar ความเข้มข้นร้อยละ 1.5 โดยน้ำหนักในอาหารเหลวก่อนทำการนึ่งฆ่าเชื้อดังแสดงในรูปภาพ 2.1



รูปภาพ 2.1 การเลี้ยงเชื้อยีสต์ *Yarrowia lipolytica* บนอาหารวุ้น

2.2.2 การเลี้ยงเซลล์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

ในการเลี้ยงเซลล์ยีสต์ *Yarrowia lipolytica* เบื้องต้นจากการเชื้อเชื้อจากอาหารวุ้นนั้น จะทำการเลี้ยงด้วยอาหาร YPD (50 มิลลิลิตร) ที่มีส่วนประกอบ ดังนี้ สารสกัดจากยีสต์ 1% เพปโตน 2% น้ำตาลกลูโคส 2% และทำการปรับค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เป็น 7.0 ก่อนที่จะทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเพื่อให้เจริญต่อไป จากนั้นจะทำการถ่ายกล้าเชื้อลงในอาหารเหลวในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 4 ลิตรต่อไป สำหรับการเลี้ยงยีสต์เพื่อที่จะเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างเอนไซม์ L-lactate oxidase ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพนั้น จะเลี้ยงในอาหารชนิด Rider ซึ่งส่วนประกอบของอาหารดังนี้ (กรัมต่อลิตร) กรด L-แล็กติก - 20, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 3.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0.7, NaCl - 0.5, CaCl_2 - 0.4, KH_2PO_4 - 1.0, K_2HPO_4 - 0.1, yeast extract - 0.1, $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 0.01,

ZnSO₄·7H₂O - 0.07, CuSO₄·5H₂O - 0.01 และ FeSO₄·7H₂O - 0.05 จากนั้นทำการปรับค่า pH ให้ได้ 6.5 ก่อนที่จะนำเข้าสู่การนิ่งฆ่าเชื้อต่อไป โดยจะทำการเลี้ยงเป็นเวลา 20 ชั่วโมง ซึ่งอยู่ในระยะการเจริญแบบ exponential phase ที่มีการเจริญอย่างรวดเร็ว โดยทำการเลี้ยงเซลล์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีการควบคุมความเร็วรอบของใบกวน 200 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.5 vvm และทำการควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

2.3 การเลี้ยงเชื้อยีสต์ที่ความเข้มข้นสูง

เนื่องจากงานวิจัยนี้ต้องการเชื้อยีสต์ที่มีการแสดงออกถึงกิจกรรมของเอ็นไซม์ L-lactate oxidase เป็นจำนวนมาก และมีรายงานวิจัยว่ากรดแล็กติกที่ความเข้มข้นสูง จะมีการแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ของยีสต์ที่สูง ทำให้เชื้อยีสต์ไม่เจริญและอาจจะตายลงได้ หากความเข้มข้นของกรดแล็กติกมีสูงเกินกว่าที่เชื้อยีสต์จะทนได้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้ได้มีการพัฒนากลยุทธ์ในการป้อนอาหารที่จะผลิตเชื้อยีสต์ในความเข้มข้นสูง (high cell density cultivation) โดยทำการป้อนอาหารแบบกึ่งกะ (fed-batch cultivation)

2.3.1 การคำนวณอัตราการป้อนสารอาหาร

ในการคำนวณหาอัตราการป้อนสารอาหารที่เหมาะสมนั้น สิ่งที่จะต้องคำนึงถึงเป็นสิ่งแรกก็คือความเข้มข้นของกรด L-แล็กติก (หรือ L-แล็กเตท) ในน้ำหมัก โดยจะต้องมีความสัมพันธ์กันกับอัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate, μ) เนื่องจากเชื้อยีสต์จะมีการใช้กรด L-แล็กติกเพื่อการเจริญของเซลล์และการคงสภาพกิจกรรมต่าง ๆ ภายในเซลล์ให้ยังคงอยู่ (maintenance) ในสถานะที่มีการป้อนสารอาหารในอัตราที่สูงเกินไป ความเข้มข้นของกรด L-แล็กติกที่สะสมมากเกินไป จะส่งผลทำให้ความเป็นพิษต่อเซลล์ และหากอัตราการป้อนกรด L-แล็กติกที่ต่ำเกินไป ก็จะมีผลถึงค่า μ ที่น้อย ทำให้ต้องใช้เวลานานในการเลี้ยงเชื้อ กล่าวโดยสรุปแล้วปัจจัยแวดล้อมในการที่จะเลือกค่าอัตราการเจริญจำเพาะที่เหมาะสมนั้น จะขึ้นอยู่กับค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (μ_{max}) อัตราการถ่ายเทออกซิเจน (oxygen transfer rate) ซึ่งจะขึ้นอยู่กับอัตราการให้อากาศและความเร็วรอบของใบกวน เป็นต้น ในงานวิจัยนี้จะใช้ค่าอัตราการป้อนสารอาหารโดยคำนวณตามค่าความเข้มข้นของเซลล์ที่มีการเพิ่มขึ้นแบบเอ็กซ์โปเนนเชียลโดยอ้างอิงจาก Korz *et al*, 1994 ซึ่งการป้อนอาหารแบบกึ่งกะนี้จะเริ่มภายหลังจากแหล่งคาร์บอนสำหรับการเลี้ยงเชื้อยีสต์ในแบบกะหมดลง

อัตราการป้อนกรด L-แล็กติกแบบเอ็กซ์โปเนนเชียลจะมีความสัมพันธ์กับอัตราการเจริญจำเพาะและความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์ ซึ่งสามารถแสดงได้ดังสมการ

$$F_t S_F = \left(\frac{\mu}{Y_{X/S}} + m \right) X_t V_t \quad 2.1$$

โดยในที่นี้ F_t แสดงถึงอัตราการป้อนในเชิงปริมาตร ณ เวลา t (ลิตรต่อชั่วโมง) S_F คือความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนในสารป้อน (กรัมต่อลิตร) μ คืออัตราการเจริญจำเพาะของเซลล์ยีสต์ที่ได้ต้องการขึ้น (ต่อชั่วโมง) $Y_{X/S}$ คือค่าสัมประสิทธิ์ของผลผลิตระหว่างเซลล์และแหล่งคาร์บอนหรือที่เรียกว่า biomass/substrate yield coefficient, m หมายถึงค่าสัมประสิทธิ์การคงสภาพกิจกรรมต่าง ๆ ของเซลล์ (specific maintenance coefficient) (ต่อชั่วโมง), X_t คือค่าความเข้มข้นของเซลล์ ณ เวลา t และ V_t หมายถึงปริมาตรของน้ำหมัก ณ เวลา t ตามลำดับ โดยที่ค่า μ สามารถหาได้จากสมการ ;

$$\frac{dXV}{dt} = \mu XV \quad 2.2$$

ทำการย้ายข้างและทำการอินทิเกรตสมการโดยเริ่มจากเวลา t เท่ากับ 0 จะได้

$$\int_0^t \frac{1}{XV} dXV = \int_0^t \mu dt \quad 2.3$$

ดังนั้น

$$X_t V_t = X_0 V_0 e^{\mu t} \quad 2.4$$

จากนั้น ทำการแทรกสมการที่ 2.4 ไปยังสมการที่ 2.1 จะได้ความสัมพันธ์ว่า

$$m_s(t) = F(t) S_F(t) = \left(\frac{\mu(t)}{Y_{X/S}} + m \right) V(t) X(t) \quad 2.5$$

โดยที่ m_s คืออัตราการไหลของสับสเตรต (หน่วยเป็น กรัมต่อชั่วโมง) F คือ อัตราการป้อนโดยรวม (ลิตรต่อชั่วโมง) S_F คือ ความเข้มข้นของกรด L-แล็กติก (กรัมต่อลิตร) μ คืออัตราการเจริญจำเพาะ (ต่อชั่วโมง) $Y_{X/S}$ ผลผลิตเซลล์ต่อสับสเตรต (กรัมต่อกรัม) m คือ the specific

maintenance coefficient (ต่อชั่วโมง) \times ความเข้มข้นของเซลล์ (กรัมต่อชั่วโมง) และ V คือ ปริมาณการเลี้ยงเชื้อ (ลิตร)

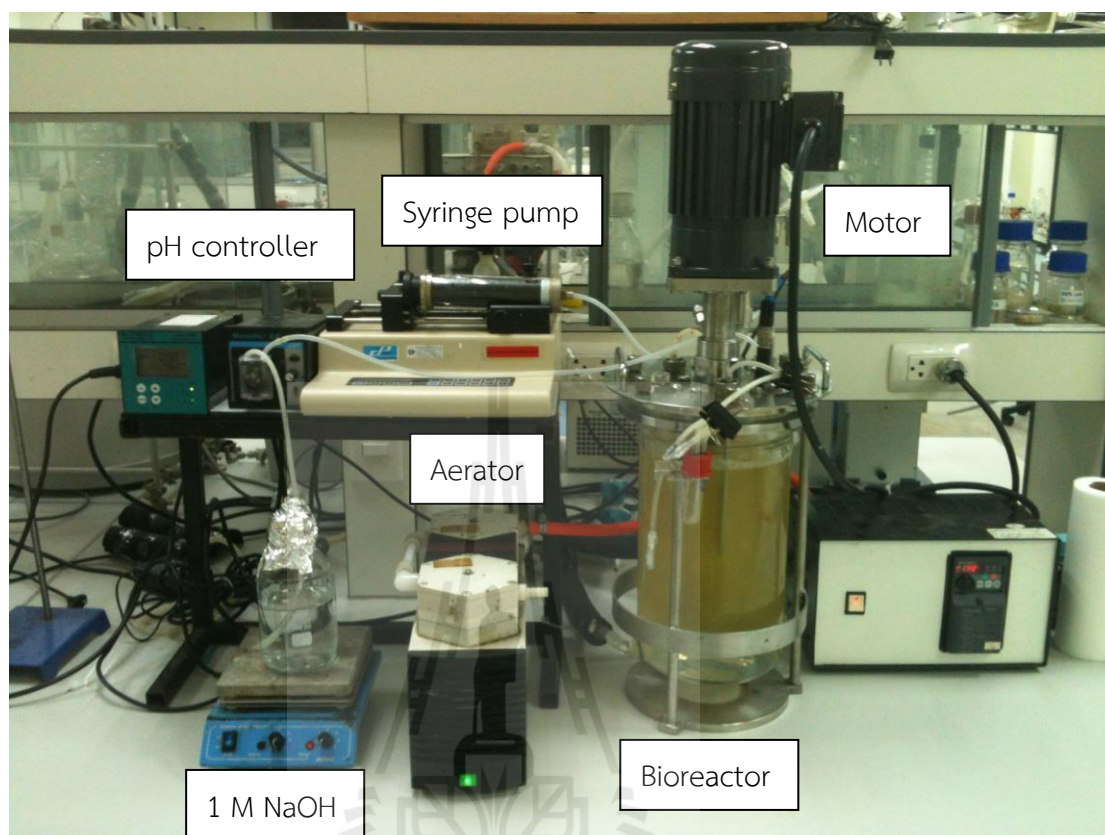
เมื่อนำสมการที่ 2.4 แทรกในสมการที่ 2.5 เราสามารถคำนวณอัตราการป้อนกรด L-แกล์กติก ณ เวลา t เมื่อเทียบอัตราการป้อนการเจริญจำเพาะ (μ_{set}) สามารถคำนวณได้ดังสมการข้างล่างนี้

$$m_s(t) = \left(\frac{\mu}{Y_{x/s}} + m \right) V_0 X_0 e^{\mu t} \quad 2.6$$

ในทางปฏิบัตินั้น จะทำการเลี้ยงเชื้อยีสต์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพในแบบกะก่อน (รูปภาพ 2.2) โดยจะกำหนดให้มีปริมาตรเริ่มต้นของน้ำหมักที่ประมาณ 2 ลิตร (ปริมาตรโดยรวมของถังหมักอยู่ที่ 4 ลิตร) จากนั้นเมื่อความเข้มข้นของ L-แกล์กติกในการหมักแบบกะหมดลง จะทำการป้อนอาหารเหลวแบบเข้มข้น (concentrated medium) ผ่านทางปั๊มหลอดฉีดยา (syringe pump) ที่สามารถปรับอัตราการป้อนได้โดยผ่านทางคอมพิวเตอร์ (โปรแกรม LabView) ผ่านพอร์ต RS232 ซึ่งองค์ประกอบของอาหารเหลวที่ใช้สำหรับการเลี้ยงเชื้อในแบบกะและอาหารเหลวเข้มข้นสำหรับการป้อนแบบกึ่งกะแสดงในตาราง 2.1

ตาราง 2.1 องค์ประกอบของอาหารเหลวที่ใช้สำหรับการเลี้ยงเชื้อยีสต์ในแบบกะและกึ่งกะ

ส่วนประกอบ	แบบกะ (กรัมต่อลิตร)	อาหารเหลวเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)
L-แกล์กติก	20	250
(NH ₄) ₂ SO ₄	3.0	30
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.7	7.0
NaCl	0.5	5.0
CaCl ₂	0.4	4.0
KH ₂ PO ₄	1.0	10.0
K ₂ HPO ₄	0.1	1.0
yeast extract	0.1	1.0
MnSO ₄ ·5H ₂ O	0.01	0.1
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.07	0.7
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.01	0.1
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.05	0.5



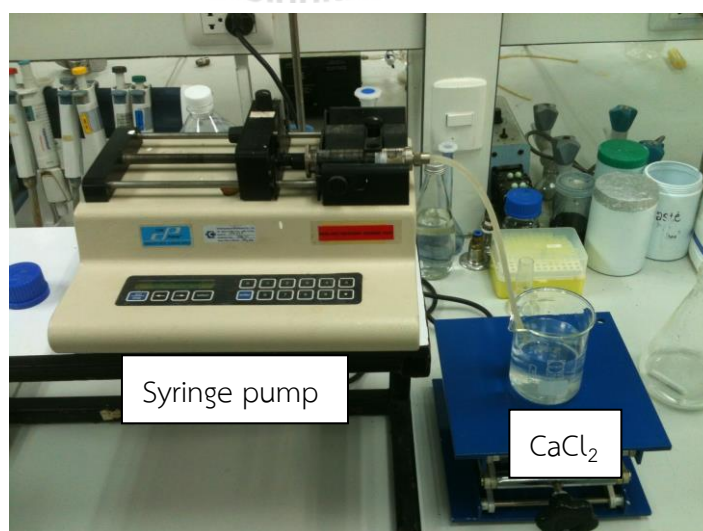
รูปภาพ 2.2 การเลี้ยงเซลล์ยีสต์ที่ความเข้มข้นสูงด้วยเทคนิคการป้อนอาหารแบบกึ่งกะ

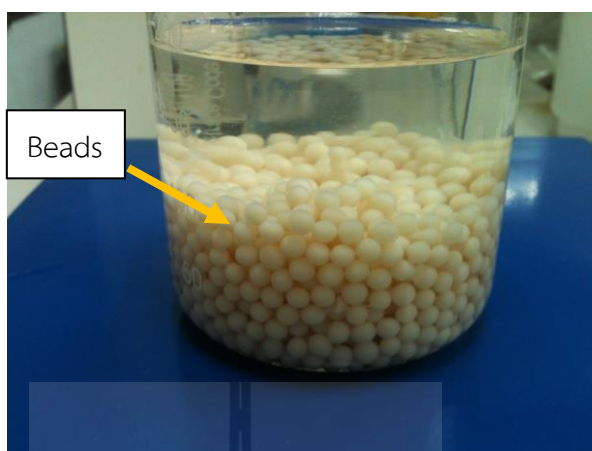
รูปภาพ 2.2 แสดงการจัดการทดลองการเลี้ยงเซลล์ยีสต์ความเข้มข้นสูงด้วยการป้อนอาหารเหลวเข้มข้นแบบกึ่งกะ โดยการกำหนดอัตราการป้อนที่เหมาะสมนั้นมีจุดประสงค์หลักในการที่จะทำให้เซลล์ยีสต์เพิ่มจำนวนเซลล์ที่เหมาะสม โดยไม่มีการเกิดผลพลอยได้อื่นมากนักและจะเป็นการทำให้แน่ใจว่า L-แกล็กเตนนั้นจะถูกใช้สำหรับการเจริญและการคงสภาพของเซลล์เท่านั้น สำหรับลักษณะของถังปฏิกรณ์นี้ เป็นโถแก้วที่มีขนาดความจุ 5 ลิตร และมีปริมาตรที่สามารถทำงานได้ (working volume) 4 ลิตร โดยด้านบนประกบด้วยหน้าแปลนพร้อมกับซีลกันรั่ว (mechanical seal) และมีใบกวนแบบ Rushton turbine จำนวน 2 ชั้น ติดอยู่กับแกนเพลา และมีแผ่นต้านการไหล (baffle) จำนวน 2 แผ่นเพื่อป้องกันการเกิดน้ำวนหรือ Vortex หากใช้อัตราการกวนที่สูง โดยที่อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก และความเร็วรอบของการกวน จะถูกบันทึกและควบคุมโดยเครื่องควบคุมอัตโนมัติ โดยอุณหภูมิของน้ำหมักจะถูกควบคุมให้คงที่ที่ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวนที่ 500 รอบต่อนาที ค่าความเป็นกรด-ด่างจะถูกวัดโดยหัววัดชนิด combined electrode (Cole parmer, USA) โดยทำการควบคุมให้คงที่ที่ 6.5 ด้วยการเติม 1.0 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ด้วยปั๊มลูกกลิ้งแบบอัตโนมัติ ค่าการละลายของออกซิเจนถูกวัดด้วยตัววัด

ชนิด polarographic dO_2 probe (Ingold, Switzerland) และถูกควบคุมโดยการใช้อาวุธโซลินอยด์ที่ต่อเข้ากับแหล่งจ่ายอากาศ โดยเมื่อค่าการละลายของออกซิเจนต่ำกว่าค่าที่ตั้งไว้ (ประมาณร้อยละ 30 ของค่าอิ่มตัว) โซลินอยด์วาล์วนี้จะเปิดออกโดยอัตโนมัติ ทำให้อากาศสามารถเข้าไปในถังหมักได้ โดยจุดประสงค์หลักของการควบคุมปริมาณออกซิเจนนี้ คือการป้องกันการขาดออกซิเจนสำหรับปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรด L-แล็กติกให้กลายเป็นกรดไพรูวิกและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์นั่นเอง

2.4 การตรึงเซลล์

เซลล์ยีสต์ที่จะนำมาตรึงเซลล์ สามารถทำได้โดยเก็บเซลล์จากน้ำหมัก เมื่อการป้อนอาหารแบบกึ่งกะเสร็จสิ้นแล้ว เซลล์จะถูกแยกออกจากน้ำหมักโดยการใช้การปั่นเหวี่ยง (centrifugation) ทำการล้างเซลล์ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงอีกครั้งหนึ่ง ก่อนที่จะนำเซลล์ออกมาผสมกับผสมกับ 4% ของสารละลายโซเดียมแอลจิเนตที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว สารละลายผสมที่ได้จะถูกนำไปหยดโดยปั๊มเข็มฉีดยา (syringe pump) ซึ่งสามารถควบคุมให้สารละลายหยดเป็นหยดเล็ก ๆ ได้ลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) ที่ความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร หยดของสารละลายจะเกิดการสัมผัสกับประจุ cation ของแคลเซียม เกิดการฟอร์มตัวเป็นเม็ดเจลแคลเซียมแอลจิเนต (beads) และแข็งตัวขึ้นที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการล้างด้วยน้ำกลั่นจำนวน 2 รอบ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดการประสานร่างแห (cross-linking) ให้แข็งแรง (Qu and Li 2000) ภายในเม็ดเจลจะมีเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ โดยถูกตรึงไว้อย่างสมบูรณ์ พร้อมทั้งนำไปใช้โดยนำไปใส่ลงในท่อเพื่อประกอบเป็นระบบในถังปฏิกรณ์ต่อไป

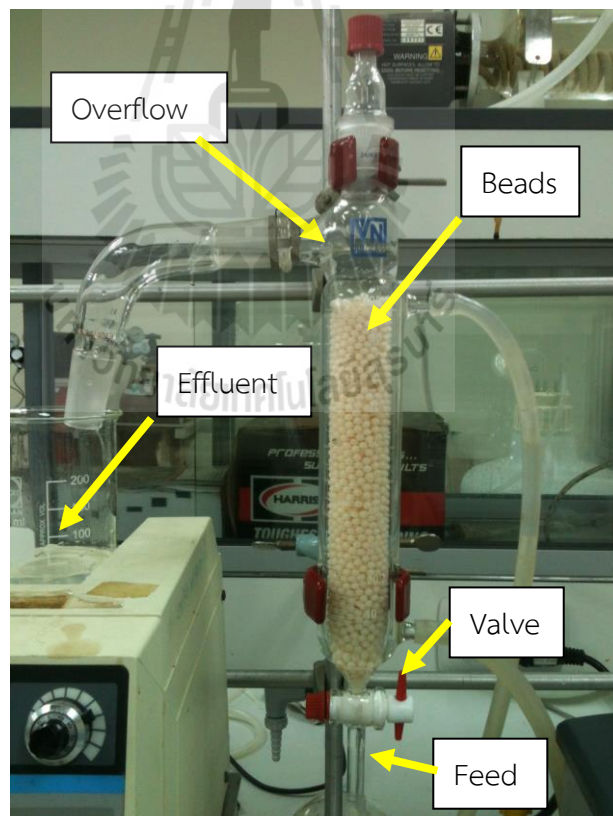
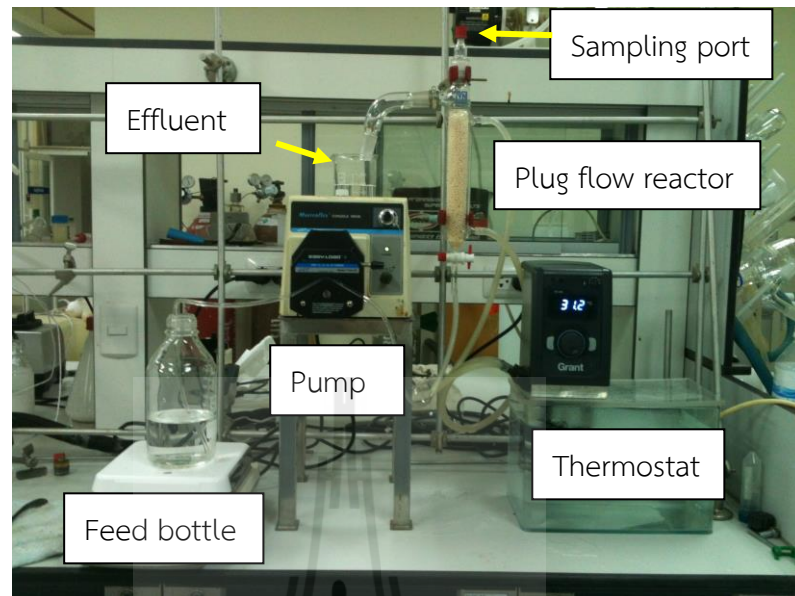




รูปภาพ 2.3 การตรึงเซลล์ *Yarrowia lipolytica* ด้วยอัลจิเนท เม็ด bead มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2.5 มิลลิเมตร ความเข้มข้นของเซลล์คือ 100 กรัมต่อลิตรสารละลายอัลจิเนต

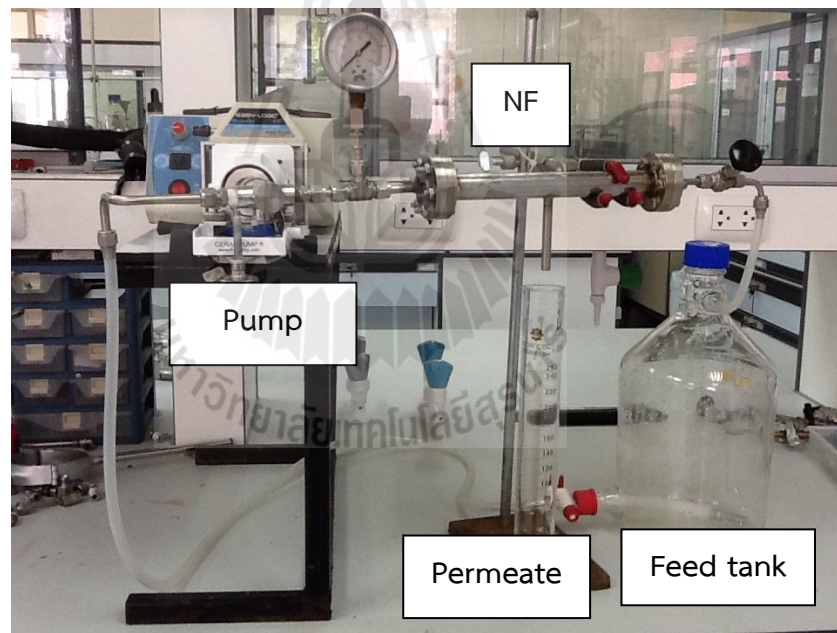
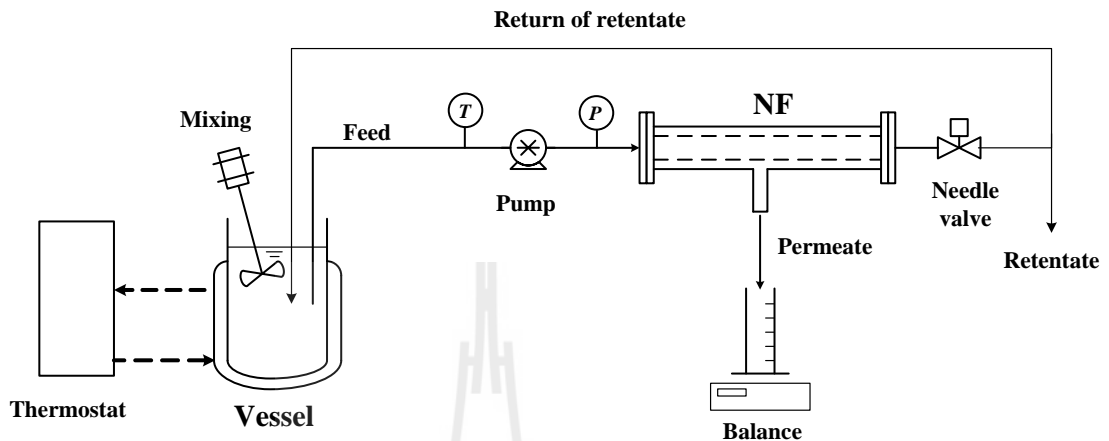
2.4.1 Packed column และถังปฏิกรณ์สำหรับการทำบริสุทธิ์กรด D-แล็กติก

ถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่เติมเม็ดอัลจิเนทที่ตรึงเซลล์ของ *Yarrowia lipolytica* เป็นคอลัมน์แก้ว มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.6 เซนติเมตรและมีความยาว คือ 15 เซนติเมตร โดยมีปริมาตรของคอลัมน์ คือ 120 มิลลิลิตรดังแสดงในรูปภาพ 2.4 ด้านนอกทำเป็นท่อสองชั้นสำหรับควบคุมอุณหภูมิโดยทำการไหลเวียนน้ำจากเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Thermostat) ด้านล่างของคอลัมน์ประกอบไปด้วยวาล์วสำหรับเปิด-ปิด และท่อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตรต่อกับสายยางซิลิโคน เนื่องจากคอลัมน์แก้วนี้ถูกออกแบบให้มีลักษณะเป็นท่อหุ้มสองชั้น ทำให้ไม่สามารถติดตั้งช่องเก็บตัวอย่าง ณ ตำแหน่งต่าง ๆ ของคอลัมน์ได้ ดังนั้นการเก็บตัวอย่าง ณ ตำแหน่งต่าง ๆ ภายในคอลัมน์ได้ถูกดัดแปลงโดยการติดตั้งช่องสำหรับเก็บตัวอย่าง (sampling port) ใต้ทางด้านบนของคอลัมน์ ซึ่งช่องสำหรับเก็บตัวอย่างนี้จะมีท่อสแตนเลสขนาด 6 มิลลิเมตร ยาว 15 เซนติเมตรเสียบอยู่และถูกยึดด้วยประเก็นยาง ท่อเก็บตัวอย่างนี้สามารถเลื่อนขึ้น-ลงได้ตามต้องการตามระยะทางภายในคอลัมน์ ก่อนที่จะทำการทดลองได้นำอุปกรณ์ต่าง ๆ ไปทำการนึ่งฆ่าเชื้อก่อน จากนั้นเติมเม็ดเจลที่เตรียมได้จากข้างต้นลงไปจนเต็ม จากนั้นทำการป้อนสารป้อนซึ่งประกอบไปด้วยอาหารอาหารเหลวชนิด yeast extract pentone dextrose (YPD) ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้ (ร้อยละ) สารสกัดจากยีสต์ 1.0 เพปโตน 2.0 กรดผสม D-และL-แล็กติก 2.0 (20 กรัมต่อลิตร) และทำการปรับค่า pH ของสารละลายให้เป็น 6.0 ด้วย Ca(OH)_2 ก่อนที่จะทำการนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ซึ่งการป้อนสารละลายจะใช้ปั๊มลูกกลิ้งหรือ peristaltic pump ไหลผ่านคอลัมน์ โดยสารละลายจะไหลออกกลายเป็น effluent ผ่านทางท่อน้ำล้น (overflow) ก่อนที่จะถูกนำไปวิเคราะห์ต่อไป



รูปภาพ 2.4 การจัดการทดลองที่อุปกรณ์ชีวภาพแบบท่อไหล

2.5 การทำบริสุทธิ์กรดดีแล็กติกด้วยเทคนิคนาโนฟิวเตรชั่น (Nanofiltration, NF)



รูปภาพ 2.5 การใช้ระบบนาโนฟิวเตรชั่นในการทำบริสุทธิ์กรด D-แล็กติกที่ผลิตได้

เนื่องจากสารป้อน YPD ที่ใช้ในหัวข้อ 2.4.1 มีส่วนประกอบของโปรตีนซึ่งจะมีผลกระทบต่อ การทดสอบการทำปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชันของกรด D-แล็กติกในขั้นสุดท้าย ดังนั้นจึงมีความจำเป็น ในการที่จะต้องทำบริสุทธิ์สารละลายกรด D-แล็กติกที่เป็น effluent ก่อน โดยการกำจัดโปรตีนออก ให้หมด ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาระบบนาโนฟิวเตรชั่นดังแสดงในรูปภาพ 2.5 โดยได้ใช้เมมเบรน ชนิดเซรามิก เนื่องจากมีคุณสมบัติที่แข็งแรง มีความทนทานเชิงกลสูง มีลักษณะเป็นท่อขนาดความ

ยาว 25 ซม และมีเส้นผ่าศูนย์กลางด้านใน 0.7 ซม และด้านนอก 1.0 ซม (พื้นที่ผิว 55 ตารางเซนติเมตร) โดยมีชั้นผิวซึ่งทำหน้าที่คัดเลือกผ่านเคลือบอยู่ด้านในของท่อเมมเบรนเซรามิกดังกล่าว ตัวเมมเบรนเซรามิกนี้ประกอบไปด้วยชั้นผิวซึ่งทำขึ้นจากไทเทเนียมไดออกไซด์ (TiO_2) เคลือบบนชั้นรองรับที่เป็น $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ โดยมีค่า molecular weight cut off ที่ 400 ดาลตัน ซึ่งท่อนี้จะถูกบรรจุอยู่ในตัวเรือนที่ทำด้วยท่อสแตนเลส และมีปั๊มแรงดันสูง (FMI, USA) ทำหน้าที่ในการไหลเวียนสารละลายจากถังเก็บขนาด 3 ลิตร โดยจะทำการไหลเวียนแบบ cross-flow ผ่านผิวหน้าของเมมเบรนและไหลเวียนกลับเข้าสู่ถังเก็บต่อไป ด้านออกของระบบจะมีการติดตั้ง needle valve (Swagelok, USA) เอาไว้เพื่อเพิ่มความดันของระบบให้สูงขึ้น ทั้งนี้ระบบนาโนฟิวเตรชันเป็นระบบที่ต้องใช้ความดันในการขับให้เกิดการไหลของส่วนที่กรองได้หรือ filtrate นั้นเอง (pressure driven process) โดยในการทดลองนี้จะทำการทดสอบประสิทธิภาพการกรองของระบบที่ความดันระหว่าง 200 ถึง 600 กิโลปาสคาล ในขั้นแรกจะใช้สารป้อนสังเคราะห์ในการทดสอบประสิทธิภาพการแยกของระบบก่อน โดยจะทำการทดสอบ ณ สภาวะต่าง ๆ เช่น ความเข้มข้นเริ่มต้นของกรดแล็กติก 10 ถึง 70 กรัมต่อลิตร ความเป็นกรด-ด่างระหว่าง 2 ถึง 7 จากนั้นจึงจะทดสอบการแยกด้วยสารละลายจริงต่อไป

ในระหว่างการทดสอบระบบด้วยสารป้อนสังเคราะห์นั้น ทั้งส่วนที่กรองได้ (permeate) และส่วนที่เหลือจากการกรอง (retentate) จะถูกปั๊มกลับเข้าไปยังถังของสารป้อนทั้งหมด ซึ่งจะเรียกปฏิบัติการในลักษณะนี้ว่า total recycle mode ทั้งนี้เพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารป้อนในระหว่างการทำการทดลอง ซึ่งจะส่งผลทำให้ผลการทดลองมีความผิดพลาดได้ โดยประสิทธิภาพของการกรองจะแสดงในรูปของค่าฟลักซ์หรืออัตราการถ่ายเทมวลจำเพาะ มีหน่วยเป็น กิโลกรัมต่อชั่วโมงต่อตารางเมตร สามารถคำนวณได้โดยการจับเวลาและทำการชั่งน้ำหนักของเพอร์มิเอท โดยทราบพื้นที่ผิวของเมมเบรนแล้ว (55 ตารางเซนติเมตร) เมื่อเสร็จการทดลองแต่ละครั้ง เมมเบรนจะถูกทำความสะอาดโดยการล้างด้วยน้ำกลั่น ตามด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 โมลาร์ และกรดฟอสฟอริก (H_3PO_4) ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์เท่ากัน จากนั้นทำการทดสอบค่าฟลักซ์ของน้ำเปล่า (น้ำกลั่น) โดยฟลักซ์ของน้ำเปล่าจะมีค่าเท่ากับค่าฟลักซ์ของน้ำเปล่าเมื่อตอนใช้เมมเบรนในครั้งแรก ค่าการกักกัน (Rejection, R%) สามารถคำนวณได้จากสมการ

$$R(\%) = \left[1 - \left(\frac{C_P}{C_R} \right) \right] \times 100$$

โดย C_p และ C_r แสดงถึงค่าความเข้มข้นของสารในด้านของเพอร์มิเอทและในด้านของ retentate ตามลำดับ

สำหรับการศึกษาระบบนาโนฟิวเตรชั่นของสารละลาย YPD ที่ได้จากถังปฏิกรณ์ชีวภาพนั้น จะทำการศึกษาในระบบ concentration mode กล่าวคือจะไหลเวียน retentate กลับเข้าสู่ถังของ สารป้อนเท่านั้น ไม่มีการไหลเวียนเพอร์มิเอทกลับเข้าสู่ถังของสารป้อนแต่อย่างใด โดยค่าฟลักซ์และ การค่าการกักกันต่าง ๆ จะถูกศึกษาโดยเฉพาะการกักกันโปรตีน ซึ่งการวิเคราะห์การอุดตัน (fouling) จะวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคการวัดค่าฟลักซ์ภายหลังจากการล้างด้วยชั้นตอนต่าง ๆ โดยสามารถ วิเคราะห์ความต้านทานได้จากสมการของดาร์ซี (Darcy's law) ดังนี้

$$R_{NF} = R_m + R_f + R_c = 3600 \times \frac{TMP}{\mu J} \quad 2.8$$

โดยที่ R_{NF} นั้นหมายถึงความต้านทานของการกรอง (filtration resistance, m^{-1}), R_m คือ ความต้านทานไฮดรอลิกของเมมเบรน (membrane hydraulic resistance), R_f คือความต้านทาน อันเนื่องมาจากการอุดตันของรูพรุนและการดูดซับ (pore blocking and adsorption) และ R_c คือ ความต้านทานเนื่องมาจากการเกิดเค้กบริเวณผิวหน้าของเมมเบรน (resistance due to cake formation) J คือเพอร์มิเอทฟลักซ์ ($m^3/m^2 \cdot h$), TMP คือความแตกต่างของความดันระหว่างทั้งสอง ด้านของเมมเบรน (trans membrane pressure, Pa) และ μ แสดงถึงค่าความหนืดของเพอร์มิเอท (Pa.s) ตามลำดับ

ในระหว่างที่ทำการทดลองนั้น เนื่องจากมีการดึงเอาเพอร์มิเอทออกตลอดเวลา ปริมาตรของ สารละลายจะลดลง แต่ความเข้มข้นของโปรตีนจะมีมากขึ้นทำให้การอุดตันบริเวณผิวหน้าของเมมเบรนจะมากขึ้น ในที่สุดค่าฟลักซ์ของระบบจะเป็นศูนย์ ดังนั้นเพื่อเป็นการป้องกันปัญหาดังกล่าวนี้ ความจำเป็นในการเติมน้ำกลั่นเพิ่มลงไปในระบบ เพื่อรักษาระดับของปริมาตรของสารละลายให้คงที่ อยู่เสมอ เรียกปฏิบัติการแบบนี้ว่าไดอะฟิวเตรชั่น (diafiltration mode) โดยในระหว่างการทดลอง จะทำการสูมตัวอย่างไปวิเคราะห์ความเข้มข้นของกรดแล็กติกในสารป้อนเป็นระยะ ๆ และปฏิบัติการ นี้จะเสร็จสิ้นสมบูรณ์เมื่อความเข้มข้นของกรดแล็กติกในด้านของสารป้อนหมดลง จากนั้นนำเพอร์มิเอทที่ได้ทั้งหมดนี้ไปเพิ่มความเข้มข้นขึ้นโดยใช้เครื่องระเหยแบบสุญญากาศ (rotary vacuum evaporator) โดยทำการระเหยน้ำออกจนกระทั่งมีความเข้มข้นของน้ำประมาณร้อยละ 30 โดย น้ำหนัก จากนั้นจะนำสารละลายกรด D-แล็กติกที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้วนี้ไปทดสอบต่อไป

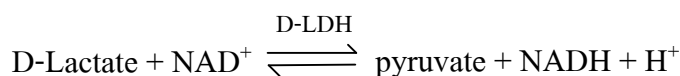
2.6. การทดสอบปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชัน

เพื่อให้สอดคล้องกับจุดประสงค์ของงานวิจัยในหัวข้อ 6.3 กรด D-แล็กติกที่ทำบริสุทธิ์ได้จากงานวิจัยนี้ได้ถูกส่งไปทดสอบการทำปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชันที่ห้องปฏิบัติการของ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปราณี ชุมสำโรง สาขาวิชาวิศวกรรมพอลิเมอร์ สำนักวิชาวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยรายละเอียดต่าง ๆ นั้น ได้อธิบายไว้ในหัวข้อ 3.4 ของรายงานวิจัยฉบับนี้

2.7 การวิเคราะห์

- ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส วัดโดยใช้วิธี DNS
- ความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์ วัดโดย spectrophotometer
- ความเข้มข้นของโปรตีน วัดโดยใช้วิธีของ Bradford
- การวิเคราะห์เชิงปริมาณของกรด D และ L-แล็กติกด้วยการดูดกลืนแสง (UV-method for the determination of D-/L-Lactic Acid)

การวิเคราะห์เชิงปริมาณของกรด D และ L-แล็กติกนั้น อ้างอิงจากการใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูปจากบริษัท Megazyme ประเทศไอร์แลนด์ โดยจำเป็นต้องใช้ขั้นตอนในการวิเคราะห์สองขั้นคือ ในขั้นตอนแรกนั้น เอนไซม์ D-lactate dehydrogenase (D-LDH) จะทำการออกซิไดซ์กรด D-แล็กติกให้กลายเป็นกรดไพรูวิก โดยมี nicotinamide-adenene dinucleotide หรือ NAD⁺ มาเป็นตัวรับไฮโดรเจนดังสมการ

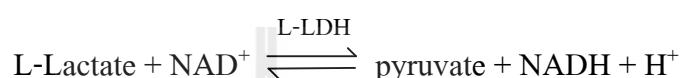


ขั้นตอนที่สองจะเป็นการกำจัดกรดไพรูวิก โดยให้ทำปฏิกิริยากับ D-กลูตาเมท (D-glutamate) และมีเอนไซม์ D-glutamate-pyruvate transaminase (D-GPT) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยจะได้ผลิตภัณฑ์สองชนิดคือ D-อะลานีน (D-alanine) และ 2-oxoglutarate ดังสมการ



โดยปริมาณของกรด D-แล็กติกที่มีอยู่ในตัวอย่าง จะมีความสัมพันธ์กับ NADH ที่เกิดขึ้น ซึ่งสามารถวิเคราะห์ได้โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 325 นาโนเมตร

ส่วนการวิเคราะห์เชิงปริมาณของกรด L-แล็กติกนั้น จำเป็นต้องใช้เอ็นไซม์สองชนิด เช่นเดียวกัน โดยในขั้นตอนแรกนั้น เอ็นไซม์ L-lactate dehydrogenase (L-LDH) จะทำการออกซิไดซ์กรด L-แล็กติก ให้กลายเป็นกรดไพรูวิก โดยมี nicotinamide-adenine dinucleotide หรือ NAD^+ มาเป็นตัวรับไฮโดรเจนดังสมการ



จากนั้นไพรูเวตที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยากับ D-กลูตาเมต โดยเอ็นไซม์ D-GPT ซึ่งจะได้โดยจะ ได้ผลิตภัณฑ์สองชนิดคือ D-อะลานีน (D-alanine) และ 2-oxoglutarate เช่นเดียวกัน



รูปภาพ 2.6 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 325 นาโนเมตร (Pharmacia Biotech) ที่ใช้ในงานวิจัยนี้

นอกจากจะใช้การวิเคราะห์ด้วยการดูดกลืนแสงแล้ว การวิเคราะห์เชิงปริมาณของกรด D- และ L-แล็กติกนั้น ยังสามารถวิเคราะห์โดยวิธีโครมาโตกราฟีได้อีกด้วย โดยการทดลองนี้ได้ใช้เครื่อง HPLC (Thermo Scientific, USA) ที่ใช้คอลัมน์สำหรับแยกสารไอโซเมอร์เชิงแสงโดยเฉพาะ (Sumi Chiral OA-5000L, Japan) และใช้เครื่องตรวจวัดชนิดอัลตราไวโอเลต (UV detector) ที่ความยาว

คลื่นแสง 240 นาโนเมตร ส่วน mobile phase ที่ใช้คือ 2 มิลลิโมลาร์ คอปเปอร์ซัลเฟต (CuSO_4) ในน้ำผสม acetonitrile ในอัตราส่วน 95:5 อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพของเทคนิคโครมาโตกราฟีสำหรับการวิเคราะห์ความบริสุทธิ์เชิงแสงนี้ จะไม่ประสบความสำเร็จมากนักเมื่อมีความเข้มข้นของกรดแล็กติกทั้งสองชนิดในปริมาณสูง ทั้งนี้เนื่องจากฐาน peak ของสารทั้งสองจะเหลื่อมกันค่อนข้างมาก ทำให้คำนวณหาพื้นที่ใต้กราฟลำบาก ดังนั้นหากความเข้มข้นของกรด L-แล็กติกในตัวอย่างมีค่าสูงจะใช้วิธีการดูคลื่นแสง และจะใช้โครมาโตกราฟีเมื่อความเข้มข้นของกรด L-แล็กติกในตัวอย่างมีค่าต่ำหรือไม่สามารถวัดได้ด้วยวิธีการดูคลื่นแสงนั่นเอง



รูปภาพ 2.7 เครื่อง HPLC (ThermoScientific) สำหรับวัดค่าความบริสุทธิ์เชิงแสงของกรดแล็กติก

บทที่ 3 ผลการทดลองและบทวิจารณ์

3.1 การศึกษาจุลศาสตร์การเจริญของเชื้อยีสต์โดยใช้ L-แล็กเตทเป็นแหล่งคาร์บอน

3.1.1 การเลี้ยงเชื้อ *Yarrowia lipolytica* เพื่อการทดสอบกิจกรรมของเซลล์

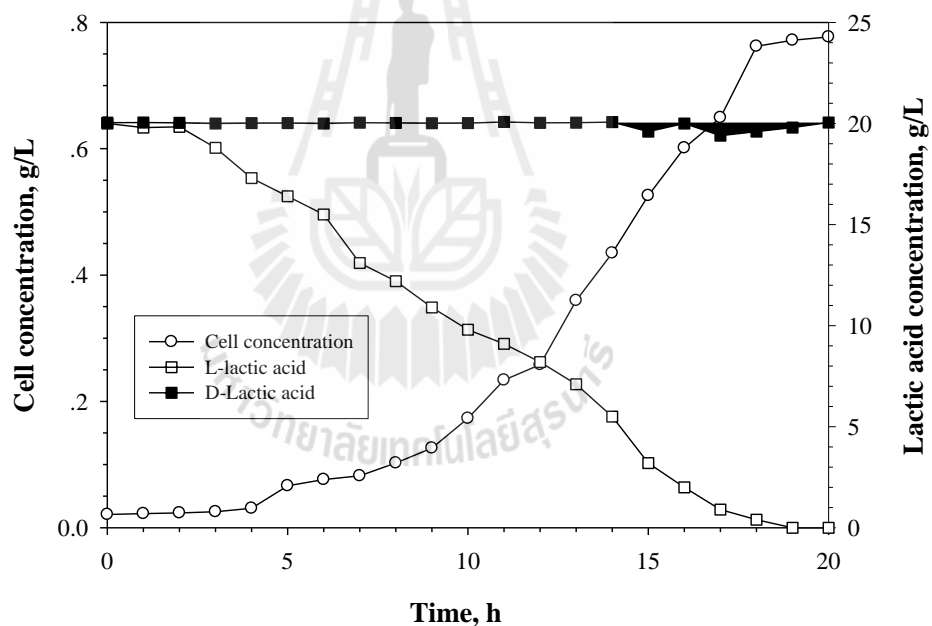
เนื่องจาก *Yarrowia lipolytica* เป็นเชื้อยีสต์ที่สามารถใช้แหล่งคาร์บอนที่หลากหลายในการให้พลังงานแก่เซลล์รวมถึง กรด L-แล็กติกด้วย ดังนั้นการศึกษากิจกรรมและการแสดงออกของเอ็นไซม์ L-lactate oxidase จึงเป็นสิ่งแรกที่จะต้องทำการศึกษาในโครงการวิจัยนี้ แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานว่ากรด L-แล็กติกเป็นสารที่ก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์ดังนั้นจึงต้องทำการทดสอบถึงผลของความเข้มข้นกรด L-แล็กติกเริ่มต้นต่อจุลศาสตร์การเจริญของเซลล์ยีสต์ดังกล่าว โดยทำการเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 200 มิลลิลิตรด้วยอาหาร YPD ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของกรด L-แล็กติกต่าง ๆ กัน และโดยทั่วไปจะทำการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้ได้ 6.5 ก่อนทำการทดลอง โดยผลการทดลองได้มาจากค่าเฉลี่ยของการทำการทดลอง 3 ซ้ำ

ตาราง 3.1 ผลกระทบของความเข้มข้น L-แล็กเตท เริ่มต้นต่อการเจริญของ *Yarrowia lipolytica*

L-แล็กเตท (กรัมต่อลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	μ (ชั่วโมง ⁻¹)	ผลผลิตเซลล์ (ต่อกรัมแล็กเตทเริ่มต้น)
10	0.31	0.19	0.031
20	0.72	0.24	0.036
30	0.97	0.23	0.032
40	1.62	0.20	0.0405
50	1.33	0.16	0.0266
50 (pH 2.0)	0.44	0.07	0.0088

ตารางที่ 3.1 แสดงถึงผลการทดลองสำหรับผลกระทบของความเข้มข้นแล็กเตทเริ่มต้นในการเจริญของ *Yarrowia lipolytica* ซึ่งผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ากรด L-แล็กติกสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนหลักเพื่อการเจริญของยีสต์ได้ โดยที่ความเข้มข้นของกรด L-แล็กติกที่เพิ่มขึ้นจะส่งผลให้เซลล์เจริญได้ดีขึ้นโดยสามารถวัดค่าการเจริญจำเพาะได้สูงสุดที่ 0.24 ชั่วโมง⁻¹ แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาพบว่าหากใช้ความเข้มข้นกรด L-แล็กติกที่สูงเกินไปจะส่งผลให้เกิดการยับยั้งจากสารตั้งต้น โดยจะเห็นว่าเมื่อความเข้มข้นของกรด L-แล็กติกสูงขึ้น ค่า μ จะลดลงจาก 0.23 เป็น 0.20 และ 0.16

ชั่วโมง⁻¹ เมื่อเมื่อความเข้มข้นของกรด L-แล็กติกมีค่า 30, 40 และ 50 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลกลูโคสที่ต่ำเกินไปก็ส่งผลให้เชื้อมีการเจริญช้าและได้เซลล์ที่มีความเข้มข้นน้อย นอกจากนี้ยังได้ทำการทดสอบผลของค่าความเป็นกรด-ด่างต่อการเจริญของเชื้อยีสต์อีกด้วย ซึ่งผลการทดลองพบว่าที่ความเข้มข้น L-แล็กติกเริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตร มีความเข้มข้นของเซลล์สุดท้ายที่ 1.33 กรัมต่อลิตร ในขณะที่เมื่อใช้ความเข้มข้นเดียวกันแต่ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เหลือ 2.0 ความเข้มข้นของเซลล์สุดท้ายที่ได้คือ 0.44 กรัมต่อลิตรเท่านั้น ซึ่งผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่ากรดแล็กติกในรูปแบบที่ยังไม่แตกตัวจะมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อยีสต์ได้มากกว่าในรูปแบบที่แตกตัวแล้ว ดังนั้นในการเพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ดังกล่าวในการทดลองต่อ ๆ ไปจะใช้ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 6.5 เท่านั้น

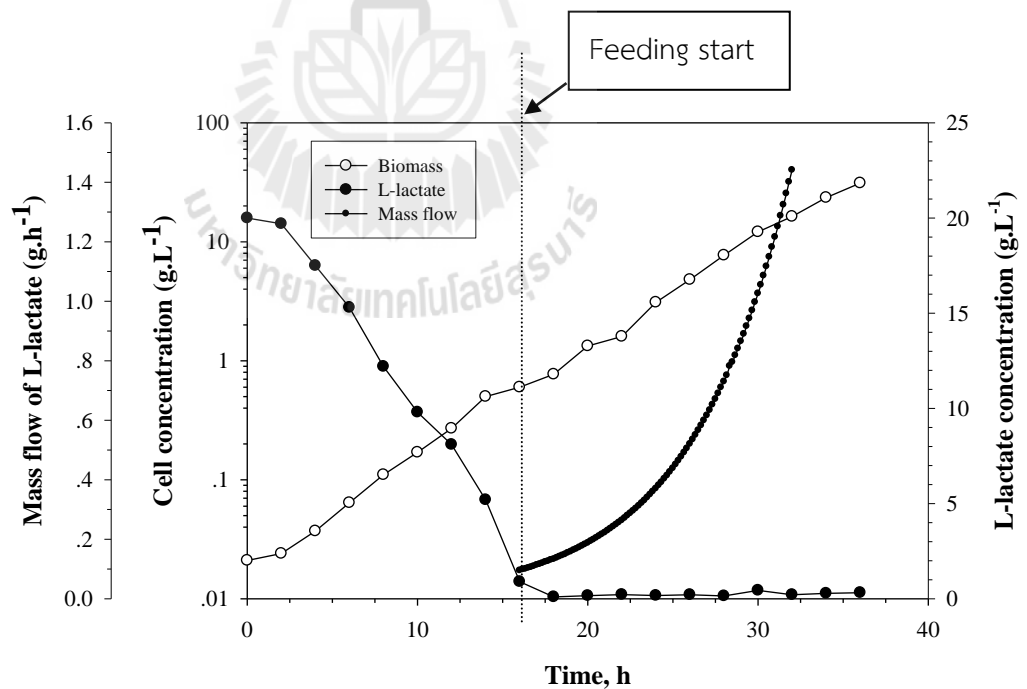


รูปภาพ 3.1 แสดงการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของกรดแล็กติกและเซลล์ยีสต์ในระหว่างการเลี้ยงเชื้อแบบกะในถังหมัก

รูปภาพ 3.1 แสดงผลการทดลองการเลี้ยงเซลล์ *Yarrowia lipolytica* ในถังหมักแบบกะ และการใช้กรด L-แล็กติกจากสารละลายผสมระหว่าง D- และ L- แล็กติกความเข้มข้นอย่างละ 20 กรัมต่อลิตร โดยทำการทดลองเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ปริมาตร 4 ลิตรในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร และมีอัตราการให้อากาศที่ 0.5 VVM ทั้งนี้เนื่องจากเอ็นไซม์ L-แล็กติกออกซิเดสนั้นต้องการออกซิเจนในการทำงาน ซึ่งจากผลการทดลองการเลี้ยงเซลล์นั้น พบว่าเป็นไป

ตามกราฟการเจริญของจุลินทรีย์โดยทั่วไปซึ่งเป็นแบบรูปตัวเอส (sigmoid curve) โดยเชื้อยีสต์จะใช้เวลาประมาณ 5 ชั่วโมงในการปรับตัว (lag phase) ก่อนที่จะมีการเจริญอย่างรวดเร็วในช่วง log หรือ exponential phase โดยความเข้มข้นของเซลล์เพิ่มขึ้นจาก 0.02 กรัมต่อลิตรไปเป็นประมาณ 0.81 กรัมต่อลิตร ในช่วงปลายของ exponential phase ก่อนที่ความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์จะมีค่าคงที่ในช่วง stationary phase ที่ประมาณ 19 ชั่วโมง ในขณะที่ความเข้มข้นของ L-แล็กเตทจะมีค่าลดลงอย่างต่อเนื่อง ก่อนที่จะหมดไปในช่วงเวลาประมาณชั่วโมงที่ 18 ส่วนความเข้มข้นของ D-แล็กเตทนั้นพบว่ามีความคงที่ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อยีสต์นั้นจะไม่ใช้ D-แล็กเตท เป็นแหล่งพลังงาน จึงนับว่าการทดลองเบื้องต้นนี้ ประสบความสำเร็จเป็นอย่างดี อย่างไรก็ตามก็ตามความเข้มข้นของเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยงแบบกะนี้จะมีค่าไม่เกิน 1 กรัมต่อลิตร ซึ่งถือว่าน้อยมาก ทำให้ต้องใช้ขนาดของถังหมักที่มีขนาดใหญ่หากต้องการเซลล์ยีสต์ในปริมาณที่มาก

3.1.2 การเลี้ยงเชื้อแบบความเข้มข้นสูง (High cell density cultivation)



รูปภาพ 3.2 กราฟแสดงการเจริญของ *Yarrowia lipolytica* ความเข้มข้นของ L-แล็กเตทและอัตราการใช้โดยมวลของ L-แล็กเตทระหว่างการเลี้ยงเชื้อด้วยความเข้มข้นสูง

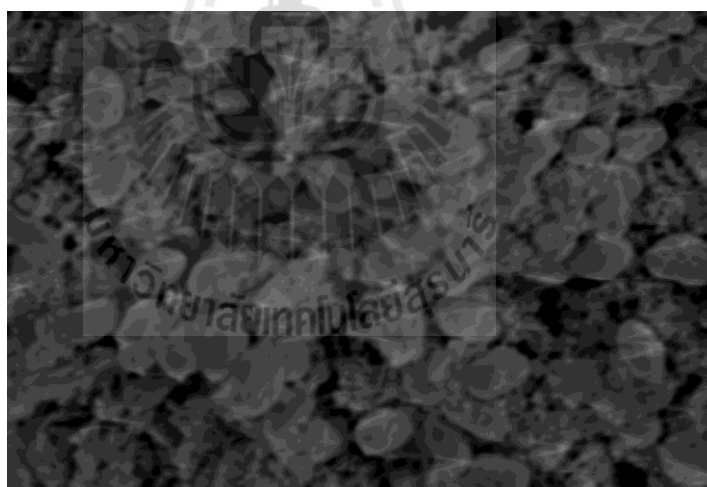
สิ่งที่น่าศึกษาสำหรับการผลิตเซลล์ในปริมาณที่มากโดยมีข้อจำกัดในด้านขนาดของถังปฏิกรณ์ชีวภาพนั้นเป็นงานที่ท้าทายมาก ทั้งนี้เนื่องจากถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีขนาดใหญ่มักจะมีราคาที่สูง ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาการเลี้ยงเชื้อยีสต์แบบความเข้มข้นสูงหรือที่เรียกว่า high cell density cultivation เพื่อให้ได้เซลล์ที่มีจำนวนมากโดยใช้ขนาดของการหมักที่เล็ก รูปภาพ 3.2 แสดงกราฟที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของเชื้อยีสต์ *Yarrowia lipolytica* ความเข้มข้นของ L-แล็กเตทในถังปฏิกรณ์ชีวภาพและอัตราการไหลโดยมวลของ L-แล็กเตทระหว่างการเลี้ยงเชื้อด้วยความเข้มข้นสูงด้วยเทคนิคการป้อนแบบกึ่งกะ ซึ่งการคำนวณอ้างอิงจากสมการ 2.6 โดยได้กำหนดค่าการเจริญจำเพาะไว้ที่ $0.17 \text{ ชั่วโมง}^{-1}$ เนื่องจากหากตั้งค่านี้ไว้สูงเกินไป จะทำให้เกิดความต้องการออกซิเจนในระบบมากเกินไป และถ้าหากอัตราการป้อนอากาศไม่เพียงพอก็จะทำให้ผลการทดลองคลาดเคลื่อนได้ โดยวิถีของการหายใจจะเปลี่ยนจากมีอากาศ (aerobic respiration) ไปเป็นแบบไม่ใช้อากาศ (anaerobic respiration) ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อตรงต่อการแสดงออกถึงเอนไซม์ L-lactate oxidase ภายในเซลล์ยีสต์ได้ นอกจากนี้การหายใจแบบไม่ใช้อากาศยังอาจจะส่งผลกระทบต่อการสร้างผลพลอยได้อื่น ๆ เช่นกรดอินทรีย์ต่าง ๆ โดยมีรายงานว่าเชื้อยีสต์ *Yarrowia lipolytica* สามารถผลิตกรดอินทรีย์ที่เป็นอนุพันธ์ของกรดอินทรีย์ที่อยู่ในวัฏจักรของเครป (Kreb's cycle) ได้เช่น อัลฟาคีโตกลูตาริก กรดไพรูวิกและประเภทรดซิตริก ได้อีกด้วยหากอยู่ในสภาวะที่ไร้อากาศ (Casal *et al.*, 2008) ดังนั้นจึงต้องควบคุมปริมาณของความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักให้ดี ส่วนอัตราการป้อนของ L-แล็กเตทนั้นจะเป็นแบบเอ็กโปเนนเชียลตามค่าอัตราการเจริญจำเพาะที่ได้กำหนดไว้ ส่วนผลการทดลองพบว่าอัตราการเจริญของเชื้อยีสต์ได้ผลเป็นที่น่าพอใจ โดยการเลี้ยงเชื้อแบบกะนั้น ได้ความเข้มข้นของเซลล์สุดท้ายที่ 0.77 กรัมต่อลิตรเนื่องจากความเข้มข้นเริ่มต้นของ L-แล็กเตทมีความเข้มข้นต่ำ และการป้อน L-แล็กเตทเข้มข้นจะเริ่มเมื่อความเข้มข้นของ L-แล็กเตทในถังปฏิกรณ์ชีวภาพต่ำกว่า 1.0 กรัมต่อลิตร (ปริมาตรเริ่มต้นของน้ำหมักคือ 2 ลิตร) โดยเริ่มต้นได้ทำการป้อน L-แล็กเตทที่ 0.09 กรัมต่อชั่วโมง เมื่อเซลล์ยีสต์ได้รับอาหารเพิ่มเติม ก็จะเริ่มเจริญอีกครั้งหนึ่งโดยพบว่าเซลล์ได้เพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็ว มีอัตราการเจริญจำเพาะของเซลล์อยู่ที่ 0.15 ต่อชั่วโมง ซึ่งมีความสอดคล้องกับการกำหนดค่าดังกล่าวก่อนเริ่มทำการทดลอง โดยเมื่อสิ้นสุดการป้อนอาหารเข้มข้น ณ เวลา 36 ชั่วโมงนั้นพบว่าความเข้มข้นของเซลล์ที่ได้สูงสุดอยู่ที่ 30.8 กรัมต่อลิตร ซึ่งนับว่าเป็นค่าที่สูงมาก และปริมาตรสุดท้ายของน้ำหมักที่ได้คือ 3.8 ลิตร ในขณะที่ความเข้มข้นของ L-แล็กเตทในถังปฏิกรณ์ชีวภาพตลอดการทดลองพบว่ามีระดับที่ต่ำ ไม่เกิน 1.0 กรัมต่อลิตรและความเข้มข้นไม่มีการเพิ่มขึ้นแต่อย่างใด จึงสามารถสรุปได้ว่า L-แล็กเตทที่ได้ทำการป้อนเข้าไปในระบบนั้น ได้ถูกนำไปใช้ในการเจริญและการรักษาสภาพ (maintenance) ของเชื้อยีสต์แต่เพียงอย่างเดียว หลังจากที่ได้เซลล์ยีสต์ตามต้องการ

แล้ว จึงนำไปทำการตรึงเซลล์ด้วยไซเตียมอัลจินทก่อนที่จะนำไปบรรจุใส่ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบท่อไหล เพื่อทดสอบการทำปฏิกิริยาเชิงแสงของกรดผสม D- และ L-แล็กติกต่อไป

3.2 การทดสอบการแยกกรด D และ L-แล็กติกด้วยถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

3.2.1 การศึกษาสัณฐานด้วย Scanning Electron Microscope

หลังจากที่เสร็จสิ้นการเลี้ยงเชื้อยีสต์ด้วยความเข้มข้นสูงแล้ว เซลล์ยีสต์ได้ถูกปั่นเหวี่ยงและกำจัดน้ำหมักทิ้งไป จากนั้นนำไปตรึงในไซเตียมอัลจินตโดยการทำให้มีลักษณะเป็นเม็ด (beads) ดังที่แสดงในหัวข้อ 2.4.1 จากนั้นได้นำเม็ดอัลจินต ดังกล่าวไปศึกษาภายใต้เครื่อง scanning electron microscope โดยพบว่าที่ผิวด้านนอกของเม็ดอัลจินตนั้นจะมีเซลล์ยีสต์เกาะอยู่ในปริมาณที่เล็กน้อย ในขณะที่ภายในเม็ดอัลจินตพบว่ามี การกระจายตัวของเซลล์ยีสต์อย่างหนาแน่นและสม่ำเสมอ (รูปภาพ 3.3) ดังนั้นกลไกของการออกซิไดซ์ L-แล็กเตทจึงเป็นการแพร่ของสารตั้งต้นผ่านเมทริกซ์ของชั้นอัลจินตก่อนที่จะเข้าสู่เซลล์ต่อไป

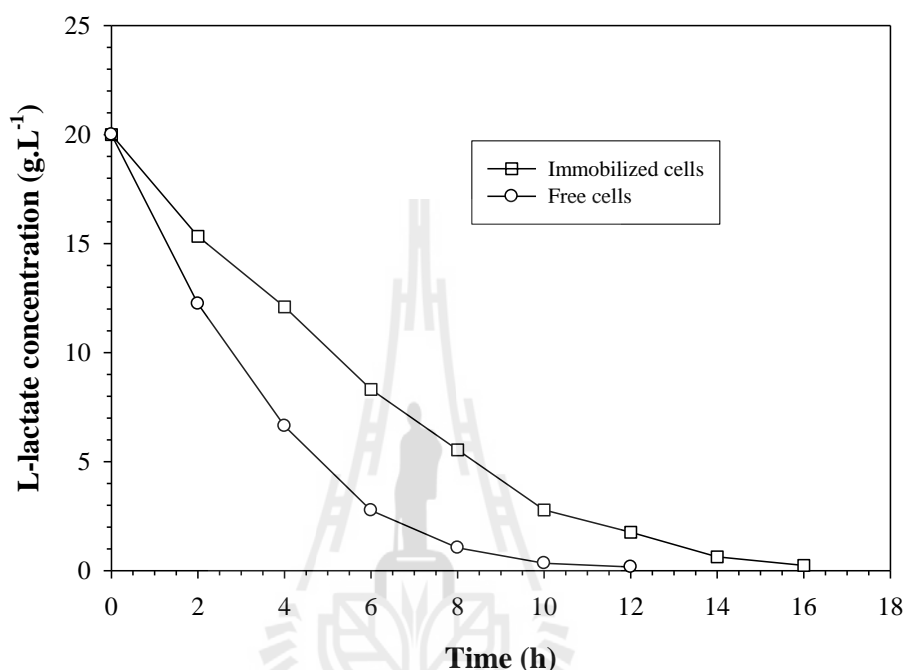


รูปภาพ 3.3 ภาพถ่าย SEM ของเชื้อยีสต์ที่ถูกตรึงในเม็ดอัลจินต

3.2.2 ปฏิกริยาการออกซิไดซ์ L-แล็กเตทด้วยเชื้อยีสต์ที่ถูกตรึงในอัลจินต

ข้อต่อประการหนึ่งของการตรึงเซลล์ในเม็ดอัลจินตนั้นคือการเกิดข้อจำกัดในการถ่ายเทมวลจากสารละลายไปยังเซลล์ยีสต์เนื่องจากในระบบปกติ สารตั้งต้นจะถูกนำเข้าสู่เซลล์โดยตรงด้วยการลำเลียงแบบใช้พลังงาน (active transport) ในขณะที่การตรึงเซลล์ด้วยวุ้นอัลจินตนั้น การถ่ายเทมวลเข้าไปในเซลล์จะเป็นการดูดซับของสารตั้งต้นบนผิวด้านนอกของเม็ดอัลจินตก่อนที่จะเข้าสู่เซลล์โดย

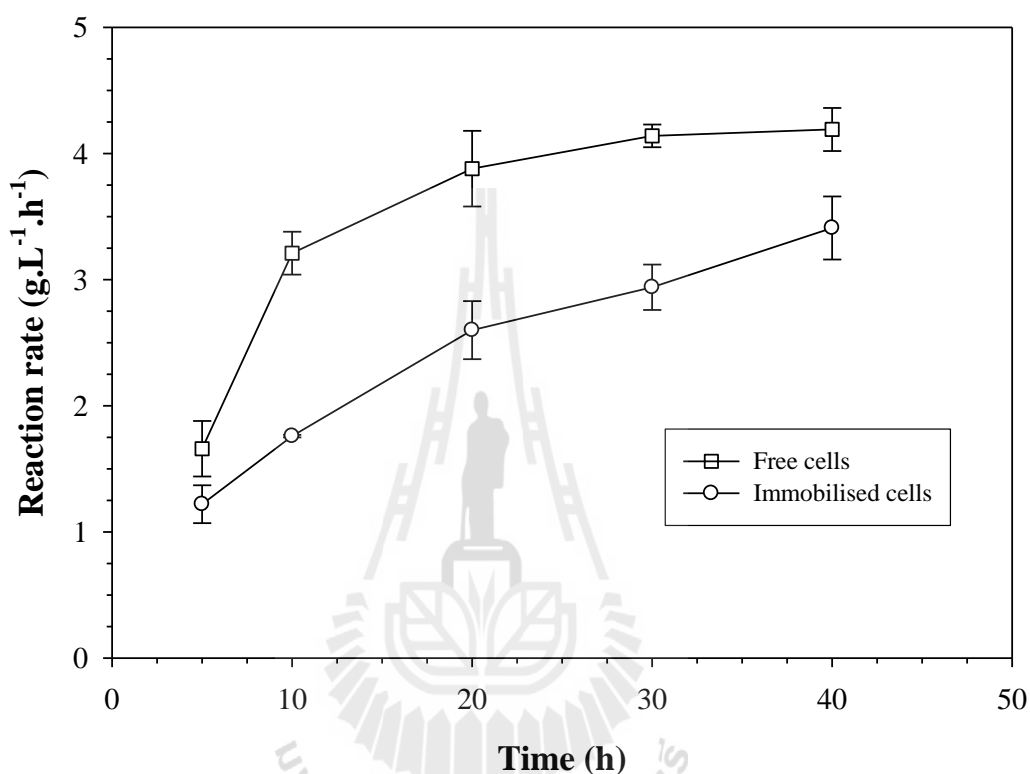
การแพร่ของสารตั้งต้นผ่านเมตริกซ์ของอัลจิเนตเนื่องจากเกิดผลต่างของความเข้มข้นระหว่างด้านนอกและด้านในของชั้นอัลจิเนตนั่นเอง



รูปภาพ 3.4 อ็อกซิเดชันของ L-แล็กเตทโดยเชื้อยีสต์ที่มีการเคลื่อนที่โดยอิสระและเชื้อยีสต์ที่ถูกตรึง

รูปภาพ 3.4 แสดงผลการทดลองอ็อกซิเดชันของ L-แล็กเตทโดยเชื้อยีสต์ที่มีการเคลื่อนที่โดยอิสระและเชื้อยีสต์ที่ถูกตรึงในเม็ดอัลจิเนต ซึ่งการทดลองนี้ใช้สารตั้งต้นคือ L-แล็กเตทความเข้มข้นเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นทั้งสองการทดลองเท่ากันคือ 30 กรัมต่อลิตร ทำการทดสอบในขวดรูปชมพู่ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสและทำการเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที ซึ่งจากการทดลองพบว่าความเข้มข้นของ L-แล็กเตทลดลงอย่างต่อเนื่องสำหรับทั้งเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกตรึงในเม็ดเจล แต่อัตราการลดลงของเซลล์อิสระจะมีมากกว่า โดยจากกราฟสามารถวัดอัตราการลดลงในช่วงแรกหรืออัตราของปฏิกิริยา (reaction rate) ได้ที่ 3.88 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง หลังจากนั้นอัตราการลดลงของความเข้มข้น L-แล็กเตทจะค่อย ๆ ลดลง (ความชันของกราฟมีค่าลดลง) โดย L-แล็กเตทถูกใช้จนหมดลงในชั่วโมงที่ 12 ของการทดลอง ส่วนกราฟของเซลล์ที่ถูกตรึงในเม็ดอัลจิเนตนั้น จะเห็นได้ว่าเกิดข้อจำกัดในการถ่ายเทมวลระหว่างในสารละลายกับในเม็ดอัลจิเนต จากกราฟสามารถวัด

อัตราการลดลงในช่วงแรกได้ที่ 2.34 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง หลังจากนั้นอัตราการลดลงของความเข้มข้น L-แล็กเตทจะค่อย ๆ โดย L-แล็กเตทถูกใช้จนหมดลงในชั่วโมงที่ 16 ของการทดลอง

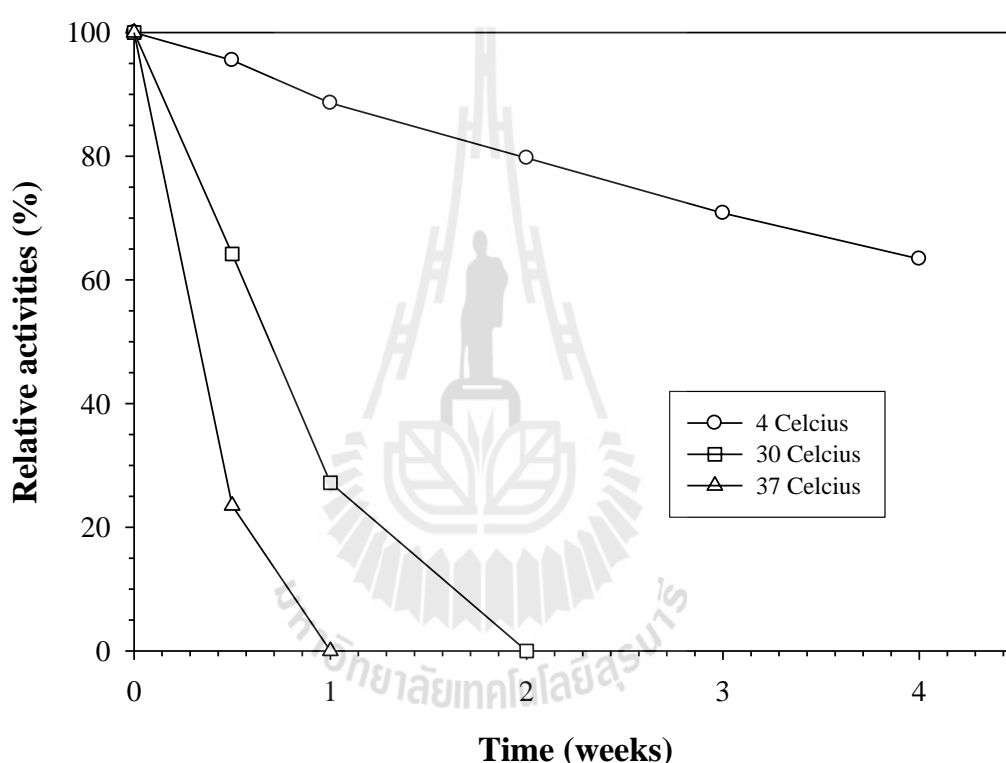


รูปภาพ 3.5 อิทธิพลของความเข้มข้น L-แล็กเตทเริ่มต้นต่อค่าอัตราการเกิดปฏิกิริยาเริ่มต้นระหว่างเชื้อยีสต์ที่มีการเคลื่อนที่โดยอิสระและเชื้อยีสต์ที่ถูกตรึงด้วยอัลจิเนต

ตาราง 3.2 แสดงอิทธิพลของความเข้มข้น L-แล็กเตทที่มีต่อค่า reaction rate เริ่มต้น โดยทำการศึกษาในช่วงความเข้มข้นของ L-แล็กเตทระหว่าง 5 ถึง 40 กรัมต่อลิตร ในส่วนของเซลล์อิสระจากการทดลองพบว่าค่าอัตราของปฏิกิริยาจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ L-แล็กเตทที่ใช้ โดยในช่วง 5 ถึง 10 กรัมต่อลิตรนั้น อัตราการเพิ่มขึ้นจะมีค่าสูงมาก ในขณะที่ความเข้มข้นในช่วง 20 ถึง 40 กรัมต่อลิตรนั้น การเพิ่มขึ้นของอัตราของปฏิกิริยาจะเพิ่มขึ้นในสัดส่วนที่น้อยกว่าในช่วงแรก โดยเกือบจะคงที่ในช่วง 30 ถึง 40 กรัมต่อลิตร แสดงให้เห็นว่าน่าจะเป็นค่าสูงที่สุดแล้วคือ 4.20 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ส่วนเซลล์ยีสต์ที่ถูกตรึงด้วยอัลจิเนตนั้น พบว่าอัตราของปฏิกิริยาจะช้ากว่ายีสต์อิสระในทุก ๆ ความเข้มข้นของ L-แล็กเตท นอกจากนี้ความชันของกราฟยังน้อยกว่าอีกด้วย โดยค่าสูงสุดของอัตรา

ของปฏิกิริยาที่วัดได้คือ 3.41 กรัมต่อลิตรต่อนาที่ ซึ่งต่ำกว่ายีสต์อิสระประมาณร้อยละ 20 ณ ความเข้มข้นเดียวกัน ส่วนสาเหตุของการเกิดปรากฏการณ์นี้นั้น คาดว่าสืบเนื่องมาจากข้อจำกัดของการถ่ายเทมวลภายในชั้นของเจลอัลจินเตนั่นเอง

3.2.3 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเชื้อยีสต์ระหว่างการเก็บรักษา



รูปภาพ 3.6 การสูญเสียกิจกรรมของเอ็นไซม์ L-lactate oxidase โดยเซลล์ยีสต์ที่ถูกตรึงในเม็ดอัลจินเตในระหว่างการเก็บรักษา ณ อุณหภูมิต่าง ๆ

ปัจจัยที่สำคัญอีกอย่างหนึ่งของการศึกษาสมบัติของการตรึงเซลล์ยีสต์ด้วยอัลจินเตคือ การศึกษาการคงกิจกรรมของเอ็นไซม์ ณ สภาวะแวดล้อมต่าง ๆ เช่น ค่าความเป็นกรด-ด่าง เวลา และ อุณหภูมิในการบ่มหรือการเก็บรักษาเป็นต้น โดยที่สภาวะของความเป็นกรด-ด่างนั้น จากการศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับการเลี้ยงเชื้อยีสต์ในหัวข้อ 3.1.1 ได้พบว่ากรด L-แล็กติกมีความเป็นพิษต่อเซลล์ยีสต์สูงเมื่ออยู่ในสถานะที่ไม่แตกตัว (pH ต่ำ) อยู่แล้ว ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงไม่ได้ศึกษารายละเอียดเพิ่มเติมถึงอิทธิพลของความเป็นกรด-ด่าง แต่ยังคงศึกษาถึงอิทธิพลของอุณหภูมิและเวลาในการเก็บรักษาเชื้อยีสต์ที่มีต่อค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ (relative activities) ของเซลล์ โดยในทางปฏิบัติแล้ว เชื้อยีสต์ควรที่จะ

active และมีความคงตัวดีพอสมควรในระหว่างการทดลอง โดยรูปภาพ 3.6 แสดงการสูญเสียกิจกรรมของเอ็นไซม์ L-lactate oxidase โดยเซลล์ยีสต์ที่ถูกตรึงในเม็ดอัลจินตในระหว่างการเก็บรักษาด้วยน้ำกลั่น ณ อุณหภูมิต่าง ๆ คือ 4, 30, และ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งผลการทดลองโดยทั่ว ๆ ไป พบว่า อุณหภูมิการเก็บรักษาที่ต่ำกว่าจะทำให้สูญเสียกิจกรรมน้อยกว่าการเก็บที่อุณหภูมิสูง เมื่อเวลาผ่านไป 1/2 สัปดาห์พบว่ากิจกรรมสัมพันธ์ของเซลล์ยีสต์ลดลงเหลือร้อยละ 95.5, 64.2 และ 23.5 จากอุณหภูมิของการเก็บรักษาที่ 4, 30, และ 37 องศาเซลเซียสตามลำดับ และเมื่อเวลาผ่านไป 1 สัปดาห์ เซื้อยีสต์ที่ถูกเก็บไว้ในอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนั้น จะสูญเสียกิจกรรมในการออกซิไดซ์ L-แล็กเตทไปทั้งหมด ส่วนยีสต์ที่เก็บในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสนั้น พบว่ากิจกรรมสัมพันธ์ลดลงเหลือร้อยละ 99.5, 88.6, 79.7, 70.8, และ 63.4 เมื่อเวลาผ่านไป 1/2, 1, 2, 3, และ 4 สัปดาห์ตามลำดับ โดยค่ากิจกรรมสัมพันธ์ ณ ช่วงเวลาต่าง ๆ นี้สามารถนำไปคำนวณหาค่าการหยุดยั้งจำเพาะ (deactivation constant) ดังสมการ

$$\ln \frac{A}{A_0} = -k_d t \quad 3.1$$

โดยจากรูปภาพ 3.6 เมื่อทำการพล็อตแกน Y ใหม่โดยปรับให้เป็นค่า ln จะได้กราฟที่มีลักษณะเป็นเส้นตรงและเมื่อทำการหาค่าความชัน จะได้ค่า deactivation constant (k_d) ซึ่งจากรูปภาพของการเก็บรักษาทั้ง 3 อุณหภูมิ (4, 30, และ 37 องศาเซลเซียส) พบว่าจะได้ค่า k_d เท่ากับ 0.11, 1.30, และ 2.89 วัน⁻¹ นอกจากนี้ยังสามารถคำนวณหาค่าครึ่งชีวิต (half-life) ของกิจกรรมจากเชื้อยีสต์นี้ได้ ดังสมการ

$$\ln 2 = -k_d t_{1/2} \quad 3.2$$

ซึ่งจากรูปภาพของการเก็บรักษาทั้ง 3 อุณหภูมิ (4, 30, และ 37 องศาเซลเซียส) พบว่า สามารถคำนวณได้ค่า half-life, $t_{1/2}$ เท่ากับ 6.30, 0.53, และ 0.22 วัน ตามลำดับ ซึ่งค่าครึ่งชีวิตนั้นจะหมายถึงเวลาที่กิจกรรมของเซลล์ใช้ในการสลายตัวเหลือกิจกรรมของเซลล์ครึ่งหนึ่งของที่มีอยู่เดิม โดยการสลายตัวของกิจกรรมของยีสต์นี้ พบว่ามีสลายตัวแบบในเอ็กโปเนนเชียล แต่อย่างไรก็ตามการสูญเสียกิจกรรมของเซลล์นี้ อาจจะไม่เกี่ยวข้องกับอัตราการตายจำเพาะของเซลล์ (specific death rate) โดยที่เซลล์ที่สูญเสียกิจกรรมของเอ็นไซม์ L-lactate oxidase ไป อาจจะยังมีชีวิตอยู่ก็เป็นได้ และเมื่อมีการเติม L-แล็กเตทอีก เซื้อยีสต์อาจจะมีการสังเคราะห์เอ็นไซม์ขึ้นมาใหม่ได้อีก โดยหากต้องการศึกษาอัตราการตายจำเพาะของเซลล์ยีสต์เพิ่มเติม จึงควรที่จะหาวิธีการอื่นนอกเหนือจากการวัดค่ากิจกรรมของเซลล์แต่เพียงอย่างเดียว เช่นการทำ viable plate count เป็นต้น

3.2.4 อิทธิพลของระยะเวลาพำนัก (resident time)

อิทธิพลที่สำคัญที่สุดของการวิเคราะห์ระบบถังปฏิกรณ์แบบท่อไหลคือการศึกษอิทธิพลของระยะเวลาพำนักหรือในที่นี่จะเรียกว่า resident time (τ) โดยการวิเคราะห์จะตั้งสมมุติฐานว่าปฏิกิริยาชีวเคมีของการออกซิไดซ์ L-แล็กเตทนั้นจะเกิดขึ้นภายในท่อโดยเกิดขึ้นในลักษณะที่เป็นแนวอน (axial position) ขนานไปกับทิศทางการจัดวางท่อ และการไหลของสารตั้งต้นเป็นไปอย่างทั่วถึงและสม่ำเสมอตลอดพื้นที่หน้าตัดของทิศทางการไหล ซึ่งค่าเวลา resident time นั้น อ้างอิงจากสมการ 1.1 โดยสามารถทำการวัดได้ดังนี้

$$\tau = \frac{L}{V_s} \varepsilon \quad 3.3$$

ซึ่ง L คือปริมาตรของคอลัมน์ (120 มิลลิลิตร) V_s คืออัตราการไหลเชิงปริมาตรของสารป้อน (มิลลิลิตรต่อชั่วโมง) และ ε คือค่า void volume ซึ่งสามารถวัดโดยการเติมน้ำกลั่นให้เต็มความจุของคอลัมน์ (120 มิลลิลิตร) ภายหลังจากที่ได้ทำการบรรจุเมล็ดอัลจิเนตลงไปแล้ว ซึ่งปริมาตรของน้ำกลั่นที่วัดได้นี้ เมื่อนำมาลบออกจากปริมาตรเริ่มต้นของคอลัมน์ก็จะคือค่า void volume นั้นเอง

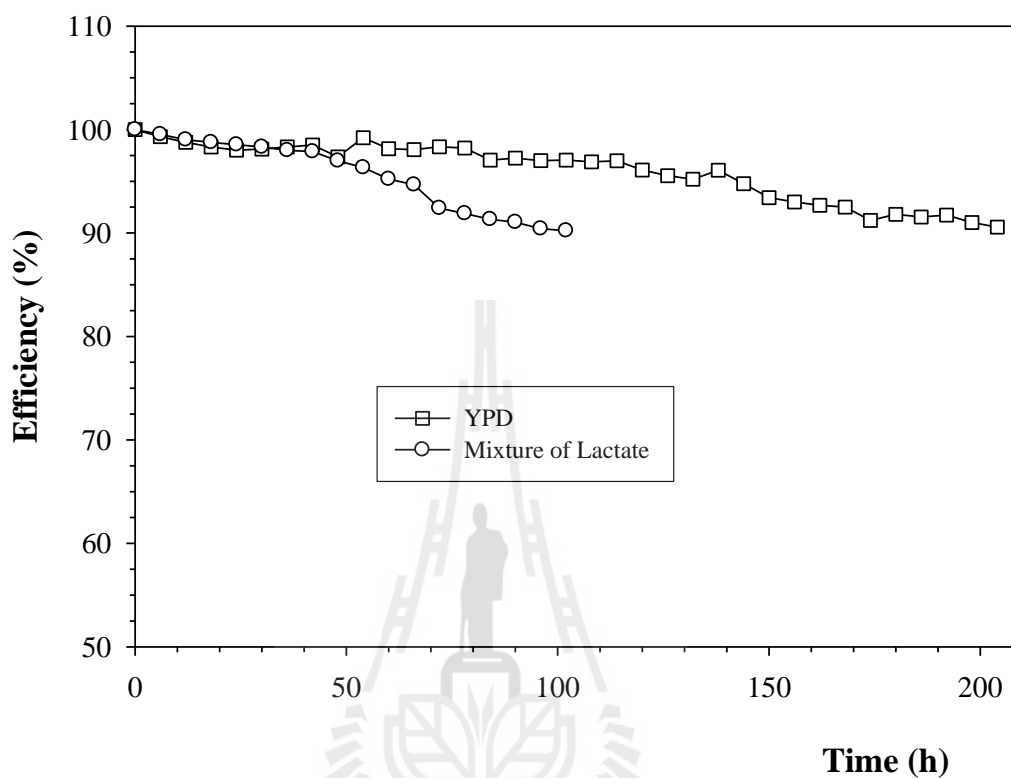
ตาราง 3.2 อิทธิพลของ resident time ต่อประสิทธิภาพการออกซิไดซ์ L-แล็กเตทในถังปฏิกรณ์แบบท่อไหลโดยใช้อุณหภูมิของการทดลอง 30 องศาเซลเซียส

ลำดับ	τ (นาท)	ความเข้มข้นของ L-แล็กเตท ใน Feed (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นของ L-แล็กเตท ใน Effluent (กรัมต่อลิตร)	ประสิทธิภาพ (%)
1	5.0	20.0	14.74	26.30
2	10.1	20.0	7.79	61.05
3	14.9	20.0	3.21	83.95
4	20.2	20.0	0.51	97.45
5	25.1	20.0	0.32	98.40
6	25.1	40.0	12.55	68.63

ตาราง 3.2 แสดงถึงอิทธิพลของ resident time (τ) ของสารละลาย L-แล็กเตทในถังปฏิกรณ์แบบท่อไหล ณ เวลาที่แตกต่างกัน โดยค่าดังกล่าวเป็นค่าที่แปรผกผันกับค่าอัตราการป้อนของสารละลาย การป้อนในอัตราที่เร็วจะส่งผลทำให้เวลาในการเคลื่อนที่ในถังปฏิกรณ์ลดลง ซึ่งผลการ

ทดลองแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าปัจจัยหลักที่มีผลต่อประสิทธิภาพการออกซิไดซ์ L-แล็กติกคือเวลาที่สารเคลื่อนที่ในถังปฏิกรณ์นั่นเอง ในที่นี้ประสิทธิภาพของระบบสามารถคำนวณได้จากความเข้มข้นของ L-แล็กเตทที่ลดลงส่วนความเข้มข้นของ L-แล็กเตทเมื่อเริ่มต้นการทดลองนั่นเอง จากผลการทดลองพบว่า resident time ที่ 5 นาที พบว่าความเข้มข้นของ L-แล็กเตทใน effluent ถูกออกซิไดซ์ไปเพียงร้อยละ 26.3 เท่านั้น แสดงให้เห็นว่าปฏิกิริยาเกิดขึ้นช้ามาก โดยเกิดจากอัตราการไหลที่เร็วเกินไปและอาจจะเกิดข้อจำกัดในด้านการถ่ายเทมวล (mass transfer limitation) ของ L-แล็กเตทภายในเมมเบรนอีกด้วย ดังนั้นเพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพของระบบ จึงทำการลดอัตราการป้อนลงเพื่อให้ค่า resident time มีมากขึ้น ซึ่งผลการทดลองได้เป็นตามสมมุติฐานกล่าวคือประสิทธิภาพของถังปฏิกรณ์ในการออกซิไดซ์ L-แล็กเตทเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 61.05, 83.95, 97.45 และ 98.40 เมื่อเพิ่ม resident time เป็น 10, 15, 20, และ 25 นาทีตามลำดับ (การทดลองที่ 2 ถึง 5) โดยลักษณะการเพิ่มขึ้นของประสิทธิภาพจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงแรก ๆ และอัตราการเพิ่มขึ้นจะค่อย ๆ ลดลงเมื่อ resident time เพิ่มขึ้น โดยที่ 20 และ 25 นาที ประสิทธิภาพของ ส่วนการทดลองที่ 6 นั้นเป็นการศึกษาการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ L-แล็กเตท โดยทำการเปรียบเทียบที่ค่า resident time ที่เท่ากัน ซึ่งผลการทดลองพบว่าประสิทธิภาพของถังปฏิกรณ์จะลดลงเหลือเพียงร้อยละ 68.63 เท่านั้น

จากผลการทดลองนี้ จึงสามารถสรุปได้ว่าค่าที่เหมาะสมในการทำให้ประสิทธิภาพของถังปฏิกรณ์มีค่าสูงสุดคือ resident time 25 นาทีและความเข้มข้นของ L-แล็กเตทเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาเกี่ยวกับอิทธิพลของค่า resident time ที่มีต่อประสิทธิภาพของถังปฏิกรณ์แบบท่อไหลนี้ เป็นเพียงการทดสอบเบื้องต้นในระยะเวลาสั้น ๆ เท่านั้น จุดประสงค์หรือเป้าหมายหลักของการประยุกต์ใช้ถังปฏิกรณ์แบบท่อไหลในงานวิจัยนี้คือการออกซิไดซ์ L-แล็กเตทอย่างสมบูรณ์ภายในท่อปฏิกรณ์และมีความคงตัวสูง สามารถปฏิบัติงานได้ในระยะเวลายาวนาน ซึ่งจากผลการทดลองเบื้องต้นในหัวข้อ 2.3.2 นั้นพบว่าเชื้อยีสต์จะมีการสูญเสียกิจกรรมในการออกซิไดซ์ L-แล็กเตทในระหว่างที่ทำการเก็บรักษา และอัตราของการสูญเสียจะมีมากขึ้นเมื่อใช้ระยะเวลาและอุณหภูมิที่สูงขึ้นในการเก็บรักษา ซึ่งอาจจะส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพของท่อปฏิกรณ์เมื่อทำการทดลองในระยะยาวได้ ดังนั้นการทดลองถัดไป นักวิจัยได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของถังปฏิกรณ์แบบท่อไหลโดยได้เปรียบเทียบองค์ประกอบของสารละลายระหว่างสารละลายที่เป็นของผสมของกรด D- และ L-แล็กเตทแต่เพียงอย่างเดียวกับสารละลายที่เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อแบบ YPD ซึ่งเป็นของผสมของกรด D- และ L-แล็กเตทที่มีการเติมแหล่งไนโตรเจนลงไป (สารสกัดจากยีสต์และเพปโตน) โดยไนโตรเจนนี้ อาจจะช่วยในการรักษาสภาพของเซลล์ (maintenance) ให้ยาวนานขึ้น

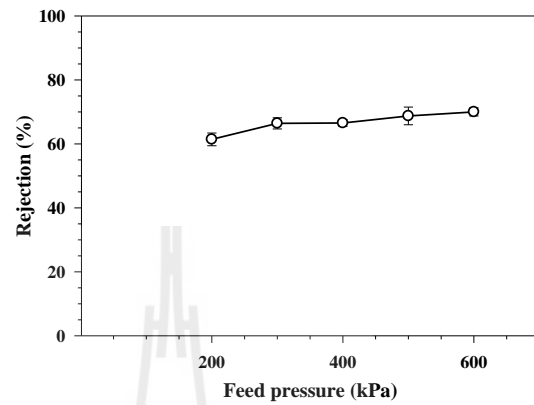


รูปภาพ 3.7 อธิบายผลของการเสริมแหล่งไนโตรเจนที่มีต่อประสิทธิภาพการออกซิเดชันของ L-แล็กเตทด้วยยีสต์ *Yarrowia lipolytica* ที่ถูกตรึงด้วยอัลจิเนตในถังปฏิกรณ์แบบท่อไหล

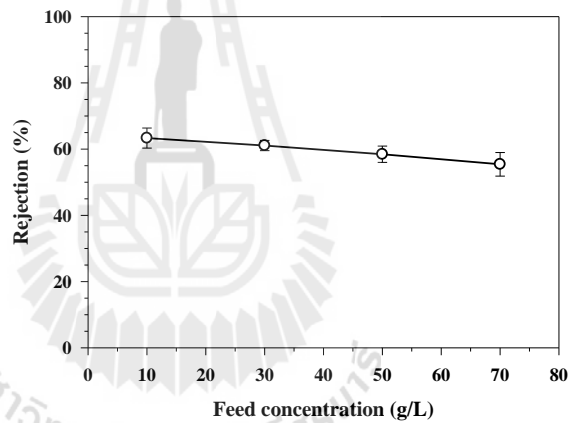
รูปภาพ 3.7 แสดงผลการทดลองประสิทธิภาพของการเสริมแหล่งไนโตรเจนที่มีต่อประสิทธิภาพในการออกซิเดชันของ L-แล็กเตทด้วยเชื้อยีสต์ *Yarrowia lipolytica* ที่ถูกตรึงด้วยอัลจิเนตในถังปฏิกรณ์แบบท่อไหล โดยผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพของท่อปฏิกรณ์มีค่าลดลงอย่างต่อเนื่องเมื่อใช้แต่เพียงสารละลายผสมของแล็กเตทแต่เพียงอย่างเดียว โดยเมื่อทำการทดลองไปเรื่อยๆ พบว่าปริมาณของ L-แล็กเตทใน effluent มีความเข้มข้นที่สูงขึ้นเรื่อยๆ โดยการทดลองได้หยุดลงเมื่อประสิทธิภาพของท่อปฏิกรณ์ลดลงมากกว่าร้อยละ 90 ซึ่งใช้เวลาไปประมาณ 100 ชั่วโมง ส่วนการป้อนสารละลายด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด YPD นั้น พบว่าประสิทธิภาพของท่อปฏิกรณ์ดีกว่าการป้อนเฉพาะสารละลายผสมของแล็กเตทแต่เพียงอย่างเดียว โดยสามารถยืดระยะเวลาปฏิบัติการไปได้อีกเป็นประมาณ 210 ชั่วโมงก่อนที่ประสิทธิภาพของท่อปฏิกรณ์จะลดลงต่ำกว่าร้อยละ 90 ซึ่งผลของการเสริมแหล่งไนโตรเจนลงในสารละลายจะส่งผลให้กิจกรรมของเชื้อยีสต์ในการออกซิเดชัน L-แล็กเตทมีประสิทธิภาพมากขึ้นเนื่องจากเซลล์ยีสต์สามารถรักษาสภาพของเซลล์ได้ดีกว่านั่นเอง

3.3 การทำบริสุทธิ์ด้วยระบบนาโนฟิวเตรชั่น

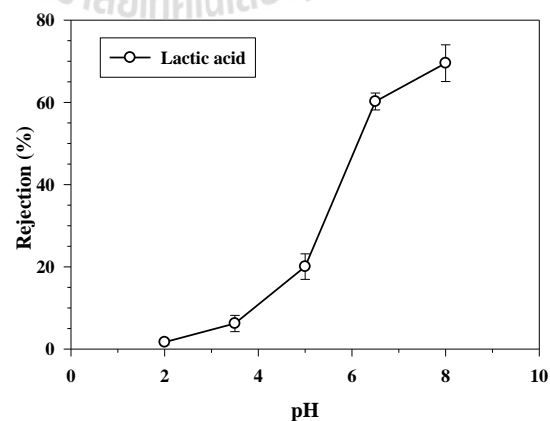
3.3.1. การทดสอบระบบด้วยสารป้อนสังเคราะห์



A



B



C

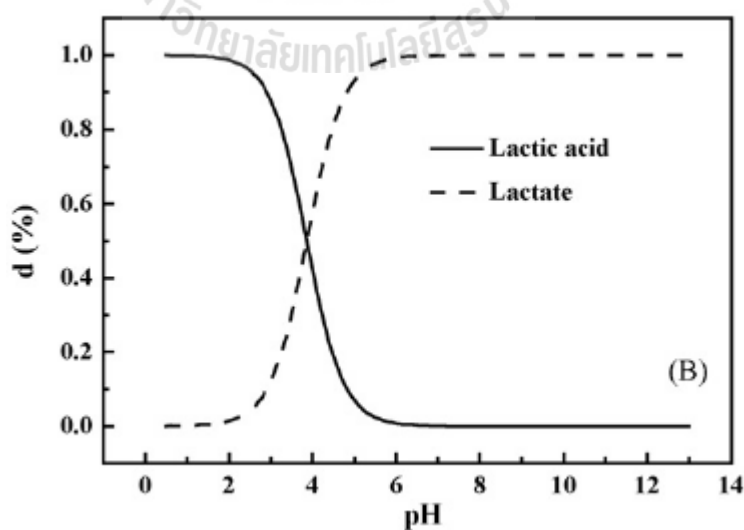
รูปภาพ 3.8 อิทธิพลของสภาวะการทดลองต่าง ๆ ต่อค่าการกักกันของสารละลายกรด D-แล็กติกโดย (A) อิทธิพลของแรงดัน (B) อิทธิพลของความเข้มข้นเริ่มต้นและ (C) อิทธิพลของค่าความเป็นกรด-ด่าง

จุดประสงค์หลักของการทดลองนี้คือการศึกษาลักษณะการแยกสารละลายกรด D-แล็กติกด้วยระบบนาโนฟิวเตรชัน ในขั้นแรกจะเป็นการศึกษาด้วยสารป้องกันแรงดันที่ก่อนโดยทำการทดลองที่สภาวะแตกต่างกัน ดังแสดงในรูปภาพ 3.8 ซึ่งรูปภาพ 3.8(A) แสดงถึงอิทธิพลของแรงดันที่มีต่อการกักกัน (rejection) โดยได้ทำการทดสอบระบบที่ความดันอยู่ในช่วง 200 ถึง 600 kPa โดยทั่วไปแล้วความดันทั่ว ๆ ไปที่ใช้ในระบบนาโนฟิวเตรชันคือประมาณ 2-2.5 MPa แต่เนื่องจากข้อจำกัดของปั๊มที่มีอยู่ จึงสามารถทำความดันได้สูงสุดที่ 600 kPa ดังกล่าว ส่วนสภาวะต่าง ๆ ที่คงที่คือ ความเข้มข้นเริ่มต้นของกรด D-แล็กติกในสารป้อนคือ 50 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 6.5 ตามลำดับ โดยผลการทดลองพบว่าอิทธิพลของความดันมีผลต่อการกักกันน้อยมาก โดยดังกล่าว ณ ความดัน 200, 300, 400, 500 และ 600 kPa อยู่ที่ร้อยละ 61.4, 66.4, 66.5, 68.7, และ 70.1 ตามลำดับ ซึ่งการกักกันในระดับร้อยละ 60-70 นี้ อาจจะเกิดเนื่องมาจากการที่กรด D-แล็กติกสามารถแตกตัวได้ในสภาวะที่เป็นกลาง ทำให้โครงสร้างของโมเลกุลมีขนาดใหญ่ขึ้น ส่วนรูปภาพ 3.8(B) แสดงอิทธิพลของความเข้มข้นของสารป้อนต่อค่าการกักกัน โดยทำการแปรผันความเข้มข้นของกรด D-แล็กติกอยู่ในช่วง 10 ถึง 70 กรัมต่อลิตรและการทดลองดังกล่าวได้กำหนดสภาวะที่คงที่คือ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความดัน 400 kPa และค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 6.5 ตามลำดับ ซึ่งผลการทดลองพบว่าแนวโน้มของการกักกันนั้นเป็นไปในทิศทางที่คล้ายคลึงกันกับกล่าวคืออิทธิพลของความเข้มข้นมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าการกักกันไม่มากนัก โดย ณ ความเข้มข้นของกรด D-แล็กติกที่ 10, 30, 50, และ 70 กรัมต่อลิตร ค่าของการกักกันจะอยู่ที่ร้อยละ 63.3, 61.2, 58.5, และ 55.4 ตามลำดับ โดยจากความเข้มข้นเริ่มต้นจนถึงความเข้มข้นสุดท้ายพบว่าค่าการกักกันลดลงประมาณร้อยละ 12.5 เท่านั้น

ส่วนสภาวะสุดท้ายที่ได้ทำการทดสอบสำหรับสารป้อนสังเคราะห์คืออิทธิพลของค่าความเป็นกรด-ด่าง ซึ่งเป็นที่เข้าใจกันดีอยู่แล้วว่ากรดแล็กติกสามารถแตกตัวได้ในสภาวะความเป็นกรด-ด่างที่แตกต่างกัน โดยกรดแล็กติกมีค่าคงที่ของการแตกตัว (pK_a) อยู่ที่ 3.86 (Li *et al.*, 2010) กล่าวคือหากค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำกว่า 3.86 กรดแล็กติกจะอยู่ในรูปที่ไม่แตกตัว (รูปภาพ 3.8C) และหากค่าความเป็นกรด-ด่างมากกว่านี้ กรดแล็กติกจะอยู่ในสภาวะที่แตกตัวเป็นแล็กเตท ซึ่งโดยธรรมชาติแล้วเมมเบรนสำหรับระบบนาโนฟิวเตรชันจะมีลักษณะของความเป็นประจุลบเล็กน้อยอยู่บนพื้นผิว ดังนั้นค่าของการกักกันจะมีมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับสมบัติของสารเป็นสำคัญ กล่าวคือขนาดของโมเลกุลและลักษณะของความเป็นขั้ว เช่นกรดอินทรีย์เมื่ออยู่ในสภาวะที่แตกตัว จะมีประจุเป็นลบ โดยเมื่อโมเลกุลเคลื่อนเข้าไปใกล้ผิวหน้าของเมมเบรนจะทำให้เกิดการผลักกันของประจุลบจากเมมเบรนและจากกรดอินทรีย์นั้น ส่งผลให้การกักกันมีมากขึ้นนั่นเอง สำหรับอิทธิพลของค่าความเป็นกรด-ด่างที่มีต่อการกักกันของกรดแล็กติกนั้น ผลการทดลองพบว่า ณ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 2.0, 3.5, 5.0, 6.5 และ 8.0

ค่าการกักกันจะอยู่ที่ร้อยละ 1.7, 7.2, 20.1, 60.2 และ 69.5 ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าการกักกันจะเพิ่มขึ้นเมื่อความเป็นกรด-ด่างเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะในช่วงที่ค่ามากกว่า 3.5 การกักกันจะเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ โดยการกักกันมีค่าต่ำเมื่อความเป็นกรด-ด่างของสารละลายต่ำกว่าค่า pK_a ซึ่งโมเลกุลของกรดแล็กติก (90 Da) มีขนาดเล็กกว่าค่า molecular weight cut off ของเมมเบรน (400 ดาลตัน) จึงทำให้สามารถเคลื่อนที่ผ่านเมมเบรนไปได้อย่างง่ายดาย

กล่าวโดยสรุปแล้ว ปัจจัยที่มีผลกระทบต่อค่าการกักกันมากก็คือค่าความเป็นกรด-ด่าง ในขณะที่ความดันและความเข้มข้นจะไม่มีอิทธิพลต่อค่าดังกล่าวมากนัก ดังนั้นจึงต้องทำการพิจารณาเพิ่มเติมว่าวัตถุประสงค์หลักของการใช้ระบบนาโนพิวเตรชันนั้น เราต้องการกักกันกรดแล็กติก (ยังคงอยู่ในสารป้อน) หรือต้องการให้กรดแล็กติกอยู่ในส่วนของเพอร์มิเอท จากองค์ประกอบทางเคมีของน้ำหมักชนิด YPD พบว่ามีองค์ประกอบของสารสกัดจากยีสต์ และเพปโตนซึ่งเป็นโปรตีน ซึ่งถือว่าเป็นประเภท macromolecule ที่มีขนาดใหญ่ ดังนั้นวัตถุประสงค์ที่ต้องการของการใช้ระบบนาโนพิวเตรชันนั้น ก็คือการแยกกรดแล็กติกซึ่งมีขนาดเล็กออกจากโปรตีนซึ่งเป็นสารที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่นั้นเอง ดังนั้นจึงควรเลือกสภาวะที่ทำให้ค่าการกักกันมีค่าต่ำสุด ก็คือการทำสารละลายให้มีสภาวะที่เป็นกรด ในที่นี้หลังจากที่ได้สารละลาย YPD ที่ไหลผ่านถึงปฏิกรณ์ชีวภาพเรียบร้อยแล้ว สารละลายดังกล่าวจะถูกปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้ได้ 2.0 ด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้นก่อนที่จะทำการทดสอบในลำดับถัดไป

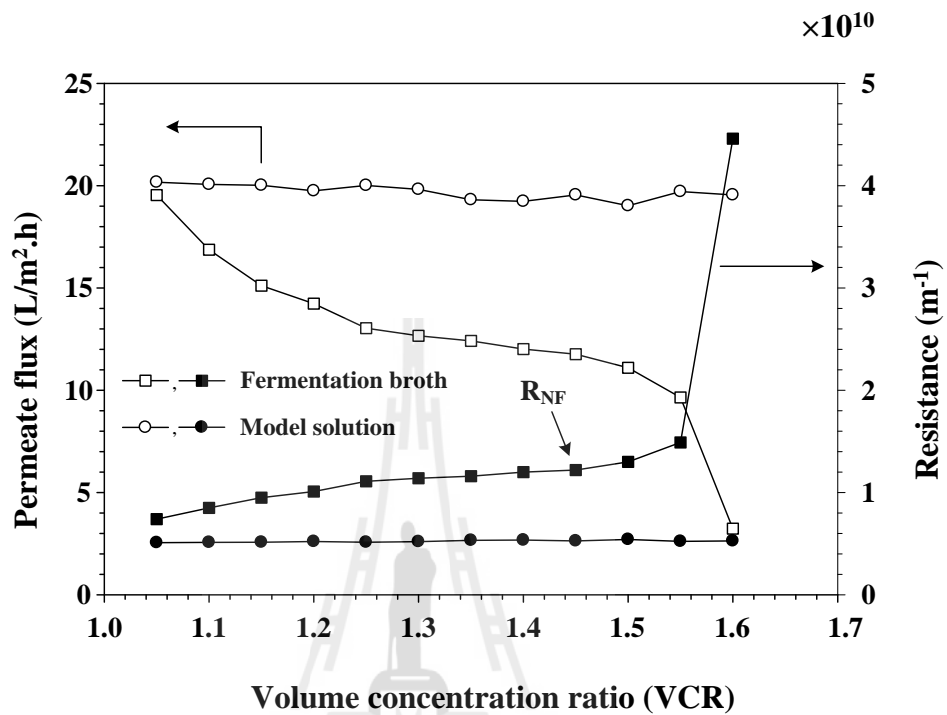


รูปภาพ 3.9 ค่าคงที่ของการแตกตัวของกรดแล็กติก ณ pH ต่าง ๆ (Li *et al.*, 2010)

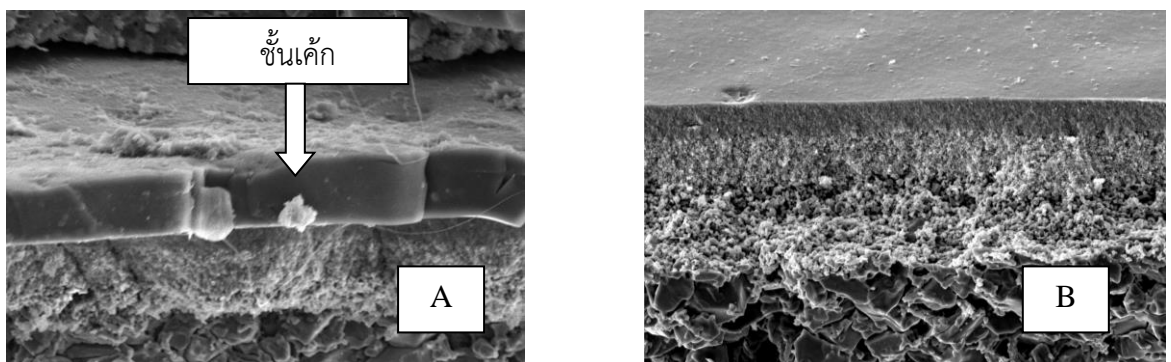
3.3.2 การทดสอบระบบด้วยน้ำหมักจริง

การศึกษาระบบนาโนฟิวเตรชันจากน้ำหมักที่ได้จาก effluent ของท่อปฏิกรณ์ชีวภาพ จากหัวข้อ 3.2.3 ได้ถูกนำไปปรับ pH ด้วยกรดซัลฟูริกให้ได้ 2.0 ก่อนที่จะนำไปกำจัด CaSO_4 และกรองผ่านระบบการกรองไมโครฟิวเตรชันอีกครั้งหนึ่งเพื่อกำจัดเซลล์ที่อาจจะหลุดออกมาจากถังปฏิกรณ์ชีวภาพ อย่างไรก็ตามระบบนี้ไม่สามารถกรองแยกโปรตีนออกจากสารละลายได้ ซึ่งระบบนาโนฟิวเตรชันมีคุณสมบัติดังกล่าวโดยสามารถกรองโปรตีน โพลีแซคคาไรด์ที่มีขนาดใหญ่ และสารสีต่าง ๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งผลการทดลองการกรองน้ำหมักดังกล่าวแสดงในรูปภาพ 3.10 โดยทำการทดสอบเทียบกับสารป้อนสังเคราะห์และได้วิเคราะห์ในส่วนของค่าฟลักซ์และการคำนวณค่าความต้านทาน (resistance) ในการทดลองนี้ได้ทำแยกส่วนเพอร์มิเอทออกจากกรรกรองตลอดเวลาโดยไม่ได้ไหลกลับเข้าสู่ถังของสารป้อน (concentration mode) ทำให้ระหว่างนั้น ปริมาตรของสารป้อนจะลดลงโดยสามารถคำนวณความสัมพันธ์ระหว่างปริมาตรสารป้อนเริ่มต้นต่อปริมาตรของสารป้อนที่เหลืออยู่เรียกว่า volume concentration ratio (VCR) ซึ่งจากการทดลองพบว่าค่าเพอร์มิเอทฟลักซ์นั้นจะมีความสัมพันธ์กับค่า VCR นี้เป็นอย่างมาก เมื่อ VCR มีค่ามากขึ้นความเข้มข้นของโปรตีนและสารโมเลกุลใหญ่ก็จะเพิ่มขึ้นด้วย โดยจะส่งผลกระทบต่อค่าเพอร์มิเอทฟลักซ์ที่ลดลง เนื่องจากการอุดตัน (fouling) ของเมมเบรนจะเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากระบบนาโนฟิวเตรชันเป็นระบบที่ทำงานด้วยแรงดัน หากแรงดันน้อยเกินไปก็จะไม่เกิดการถ่ายเทมวลผ่านเยื่อแผ่น หากแรงดันมากเกินไปในตอนแรกก็จะส่งผลให้เกิดการอุดตันที่ผิวหน้าของเมมเบรนอย่างรวดเร็ว ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้ใช้ค่าแรงดันที่ 400 kPa ตลอดการทดลอง

สำหรับสารป้อนสังเคราะห์ (model solution) ซึ่งประกอบด้วยกรด D-แล็กติกเพียงอย่างเดียวนั้น ค่าเพอร์มิเอทฟลักซ์ของระบบในช่วงเริ่มแรกวัดได้ 20.17 ลิตรต่อตารางเมตรต่อชั่วโมงและค่านี้มีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยตลอดช่วงเวลาของการทดลอง โดยเมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่าค่าเพอร์มิเอทฟลักซ์ของระบบวัดได้ 19.56 ลิตรต่อตารางเมตรต่อชั่วโมง และค่าความต้านทานที่คำนวณได้มีค่าอยู่ในช่วง 0.51 ถึง 0.54×10^{10} เมตร⁻¹ โดยค่าเพอร์มิเอทฟลักซ์ที่คงที่นี้มีสาเหตุมาจากการที่สารละลายประกอบด้วยน้ำและกรดแล็กติกเพียงอย่างเดียว ทำให้ไม่เกิด fouling ในระหว่างการทดลอง สำหรับการทดสอบระบบกับน้ำหมักจริงนั้น พบว่าผลการทดลองแตกต่างกันเป็นอย่างมาก โดยค่าเพอร์มิเอทฟลักซ์ของน้ำหมักลดต่ำลงจาก 19.5 ไปเป็น 16.9 ลิตรต่อตารางเมตรต่อชั่วโมง ในช่วงแรก ๆ ของการทดลองและมีค่าลดลงเรื่อย ๆ จนกระทั่งที่ VCR 1.5 ค่าฟลักซ์ได้ลดลงอีกอย่างรวดเร็วเหลือเพียงประมาณ 3.2 ลิตรต่อตารางเมตรต่อชั่วโมง จึงจำเป็นต้องหยุดการทดลองเนื่องจากเมมเบรนได้ถูกอุดตันจนเกือบสมบูรณ์แล้ว โดยสามารถคำนวณค่าความต้านทานได้ที่ 4.7×10^{10} เมตร⁻¹ รูปภาพ 3.10 แสดงภาพถ่าย SEM ของเมมเบรนที่ถูกอุดตันแล้วและเมมเบรนใหม่

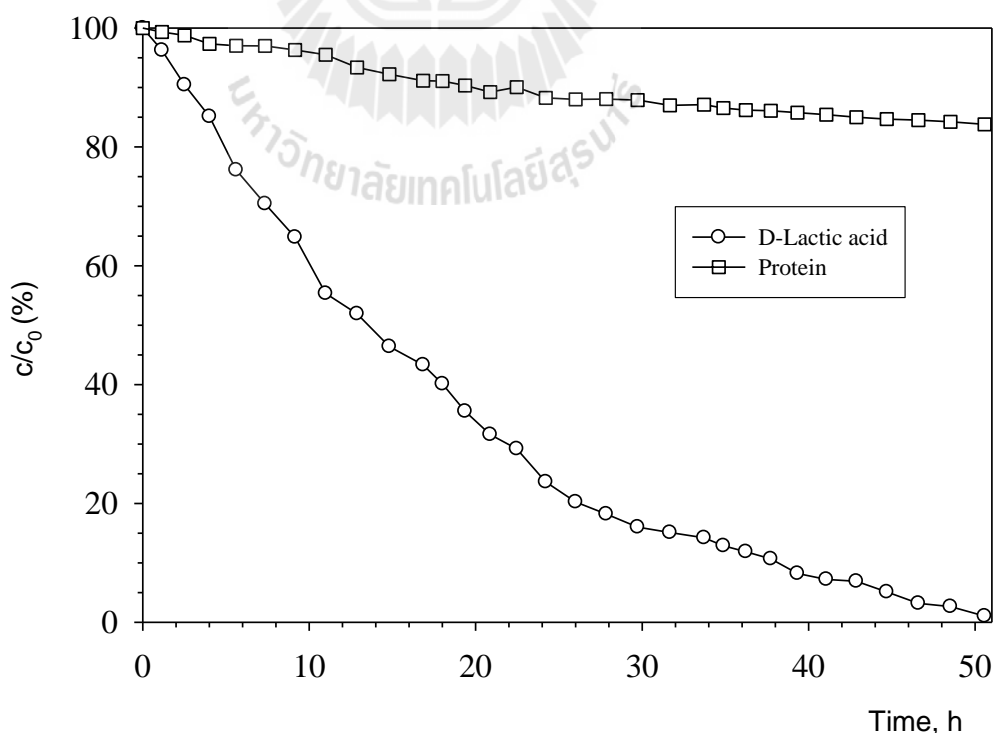


รูปภาพ 3.10 การเปลี่ยนแปลงเพอร์มิเอตฟลักซ์ของสารป้อนสังเคราะห์และน้ำหมักในระหว่างการกรองด้วยนาโนฟิวเตรชั่น

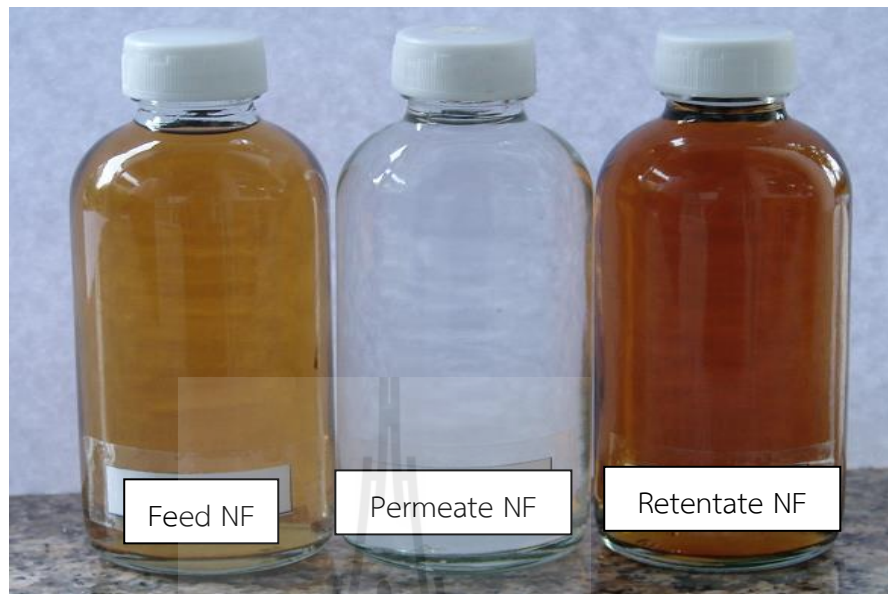


รูปภาพ 3.11 ภาพถ่าย SEM ด้านข้างของเมมเบรนที่ถูกอุดตันด้วยโปรตีนรวมถึงสารโมเลกุลใหญ่ต่างๆ เกิดเป็นชั้นเค้ก (A) และเมมเบรนใหม่ที่ยังไม่ผ่านการใช้งาน (B)

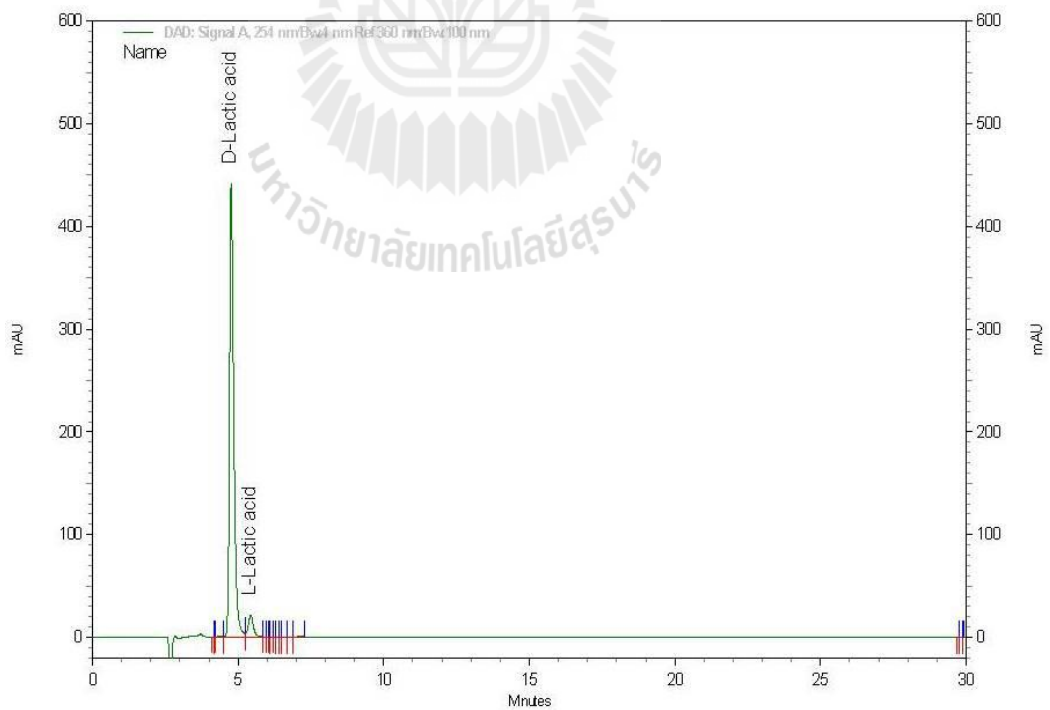
จากการทดลองระบบนาโนฟิวเตรชันของน้ำหมักในโหมดจะพบปัญหาหลักคือปริมาณของสารป้อน (น้ำหมัก) จะลดลงอย่างต่อเนื่อง ทำให้โปรตีนและสารโมเลกุลใหญ่อื่น ๆ มีความเข้มข้นสูงขึ้นเรื่อย ๆ ค่าเพอร์มิเอทฟลักซ์จะลดลงอย่างต่อเนื่อง จะกระทั่งถึงจุด ๆ หนึ่งที่จะเกิดการอุดตันอย่างสมบูรณ์ทำให้ไม่มีการไหลของเพอร์มิเอทอีก และจะต้องทำการล้างเมมเบรนเพื่อให้สามารถกลับมาใช้งานได้อีกครั้งหนึ่ง แต่อย่างไรก็ตามหากทำการกรองน้ำหมักดังกล่าวอีกก็จะส่งผลให้เกิดการอุดตันเร็วขึ้นกว่าเดิม ดังนั้นจึงต้องใช้การทำงานแบบไดอะฟิวเตรชัน คือการรักษาปริมาณของสารป้อนให้คงที่ ซึ่งในที่นี้จะทำการเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 2.0 ด้วยกรดซัลฟูริกมาแล้ว สารป้อนจะถูกเก็บตัวอย่างเพื่อที่จะวิเคราะห์ความเข้มข้นของกรด D-แล็กติกและโปรตีน ซึ่งผลการทดลองแสดงในรูปภาพ 3.12 จากการทดลองพบว่าความเข้มข้นสัมพันธ์ (C/C_0) ของกรด D-แล็กติกจะลดลงอย่างสม่ำเสมอ โดยที่ใช้เวลาในการแยกทั้งหมด 50 ชั่วโมงและพบว่าโปรตีนส่วนใหญ่ (ร้อยละ 80) จะยังถูกกักกันอยู่ในสารป้อน โดยที่เพอร์มิเอทนั้นจะมีลักษณะที่ใส ไม่มีสี ส่วนสารป้อนนั้นจะมีสีเหลืองเข้ม ซึ่งเป็นสีของโปรตีนและสารโมเลกุลใหญ่ ดังแสดงในรูปภาพ 3.13 และเมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC แล้วพบว่ามีความบริสุทธิ์สูง ไม่มีสารอื่นเจือปน และมีความบริสุทธิ์เชิงแสงสูงมากกว่าร้อยละ 95 โดยมีกรด L-แล็กติกปนมาในปริมาณที่เล็กน้อยเท่านั้น (รูปภาพ 3.14)



รูปภาพ 3.12 นาโนฟิวเตรชันของน้ำหมักโดยใช้เทคนิคไดอะฟิวเตรชัน



รูปภาพ 3.13 แสดงลักษณะใสของเพอร์มิเอทที่ได้จากนาโนฟิวเตรชั่นของน้ำหมัก (Feed NF)



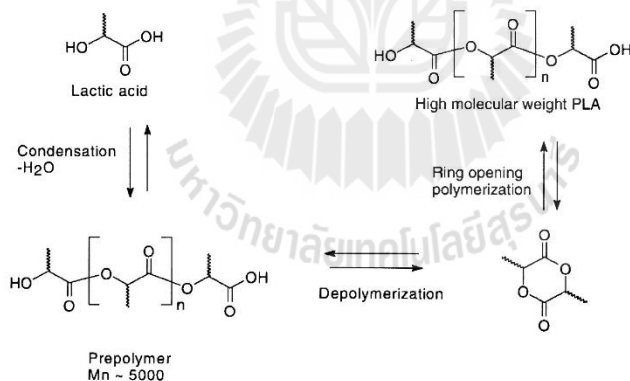
รูปภาพ 3.14 โครมาโตแกรมของเพอร์มิเอทที่ได้จากนาโนฟิวเตรชั่น (Permeate NF)

3.4 ผลการสังเคราะห์พอลิแลคติกแอซิดโดยปฏิกิริยาการสังเคราะห์แบบควบแน่น (condensation polymerization) ภายใต้สภาวะบัลค์ (bulk polymerization)

โดยทั่วไปแล้ว การสังเคราะห์พอลิแลคติกแอซิดแบ่งออกเป็น 2 แบบหลัก ๆ คือ กระบวนการสังเคราะห์พอลิเมอร์แบบเปิดวงแหวนแลคไทด์ (ring opening polymerization of lactide) และกระบวนการสังเคราะห์พอลิเมอร์แบบควบแน่นกรดแลคติกโดยตรง (direct condensation polymerization of lactic acid) อย่างไรก็ตามเพื่อให้ได้พอลิแลคติกแอซิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ขั้นตอนเพิ่มเติมของการสังเคราะห์แต่ละแบบก็จะแตกต่างกันออกไป

3.4.1 กระบวนการสังเคราะห์พอลิเมอร์แบบเปิดวงแหวนแลคไทด์ (ring opening polymerization of lactide)

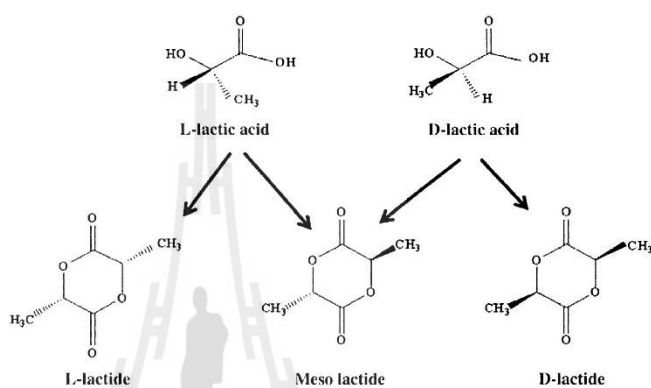
ปัจจุบัน พอลิแลคติกแอซิดน้ำหนักโมเลกุลสูงที่ผลิตขึ้นในเชิงพาณิชย์นั้นโดยส่วนใหญ่ผลิตขึ้นด้วยกระบวนการสังเคราะห์แบบเปิดวงแหวนแลคไทด์ โดยขั้นตอนการสังเคราะห์แบบคร่าว ๆ เริ่มจากปฏิกิริยาการควบแน่นกรดแลคติกเป็นพอลิแลคติกแอซิดน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (prepolymer) (ดูรูปที่ 3.15 ประกอบ)



รูปภาพ 3.15 แผนภาพแสดงขั้นตอนการผลิตพอลิแลคติกแอซิดผ่านพอลิแลคติกแอซิดน้ำหนักโมเลกุลต่ำและ แลคไทด์

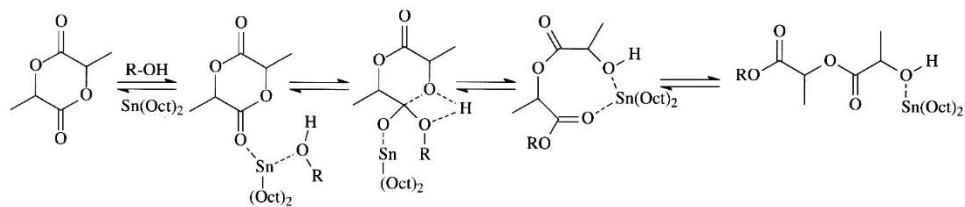
ต่อจากนั้น ใช้ความร้อนและตัวเร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนพอลิเมอร์น้ำหนักโมเลกุลต่ำเป็นวงแหวนไดเมอร์ของกรดแลคติก หรือเรียกว่า แลคไทด์ (lactide) เนื่องจากกรดแลคติกมี 2 ไอโซเมอร์ คือ แอลและดี แลคไทด์ที่เกิดขึ้นอาจเป็น แอลแลคไทด์ (L-lactide) ดีแลคไทด์ (D-Lactide) และเมโซแลคไทด์ หรือดีแอลแลคไทด์ (meso-lactide or D,L-lactide) ดังแสดงในรูปที่ 2 นอกจากนี้ยังมีสารปนเปื้อนอื่น ๆ อยู่ด้วย อาทิเช่น น้ำ กรดแลคติก โอลิโกเมอร์ของกรดแลคติก เพื่อให้ได้น้ำหนักโมเลกุลและไอ

โพลิเมอร์ตามที่ต้องการ จะต้องกลั่นแลคไทด์ให้บริสุทธิ์ก่อน แล้วใช้ปฏิกิริยาเปิดวงแหวนแลคไทด์โดยอาศัยตัวเร่งปฏิกิริยาเชื่อมต่อเป็นพอลิแลคติกแอซิด จากขั้นตอนการสังเคราะห์ที่ผ่านการเกิดแลคไทด์ ทำให้พอลิเมอร์ที่ได้จากกระบวนการดังกล่าวนี้ มีชื่อเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า “พอลิแลคไทด์ (polylactide)”



รูปภาพ 3.16 2 สเตอริโอไอโซเมอร์ของแลคไทด์ (Gruber, 2001)

การสังเคราะห์พอลิเมอร์แบบเปิดวงแหวนแลคไทด์สามารถทำได้ทั้งในสภาวะหลอม สภาวะบัลค์ สภาวะสารละลายและอิมัลชัน รูปแบบของปฏิกิริยาเปิดวงแหวนขึ้นอยู่กับกลไกการเกิดปฏิกิริยาและประเภทของตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งโดยทั่วไปแบ่งออกเป็น 3 ชนิด คือ ปฏิกิริยาแบบไอออนประจุลบ (anionic polymerization) ปฏิกิริยาแบบไอออนประจุบวก (cationic polymerization) และปฏิกิริยาแบบโคออร์ดิเนชัน (coordination-insertion mechanism) อย่างไรก็ตาม กลไกปฏิกิริยาที่มีการศึกษากันมากในการสังเคราะห์ พอลิแลคติกแอซิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง คือ ปฏิกิริยาแบบโคออร์ดิเนชัน ตัวเร่งปฏิกิริยาที่มีกลไกการเกิดปฏิกิริยาแบบโคออร์ดิเนชัน และมีประสิทธิภาพการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาสูง ละลายในแลคไทด์หลอม ได้แก่ tin(II) 2-ethylhexanoate [tin (II) octoate, Sn(Oct)₂] ซึ่งใช้ร่วมกับสารประเภทแอลกอฮอล์ กลไกการเกิดปฏิกิริยาของ Sn(Oct)₂ แสดงไว้ในรูปที่ 3 ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดนี้ให้พอลิแลคติกแอซิดน้ำหนักโมเลกุลสูง ให้เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนจากแลคไทด์ไปเป็นพอลิแลคไทด์ > 90% (conversion of lactide > 90%) และเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงอินแนนทิโอเมอร์ (racemization) น้อยกว่า 1%



รูปภาพ 3.17 ปฏิกิริยาการเปิดวงแหวนแลคไทด์ด้วยกลไกการเกิดปฏิกิริยาแบบโคออร์ดิเนชัน (Nampoothiri et al., 2010)

จากที่กล่าวไปข้างต้น สามารถสรุปได้ว่า กระบวนการสังเคราะห์แบบเปิดวงแหวนแลคไทด์ให้พอลิแลคติกแอซิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงและสามารถควบคุมการจัดเรียงโมเลกุลให้เป็นไปตามต้องการได้ แต่กระบวนการนี้มีข้อด้อยในเรื่องขั้นตอนการทำให้แลคไทด์บริสุทธิ์ รวมทั้งการปนเปื้อนของแลคไทด์กับพอลิแลคไทด์ที่ได้

3.4.2 กระบวนการสังเคราะห์พอลิเมอร์ด้วยปฏิกิริยาแบบควบแน่นกรดแลคติกโดยตรง (direct condensation polymerization of lactic acid)

ปฏิกิริยาควบแน่นกรดแลคติกโดยตรงทำโดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาและลดความดัน กระบวนการนี้มีข้อดี คือ สามารถทำในสภาวะบัลค์ไม่ใช้ตัวทำละลาย จึงไม่ต้องการกำจัดตัวทำละลาย และเริ่มต้นจากมอนอเมอร์โดยตรงได้เลย แต่อย่างไรก็ตาม เนื่องจากผลผลิตที่เกิดจากปฏิกิริยาการควบแน่น คือ พอลิแลคติกแอซิดและน้ำ เพื่อให้ได้พอลิแลคติกแอซิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงตามต้องการจะต้องกำจัดน้ำที่เกิดขึ้นนั้นออกอย่างสมบูรณ์ ในการทดลองนี้ มุ่งหาแนวโน้มความเป็นไปได้ในการใช้กรดดีแลคติกแอซิดที่ผลิตขึ้น จึงได้เลือกใช้วิธีการสังเคราะห์พอลิแลคติกแอซิดด้วยปฏิกิริยาการสังเคราะห์แบบควบแน่นกรดแลคติกแอซิดโดยตรง

3.4.3 วิธีการดำเนินการวิจัยการสังเคราะห์พอลิดีแลคติกแอซิด

การสังเคราะห์พอลิดีแลคติกแอซิด

พอลิดีแลคติกแอซิด [poly(D-lactic acid)] สังเคราะห์ขึ้นด้วยปฏิกิริยาการสังเคราะห์พอลิเมอร์แบบควบแน่น (condensation polymerization) ภายใต้สภาวะบัลค์ (bulk polymerization) วัสดุที่ใช้และรายละเอียดการสังเคราะห์มีดังนี้

1.1 วัสดุที่ใช้ในการทดลอง

รายละเอียดและที่มาของวัสดุที่ใช้ในการทดลองแสดงไว้ในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.3 ชนิด หน้าที่ และแหล่งที่มาของวัสดุที่ใช้ในการทดสอบปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชัน

วัสดุ	หน้าที่ / แหล่งที่มา
กรดดีแลคติกแอซิด [D-lactic acid]	มอนอเมอร์เริ่มต้น /งานวิจัยนี้
ไทเทเนียมบิวทอกไซด์ [99%-titanium (IV) butoxide, TNBT]	ตัวเร่งปฏิกิริยา / Acros
เมทานอล [methanol]	สารตกตะกอนพอลิเมอร์ / Carlo

1.2 กระบวนการสังเคราะห์พอลิดีแลคติกแอซิด

การสังเคราะห์พอลิดีแลคติกแอซิดทำในขวดแก้วทำปฏิกิริยาชนิด 3 คอ ขนาด 100 มิลลิลิตร การสังเคราะห์เริ่มจากการเติมกรดแลคติกจำนวน 25 มิลลิลิตร ลงในขวดแก้วทำปฏิกิริยา ติดตั้งอุปกรณ์ดังแสดงไว้ในรูปที่ 4 กำจัดน้ำออกจากกรดแลคติก ที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากกำจัดน้ำแล้วเพิ่มอุณหภูมิไปที่ 170 องศาเซลเซียส และเติมตัวเร่งปฏิกิริยา 0.2 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ให้ปฏิกิริยาควบแน่นดำเนินไป 24 ชั่วโมง ภายใต้ความดันบรรยากาศเท่ากับ 200 มิลลิบาร์ หลังจากปฏิกิริยาเสร็จสิ้นตกตะกอนและล้างตัวอย่างด้วยเมทานอล



รูปภาพ 3.18 การติดตั้งอุปกรณ์สำหรับการสังเคราะห์พอลิดีแลคติกแอซิดด้วยกระบวนการสังเคราะห์พอลิเมอร์แบบควบแน่นโดยตรง

การตรวจสอบสมบัติต่าง ๆ ของพอลิดีแลคติกแอซิด

2.1 การหาน้ำหนักโมเลกุลของพอลิแลคติกแอซิด

น้ำหนักโมเลกุลของพอลิดีแลคติกแอซิดที่สังเคราะห์ได้นั้น วิเคราะห์โดยใช้เครื่องเจลเพอมีเอ-เบิลโครมาโตกราฟี (GPC/Agilent series) ใช้คลอโรฟอร์มเป็นสารชะ อัตราการไหลของสารชะ คือ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที คงอุณหภูมิของคอลัมน์ไว้ที่ 40 องศาเซลเซียส ส่วนอุณหภูมิของเครื่องวิเคราะห์ผล (detector) เท่ากับ 35 องศาเซลเซียส ใช้พอลิสไตรีนมาตรฐาน (Shodex standard) ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 6.59×10^4 , 2.86×10^4 , 9.68×10^3 , 2.96×10^3 และ 1.30×10^3 กรัมต่อโมล สร้างกราฟมาตรฐาน เตรียมตัวอย่างพอลิแลคติกแอซิดโดยละลายในคลอโรฟอร์มที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และกรองก่อนที่จะนำไปฉีด

2.2 การตรวจสอบโครงสร้างทางเคมีของพอลิดีแลคติกแอซิด

นำพอลิแลคติกแอซิดที่สังเคราะห์ได้มาตรวจสอบหมู่ฟังก์ชันต่าง ๆ ด้วยเทคนิคฟูเรียรทรานซฟอร์ม อินฟราเรด สเปกโทรสโคปี [Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) (Bruker, Tensor 27) โดยเตรียมตัวอย่างอยู่ในรูปของเม็ดโปแตสเซียมโบรไมด์ (KBr pellet technique) ช่วงการบันทึกสเปกตรัมอยู่ในช่วงเลขคลื่น $400-4000 \text{ cm}^{-1}$ และความละเอียดเท่ากับ 4 cm^{-1}

2.3 การวิเคราะห์อุณหภูมิหลอมเหลวของพอลิแลคติกแอซิด

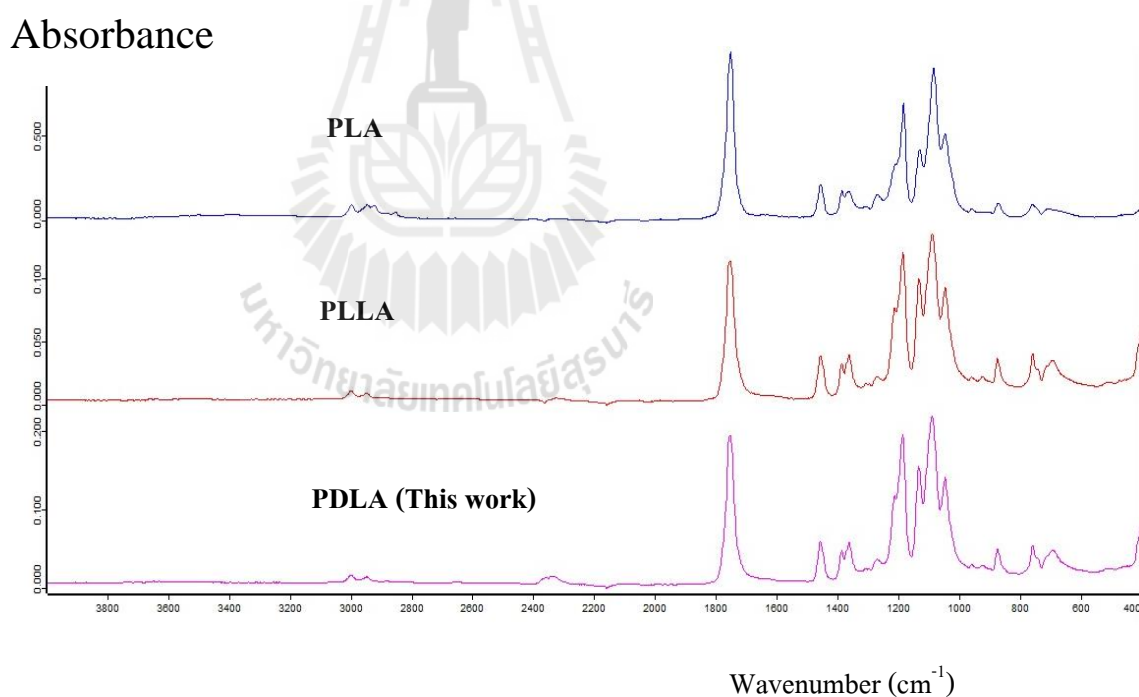
นำพอลิแลคติกแอซิดที่สังเคราะห์ได้ประมาณ 10 มิลลิกรัม ไปใส่จานอะลูมิเนียม และวิเคราะห์อุณหภูมิการหลอมเหลวด้วยเครื่องดีฟเฟอเรนเชียลสแกนนิ่งแคลอริเมตรี (Differential Scanning Calorimetry, DSC, Perkin-Elmer DSC 7) โดยตรวจสอบที่อุณหภูมิตั้งแต่ 25 ถึง 250 องศาเซลเซียส อัตราการให้ความร้อน 10 องศาเซลเซียสต่อนาที

3.4.4 ผลการทดลองการทำพอลิดีแลคติกแอซิด

น้ำหนักโมเลกุลของพอลิแลคติกแอซิดที่ได้จากการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของพอลิดีแลคติกแอซิดที่สังเคราะห์ด้วยปฏิกิริยาการสังเคราะห์พอลิเมอร์แบบควบแน่น พบว่า น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยน้ำหนัก (weight-average molecular weight, M_w) มีค่าประมาณ 8762 กรัมต่อโมล และน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยจำนวน (number-average molecular weight, M_n) มีค่าประมาณ 5847 กรัมต่อโมล ค่าการกระจายน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 1.50 ผลที่ได้ใกล้เคียงกับพอลิ-แอลแลคติกแอซิดที่สังเคราะห์ขึ้นด้วยสถานะการสังเคราะห์เดียวกัน

อุณหภูมิหลอมเหลวของพอลิดีแลคติกแอซิดพอลิดีแลคติกแอซิดที่สังเคราะห์ได้ แสดง อุณหภูมิหลอมเหลว (T_m) สองค่า โดยมีค่า T_{m1} เท่ากับ 116.3 องศาเซลเซียส และ T_{m2} เท่ากับ 131.8 องศาเซลเซียส

ผลการตรวจสอบโครงสร้างโมเลกุลของพอลิดีแลคติกแอซิดด้วยเทคนิค FTIR รูปที่ 3.19 แสดง FTIR สเปกตรัมของพอลิดีแลคติกแอซิด (PDLA) เปรียบเทียบกับ FTIR สเปกตรัมของพอลิแลคติกแอซิด (PLA) จากบริษัท Nature work และพอลิแอลแลคติกแอซิด (PLLA) ที่สังเคราะห์จากกรดแลคติกซึ่งจัดซื้อจากบริษัท Sigma-Aldrich พบว่า สเปกตรัมของพอลิแลคติกแอซิดทั้งสามชนิดให้ผลเหมือนกัน คือ แสดงหมู่ฟังก์ชันที่สำคัญดังนี้ พีค ตำแหน่ง 2995 cm^{-1} และ $2,921.13\text{ cm}^{-1}$ คือ stretching ของหมู่ $-CH-$ ตำแหน่ง 1456 cm^{-1} คือ bend ของหมู่เมทิล ($-CH_3$) และตำแหน่ง 1093 cm^{-1} คือ $-C-O-$ stretching พีคที่ตำแหน่ง 1753.42 and 1753.50 สัมพันธ์กับ $C=O$ stretching ในหมู่เอสเตอร์ของ PLLA และ PDLA ตามลำดับ



รูปที่ 3.19 FTIR สเปกตรัมของพอลิแลคติกแอซิดชนิดต่าง ๆ

โดยสรุปแล้ว จากผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่า กรด D-แล็กติกที่ผลิตขึ้นจากการทำบริสุทธิ์เชิงแสงจากสารผสมของกรด D- และ L-แล็กติก ด้วยวิธีการทางชีวภาพ สามารถใช้ในการสังเคราะห์พอลิดีแลคติกแอซิดด้วยสภาวะการสังเคราะห์ที่ใช้ตามในรายงานการวิจัย

เรื่อง การศึกษาเบื้องต้นการเตรียมพอลิแลคติกแอซิดจากกรดแลคติก (ชุมสำโรง, 2554)
เช่นเดียวกับกรดแอลแลคติกแอซิดที่ซื้อมาจากบริษัท Sigma-Aldrich



บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้ทำการทดสอบการทำบริสุทธิ์กรด D-แล็กติกออกจากของผสมระหว่างกรด L- และ D-แล็กติกด้วยวิธีการทางชีวภาพ โดยใช้เอ็นไซม์ L-lactate oxidase ที่มีอยู่ในเซลล์ของยีสต์ *Yarrowia lipolytica* ซึ่งมีความจำเพาะกับกรด L-แล็กติกทำให้กรด L-แล็กติกถูกใช้เป็นแหล่งคาร์บอนภายในเซลล์ แต่เอ็นไซม์นี้จะไม่ทำปฏิกิริยากับกรด D-แล็กติก ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความบริสุทธิ์เชิงแสงสูง นอกจากนี้ยังได้ทำการตรึงเซลล์ในแคลเซียมอัลจิเนตและได้ศึกษาการทำบริสุทธิ์เชิงแสงของกรด D-แล็กติกอย่างต่อเนื่องด้วยระบบท่อปฏิกิริยาชีวภาพแบบท่อไหล โดยได้พบว่สารละลายผสมของ D- และ L-แล็กติกที่เสริมด้วยแหล่งไนโตรเจนจะช่วยทำให้ระบบมีความคงตัวที่ยาวนานขึ้น แต่อย่างไรก็ตามการเติมโปรตีนเข้าไปในระบบจะทำให้ขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ยุ่งยากขึ้น ด้วยเหตุนี้ ระบบนาโนพิวเตรซันจึงได้ถูกนำมาศึกษาในการแยกโปรตีนและสารโมเลกุลใหญ่ออกจากสารละลาย โดยได้ทำการศึกษารกกันใในสภาวะการทดลองต่าง ๆ โดยพบว่าสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการทำบริสุทธิ์กรด D-แล็กติกที่ผลิตได้เป็นอย่างดี โดยได้เพอร์มิเอทที่ใสและสามารถนำไปทดสอบปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันโดยพบว่าสามารถผลิตเป็น poly-D-lactic acid (PDLA) ได้ โดยพบว่าค่า absorbance FT-IR ของ PDLA ที่ผลิตได้จากงานวิจัยนี้มีลักษณะเหมือนกันกับตัวอย่างที่ได้จากทางการค้า

บรรณานุกรม

- Biryukova, E. N., A. G. Medentsev, et al. (2006). "Tolerance of the yeast *Yarrowia lipolytica* to oxidative stress " Microbiology 75(3): 243-247.
- Biryukova, E. N., Y. O. Stupar, et al. (2009). "*Yarrowia lipolytica*, a producer of L-lactate oxidase." Microbiology 78(5): 650-652.
- Finogenova, T. V., I. G. Morgunov, et al. (2005). "Organic acid production by the yeast *Yarrowia lipolytica*: A review of prospects." Appl Biochem and Microbiol 41(5): 418-425.
- Gao, C., J. Qiu, et al. (2009). "Enantioselective oxidation of racemic lactic acid to D-lactic acid and pyruvic acid by *Pseudomonas stutzeri* SDM." Bioresource Technology 100: 1878-1880.
- Gao, C., J. Qiu, et al. (2009). "Enantioselective oxidation of racemic lactic acid to D-lactic acid and pyruvic acid by *Pseudomonas stutzeri* SDM." Bioresource Technology 100: 1878-1880.
- Gonzalez, G., M. G. Herrera, et al. (2001). "Biodegradation of phenol in a continuous process: comparative study of stirred tank and fluidized-bed bioreactor." Bioresource Technology 76(3): 245-251.
- Gruber, P. and M. O'brien (2001) Polylactides "NatureWorkTMPLA" in Biopolymer Vol. 4 edited Y. Doi and A. Steinbüchel, Wiley-VCH
- Huang, L. P., B. Jin, et al. (2005). "Simultaneous saccharification and fermentation of potato starch wastewater to lactic acid by *Rhizopus oryzae* and *Rhizopus arrhizus*." Biochem Eng J 23: 265-276.
- John, R. P., K. M. Nampoothiri, et al. (2007). " Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives." Applied Microbiology and Biotechnology 74: 524-534.
- Kupletskaya, M. B., M. V. Sukacheva, et al. (2007). "Search for lactate oxidase producer microorganisms." Appl Biochem and Microbiol 43(2): 199-202.
- Lan, W., G. Gang, et al. (2009). "Biodegradation of oil wastewater by free and immobilized *Yarrowia lipolytica* W29." Journal of Environmental Science 21: 237-242.

- Levenspiel, O. (1999). Chemical Reaction Engineering, John Wiley & Sons, New York, USA.
- Mansour, S., J. M. Beckerich, et al. (2008). "Lactate and amino acid catabolism in the cheese-ripening yeast *Yarrowia lipolytica*." Appl Environ Microbiol 74(21): 6505-6512.
- Nampoothiri, K.M., N.R. Nair and R.P. John (2010) "An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research" Bioresour. Technol. (101), 8493-8501.
- Qu, X. M. and D. C. Li (2000). "Organic micropolluted source water treatment by immobilized cell." Chinese Journal of Environment Science 21(6): 80-84.
- Shen, P., X. R. Fan, et al. (2000). Microbiology experiments. Beijing, China, High Education Press.
- Sztajer, H., W. Wang, et al. (1996). "Purification and some properties of a novel microbial lactate oxidase." Appl Microbiol Biotechnol 45: 600-606.
- Wang, N. S. Experiment No. 11: Cell immobilization with calcium alginate. Maryland, University of Maryland, Department of chemical and biomolecular engineering: 1-6.
- Yashina, E. I., A. V. Borisova, et al. (2010). "Sol-Gel immobilization of lactate oxidase from organic solvent: Toward the advanced lactate biosensor." Analytical Chemistry 82: 1601-1604.
- ศิริคันสนียกุล, ส. (2547). เทคโนโลยีชีวภาพอาหาร การหมักและสิ่งแวดล้อม. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, คณะอุตสาหกรรมเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ปราณี ชุมสำโรง นิธินาถ ศุภกาญจน์ และจันทิมา ดีประเสริฐกุล (2554) รายงานการวิจัยเรื่อง การศึกษาเบื้องต้นการเตรียมพอลิแลคติกแอซิดจากกรดแลคติก ทุนสนับสนุนงานวิจัยจาก สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปี

ประวัติผู้วิจัย

1. ชื่อ : นาย อภิชาติ บุญหาวัน
2. ตำแหน่งปัจจุบัน : รองศาสตราจารย์ประจำสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ
3. ที่อยู่ : สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
111 ถนนมหาวิทยาลัย ตำบลสุรนารี
อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา 30000
โทรศัพท์: (044)-224578
โทรสาร: (044)-224154
อีเมลล์ : apichat@sut.ac.th
4. ประวัติการศึกษา

ปี	ระดับ	สาขา	สถานศึกษา	ประเทศ
2548	ป. เอก	วิศวกรรมเคมี	Imperial college London	อังกฤษ
2543	ป. โท	วิศวกรรมชีวเคมี	The University of Birmingham	อังกฤษ
2537	ป. ตรี	วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี การอาหาร (เกียรตินิยม)	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	ไทย
1990	มัธยมศึกษา ตอนปลาย	-	โรงเรียนปริญธรอัยวิทยาลัย เชียงใหม่	ไทย

5. ประสบการณ์การทำงาน

- งานวิจัยหลังปริญญาเอก ASEA-UNINET Post-doc, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีเวียenna, ประเทศออสเตรเลีย (พ.ศ. 2550- เม.ย. 2551)
- อาจารย์/ผู้ช่วยศาสตราจารย์ประจำสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (ม.ค. 2548 - ปัจจุบัน)

6. สถานะภาพงานวิจัย

หัวหน้าโครงการ

- การศึกษาการพัฒนาการผลิตเอทานอลแบบต่อเนื่องจากกากน้ำตาลอ้อยโดยใช้เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ในถังหมักแบบใช้เยื่อแผ่น
แหล่งเงินทุน: มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี 100,000. บาท
สถานะภาพ เสร็จสิ้นโครงการ (ก.ย. 2548- ส.ค. 2549)
- การเก็บเกี่ยวกรด L-แล็คติกจากน้ำหมักด้วยระบบอิเล็กทรอนิกส์อินไลน์เซนส์
แหล่งเงินทุน: สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ/มทส สัญญาเลขที่ มทส -3-304-51-12-09
240,000. บาท (ธ.ค. 2550- พ.ย. 2551) งานวิจัยเสร็จสมบูรณ์
- การสังเคราะห์เมทานอลแบบต่อเนื่องด้วยเชื้อ *Methylosinus trichosporium* OB3b ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเมมเบรนโดยใช้เทคนิคเพอร์แวกเพอเรชั่น
แหล่งเงินทุน: สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
305,000.- บาท (ต.ค. 2549- พ.ย. 2551) งานวิจัยเสร็จสมบูรณ์
- การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายกรดไขมันจากสบู่ดำ ในสภาวะไร้ออกซิเจน
แหล่งเงินทุน: สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
200,000. บาท (ก.ย. 2549- ส.ค. 2550) งานวิจัยเสร็จสมบูรณ์
- การพัฒนาท่อใยกลวงเชิงประกอบสำหรับใช้ในกระบวนการผลิตอะซีโตน-บิวทานอล-เอทานอลจากมันสำปะหลัง
แหล่งเงินทุน: สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

351,000. บาท (ธ.ค. 2552- พ.ย. 2553) งานวิจัยเสร็จสมบูรณ์

- การประยุกต์ใช้สเปกโตรสโคปีของรังสีใกล้คลื่นใต้แดงในการควบคุมการผลิตเอทานอลบริสุทธิ์โดยใช้ระบบการแยกไอน้ำผ่านเยื่อแผ่นและการดูดซับ

แหล่งเงินทุน: สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

301,000. บาท (ธ.ค. 2552- พ.ย. 2553) งานวิจัยเสร็จสมบูรณ์

- การประยุกต์ใช้ระบบอิเล็กทรอนิกส์อินทรีย์ในการแยกโปรตีนเอ็นเทอร์โคเนส จากน้ำหมัก

แหล่งเงินทุน: สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

271,000. บาท (ธ.ค. 2552- พ.ย. 2553) งานวิจัยเสร็จสมบูรณ์

- Process optimization for motor fuel grade ethanol production using hybrid vapor permeation and pressure swing adsorption technique

แหล่งเงินทุน: มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

200,000. บาท (30 พ.ย. 2551- 29 พ.ย. 2552) งานวิจัยเสร็จสมบูรณ์

- การวิเคราะห์สมดุลมวลและพลังงานของการผลิตเอทานอลบริสุทธิ์จากน้ำหมักในระดับโรงงาน ต้นแบบด้วยเทคนิคผสมระหว่างการกลั่น การแยกไอน้ำผ่านเยื่อแผ่น และการดูดซับ

แหล่งเงินทุน: สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

2,500,000. บาท (ส.ค. 2552- ส.ค. 2555) อยู่ในระหว่างการดำเนินการ

- การสร้างโรงงานต้นแบบการผลิตเอทานอลสำหรับใช้เป็นเชื้อเพลิงจากมันสำปะหลังโดยใช้เทคนิคผสมระหว่างการแยกไอน้ำผ่านเยื่อแผ่นและการดูดซับ

แหล่งเงินทุน: มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

2, 143, 000. บาท (มี.ค. 2553- มี.ค. 2554) อยู่ในระหว่างการดำเนินการ

- การทำบริสุทธิ์กรดซัคซินิคจากน้ำหมักด้วยวิธีตกตะกอน เอสเทอร์ริฟิเคชันและการกลั่น

แหล่งเงินทุน: สำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติ

537,200. บาท งานวิจัยเสร็จสมบูรณ์

- การทำบริสุทธิ์กรด D- และ L-แล็คติกด้วยวิธีเอสเทอร์รีฟิเคชันและการกลั่นจากน้ำหมัก
แหล่งเงินทุน: สำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติ (B10-52)
3,272,440. บาท (ธ.ค. 2552- พ.ย. 2553) งานวิจัยเสร็จสมบูรณ์
- การออกแบบถังปฏิกรณ์แบบท่อไหลสำหรับการทำบริสุทธิ์กรด D-แล็คติก
แหล่งเงินทุน: มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
683,290. บาท (ม.ค. 2554- ธ.ค. 2554) อยู่ในระหว่างการดำเนินการ
- การพัฒนาท่อใยกลวงเซรามิคเชิงประกอบสำหรับการผลิตเชื้อเพลิงเอทานอลด้วยระบบ
การแยกไอน้ำผ่านเยื่อแผ่น
แหล่งเงินทุน: สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
385,290. บาท (ม.ค. 2554- ธ.ค. 2554) อยู่ในระหว่างการดำเนินการ
- ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเมมเบรนสำหรับเซลล์เชื้อเพลิงเอทานอล
แหล่งเงินทุน: สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
350,290. บาท (ม.ค. 2554- ธ.ค. 2554) อยู่ในระหว่างการดำเนินการ

ผู้ร่วมโครงการ

- การทดสอบประสิทธิภาพกระบวนการทำบริสุทธิ์กรดดีแล็คติกโดยอิงเทคโนโลยีการกลั่น
พร้อมการทำเอสเทอร์รีฟิเคชัน (สัญญา สนช-มก-มทส เลขที่ B10-52) จากน้ำหมัก
ของบริษัท มิตรผลวิจัย พัฒนาอ้อยและน้ำตาล จำกัด
แหล่งเงินทุน: บริษัท มิตรผลวิจัย พัฒนาอ้อยและน้ำตาล จำกัด
หัวหน้าโครงการ: ผศ.ดร. วีระศักดิ์ เลิศศิริโยธิน
1,187,220. บาท (1 พ.ย 2553- เม.ย 2554) งานวิจัยเสร็จสมบูรณ์

- การพัฒนาเยื่อแผ่นเชิงประกอบจากยางธรรมชาติสำหรับการแยกเอทิลแอลกอฮอล์จากปฏิกิริยาเอสเทอร์รีฟิเคชันด้วยระบบเพอร์เมอรัปพอร์ชัน
แหล่งเงินทุน: สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
หัวหน้าโครงการ: อ.ดร. วิรัช ทวีปรีดา
665,000. บาท (23 ต.ค 2553- 22 ต.ค 2554) งานวิจัยเสรีจสมบурณ์

7. งานวิจัยตีพิมพ์:

- 1 **Boontawan, A.**, Stuckey D.C. (2005), Mass Transfer of Terpenes through a Silicone Rubber Membrane in a Liquid-Liquid Contacting System, *Biotechnol Prog*, 21:1680-1687.
- 2 **Boontawan, A.**, Stuckey D.C. (2005), A Membrane Bioreactor for the Biotransformation of α -Pinene Oxide to Isonovalal by Resting Cells of *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11671, *Appl Microbiol biotechnol*, 69:643-649.
- 3 **Boontawan, A.**, Schausberger, P., Bösch, P., and Friedl, A. (2008) Dehydration of Ethanol/Water Mixture using Pervaporation and Vapor Permeation Technique, *J Appl Membr Sci Technol*, 5:1-7
- 4 Boontawan, P., Kanchanatawee, S., and **Boontawan A.** (2011) Extractive Fermentation of L-(+)-lactic acid by *Pediococcus pentosaceus* using Electrodeionization (EDI) Technique, *Biochem Eng J*, 54: 192-199
- 5 Boontawan, P., and **Boontawan A.** (2011) Isolation and characterization of Jatropha oil-degrading *Enterococcus faecalis* and *Burkholderia cenocepacia* W-1 under anaerobic condition, *Afr J Biotechnol*, 10(63): 13841-13851
- 6 Khunnonkwao, P., Boontawan, P., Haltrich, D., Maischberger, T., and **Boontawan, A.** (2012) Purification of L-(+)-Lactic Acid from Pre-treated Fermentation Broth using Vapor Permeation-Assisted Esterification, *Process Biochem*, 47(12): 1948-1956

- 7 Pimkaew, S., and **Boontawan, A.** (2011) Process Optimization for Motor Fuel Grade Ethanol Production using Hybrid Vapor Permeation and Pressure Swing Adsorption Technique, *Euro J of Sci Res*, 64(4): 644-657

8. **งานนำเสนอในงานประชุมทางวิชาการระดับนานาชาติ:**

1. **Boontawan, A.**, Schausberger, P., Bösch, P., Brinkmann, T., and Friedl, A. Dehydration of Ethanol/Water Mixture using Pervaporation and Vapor Permeation Technique. *The 6th Regional Symposium on Membrane Science and Technology 2008*, 13rd-15th August 2008, Phuket, Thailand (นำเสนอด้วยวาจา)
2. **Boontawan, A.**, Schausberger, P., Bösch P., Brinkmann, T., and Friedl, A. Dehydration of Ethanol/Water Mixture using Vapor Permeation Technique. *2008 International Congress on Membranes and Membrane Processes*, 12nd-18th July 2008, Hawaii, United State of America. (นำเสนอแบบโปสเตอร์)
3. Bösch, P., Schausberger, P., **Boontawan, A.**, and Friedl, A. Modelling and Process Integration of Membranes for Ethanol Dehydration. *2008 International Congress on Membranes and Membrane Processes*, 12nd-18th July 2008, Hawaii, United State of America. (นำเสนอด้วยวาจา)
4. Panvichit, P., **Boontawan, A.**, and Kanchanatawee, S. Selection of Lactic Acid Bacteria for L-Lactic Acid Fermentation from Cassava Starch. *The 3rd International Conference on Renewable Resources and Biorefineries 2007*, 4th-6th June 2007, Ghent University, Belgium. (นำเสนอแบบโปสเตอร์)
5. Panvichit, P., Kanchanatawee, S. and **Boontawan, A.** Mass transfer characteristic of ethanol from diluted aqueous solution through silicone membranes in a liquid-liquid contacting system. *Membrane Science & Technology 2006*, 26th-29th April 2006, Nanyang Technological University, Singapore. (นำเสนอแบบโปสเตอร์)

6. **Boontawan, A.** and Stuckey, D.C. A Membrane Bioreactor for Biotransformation of Monoterpene. *3rd Regional Symposium on Membrane Science & Technology 2005*, 27th-28th April 2005, Institut Teknologi Bandung, Indonesia. (นำเสนอด้วยวาจา)
7. **Boontawan, A.** Molecular Diffusion in PVA Membrane for Separation Dehydration of EtOH/H₂O Mixtures using Vapor Permeation Technique. *Nanotech Insight Conference 2009*, 29th March-2nd April 2009, Barcelona, Spain. (นำเสนอแบบโปสเตอร์)
8. **Boontawan, A.** and Pimkaew, S. Anhydrous ethanol production from fermentation broth using distillation, vapor permeation, and pressure swing adsorption technique. *The 8th International Conference on Membrane Science and Technology 2010*, 29th November-2nd December 2010, Institute Teknologi Bandung, Indonesia. (นำเสนอด้วยวาจา)
9. Molina, S., Lertsiriyothin, W., and **Boontawan, A.** Production and Purification of D-(-)-Lactic Acid from Concentrated Fermentation Broth using Esterification, Distillation and Hydrolysis Technique. *The 4th International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products (FerVAAP) Conference*, 29th -31st August 2011, Khon Kaen, Thailand. (นำเสนอด้วยวาจา)
10. Samnaknit, W., Kongkaew, A., and **Boontawan, A.**, Extractive Fermentation of Bio-Ethanol from Concentrated Sweet Sorghum Juice using Vacuum Fractionation Technique, ISSCT co-product workshop: successful utilization of co-product in the sugar industry, 19th-22nd March 2012, Bangkok, Thailand