



รายงานการวิจัย

การทำบริสุทธิ์กรดซัคซินิกที่ได้จากน้ำหมักด้วยเทคนิคนาโนฟิลเตรชันและ
การตกผลึก

(Purification of fermentation derived-succinic acid using
nanofiltration and crystallization technique)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว



รายงานการวิจัย

การทำบริสุทธิ์กรดซัคซินิกที่ได้จากน้ำหมักด้วยเทคนิคนาโนฟิลเตรชันและ
การตกผลึก

(Purification of fermentation derived-succinic acid using
nanofiltration and crystallization technique)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร. อภิชาติ บุญทาวัน

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2559

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

มกราคม 2562

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง “การทำบริสุทธิ์กรดซัคซินิคที่ได้จากน้ำหมักด้วยเทคนิคนาโนฟิลเตชันและการตกผลึก” ได้ทำการวิจัยที่ห้องปฏิบัติการหมัก อาคารปฏิบัติการ 10 ซึ่งสามารถสำเร็จจุล่งได้ด้วยดี การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2559

รองศาสตราจารย์ ดร. อภิชาติ บุญทาวัน
สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ
สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
มกราคม 2562



บทคัดย่อภาษาไทย

ปัจจุบันพลาสติกชีวภาพย่อยสลายได้กำลังเป็นที่สนใจ เนื่องจากไม่เกิดผลเสียต่อสิ่งแวดล้อม กรดซัคซินิกถือเป็นกรดอินทรีย์ชนิดหนึ่งที่สามารถนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตพลาสติกชีวภาพได้ โดยกรดซัคซินิกสามารถผลิตได้จากกระบวนการหมักด้วยเชื้อ *Actinobacillus succinogenes* ATCC 55618 สามารถผลิตกรดซัคซินิกได้ความเข้มข้นสูงสุดคือ 130.4 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 0.62 g_{SA}/g_{glucose} นอกจากนี้ผลผลิตสุดท้ายของการหมักจะได้ผลพลอยได้อื่นๆ อาทิเช่น กรดแลคติก กรดอะซิติก กรดฟอร์มิก และไพรูวิก เท่ากับ 2.3, 16.7, 1.22 และ 50.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โครงการนี้จึงทำการศึกษากระบวนการทำบริสุทธิ์กรดซัคซินิก โดยใช้เทคนิคที่มีประสิทธิภาพและมีราคาถูกในการแยกกรดซัคซินิกออกจากกรดอินทรีย์ชนิดอื่น จึงพัฒนาโดยมีหน่วยปฏิบัติการ (unit operation) ต่าง ๆ ภายหลังจากการหมัก เริ่มจากการกรองเซลล์ โดยตัวอย่างจะถูกปั๊มผ่านเมมเบรนไมโครฟิลเตชันและเมมเบรนนาโนฟิลเตชัน ผลการทดลองพบว่าค่าฟลักซ์จะลดลงเมื่อเวลาผ่านไปและปริมาตรสะสมและความเข้มข้นของเพอร์มิเอทเพิ่มขึ้นด้วย สามารถกำจัดสิ่งปนเปื้อนชนิดอื่นออกจากน้ำหมักก่อน โดยเฉพาะโปรตีนและสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ รวมทั้งกำจัดสีของสารละลาย ทำให้ส่วนกรองที่ได้มีสีใส ตามด้วยทำการตกผลึก เนื่องจากค่าการละลายของกรดซัคซินิกจะต่ำกว่ากรดอินทรีย์ชนิดอื่นสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตกผลึกได้ด้วยการตกผลึกแบบขั้น ในขณะที่สารอื่น ๆ จะไม่สามารถตกผลึกได้ ทำให้ได้ตัวอย่างที่มีความบริสุทธิ์สูง อีกทั้งตัวอย่างที่ไม่ผ่านกระบวนการนาโนฟิลเตชัน เมื่อเกิดการตกผลึก จะเกิดเป็นผลึกที่มีสีเหลือง ไม่ใส และคุณภาพต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ผ่านนาโนฟิลเตชัน พบว่ามีสีขาว ลักษณะใสคล้ายแก้วจากการทดลองเติม seeding นั้นพบว่าจะได้ขนาดของผลึกที่ใหญ่ขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับที่ไม่ได้เติม seed (unseeding) ที่ high seeding พบว่าจะได้ขนาดของผลึกที่ใหญ่กว่า มีลักษณะใสมากกว่าแบบ low seeding ผลึกที่ได้ออกมาจะมีลักษณะที่ใกล้เคียงกับผลึกทางการค้า ผลจากการศึกษานี้จึงสามารถใช้เป็นแนวทางในการทำบริสุทธิ์กรดซัคซินิกจากน้ำหมักในระดับโรงงานต้นแบบต่อไป

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Currently, bio-degradable plastics are of interest, since no effect on the environment. The succinic acid is an acid that can be used as a precursor in the bioplastics production. Succinic acid can be produced by fermentation by *Actinobacillus succinogenes* ATCC 55618. The highest concentration was obtained at 130.4 g/L, representing the yield of 0.62 g_{SA} / g_{glucose}. The byproducts of the end of fermentation processes such as lactic acid, acetic acid, formic acid and pyruvic of 2.3 g / L, 16.7 g / L, 1.22 g / L and 50.5 g / L, respectively. This research is to study the purification of succinic acid. Using effective and cheaper the purification techniques. It was developed by a unit operation any subsequent fermentation. The fermentation broth is pumped through a microfiltration membrane and nanofiltration membrane. The results showed that the flux decreases over time and volume accumulation and concentration of permeate increased. Eliminate other contaminants out of the water before fermentation including the proteins are large molecules and compounds. The filter makes that clear. Next step is the crystallization system. Since the dissolution of the acid, succinic acid can be induced crystallization. While other substances can not be crystallized, making a high purity. The sample did not pass the nanofiltration system. When crystallization, it not clear showed yellow crystal, and lower quality compared to the filtered samples. The experiments showed that the addition of seeding crystals of size will be larger when compared with unseeding. Moreover, at high seeding obtained the bigger crystals size. The low seeding crystal clear than that have come out, it looks similar to quartz trade. Results from this study can be used as a guide in making pure succinic acid from fermentation pilot plant next level.

สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	3
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	4
กิตติกรรมประกาศ.....	5
สารบัญเรื่อง.....	6
สารบัญภาพ.....	8
สารบัญตาราง.....	10
บทที่ 1 บทนำ.....	11
1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย.....	11
1.2 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....	12
1.2.1 กรดซัคซินิค.....	12
1.2.2 กระบวนการหมักกรดซัคซินิค.....	13
1.2.3 จลศาสตร์ของการหมักกรดซัคซินิค.....	14
1.2.4 กระบวนการทำบริสุทธิ์กรดซัคซินิคจากน้ำหมัก.....	15
1.3 การประยุกต์ใช้กรดซัคซินิคในอุตสาหกรรมพลาสติกชีวภาพ.....	16
1.4 จุดประสงค์ของโครงการวิจัย.....	20
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย.....	22
2.1 ขอบเขตของโครงการวิจัย.....	23
2.2 อุปกรณ์และสารเคมี.....	30
2.3 จุลินทรีย์และการเลี้ยงเชื้อ.....	34
2.4 กระบวนการหมักแบบกะ.....	34
2.5 กระบวนการทำบริสุทธิ์กรดซัคซินิค.....	43
2.6 นาโนฟิลเตรชัน.....	44
2.7 การตกผลึก.....	43
2.8 การวิเคราะห์.....	54
บทที่ 3 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	55
3.1 กระบวนการหมักกรดซัคซินิคแบบกะ.....	55
3.2 การหมักกรดซัคซินิคแบบกึ่งกะ.....	54
3.3 การทำบริสุทธิ์กรดซัคซินิคจากกระบวนการหมักด้วยการศึกษาการแยกเซลล์แบบที่เรียโดย ไมโครฟิลเตรชัน.....	55
3.4 การตกผลึกแบบชั้น (Layer melt crystallization).....	45
3.5 การทำบริสุทธิ์น้ำหมักด้วยเทคนิคนาโนฟิลเตรชัน.....	56
3.5.1 การทดสอบระบบโดยใช้สารสังเคราะห์.....	67

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

หน้า

3.5.1.1 อิทธิพลของสภาวะการทำงานต่าง ๆ ที่มีต่อค่าการกักกันของกรดอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ.....	56
3.5.1.2 ผลของ volumetric flux และการต้านทางของเมมเบรนในระบบ nanofiltration จากการทดลองด้วยตัวอย่างน้ำ DI.....	65
3.5.2 การทดสอบระบบโดยใช้ตัวอย่างน้ำหมัก.....	76
3.6 การตกผลึกกรดซัคซินิก (Crystallization technique of succinic acid).....	65
3.6.1 การจัดการทดลองการตกผลึก.....	66
3.6.2 การเตรียม seed (Seed preparation).....	56
3.6.3 กระบวนการตกผลึกกรดซัคซินิกในตัวอย่างน้ำหมัก.....	76
บทที่ 4 บทสรุป.....	56
4.1 สรุปผลการทดลอง.....	56
เอกสารอ้างอิง.....	65
ประวัติผู้วิจัย.....	54

สารบัญภาพ

	หน้า
รูปภาพ 1 โครงสร้างทางเคมีของกรดซัคซินิค.....	1
รูปภาพ 2 แสดงวิถีในกระบวนการผลิตกรดซัคซินิคจากน้ำตาลกลูโคส (Song <i>et al.</i> , 2006).....	2
รูปภาพ 3 อิทธิพลของค่าความเป็นกรด-ด่างที่มีต่อการแตกตัวของกรดซัคซินิค (Li <i>et al.</i> , 2010).....	23
รูปภาพ 4 หลักการทำงานของระบบ Electrodialysis (ED).....	22
รูปภาพ 5 กระบวนการ esterification ของกรดซัคซินิคและเอทานอล.....	22
รูปภาพ 6 การทดลองกระบวนการหมักกรดซัคซินิคขนาด 5 ลิตร	22
รูปภาพ 7 กระบวนการทำบริสุทธิ์กรดซัคซินิคจากน้ำหมักโดยนาโนฟิวเตรชั่นและการตกผลึก.....	22
รูปภาพ 8 นาโนฟิวเตรชั่นในการแยกกรดซัคซินิคจากน้ำหมัก (Lubsungneon <i>et al.</i> , 2014)	22
รูปภาพ 9 การจัดการทดลองการตกผลึกแบบ layer melt crystallizer	22
รูปภาพ 10 กระบวนการทำบริสุทธิ์กรดซัคซินิคจากน้ำหมักโดยนาโนฟิวเตรชั่นและการตกผลึก.....	22
รูปภาพ 11 กราฟแสดงความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้นของเซลและความเข้มข้นของกรดอินทรีย์ต่างๆ ในระหว่างการหมักกรดซัคซินิคด้วยเชื้อ <i>A. succinogenes</i> ATCC 55618...22	22
รูปภาพ 12 แสดงการการเจริญของเซลล์ การใช้กลูโคส และการเกิดผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ในระหว่างการหมักแบบกึ่งกะ.....	22
รูปภาพ 13 ระบบไมโครฟิลเตรชั่นและนาโนฟิลเตรชั่นสำหรับการแยกเซลแบคทีเรียและโปรตีนที่ใช้ในโครงการวิจัยนี้.....	22
รูปภาพ 14 แสดงหลักการทำงานของระบบไมโครฟิลเตรชั่น.....	22
รูปภาพ 15 กราฟแสดงการคำนวณหาค่าความต้านทานที่เกิดขึ้นจากเมมเบรน $R_m = 1.02 \times 10^{12} \text{ m}^{-1}$	22
รูปภาพ 16 การลดลงของฟลักซ์เมื่อเวลาผ่านไปและปริมาตรสะสมของเพอร์มิเอทที่ได้.....	22
รูปภาพ 17 หลักการทำงานของระบบการตกผลึกแบบชั้น layer melt crystallization.....	22
รูปภาพ 18 การจัดการทดลองการตกผลึกแบบ layer melt crystallizer.....	22
รูปภาพ 19 การตกผลึกแบบชั้นเพื่อแยกกรดซัคซินิคออกจากสารละลายกรดอินทรีย์ชนิดอื่น.....	22
รูปภาพ 20 อิทธิพลของสภาวะการทำงานต่าง ๆ ที่มีต่อค่าการกักกันของกรดอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ.....	22
รูปภาพ 21 แสดง volumetric flux และการต้านทานของเมมเบรนในระบบ nanofiltration จากการทดลองด้วยตัวอย่างน้ำ DI ที่ความดันต่าง ๆ.....	22
รูปภาพ 22 การหาค่า membrane resistance และค่าฟลักซ์ในการทดสอบการใช้น้ำหมักจริงในระบบนาโนฟิลเตรชั่น.....	22
รูปภาพ 23 แสดงค่า rejection ของกรดอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ในระบบนาโนฟิลเตรชั่น ใช้เวลา 24 ชั่วโมง.....	22

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

รูปภาพ 24	กราฟแท่งแสดงสารประกอบที่ผสมอยู่ในสารป้อนและส่วน permeate จากนาโนฟิลเตชัน (A) คือ กรดซัคซินิค, SO_4^{2-} , Mg^{2+} , Cl^- (B) คือ กรดแลคติก, กรดอะมิโน, กรดโพธิโอนิก.....	43
รูปภาพ 25	การศึกษาระบบนาโนฟิวเตรชันระหว่างน้ำหมักและของผสมของกรดอินทรีย์สังเคราะห์ และแสดงการวิเคราะห์แรงต้านทานต่าง ๆ.....	34
รูปภาพ 26	รูปภาพของส่วนกรองต่าง ๆ ที่ผลิตได้จากเทคนิคไมโครฟิลเตชัน (MF) และนาโนฟิลเตชัน (NF)	34
รูปภาพ 27	ตัวอย่างน้ำหมักที่ถูกกำจัดสีออกด้วยเทคนิคนาโนฟิลเตชัน.....	34
รูปภาพ 28	การจัดการศึกษากระบวนการตกผลึกของกรดซัคซินิค.....	34
รูปภาพ 29	Solubility curve ของตัวอย่างที่อุณหภูมิต่างๆ.....	34
รูปภาพ 30	Cooling rate ในกระบวนการตกผลึก.....	34
รูปภาพ 31	การเปรียบเทียบขนาดของผลึกกรดซัคซินิคที่ต่าง ๆ กัน รวมทั้งผลึกทางการค้า	
รูปภาพ 32	รูปถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของผลึกกรดซัคซินิคที่เกิดขึ้นจากการทดลองต่าง ๆ โดยที่ (A) คือ seed (B) คือ unseeding (C) คือ high seeding (D) คือ low seeding (E) คือ ตัวอย่างที่ไม่ผ่านนาโนฟิลเตชัน และ (F) คือ ผลึกที่ขายทางการค้า.....	34
รูปภาพ 33	แสดง XRD pattern ของผลึกกรดซัคซินิคที่ได้จากตัวอย่างที่ไม่ผ่านนาโนฟิลเตชัน, succinic acid standard และ magnesium sulfate standard และรูปผลึกที่ได้จากตัวอย่างที่ไม่ผ่านนาโนฟิลเตชัน (A) และตัวอย่างที่ผ่านนาโนฟิลเตชัน (B)	34
รูปภาพ 34	แสดง XRD pattern ของผลึกกรดซัคซินิคที่ได้จากกระบวนการตกผลึกที่สภาวะต่างๆกัน...	23
รูปภาพ 35	รูปภาพจาก SEM ของผลึกกรดซัคซินิค (A) ไม่ผ่านนาโนฟิลเตชัน (B) unseeding (C) high seeding (D) low seeding และ (E) ผลึกที่ขายทางการค้า.....	34
รูปภาพ 36	ตัวอย่างผลึกที่เกิดขึ้นจากการทดลองที่ใช้กระบวนการต่างๆกัน.....	34

สารบัญตาราง

	หน้า
ตาราง 1 ลักษณะทางเคมีและกายภาพของกรดซัคซินิค.....	22
ตาราง 2 สมบัติทางกายภาพและเคมีของ ethyl ester ของ lactic acid, acetic acid, formic acid และ succinic acid.....	22
ตาราง 3 คุณลักษณะของเยื่อแผ่นเมมเบรนไมโครฟิลเตรชั่น.....	22
ตาราง 4 ผลการทดลองอิทธิพลของความแตกต่างของความดันต่อค่าฟลักซ์ของน้ำ.....	22
ตาราง 5 คุณลักษณะของเยื่อแผ่นเมมเบรนนาโนฟิลเตรชั่น.....	22
ตาราง 6 องค์ประกอบทางเคมีของส่วนกรองต่าง ๆ ที่ได้จากไมโครฟิลเตรชั่นและนาโนฟิลเตรชั่น.....	22
ตาราง 7 แสดงส่วนประกอบในตัวอย่างน้ำหมักหลังจากผ่านนาโนฟิลเตรชั่น.....	22
ตาราง 8 แสดงการตกผลึกของกรดซัคซินิคที่การทดลองต่าง ๆ กัน.....	22
ตาราง 9 ผลของกระบวนการที่มีผลต่อผลึก phase purity และลักษณะของผลึกที่ได้.....	22



บทที่ 1 บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

ปัจจุบันพลาสติกสังเคราะห์มีบทบาทต่อชีวิตประจำวันของมนุษย์สูงมาก โดยใช้เป็นวัสดุอุปกรณ์ชนิดต่างๆ อาทิเช่น เป็นส่วนประกอบของเครื่องใช้ไฟฟ้า ภาชนะบรรจุอาหาร และอุปกรณ์สำนักงานต่างๆ เป็นต้น โดยพลาสติกเหล่านี้สังเคราะห์ได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมีซึ่งก่อให้เกิดปัญหาขยะมลพิษและสิ่งแวดล้อมโดยรวม เนื่องจากกำจัดได้ยากและไม่สามารถย่อยสลายเองได้ตามธรรมชาติหรือต้องใช้เวลานานมาก ดังนั้นพลาสติกชีวภาพย่อยสลายได้ หรือ biodegradable plastic จึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการพัฒนาวัสดุสำหรับการใช้งานเพื่อจุดประสงค์หลักคือการอนุรักษ์สิ่งแวดล้อม ทั้งในด้านวัตถุดิบ กระบวนการผลิต และกระบวนการกำจัด โดยปัจจุบันพลาสติกชีวภาพย่อยสลายได้ ได้ถูกให้ความสำคัญเป็นอย่างมากจากทั้งภาครัฐและภาคเอกชน โดยมีการจัดตั้งสมาคมอุตสาหกรรมพลาสติกชีวภาพไทย เพื่อพัฒนาและยกระดับอุตสาหกรรมการผลิตพลาสติกชีวภาพครบวงจรตั้งแต่ระดับต้นน้ำ กลางน้ำและปลายน้ำ ซึ่งพลาสติกชีวภาพนั้น ผลิตมาจากวัตถุดิบที่สามารถผลิตทดแทนขึ้นใหม่ได้ในธรรมชาติ ใช้พลังงานในกระบวนการผลิตต่ำ และภายหลังจากการใช้งาน จะสามารถย่อยสลายเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำได้ด้วยจุลินทรีย์ในธรรมชาติ โดยพลาสติกชีวภาพนั้นจะมีคุณสมบัติทางกายภาพเทียบเท่ากับพลาสติกจากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี กรดซัคซินิกถือเป็นกรดอินทรีย์ชนิดหนึ่งที่สามารถนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตพลาสติกชีวภาพได้ โดยกรดซัคซินิกสามารถผลิตได้จากกระบวนการหมักของเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Actinobacillus succinogenes* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียที่ได้ถูกคัดเลือกจากกระเพาะของวัว (bovine rumen)

สำหรับต้นทุนการทำบริสุทธิ์กรดซัคซินิกจากกระบวนการหมักนั้น พบว่ามีสัดส่วนมากกว่าร้อยละ 60 ของต้นทุนการผลิตทั้งหมด ทั้งนี้เนื่องจากกระบวนการหมักซัคซินิกนั้น มักจะมีสิ่งปนเปื้อนอื่น ๆ ตามมามากมาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งกรดอินทรีย์ชนิดอื่น ๆ เช่น กรดฟอร์มิก กรดอะซิติกและกรดแล็กติก เป็นต้น โดยที่กรดอินทรีย์เหล่านี้ จะมีสมบัติทางกายภาพและทางเคมีที่คล้ายกันกับกรดซัคซินิก กล่าวคือมีค่าคงที่ของการแตกตัว (pKa) ที่ใกล้เคียงกันและยังมีหมู่ฟังก์ชันคาร์บอกซิลิกเช่นเดียวกันอีกด้วย ดังนั้นการแยกด้วยวิธีต่าง ๆ มักจะไม่ประสบความสำเร็จ ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องหาวิธีการที่มีประสิทธิภาพและมีราคาถูกในการแยกกรดซัคซินิกออกจากกรดอินทรีย์ชนิดอื่น ซึ่งวิธีการตกผลึกเป็นเทคนิคหนึ่งที่มีความน่าสนใจ ทั้งนี้เนื่องจากค่าการละลายของกรดซัคซินิกจะต่ำกว่ากรดอินทรีย์ชนิดอื่น ๆ แต่อย่างไรก็ตามจำเป็นที่จะต้องทำการกำจัดสิ่งปนเปื้อนชนิดอื่นออกจากน้ำหมักก่อน โดยเฉพาะโปรตีนและสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ ซึ่งระบบนาโนฟิลเตรชันเป็นการแยกด้วยเมมเบรนที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการกำจัดสีของสารละลาย เช่น การหมักกรดอินทรีย์และอุตสาหกรรมฟอกย้อม เป็นต้น ซึ่งน้ำหนักโมเลกุลของสีเหล่านี้ ส่วนใหญ่จะมากกว่า 1000 ดาลตัน ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าขนาดรูของเมมเบรน และจะถูกกักกันไว้ไม่ผ่านเมมเบรนไป ในขณะที่โมเลกุลของกรดอินทรีย์จะมีขนาดเล็กกว่า 1000 ดาลตัน จะสามารถซึมผ่านรู

ของเมมเบรนไปได้ ทำให้ส่วนกรองที่ได้ (filtrate หรือ permeate) มีสีใส ก่อนที่จะนำไปทำการตกผลึกต่อไป

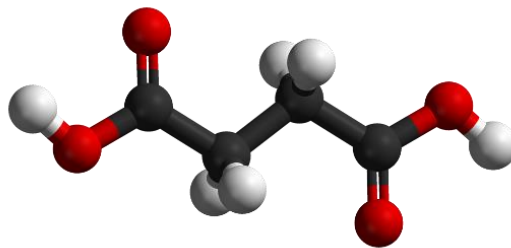
ในข้อเสนอโครงการนี้ จะทำการศึกษาระบวนการทำบริสุทธิ์กรดซัคซินิกจากน้ำหมักในระดับห้องปฏิบัติการขนาดการหมัก 5 ลิตร โดยมีหน่วยปฏิบัติการ (unit operation) ต่าง ๆ ภายหลังจากกระบวนการหมักดังนี้ การกรองเซลล์ การกำจัดสียด้วยนาโนฟิลเตชัน การระเหยน้ำ และการตกผลึก โดยมีจุดประสงค์หลักเพื่อสามารถใช้เป็นแนวทางในการทำบริสุทธิ์กรดซัคซินิกจากน้ำหมักในระดับโรงงานต้นแบบต่อไป

1.2 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

กรดซัคซินิกเป็นกรดอินทรีย์ที่มีค่าการละลายต่ำในน้ำ (58 กรัมต่อลิตรที่ 20 องศาเซลเซียส) แต่การทำบริสุทธิ์กรดซัคซินิกจากกระบวนการหมักนั้น จะต้องทำการกำจัดสิ่งปนเปื้อนต่าง ๆ ให้หมดเสียก่อน เช่น เซล โปรตีน สารโมเลกุลใหญ่ (macromolecule) และอิมูนต่าง ๆ เป็นต้น ซึ่งสามารถใช้เมมเบรนชนิดต่าง ๆ ในการแยกสารต่าง ๆ ออกได้เช่น ไมโครฟิวเตรชันสำหรับการแยกเซลล์และนาโนฟิลเตชันสำหรับการแยกสารโมเลกุลใหญ่ เป็นต้น หลังจากนั้นสารละลายจะถูกทำให้เข้มข้นก่อนที่จะทำการแยกกรดซัคซินิกออกจากสารปนเปื้อนที่เหลือด้วยกระบวนการตกผลึก ซึ่งอิมูนและกรดอินทรีย์ชนิดอื่นจะไม่สามารถตกผลึกได้ จึงเป็นวิธีการทำบริสุทธิ์ที่มีประสิทธิภาพสูง

1.2.1 กรดซัคซินิก

กรดซัคซินิก มีสูตรทางเคมีคือ $C_4H_6O_4$ แสดงดังรูปภาพ 1 คุณสมบัติและลักษณะทางกายภาพแสดงดังตาราง 1 ทั้งนี้กรดซัคซินิกถือเป็นสารประกอบอินทรีย์ 1 ใน 12 ชนิด ที่ถูกประกาศโดยกระทรวงพลังงานของสหรัฐอเมริกา เพื่อให้เป็นสารที่สามารถนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นประยุกต์ได้ในอุตสาหกรรมอย่างหลากหลาย เช่น อุตสาหกรรมอาหาร เคมี ยา และพอลิเมอร์ เป็นต้น สำหรับการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมทางเคมี กรดซัคซินิกสามารถนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นที่สำคัญในขั้นตอนการผลิตกรดอะดิพิค (adipic acid), 1,4-butanediol tetrahydrofuran, N-methyl pyrrolidone, 2-pyrrolidone succinate salts และ gamma-butyrolactone (Song *et al.*, 2006) อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบัน กรดซัคซินิกมีความสำคัญเป็นอย่างมากในการผลิตเป็นพลาสติกชีวภาพที่สามารถย่อยสลายได้เพื่อทดแทนพลาสติกจากปิโตรเลียมที่ใช้แพร่หลายในปัจจุบัน



รูปภาพ 1 โครงสร้างทางเคมีของกรดซัคซินิก

ตาราง 1 ลักษณะทางเคมีและกายภาพของกรดซัคซินิค.

คุณสมบัติ	ปริมาณ
ลักษณะ (ความบริสุทธิ์สูง ที่อุณหภูมิห้อง)	ของแข็งคล้ายคริสตัล ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น
มวลโมเลกุล	118.09 กรัมต่อโมล
ความหนาแน่น	1.56 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร
จุดหลอมเหลว	185-187 องศาเซลเซียส
จุดเดือด	235 องศาเซลเซียส
ค่าความเป็นกรด (pK _a)	pK _{a1} = 4.2 pK _{a2} = 5.6

1.2.2 กระบวนการหมักกรดซัคซินิค

กระบวนการหมักกรดซัคซินิค ได้มีการศึกษากันอย่างจริงจัง เมื่อปี ค.ศ. 1980 (Zeikus *et al.*, 1999) อย่างไรก็ตามในปัจจุบันนี้ได้มีการสนใจการผลิตกรดซัคซินิคดังกล่าวโดยใช้สารตั้งต้นที่มีการนำกลับมาใช้ใหม่ได้ (renewable resource) หรือวัตถุดิบทางการเกษตร จำพวก ข้าวโพด มันสำปะหลัง น้ำตาลอ้อย ฯลฯ กรดซัคซินิคสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์หลากหลายชนิด ยกตัวอย่างเช่น *Actinobacillus succinogenes* *Anaerobiospirillum succiniciproducens* และ *Mannheimia succiniciproducens* (Song *et al.*, 2007) จุลินทรีย์กลุ่มที่กล่าวมานี้มีคุณสมบัติพิเศษคือ มีความสามารถทนต่อความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสได้สูงโดยไม่เกิดแรงดันออสโมติส และมีความสามารถในการผลิตกรดซัคซินิคสูง (Huh *et al.*, 2006) สำหรับกรดซัคซินิคนี้ยังเป็นสารตัวกลางหรือ intermediate ในวัฏจักร TCA (tricarboxylic acid) และเป็นผลผลิตสุดท้ายในกระบวนการหมักที่ไม่มีออกซิเจน ในกระบวนการหมัก นอกเหนือจากกรดซัคซินิคแล้ว อาจมีผลพลอยได้ที่เป็นกรดอะซิติก กรดฟอร์มิก กรดแล็กติก และเอทานอลเกิดขึ้น การผลิตกรดซัคซินิค ยกตัวอย่างเช่น เชื้อ *A. succiniciproducens* สามารถผลิตกรดซัคซินิคได้ความเข้มข้น 83 กรัมต่อลิตร *M. succiniciproducer* ผลิตได้มากกว่า 50 กรัมต่อลิตร และ *A. succinogenes* ผลิตได้มากกว่า 100 กรัมต่อลิตร (Qiang *et al.*, 2010) เป็นต้น สำหรับวิธีการผลิตกรดซัคซินิคแสดงดังรูปที่ 2 โดยที่เข้าสู่วิถี PEP (phosphoenol pyruvate) carboxykinase สำหรับเชื้อ *A. succiniciproducens* และ *A. succinogenes* โดยจากแผนภาพจะเห็นได้ว่าปฏิกิริยาผลิตกรดซัคซินิคจะมีประสิทธิภาพดีในสภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์อยู่ในปริมาณที่สูง (High CO₂) โดยน้ำตาลกลูโคสสามารถที่จะเปลี่ยนเป็นกรดซัคซินิคได้เกือบทั้งหมด ในขณะที่สภาวะ คาร์บอนไดออกไซด์ต่ำ (Low CO₂) ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นหลายปฏิกิริยา ส่งผลให้เกิดผลพลอยได้ที่หลากหลาย (by product) เช่น กรดอะซิติก กรดฟอร์มิก กรดแล็กติก และเอทานอล เป็นต้น ดังนั้นจะเห็นว่าการบังคับให้เชื้อสามารถผลิตกรดซัคซินิคได้ในปริมาณที่สูงนั้น จำเป็นที่จะต้องทำให้ปริมาณของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในระบบสูงอีกด้วย การผลิตกรดซัคซินิคจากกากน้ำตาลอ้อย (molasses) ที่เป็นผลพลอยได้จากโรงงานน้ำตาล ซึ่งวัตถุดิบนี้ประกอบด้วย น้ำตาลชนิดต่างๆ (น้ำตาล

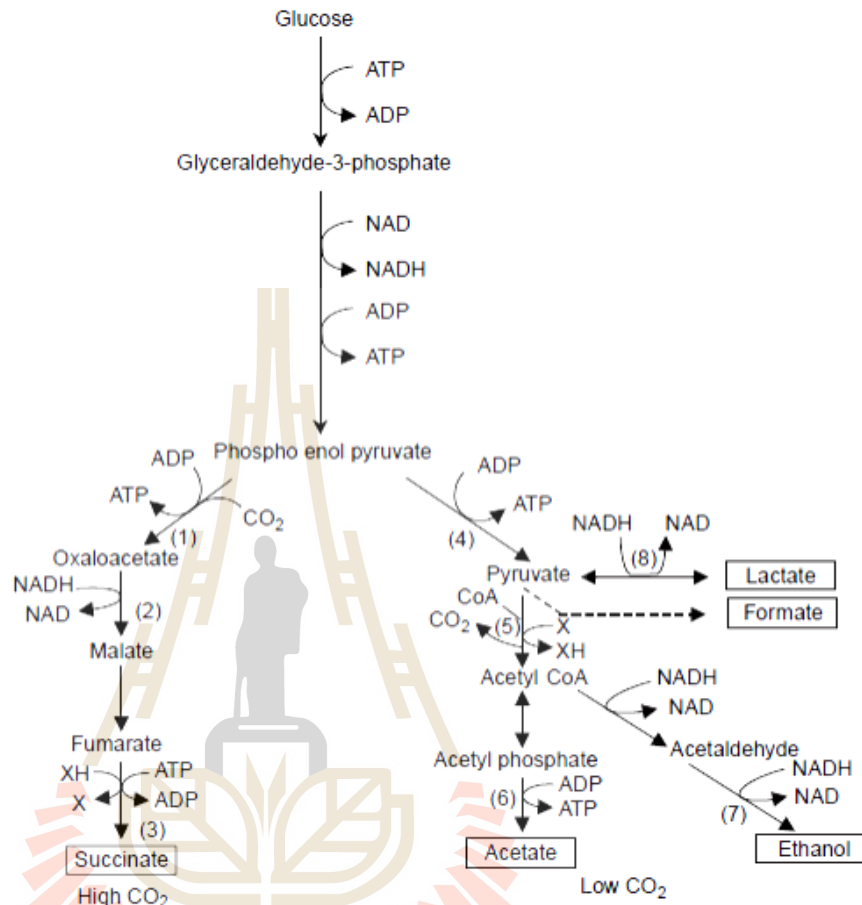
ซูโครส กลูโคส ฟรุกโตส) ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนัก สารคอลลอยด์ โลหะหนักต่างๆ วิตามิน และสารประกอบไนโตรเจน เป็นต้น ซึ่งถือเป็น วัตถุดิบที่มีประโยชน์และมีราคาถูก นิยมใช้ในการผลิตเอทานอล กรดแล็กติก และน้ำตาลซอร์บิทอล (Liu *et al.*, 2008) สำหรับการผลิตกรดซัคซินิคโดยกระบวนการหมักแบบกะ จะสามารถผลิตได้ประมาณ 46.4 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อ *A. succinogenes* นอกจากนี้ยังได้มีการนำน้ำย่อยฟางข้าวที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลไซโลส มาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตกรดซัคซินิค โดยเชื้อ *A. succinogenes* ในกระบวนการหมักแบบกะ ที่สภาวะที่ไม่มีออกซิเจนพบว่าสามารถผลิตกรดซัคซินิคได้มากกว่า 45.5 กรัมต่อลิตร และในกระบวนการหมักแบบกึ่งกะสามารถผลิตได้มากกว่า 53.2 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิต 1.21 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ที่ระยะเวลาหมัก 44 ชั่วโมง (Zhenga *et al.*, 2009) หลังจากที่ทำกรย่อยฟางข้าว จะได้เป็นน้ำตาลออกมา ทำให้ง่ายต่อการที่เชื้อแบคทีเรียนำไปใช้ เป็นสารตั้งต้นได้ แต่อย่างไรก็ตามวัตถุดิบจำพวกแป้งนั้น จะมีความน่าสนใจมากที่สุดเนื่องจากมีปริมาณธาตุอาหารสูงและสามารถหาซื้อได้ง่าย ดังนั้นในประเทศไทยและจังหวัดนครราชสีมา เป็นพื้นที่ที่มีการผลิตมันสำปะหลัง ทั้งที่เป็นสด แป้งมันสำปะหลัง และแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ ที่มีคุณภาพออกมา จำพวกกลูโคสไซรัปหรือกลูโคสเหลว ซึ่งล้วนแต่มีราคาถูก อีกทั้งมีโรงงานหลายแห่งที่ตั้งอยู่ภายในจังหวัด ได้มีความสนใจหาแนวทางความเป็นไปได้ในการใช้พัฒนาวัตถุดิบดังกล่าวในการผลิตกรดซัคซินิค ถือเป็นก้าวให้เกิดประโยชน์และเพิ่มมูลค่าของผลิตภัณฑ์เป็นอย่างมาก ทั้งยังสร้างมูลค่าให้กับวัตถุดิบมวลชีวภาพควบคู่กับการพัฒนาด้านเทคโนโลยีชีวภาพก่อให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่เป็นประโยชน์ต่อไป

กระบวนการผลิตทางชีวภาพหรือกระบวนการหมักที่มีการใช้เชื้อจุลินทรีย์ร่วมด้วย ถือเป็นวิธีการที่ดีต่อสิ่งแวดล้อม และเป็นเทคโนโลยีสะอาด ที่ได้รับความสนใจศึกษาวิจัยกันอย่างกว้างขวาง นอกจากนี้ในการผลิตกรดซัคซินิคด้วยวิธีการหมัก ยังมีการตรึงก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เข้าสู่เซลล์เพื่อใช้ในกระบวนการหมัก กรดซัคซินิคซึ่งถือเป็น CO₂-fixation fermentation เป็นประโยชน์เป็นอย่างมากกับการลดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

1.2.3 จลศาสตร์ของการหมักกรดซัคซินิค

Lin *et al.*, 2008 ได้ทำการศึกษาจลศาสตร์การหมักกรดซัคซินิคด้วยเชื้อ *A. succinogenes* โดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าการเจริญของเชื้อขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสและผลิตภัณฑ์กรดซัคซินิค โดยการยับยั้งจากสารตั้งต้นหรือ substrate inhibition จะเกิดขึ้นเมื่อมีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเกินกว่า 143 กรัมต่อลิตร และหากความเข้มข้นของน้ำตาลมากกว่า 158 กรัมต่อลิตร จะส่งผลทำให้เชื้อแบคทีเรียไม่สามารถเจริญได้ นอกจากนี้ยังพบว่าความเข้มข้นวิกฤตของกรดซัคซินิคและผลพลอยได้ กรดฟอร์มิก กรดอะซีติก เอทานอล และกรดไพรูวิก ที่มีต่อกระบวนการหมักคือ 104, 46, 42, 16, และ 74 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าในระหว่างกระบวนการหมักนั้น จะมีการสะสมกรดอินทรีย์และเอทานอลในน้ำหมัก ซึ่งเมื่อความเข้มข้นของสารเหล่านี้สูงขึ้น จะส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพในการหมักของเชื้อแบคทีเรีย และเมื่อความเข้มข้นของสารเหล่านี้ถึงจุดวิกฤต จะทำให้กระบวนการหมักยุติลง ดังนั้นในระหว่างกระบวนการหมักจึงมักที่จะเติมต่างลงไปเพื่อทำให้น้ำหมักมีค่าความเป็นกรดต่างที่เป็นกลางเสมอ โดยต่างนั้นมักจะใช้แคลเซียมไฮดรอกไซด์

(Ca(OH)₂) เนื่องจากมีราคาถูก แต่อย่างไรก็ตามเมื่อทำการปรับค่าความเป็นกรดต่างด้วยกรดซัลฟูริกแล้ว จะเกิดยิบซัมหรือแคลเซียมซัลเฟตขึ้น (CaSO₄) ซึ่งจะเป็นต้องกำจัดออกไปจากปฏิกิริยา



รูปภาพ 2 แสดงวิถีในกระบวนการผลิตกรดซัคซินิคจากน้ำตาลกลูโคส (Song et al., 2006)

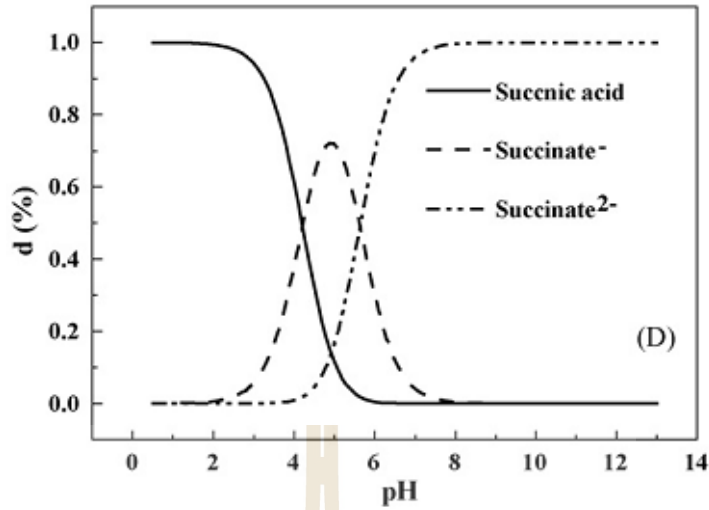
1.2.4 กระบวนการทำบริสุทธิ์กรดซัคซินิคจากน้ำหมัก

สำหรับกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ของกรดซัคซินิคนั้น ต้นทุนในการทำบริสุทธิ์กรดซัคซินิคมีมากกว่า 60% ของต้นทุนการผลิตทั้งหมด ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาและพิจารณาเลือกวิธีที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพสูงในการแยกกรดซัคซินิคออกจากน้ำหมักและเข้าสู่กระบวนการทำให้บริสุทธิ์ต่อไป ด้วยคุณลักษณะเฉพาะของผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพ จึงเป็นข้อจำกัดสำหรับกระบวนการแยกโดยทั่วไป ในบางครั้งอาจจะจำเป็นต้องพัฒนาวิธีใหม่ที่เหมาะสมขึ้นมาใช้ในการแยก สำหรับการออกแบบกระบวนการหรือการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ นอกจากต้องคำนึงถึงชนิดและคุณภาพของผลิตภัณฑ์แล้ว ยังต้องพิจารณาปัจจัยอื่น ๆ ร่วมด้วย เช่น ตำแหน่งของผลิตภัณฑ์และสารเจือปนในกระบวนการผลิต ประโยชน์ของ

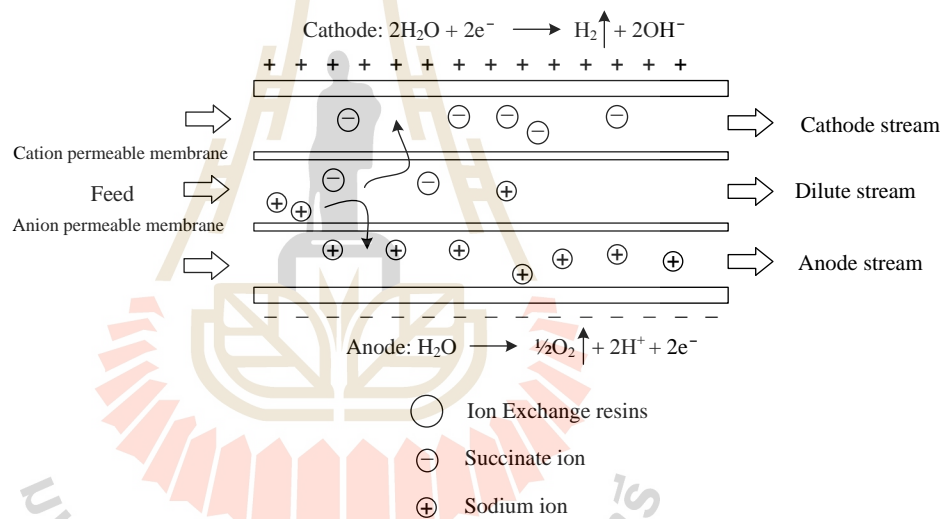
ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการรวมทั้งความคุ้มค่าของกระบวนการแยกที่นำมาใช้อีกด้วย กรดซัคซินิกเป็นองค์ประกอบที่อยู่ภายในน้ำหมักซึ่งเป็นองค์ประกอบที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นและถูกขับออกนอกเซลล์ (extracellular) เมื่อเซลล์มีการเจริญเติบโตและสร้างผลิตภัณฑ์ ดังนั้นการทำให้บริสุทธิ์ของกรดซัคซินิกจึงมีอยู่หลายวิธี เช่น electro dialysis acidification และ extraction เป็นต้น สำหรับ electro dialysis เป็นกระบวนการแยกผลิตภัณฑ์ที่มีการใช้การแลกเปลี่ยนประจุในโมเลกุลของสารนั้นๆ โดยใช้เยื่อแผ่นร่วมกับใช้ไฟฟ้ากระแสตรงเป็นตัวช่วยในการแตกตัวของประจุให้เกิดการแยกผลิตภัณฑ์ที่สมบูรณ์ แต่อย่างไรก็ตามเทคโนโลยีดังได้กล่าวนี้ มีการลงทุนที่ค่อนข้างสูง ทั้งในด้านการจัดระบบการแยกและอุปกรณ์จัดสร้างระบบต่างๆ (Zeikus *et al.*, 1999) นอกจากนี้ เทคนิคดังกล่าวไม่สามารถแยกกรดอินทรีย์หลายชนิดที่ได้จากกระบวนการหมัก เนื่องจากกรดอินทรีย์เหล่านี้สามารถแตกตัวเป็นไอออนได้เช่นกัน และสำหรับกระบวนการ crystallization เป็นอีกเทคนิคหนึ่งที่ยอมรับแยกกรดซัคซินิก แต่อย่างไรก็ตาม ยังคงมีปัญหามากมาย ยกตัวอย่าง เช่น มีการปนเปื้อนจากส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ โปรตีน กรดนิวคลีอิก ไขมัน หรือเกลือ ที่ส่งผลต่อผลผลิตและความบริสุทธิ์ของกรดซัคซินิกในขั้นตอนสุดท้าย ที่มีความบริสุทธิ์ไม่ตีพอ คือที่ 90 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น (Qiang *et al.*, 2010) การแยกกรดซัคซินิกที่มีการรวมกันของเทคนิค reactive extraction vacuum distillation และ crystallization โดยผลที่ออกมาจะได้ความบริสุทธิ์สูง 99.76 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนัก ซึ่งถือว่าเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพที่ดีมาก (Zeikus *et al.*, 1999)

- อิเล็กโตรไดอะไลซิส

Meynial-Salles *et al.*, 2007 ได้ทำการศึกษาการผลิตกรดซัคซินิกแบบต่อเนื่องควบคู่กับกระบวนการหมักด้วยเทคนิคอิเล็กโตรไดอะไลซิสโดยใช้เชื้อ *A. succiniproducens* ซึ่งระบบอิเล็กโตรไดอะไลซิสนั้น เป็นปฏิกิริยาทางไฟฟ้า-เคมีที่ใช้เยื่อแผ่นที่มีประจุ (charged membranes) สองชนิดคือ anion และ cation-exchange membrane โดยที่แต่ละชนิดจะยอมให้อิออนประจุลบและประจุบวกผ่านได้ตามลำดับ นอกจากนี้แล้ว ยังจะมีการใช้ไฟฟ้ากระแสตรง เป็นตัวทำให้เกิดความต่างศักย์ของไฟฟ้าระหว่างเยื่อแผ่นทั้งสอง ในระหว่างการแยกนั้น จะมีการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้อยู่ในสภาวะที่เหมาะสม โดยกรดซัคซินิกมีค่าคงที่ของการแตกตัวอยู่ 2 ค่าคือที่ pH 4.2 และ 5.6 ตามลำดับ (รูปภาพ 3) ซึ่งจะทำให้กรดซัคซินิกแตกตัวเป็นไอออนของซัคซิเนตซึ่งมีประจุเป็นลบ และสามารถแพร่ออกจาก Cation-exchange membrane ได้ ในขณะที่ โซเดียมหรือแคลเซียมซึ่งมีประจุบวกจะแพร่ออกจาก anion-exchange membrane (รูปภาพ 4) ซึ่งผลการทดลองระบุว่า ความเข้มข้นของเซลล์แบคทีเรียและผลผลิตของกรดซัคซินิกอยู่ที่ 42 กรัมต่อลิตรและ 14.8 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งสูงมากกว่าการหมักในแบบกะถึง 28 และ 20 เท่าตามลำดับ



รูปภาพ 3 อิทธิพลของค่าความเป็นกรด-ด่างที่มีต่อการแตกตัวของกรดซัคซินิก (Li *et al*, 2010)

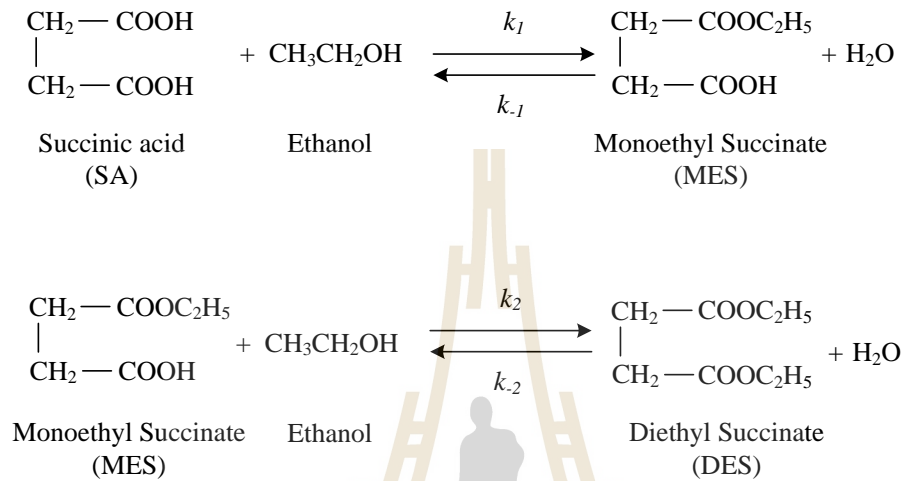


รูปภาพ 4 หลักการทำงานของระบบ Electrodialysis (ED)

- ปฏิกริยาเอสเทอร์ริไฟเคชันและการกลั่น

สารประกอบเอสเทอร์เกิดจากการที่หมู่ฟังก์ชันคาร์บอกซิลิกของกรดอินทรีย์ชนิดหนึ่ง ๆ มาทำปฏิกิริยาเคมีกับหมู่ฟังก์ชันไฮดรอกซิลของแอลกอฮอล์ เช่น เอทานอล เป็นต้น ได้เป็นพันธะเอสเทอร์ เช่นเดียว กับกรดซัคซินิกที่สามารถเกิดเป็นสารประกอบเอสเทอร์ได้ แสดงดังรูปภาพ 5 โดยกรดซัคซินิก ซึ่งมีหมู่คาร์บอกซิลิก 2 หมู่ฟังก์ชันจะทำปฏิกิริยากับเอทานอล 2 โมล ได้เป็นไดเอทิลซัคซิเนต และจะเกิดน้ำขึ้น 2 โมลจากปฏิกิริยา นอกจากนี้กรดอินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ก็สามารที่จะเกิดปฏิกิริยาเอสเทอร์ริไฟเคชันกับแอลกอฮอล์ได้เช่นเดียวกันกับกรดซัคซินิกและสามารถใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาได้หลายชนิดเช่น

กรดซัลฟูริก หรือ macroporous Amberlyst- 15 ion exchange resin ที่ความเข้มข้น 1-5 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนัก เป็นต้น โดยทำการควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ระหว่าง 78 ถึง 120 องศาเซลเซียส เพื่อให้เกิด mono-ethyl succinate และ di-ethyl succinate ตามลำดับ



รูปภาพ 5 กระบวนการ esterification ของกรดซัลฟูริกและเอทานอล

ตาราง 2 แสดงสมบัติทางกายภาพของเอสเทอร์ชนิดต่าง ๆ เช่น เอทิลฟอร์มเมต ไดเอทิลซัลซิเนต เอทิลแล็กเตทและเอทิลอะซีเตท ซึ่งจะสังเกตเห็นได้ว่าเอทิลเอสเทอร์ของกรดอินทรีย์ต่าง ๆ เหล่านี้จะมีจุดเดือดที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน โดยเอทิลฟอร์มเมต เอทิลอะซีเตท เอทิลแล็กเตทและไดเอทิลซัลซิเนต มีจุดเดือดที่ 54, 77.1, 151 และ 218 องศาเซลเซียสตามลำดับ ซึ่งไดเอทิลซัลซิเนตจะมีจุดเดือดที่สูงกว่าสารทั้ง 3 ชนิดเป็นอย่างมาก ทำให้สามารถแยกได้โดยอาศัยการกลั่นลำดับส่วน

ตาราง 2 สมบัติทางกายภาพและเคมีของ ethyl ester ของ lactic acid, acetic acid, formic acid และ succinic acid

สมบัติ	Ethyl formate	Diethyl succinate	Ethyl lactate	Ethyl acetate
มวลโมเลกุล	C ₃ H ₆ O ₂	C ₈ H ₁₄ O ₄	C ₃ H ₁₀ O ₃	C ₄ H ₈ O ₂
Molar mass (g/mole)	74.08	174.19	118.13	88.11
ลักษณะทางกายภาพ	Colorless liquid	Colorless liquid	Slightly yellow liquid	Colorless liquid
ความหนาแน่น (g/cm ³) 20 °C	0.197	1.047	1.03	0.897
จุดหลอมเหลว (°C)	-80	-20	-26	-83.6
จุดเดือด (°C)	54	218	151	77.1
Refractive index (η _D)	1.36	1.42	1.41	1.372
ความหนืดที่ 25 °C	-	1.22 cP	0.0261 cP	0.426 cP

Labsungneon *et al*, 2014 ได้ศึกษากระบวนการทำบริสุทธิ์กรดซัคซินิคจากน้ำหมักด้วยเทคนิคเอสเทอร์ฟิเคชันกับเอทานอล ซึ่งพบว่าหากทำการกำจัดน้ำออกจากปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันแล้ว จะสามารถช่วยให้กรดซัคซินิคเปลี่ยนไปเป็นไดเอทิลซัคซิเนตได้ทั้งหมด และสามารถใช้การกลั่นแบบธรรมดาในการกลั่นลำดับส่วนแยกเอทิลฟอร์มเมต เอทิลแกลีเททและเอทิลอะซีเตท ออกจากไดเอทิลซัคซิเนตได้อย่างสมบูรณ์

- การดูดซับ

การดูดซับเป็นเทคนิคที่มีศักยภาพในการแยกกรดซัคซินิคออกจากน้ำหมัก โดยเฉพาะการใช้ตัวดูดซับที่มีสมบัติเป็นตัวแลกเปลี่ยนประจุชนิดต่างอ่อน (weak alkaline anion exchange adsorbents) ซึ่งจะทำให้สามารถจับกับสารที่มีประจุเป็นลบได้เป็นอย่างดี โดยเมื่อตัวดูดซับเกิดการอิ่มตัว ก็สามารถที่จะทำการคายซับ (desorption) แเอกรดซัคซินิคออกจากด้วยวิธีการล้างด้วยสารละลายที่มีค่า ionic strength สูง ซึ่งจะทำให้กรดซัคซินิคหลุดออกจากตัวดูดซับนั้น ซึ่งข้อดีของเทคนิคนี้คือมีการลงทุนที่ไม่สูงมากนัก และมีความสามารถในการจับกรดซัคซินิคได้ดี แต่อย่างไรก็ตาม เทคนิคนี้ไม่สามารถแยกกรดอินทรีย์ชนิดอื่นที่ปนเปื้อนมาจากน้ำหมักได้ ทั้งนี้เนื่องจากกรดอินทรีย์เหล่านี้จะมีสมบัติทางกายภาพและทางเคมีที่คล้ายกันกับกรดซัคซินิค กล่าวคือมีค่าคงที่ของการแตกตัว (pKa) ที่

ใกล้เคียงกันและยังมีหมู่ฟังก์ชันคาร์บอกซิลิกเช่นเดียวกันอีกด้วย ดังนั้นกระบวนการดูดซับ จึงถือเป็นการทำบริสุทธิ์ขั้นต้นเท่านั้น และจะต้องใช้เทคนิคอื่น ๆ ร่วมในกระบวนการเพื่อที่จะผลิตกรดซัลฟอนิกบริสุทธิ์สูงต่อไป

- นาโนฟิลเตชัน

นาโนฟิลเตชันเป็นกระบวนการแยกบางที่อยู่ระหว่างกระบวนการอัลตราฟิลเตชัน (ultrafiltration) และกระบวนการออสโมซิสแบบผันกลับ (reverse osmosis) ซึ่งใช้สำหรับแยกสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยออกจากสารละลาย กระบวนการนาโนฟิลเตชันเป็นกระบวนการแยกบางที่อาศัยความแตกต่างของความดันเป็นแรงขับเคลื่อน (Driving force) โดยจะยอมให้น้ำและตัวถูกละลายที่มีขนาดเล็กหรือมีน้ำหนักโมเลกุลน้อย เช่น น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ไอออนที่ประจุเดี่ยว แต่จะไม่ยอมให้สารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงหรือมีขนาดของโมเลกุลใหญ่ผ่านไป ตัวอย่างเช่น น้ำตาลโมเลกุลคู่ ไอออนที่มีประจุมากกว่าหนึ่ง และสารอินทรีย์ที่มีขนาดโมเลกุลมากกว่า 1000 ดาลตัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับ molecular weight cut-off ของเมมเบรนชนิดนั้นด้วย โดยค่าดังกล่าวอาจอยู่ในช่วงตั้งแต่ 400-1000 โดยต้องศึกษาจากบริษัทผู้ผลิตอีกครั้งหนึ่ง ดังนั้นกระบวนการนาโนฟิลเตชันจึงสามารถใช้แยกน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวออกจากน้ำตาลโมเลกุลคู่ได้ และสามารถแยกไอออนที่มีประจุเดี่ยวออกจากไอออนที่มีประจุคู่ได้ กระบวนการนาโนฟิลเตชันถูกนำมาใช้ประโยชน์ในหลาย ๆ ด้าน เช่น การลดความกระด้างของน้ำโดยการกำจัดไอออนที่มีโมเลกุลคู่เช่น Ca^{2+} และ Mg^{2+} ใช้อุตสาหกรรมยา และประยุกต์ใช้ในการเทคโนโลยีชีวภาพ เป็นต้น ปัจจุบันมีงานวิจัยที่จะพัฒนานำเอานาโนฟิลเตชันมาใช้เพื่อแยกและทำให้สารมีความบริสุทธิ์ในเชิงอุตสาหกรรมมากขึ้น ตัวอย่างเช่น การแยกน้ำตาลที่เป็นสารปนเปื้อนในการผลิตกรดอินทรีย์ด้วยวิธีการหมัก การแยกกรดอินทรีย์ออกจากน้ำหมักที่มีน้ำตาลและโปรตีนผสมอยู่ เป็นต้น

สำหรับกลไกของการแยกโดยกระบวนการนาโนฟิลเตชันสามารถอธิบายได้ในเทอมของประจุและขนาดของโมเลกุล ปรากฏการณ์การถ่ายโอนของตัวถูกละลายที่ไม่มีประจุผ่านเยื่อบางนาโนฟิลเตชันจะเกิดขึ้นสองลักษณะ ได้แก่ การพา (Convection) เนื่องจากใช้ความแตกต่างของความดันสองเฟสเป็นตัวขับเคลื่อน และการซึมผ่าน (Diffusion) เนื่องจากใช้ความแตกต่างของความเข้มข้นระหว่างสองเฟสเป็นตัวขับเคลื่อน ดังนั้น การกรองผ่านเยื่อบางนาโนฟิลเตชันของโมเลกุลที่ไม่มีประจุจะเกิดขึ้นด้วยอิทธิพลจากขนาดโมเลกุลเป็นหลัก สำหรับการถ่ายโอนของตัวถูกละลายที่มีประจุผ่านเยื่อบางนาโนฟิลเตชันจะเกิดขึ้นเนื่องจากอิทธิพลของแรง Electrostatic ระหว่างโมเลกุลที่มีประจุกับประจุของเยื่อบาง (เยื่อบางนาโนฟิลเตชันส่วนใหญ่มีประจุลบ) ถ้าโมเลกุลที่มีประจุเดียวกันกับเยื่อบางก็จะถูกผลักไม่ให้ผ่านเยื่อบางไปได้ สำหรับโมเลกุลที่มีประจุแตกต่างจากประจุของเยื่อบางก็จะ

สามารถซึมผ่านแผ่นเยื่อบางไปได้ ดังนั้นระบบนาโนฟิลเตรชันของโมเลกุลที่มีประจุจะเกิดขึ้นด้วยอิทธิพลของประจุของโมเลกุลเป็นหลัก และลักษณะการถ่ายโอนมวลของกรดอินทรีย์นั้น จะขึ้นอยู่กับค่า pH ของสารละลายเป็นหลักด้วย

- การตกผลึก

โดยหลักการทั่วไปแล้ว สารส่วนใหญ่จะละลายได้ดีในตัวทำละลายที่สูงมากกว่าที่อุณหภูมิห้อง ดังนั้นเมื่อทำให้สารละลายอิ่มตัวที่อุณหภูมิสูงเย็นตัวลง ก็จะทำให้สารแยกตัวออกมาจากสารละลายในรูปของของแข็ง ซึ่งกระบวนการนี้เรียกว่า การตกผลึก (crystallization) โดยในทางปฏิบัติการตกผลึกจะเป็นการนำสารไปละลายในตัวทำละลายที่เหมาะสมที่อุณหภูมิสูงจนกระทั่งได้สารละลายอิ่มตัว แล้วทิ้งไว้ให้เย็นจนสารค่อยๆ ตกผลึกออกมา โดยคาดหวังว่าจะได้สารที่ต้องการเพียงสารเดียวตกผลึกออกมาเท่านั้น และสารอื่นๆ ที่เจือปนยังคงละลายอยู่ในสารละลาย ซึ่งสารละลายส่วนที่เหลือนี้เรียกว่า mother liquor ซึ่งการตกผลึกกรดซัคซินิกนั้น พบว่ามีปัจจัยแวดล้อมที่ส่งผลทำให้ค่าการละลายของกรดซัคซินิกในน้ำเปลี่ยนไปคือ ค่าความเป็นกรดต่าง อุณหภูมิ ชนิดของเกลือซัคซิเนตและความเข้มข้น เป็นต้น ซึ่งกล่าวโดยทั่วไปแล้วกรดซัคซินิกจะมีค่าการละลายน้อยลงเมื่อค่าความเป็นกรดต่างลดลง อุณหภูมิต่ำลง และความเข้มข้นที่เพิ่มมากขึ้น ดังนั้นการทำการตกผลึกกรดซัคซินิกที่เหมาะสมจึงจำเป็นที่จะต้องทำการศึกษาสถานะต่าง ๆ ให้เหมาะสมด้วย ซึ่งปัจจัยที่บ่งชี้ประสิทธิภาพของการตกผลึกมี 2 ประการ คือ 1) การตกผลึกที่ทำให้ได้ผลึกที่บริสุทธิ์ที่สุดนั้นคือปริมาณของสารเจือปนต่อน้อยที่สุด 2) การตกผลึกให้ได้สารออกมาปริมาณมากที่สุด หรือมีสารคงเหลือละลายอยู่ใน mother liquor น้อยที่สุด นั่นคือมี % recovery สูง ซึ่งความสำเร็จทั้ง 2 ประการข้างต้น ขึ้นอยู่กับทางเลือกระบบตัวทำละลายและความบริสุทธิ์เมื่อ เริ่มต้นของสารที่จะทำการตกผลึกเป็นอย่างมาก บ่อยครั้งที่การตกผลึกเพียงครั้งเดียวไม่สามารถทำให้ได้สารบริสุทธิ์ตามต้องการ จึงต้องมีการตกผลึกซ้ำ เพื่อให้ได้สารที่บริสุทธิ์ขึ้น ในการตกผลึกแต่ละครั้งจะมีการสูญเสียสารไปกับ mother liquor บ้าง จึงทำให้ % recovery ต่ำลง แต่ความบริสุทธิ์สูงขึ้น โดยทั่วไปแล้วการตกผลึกมักใช้กับของผสมที่มีสารมากและมีสิ่งเจือปนอยู่น้อย

โดยทั่วไปแล้วการตกผลึกในอุตสาหกรรมนิยมใช้กระบวนการตกผลึกแบบชั้นหรือที่เรียกว่า melt layer crystallization ซึ่งการตกผลึกแบบนี้มักจะทำแบบกะ โดยทำการกวนให้ระบบมีความเป็นเนื้อเดียวกันและมีการประยุกต์ใช้สารทำความเย็นวิ่งผ่านท่อขดซึ่งจุ่มอยู่ในสารละลายที่ต้องการตกผลึก นั้น หลักการทำงานจะอยู่ที่กระบวนการตกผลึกละลายด้วยการระบายความร้อน เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการตกผลึกลงบนพื้นผิว จากนั้นทำการขยายมวลของผลึกที่เกิดขึ้น ก่อนที่จะนำผลึกของกรดซัคซินิกที่ผลิตได้ไปทำบริสุทธิ์ขั้นสุดท้ายต่อไป

กล่าวโดยสรุปแล้วสำหรับกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ของกรดซัคซินิกนั้นต้นทุนในการทำบริสุทธิ์กรดซัคซินิกมีมากกว่า 60% ของต้นทุนการผลิตทั้งหมด ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาและพิจารณาเลือกวิธีที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพสูงในการแยกกรดซัคซินิกออกจากกรดอินทรีย์อื่นๆ เพื่อลดต้นทุนในการผลิต

1.3 การประยุกต์ใช้กรดซัคซินิกในอุตสาหกรรมพลาสติกชีวภาพ

ปัจจุบันทั่วโลกมีความต้องการในการใช้เม็ดพลาสติกชีวภาพอยู่ประมาณ 500,000 เมตริกตันต่อปี โดยพลาสติกชีวภาพที่เป็นที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย คือ พอลิแลคติกแอซิด (polylactic acid: PLA) อย่างไรก็ตาม กำลังการผลิตเม็ดพลาสติกชีวภาพชนิดพอลิแลคติกแอซิดทั่วโลกมีเพียง 200,000 เมตริกตันต่อปี ดังนั้น ปัจจุบันพลาสติกชีวภาพชนิดอื่นๆ จึงได้เข้ามามีส่วนแบ่งในตลาดผลิตภัณฑ์พลาสติกชีวภาพมากยิ่งขึ้น พลาสติกชีวภาพที่กำลังได้รับความนิยมในลำดับถัดมา คือ พอลิบิวทิลีนซัคซิเนต (polybutylene succinate: PBS) เนื่องจากเม็ดพลาสติกชีวภาพชนิดนี้สามารถนำไปขึ้นรูปได้ใกล้เคียงกับพลาสติกทั่วไป เมื่อเร็วๆ นี้บริษัท Mitsubishi Chemical แห่งประเทศญี่ปุ่น และบริษัท ปตท. แห่งประเทศไทย ได้ตกลงที่จะศึกษาการพัฒนา bio-polybutylene succinate (โพลิบิวทิลีน ซัคซิเนตชีวภาพ) ที่ผลิตจากชีวมวลที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ ทั้ง 2 บริษัทจะทำการศึกษาร่วมกันที่ GS PLA ซึ่งเป็นเม็ดพลาสติกที่ผลิตโดยบริษัท Mitsubishi และเม็ดพลาสติก bio-succinic acid ซึ่งจากข้อมูลนี้ถือเป็นอุตสาหกรรมปลายน้ำที่จะมีการพัฒนา อย่างไรก็ตาม หากการผลิตกรดซัคซินิกที่เป็นสารตั้งต้น ทำให้มีความบริสุทธิ์สูงและต้นทุนการผลิตต่ำ ถือเป็นความคุ้มค่าทางเศรษฐกิจ เพื่อส่งไปยังการผลิตเม็ดพลาสติกชีวภาพต่อไปได้ ดังนั้นการพัฒนากระบวนการผลิตและการทำบริสุทธิ์ ถือเป็นขั้นตอนที่สำคัญ เพื่อสนับสนุนให้ระบบการผลิตพลาสติกชีวภาพเป็นไปอย่างสมบูรณ์และมีประสิทธิภาพสูงในอนาคต การผลิตกรดซัคซินิกสามารถผลิตได้ทางเคมีโดยใช้ปิโตรเลียมเป็นสารตั้งต้นการผลิต แต่จำเป็นที่จะต้องมีการใช้อุณหภูมิ ความดันที่สูง อีกทั้งต้องมีการเพิ่มต้นทุนสำหรับตัวเร่งปฏิกิริยาในระบบ (Qiang *et al.*, 2010) ในปี ค.ศ. 2004 พบว่ามีความต้องการกรดซัคซินิกและสาร derivative มากกว่า 270,000 ตันต่อปี ทั้งนี้เพื่อนำมาใช้ในอุตสาหกรรมหลักสำหรับผลิตพอลิเมอร์ polysuccinate ester และ polyamides (Song *et al.*, 2006) ในการผลิตกรดซัคซินิกด้วยวิธีทางเคมีดังกล่าวมาแล้วนั้น กรดซัคซินิกจำนวน 1 กิโลกรัม ต้องมีการใช้ n-butane และ maleic anhydride ทำให้มีต้นทุนการผลิตประมาณ 1.30 ดอลลาร์ และในกระบวนการผลิตยังอาจเกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมได้อีกด้วย ซึ่งหากมีการพัฒนากระบวนการผลิตกรดซัคซินิกบริสุทธิ์ให้มีต้นทุนการผลิตที่ต่ำลงแล้ว ก็จะเป็นการเพิ่มความสามารถในการแข่งขันทางด้านต้นทุนและเป็นการเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจของประเทศไทยโดยรวมได้อีกด้วย

1.4 จุดประสงค์ของโครงการวิจัย

1. พัฒนาระบบการทำบริสุทธิ์กรดซัคซินิกจากกระบวนการหมักโดยอิงเทคโนโลยีนาโนฟิลเตชันและการตกผลึกชนิด layer melt crystallization

2. ศึกษาถึงค่าพลังงานที่ใช้และประสิทธิภาพของหน่วยปฏิบัติการต่าง ๆ เช่น การหมัก ไมโครฟิลเตรชัน นาโนฟิลเตรชัน การระเหยน้ำและการตกผลึก เพื่อที่จะนำไปศึกษาถึงค่าพลังงานที่ต้องใช้ทั้งหมดต่อกรดซัคซินิคที่ทำบริสุทธิ์ได้



บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 ขอบเขตของโครงการวิจัย

โครงการวิจัยนี้จะทำการศึกษากำทำบริสุทธิ์กรดซัคซินิคจากน้ำหมักในระดับการหมัก 5 ลิตร โดยใช้เชื้อแบคทีเรีย *Actinobacillus succinogens* ATTC 55168 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตของกรดซัคซินิคสูงและมีกรดอินทรีย์อื่นปนเปื้อนน้อย น้ำหมักจะถูกทำให้ใสก่อนโดยการแยกเซลและระบบนาโนฟิลเตชัน จากนั้นจะถูกทำให้เข้มข้นโดยใช้การระเหยน้ำแบบสุญญากาศ (rotary vacuum evaporator) เพื่อให้ได้สารละลายเข้มข้นยิ่งยวด หลังจากนั้นจะทำการตกผลึกโดยใช้ผงกรดซัคซินิคบริสุทธิ์เป็นตัวล่อ (seeding) ให้เกิดผลึก ก่อนที่จะทำการกำจัดสารละลายทิ้งไป โดยในสารละลายนี้จะประกอบไปด้วยกรดอินทรีย์ชนิดอื่นที่ไม่สามารถตกผลึกได้ จากนั้นจะนำผลึกของกรดซัคซินิคบริสุทธิ์ที่บริสุทธิ์

2.2 อุปกรณ์และสารเคมี

สำหรับอุปกรณ์และสารเคมีสำหรับการดำเนินงานวิจัยพร้อมทั้งเครื่องมือวิเคราะห์ต่างๆ มีอยู่แล้วบางส่วน ณ อาคารปฏิบัติการศูนย์เครื่องมือ 10 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

2.3 จุลินทรีย์และการเลี้ยงเชื้อ

- การเลี้ยงเชื้อ *A. succinogens*

เชื้อแบคทีเรีย *Actinobacillus succinogens* จะทำการซื้อมาจากศูนย์เก็บรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์แห่งชาติ สหรัฐอเมริกา หรือ American Type Culture Collection (ATCC, USA) จากนั้นจะทำการเลี้ยงด้วยอาหารชนิด AS medium ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้ (กรัมต่อลิตร) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (1.5), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1.0), MgCl_2 (0.2), CaCl_2 (0.2), NaCl (1.0), glucose (10.0), และ Yeast extract (5.0) และทำการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างใน (pH) ของอาหารเลี้ยงเชื้อให้ได้ 6.5 โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ จากนั้นนำมานิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

- การเตรียมกล้าเชื้อ

เชื้อ *A. succinogens* จะถูกถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อเตรียมเป็นหัวเชื้อในกระบวนการหมัก โดยมีการหมักในสถานะที่ไม่มีออกซิเจน โดยทำการเติมก๊าซไนโตรเจนเพื่อไล่ออกซิเจนออก หลังจากนั้นทำการบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เพื่อเตรียมไว้สำหรับถ่ายลงสำหรับกระบวนการหมักต่อไป

2.4 กระบวนการหมักแบบกะ

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 4.0 ลิตร ลงในถังกล้าเชื้อ 5 ลิตร (Sartorius B-Plus, Germany) เพื่อจะทำการเลี้ยงเชื้อขนาดปริมาตร 50 ลิตร เมื่อกล้าเชื้อที่เตรียมไว้โดยบ่ม ถ่ายลงไปในถังหมัก ในกระบวนการหมักโดยใช้ถังหมักแบบนี้ต้องมีการควบคุมด้วยเครื่องควบคุมเฉพาะ มีการควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ตามที่ต้องการ การแสดงค่า pH ที่มีการเปลี่ยนแปลงในระบบ อีกทั้งเครื่องควบคุมจะมีการเชื่อมต่อกับปั๊มที่ทำหน้าที่ปั๊มต่างลงในถังหมักเพื่อควบคุมค่า pH และอัตราการกวนที่สามารถระบุได้ ระหว่างดำเนินการหมัก สำหรับการควบคุมค่า pH ให้คงที่นั้นจะมีการเตรียมสารละลายต่างแคลเซียมคาร์บอเนต (ปูนขาว) เข้มข้น โดยที่หลังจาก pH probe เกิดการตอบสนองและแสดงการลดลงของ pH ปั๊มจะปั๊มต่างนี้ลงไป โดยที่ไม่เปลี่ยนปริมาตรในถังหมักมากนัก เนื่องจากถังที่ใช้มีความเข้มข้นสูง เพื่อที่จะควบคุมปริมาตรในการหมัก ทั้งนี้ควบคุมอุณหภูมิให้ได้ 37 องศาเซลเซียส โดยอ่างน้ำร้อน อีกทั้งดำเนินการภายใต้สถานะไม่มี อากาศ เพื่อให้เซลล์สามารถเจริญและสร้างผลผลิตเกิดขึ้นได้ จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างโดยดูดน้ำหมัก มาครั้งละ 10 มิลลิลิตร โดยเริ่มเก็บตัวอย่าง ตั้งแต่ ชั่วโมงที่ 0 และทุกๆ 3-4 ชั่วโมงเป็นระยะเวลาประมาณ 40-60 ชั่วโมง จนกว่าการสร้างกรดซัคซินิคจะหยุดลง หลังจากนั้นนำมาวิเคราะห์สารต่างๆต่อไป

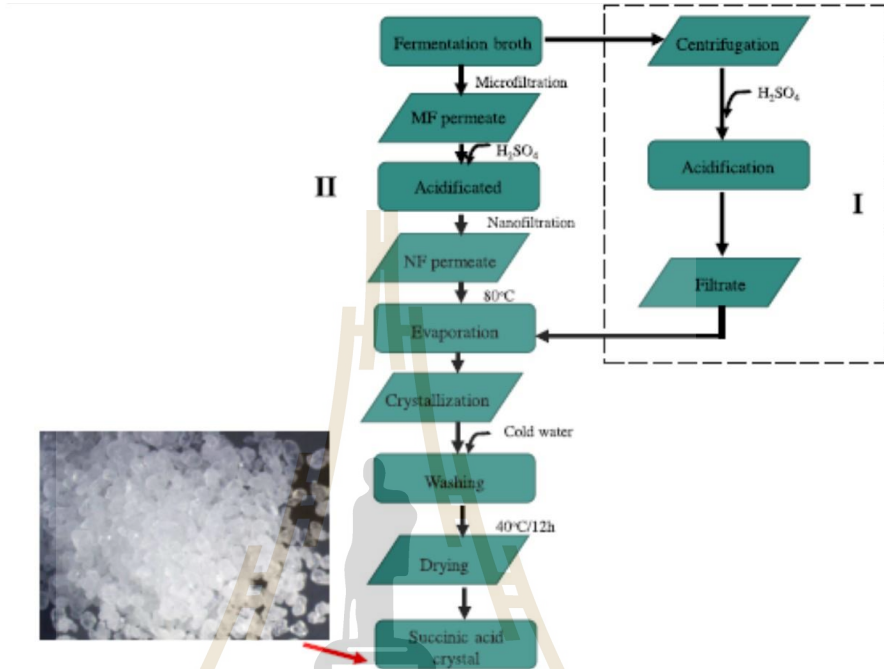


รูปภาพ 6 การทดลองกระบวนการหมักกรดซัคซินิคขนาด 50 ลิตร

2.5 กระบวนการทำบริสุทธิ์กรดซัคซินิค

ขั้นตอนถัดไปคือการทำบริสุทธิ์กรดซัคซินิค (downstream processing) โดยได้ทำการออกแบบกระบวนการทำบริสุทธิ์ในรูปภาพ 7 ซึ่งในขั้นแรกจะเป็นการกำจัดของแข็งด้วยการปรับค่าความเป็นกรดต่างด้วยกรดซัลฟูริกเพื่อทำให้กรดซัคซินิคแยกตัวออกมาและเกิดเป็นตะกอนของแคลเซียมซัลเฟต (CaSO_4) หรือยิบซัม จากนั้นจะทำการกรองยิบซัมออกด้วยระบบการกรองผ่านถุงกรองขนาด 1 ไมครอน

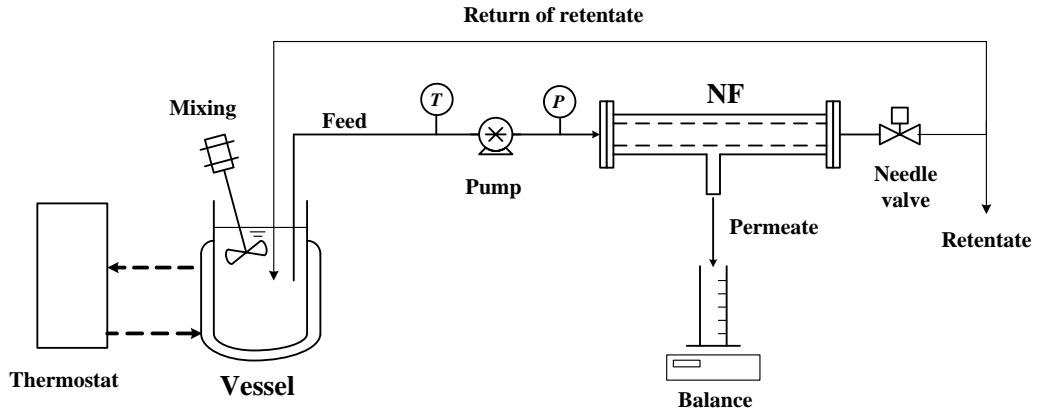
จากนั้นจะใช้ระบบไมโครฟิวเตรชัน (MF) ในการแยกเซลล์แบคทีเรียออกจากระบบ จากนั้นจะทำการใช้ระบบนาโนฟิวเตรชันทำการแยกสารสีและสาร macromolecules อื่น ๆ ออกไป สารละลายกรดซัคซินิคที่ได้นี้ จะถูกระเหยน้ำจนมีความเข้มข้นสูง ก่อนที่จะทำการตกผลึกเพื่อให้ได้กรดซัคซินิคบริสุทธิ์ต่อไป ส่วนกรดอินทรีย์ชนิดอื่นที่ไม่สามารถตกผลึกได้นั้น จะละลายอยู่ใน mother liquor และจะถูกกำจัดทิ้งไปในที่สุด



รูปภาพ 7 กระบวนการทำบริสุทธิ์กรดซัคซินิคจากน้ำหมักโดยนาโนฟิวเตรชันและการตกผลึก

2.6 นาโนฟิวเตรชัน

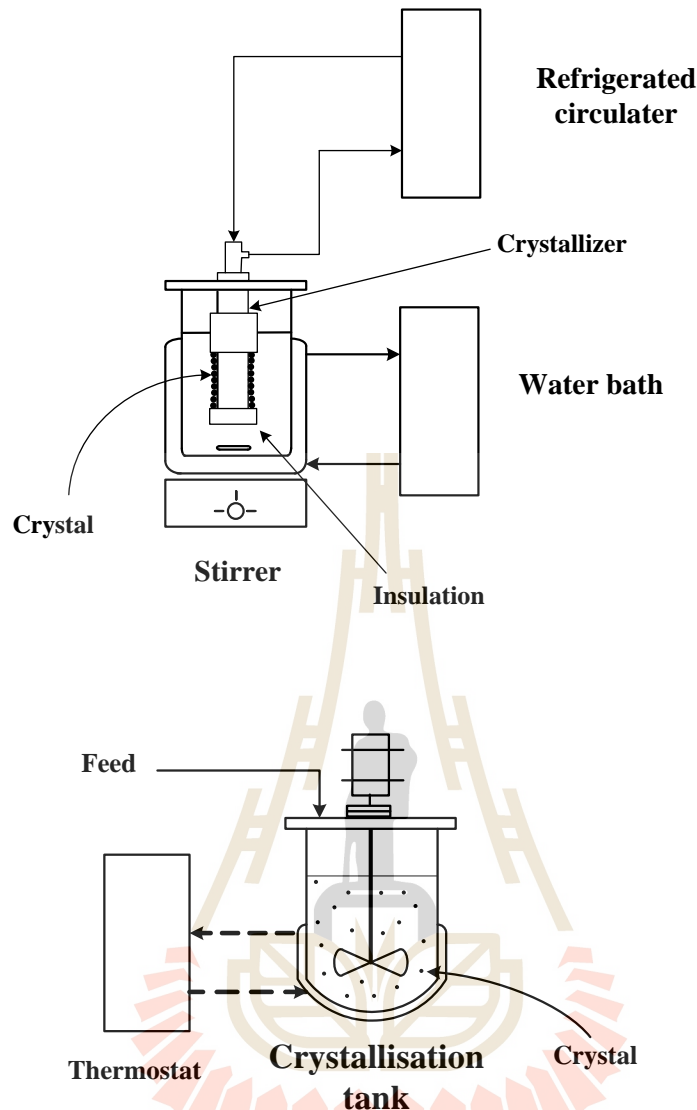
ระบบนาโนฟิวเตรชันจะใช้เมมเบรนชนิดเซรามิก เนื่องจากมีคุณสมบัติที่แข็งแรง มีความทนทานเชิงกลสูง มีลักษณะเป็นท่อขนาดความยาว 25 ซม และมีเส้นผ่าศูนย์กลางด้านใน 0.7 ซม และด้านนอก 1.0 ซม โดยมีชั้นผิวซึ่งทำหน้าที่คัดเลือกว่าผ่านเคลือบอยู่ด้านในของท่อเมมเบรนดังกล่าว ซึ่งท่อนี้จะถูกบรรจุอยู่ในตัวเรือนที่ทำด้วยท่อสแตนเลส และมีปั๊มแรงดันสูงทำหน้าที่ในการไหลเวียนน้ำหมักดังแสดงในรูปภาพ 8



รูปภาพ 8 นาโนฟิวเตรชั่นในการแยกกรดซัคซินิกจากน้ำหมัก (Lubsungneon *et al*, 2014)

2.7 การตกผลึก

ส่วนที่กรองได้ (filtrate) จากระบบนาโนฟิวเตรชั่นจะประกอบด้วยกรดซัคซินิก กรดแล็กติก กรดอะซีติก กรดฟอร์มิกและอ็อกตอนต่าง ๆ ซึ่งดังที่ได้กล่าวมาแล้วว่ากรดซัคซินิกนั้น มีค่าการละลายที่ต่ำมาก ซึ่งสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตกผลึกได้ในขณะที่สารอื่น ๆ จะไม่สามารถตกผลึกได้ ซึ่งเทคนิคการตกผลึกกรดซัคซินิกจากน้ำหมักนี้ จะใช้เทคนิคที่เรียกว่า layer crystallization (รูปภาพ 9 บน) ซึ่งจะประกอบด้วยขวดแก้วสองชั้น โดยในขวดแก้วนี้จะบรรจุส่วนที่กรองได้ (filtrate) ที่ทำให้เข้มข้นแล้ว ซึ่งอุณหภูมิของ filtrate นี้จะถูกควบคุมด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ จากนั้นจะใช้แท่งแลกเปลี่ยนความร้อน (cooling finger) จุ่มลงในสารละลายดังกล่าว ภายในท่อจะมีการหล่อด้วยน้ำเย็นที่ผลิตจากเครื่องควบคุมความเย็น (refrigerated circulator) ที่อุณหภูมิต่าง ๆ โดยที่กรดซัคซินิกจะตกผลึกบนผิวของท่อแลกเปลี่ยนความร้อนดังกล่าว ซึ่งอัตราการเกิดผลึกสามารถศึกษาได้จากการวัดความหนาของชั้นผลึกที่เกิดขึ้น ส่วนการตกผลึกโดยตรงจากสารละลาย (รูปภาพ 9 ล่าง) นั้น จะเป็นการควบคุมอุณหภูมิสารละลายที่บรรจุอยู่ในโถแก้ว 2 ชั้น (crystallization tank) ผ่านทางเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (thermostat) และกวนอยู่ตลอดเวลาเพื่อทำให้สารละลายมีความเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneous) อยู่ตลอดเวลา



รูปภาพ 9 การจัดการทดลองการตกผลึกแบบ layer crystallizer สำหรับการตกผลึกกรดซัคซินิกแบบ
ชั้น (บน) และ การตกผลึกโดยตรงจากสารละลาย (ล่าง)

2.8 การวิเคราะห์

นำตัวอย่างที่เก็บได้จากถังปฏิกรณ์ชีวภาพ นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที โดยเครื่องปั่นเหวี่ยง เพื่อแยกเซลล์และส่วนใสที่เป็นตัวอย่างที่ต้องการนำมาวิเคราะห์ ดังนี้คือ

(1) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี Dinitrosalicylic (DNS) method ตามวิธีของ Miller (Miller, 1959) โดยที่จะนำเอาน้ำหมักที่ปั่นเหวี่ยงกรองเอาส่วนใสมา 0.5 มิลลิลิตร และเติม 3, 5-dinitrosalicylic acid reagent 0.5 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองแก้ว จากนั้นนำไปต้มให้ความร้อนเพื่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสี เป็นการเกิดปฏิกิริยาของน้ำตาลกับสารละลายที่เติมลงไปตั้งกล่าวเป็นเวลา 5 นาที และ

นำไปวิเคราะห์ผลหาค่าความขุ่นของตัวอย่างโดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร พร้อมกับทำการฟามาตรฐานของน้ำตาลโดยแปรผันความเข้มข้นระหว่าง 0.2-1.0 ไมโครโมลต่อ มิลลิลิตร ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดจะถูกนำมาเปรียบเทียบกับกราฟความเข้มข้นน้ำตาล มาตรฐาน (ในที่นี้ใช้น้ำตาลกลูโคส) ที่ทราบความเข้มข้นแล้ว เพื่อให้ได้กราฟมาตรฐานและเทียบกับค่าที่ได้จาก ตัวอย่างที่ต้องการ

(2) ความเข้มข้นของเซลล์ในน้ำหมักได้ถูกวัดโดยใช้เครื่องวัดความเข้มของการดูดกลืนแสง หรือ spectrophotometer (UV-vis Spectrometer) ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร โดยตัวอย่างน้ำหมัก จะ ถูกนำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 12000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำส่วนที่เป็นอาหารเหลว (Supernatant) ที่ไป ก่อนที่จะเติมฟอสเฟตบัพเฟอร์ให้มีปริมาตรเท่าเดิม และ ทำการเจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม และ เปลี่ยนเป็นความเข้มข้นของเซลล์ (Dry Cell Weight, DCW)

กราฟมาตรฐาน (standard calibration curve) สามารถสร้างได้โดยทำการกรองแบคทีเรียที่ ความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผ่านกระดาษกรองขนาดรูพรุน 13 มิลลิเมตร, 0.2 ไมโครเมตร (Whatman, England) ร่วมกับการใช้สุญญากาศดูดออก และนำกระดาษกรองที่มีเซลล์ติดอยู่ไปอบเพื่อ ระเหยน้ำออกที่อุณหภูมิ ที่ผ่านการอบให้แห้ง และ ชั่งน้ำหนักมาแล้ว จากนั้นนำกระดาษกรองดังกล่าวไป อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานของการวัดความเข้มข้น ของเซลล์อยู่ที่ \pm ร้อยละ 5 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

(3) การวิเคราะห์กรดอินทรีย์ชนิดต่างๆที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักกรดซัคซินิคและผลพลอยได้ อื่นๆ โดยที่ตัวอย่างน้ำหมักจะถูกกรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.2 ไมครอนเพื่อกำจัดเซลล์แบคทีเรีย ก่อนที่ จะทำการวิเคราะห์ ส่วนตัวอย่างในด้านตัวทำละลายอินทรีย์จะถูกฉีดเข้าเครื่องวิเคราะห์โดยตรง ซึ่งการ วิเคราะห์เชิงปริมาณของสารตัวอย่าง ได้ด้วยเครื่อง HPLC ที่ใช้ detector เป็น UV และ RI-detectors คอลัมน์ที่ใช้แยกสารจะเป็นประเภท ion exchange column (ZORBAX SB-Aq (4.6 mm×150 mm)column) และถูกวิเคราะห์ด้วย UV ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร จากนั้นทำ การคำนวณ ปริมาณของกรดซัคซินิคเปรียบเทียบกับพื้นที่ใต้กราฟของสารละลายตัวอย่างมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ใช้อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และมี 1% acetonitrile + 99% 20 mL⁻¹ Na₂HPO₄ ที่ pH 2.0 โดยใช้อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) เพื่อเป็นตัวนำพาตัวอย่างเข้าสู่คอลัมน์เกิดการแยกสาร ที่อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นเวลา 40 นาที ซึ่งผลที่ได้สามารถ นำมาใช้หาค่าผลได้ (yield) อัตราผลผลิตของกรดแลกติก (productivity) และชีวมวล (biomass) สำหรับค่าการเจริญจำเพาะ (μ) สามารถหาได้จากสูตร $1/X \cdot dX/dt$ โดยที่ X คือความเข้มข้นของเซลล์ และ t คือเวลา

(4) ความเข้มข้นของโปรตีนประมาณโดยใช้ Bradford (Bradford. 1976) โดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร (Thermo Scientific, GENESYS 10S UV-Vis) (Gerberding. 2012)

(5) ไอออนต่างๆสามารถหาได้โดยใช้เครื่อง Dionex ion chromatograph system (ICS 5000, Thermo Scientific, USA) ใช้ detector แบบ CD20 conductivity detector

(6) ค่าของแข็งที่ละลายได้หาได้โดยใช้ hand held refractometer

(7) นาโนฟิลเตรชัน จะหาประสิทธิภาพของการกรองได้จากค่าฟลักซ์ ($\text{kg/m}^2\cdot\text{h}$) และค่า rejection โดยทำการทดลองที่สภาวะต่าง ๆ เช่น ความดัน, ความเข้มข้นของสารป้อนของทั้งระบบ สารละลายสังเคราะห์และน้ำหมักจริงเป็นต้น

ค่า recovery rate และค่าความบริสุทธิ์ของกรดซัคซินิคสามารถคำนวณได้โดย (Wong, Bund, Connelly, & Hartel, 2012):

$$\text{Recovery rate (\%)} = \frac{\text{Experimental yield (g)}}{\text{Initial mass of succinic acid in the broth (at } t=0\text{)(g)+seed mass (g)}} \times 100\%$$

$$\text{Purity (\%)} = \frac{\text{Dry weight of succinic acid in crystals recovered (g)}}{\text{Dry weight of crystals recovered (g)}} \times 100\%$$

สำหรับค่า removal rate ของกลูโคสและโปรตีนหาได้จาก (Sun *et al.*, 2014)

$$D_{G/P} = \left(1 - \frac{M_T}{M_W}\right) \times 100\%$$

โดยที่ $D_{G/P}$ คือ ค่า removal rate ของกลูโคสหรือโปรตีน (%)

M_T คือ มวลของกลูโคสหรือโปรตีนในส่วน top phase หรือที่ยังคงเหลือหลังจากเกิดคริสตัลแล้ว

M_W คือ มวลของกลูโคสหรือโปรตีนทั้งหมดในน้ำหมักก่อนที่จะตกผลึก (g)

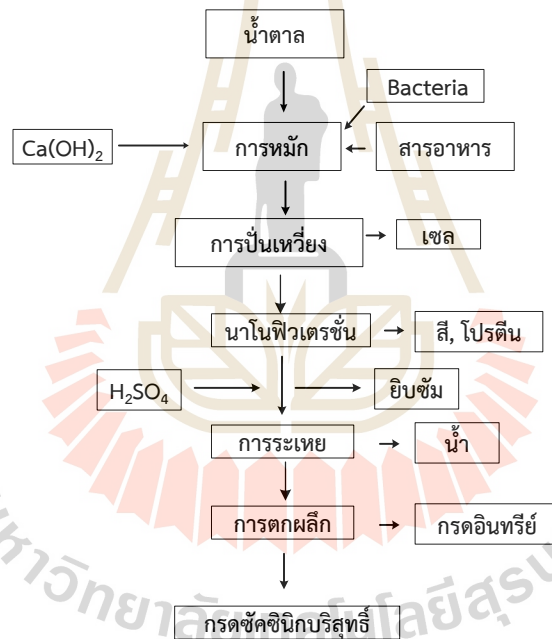
สีของผลึกกรดซัคซินิคหาได้โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร (Thermo Scientific, GENESYS 10S UV-Vis) (Gerberding, 2012) ขนาดของผลึกวัดโดยเครื่อง particle size distribution analyzer LA-950V2 ลักษณะของผลึกที่ได้ดูด้วยเครื่อง Stereoscopic Light Microscope Olympus szx7 โดยมีกล้อง Olympus SC100 camera ที่กำลังขยาย 12.5 x magnification คุณสมบัติของผลึกที่ผลิตได้สามารถดูได้ด้วยเครื่อง D2 phaser X-ray diffractometer (XRD) ร่วมกับ $\text{CuK}\alpha$ diffraction ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$) ที่ 30 kV และ 10 mA ผ่าน graphite monochromator ลักษณะการตกผลึกวิเคราะห์ด้วย X-ray diffraction โดยใช้ที่ 20.0° , 25.5° และ 31.5° ตามลำดับ ทั้งนี้โอกาสที่จะเกิดการตกผลึกมากที่สุดสามารถคำนวณได้จาก (P. Emrani, Fatemi, & Ashraf Talesh, 2011)

$$\text{(\% relative crystallinity)} = \frac{\text{(total area of crystalline peaks)}}{\text{(total area of crystalline peaks for the highest crystallinity sample)}}$$

บทที่ 3 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

3.1 กระบวนการหมักกรดซัคซินิคแบบกะ

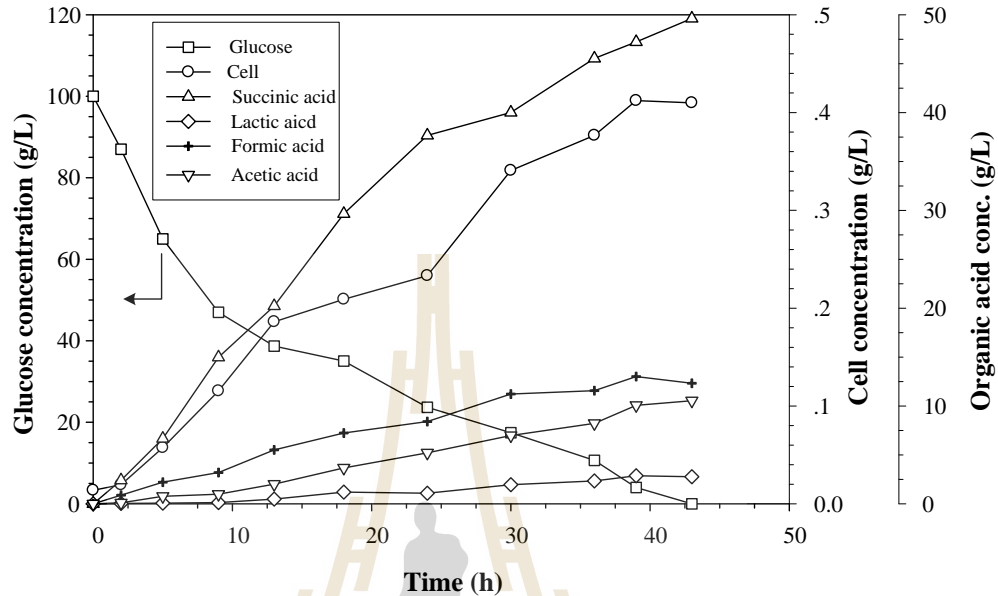
รูปภาพ 10 เป็นการสรุปขั้นตอนต่าง ๆ ของกระบวนการหมักและการทำบริสุทธิ์กรดซัคซินิคสำหรับโครงการวิจัยนี้ ซึ่งในขั้นแรกจะเป็นการกำจัดเซลล์แบคทีเรียออกโดยใช้การปั่นเหวี่ยง (centrifugation) จากนั้นจะทำการใช้ระบบนาโนฟิวเตรชันทำการแยกสารสีและสาร macromolecules อื่น ๆ โดยเฉพาะโปรตีนออกไป จากนั้นจะทำการปรับค่าความเป็นกรดต่างด้วยกรดซัลฟูริกเพื่อให้กรดซัคซินิคอิสระแยกตัวออกมาและเกิดเป็นตะกอนของแคลเซียมซัลเฟต (CaSO_4) หรือยิบซั่ม สารละลายกรดซัคซินิคที่ได้นี้ จะถูกระเหยน้ำจนมีความเข้มข้นสูงขึ้น ก่อนที่จะทำการตกผลึกเพื่อให้ได้กรดซัคซินิคบริสุทธิ์ต่อไป ส่วนกรดอินทรีย์ชนิดอื่นจะไม่สามารถตกผลึกได้ และจะละลายอยู่ใน mother liquor และจะถูกกำจัดทิ้งไปในที่สุด



รูปภาพ 10 กระบวนการทำบริสุทธิ์กรดซัคซินิคจากน้ำหมักโดยนาโนฟิวเตรชันและการตกผลึก

รูปภาพ 11 แสดงระยะเวลาในการเจริญของเซลล์ ปริมาณการใช้กลูโคสและความเข้มข้นของกรดอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ในระหว่างการหมักของ *A. succinogenes* ATCC 55618 ซึ่งจากการวิเคราะห์ตัวอย่างด้วย HPLC นั้นจะพบว่า ถึงแม้ว่ากรดซัคซินิคจะเป็นผลผลิตหลักแต่เชื่อดังกล่าวก็ยังมีกรดอะซิติก กรดฟอร์มิก และกรดแลคติก เป็นผลพลอยได้ของกระบวนการหมัก ความเข้มข้นของกลูโคสลดลงอย่างรวดเร็วใน 10 ชั่วโมงแรก จากนั้นความเข้มข้นค่อยๆ ลดลงจนกระทั่งกลูโคสถูกใช้หมดภายในเวลา 43 ชั่วโมง เชื้อมีการเจริญแบบ lag phase ในช่วง 5 ชั่วโมงแรก ตามด้วยการเจริญแบบ exponential

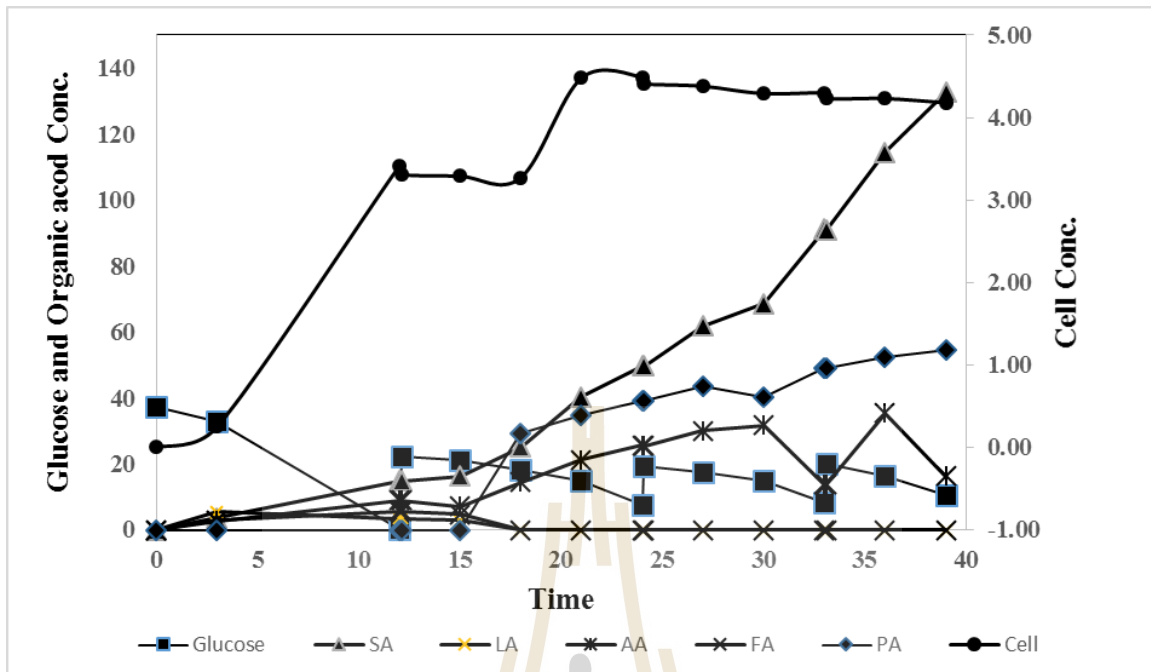
เซลล์เจริญได้สูงสุด 0.41 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของกรดซัคซินิคสูงสุดที่ผลิตได้คือคือ 47.2 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่าผลผลิต 0.56 gSA/gglucose นอกจากนี้ผลผลิตสุดท้ายของผลิตภัณฑ์กรดอะซิติก กรดฟอร์มิก และ กรดแลคติก คือ 12.3, 2.7 และ 10.5 กรัมต่อลิตรตามลำดับ



รูปภาพ 11 กราฟแสดงความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้นของเซลล์และความเข้มข้นของกรดอินทรีย์ต่างๆ ในระหว่างการหมักกรดซัคซินิคด้วยเชื้อ *A. succinogenes* ATCC 55618

3.2 การหมักกรดซัคซินิคแบบกึ่งกะ

ระยะเวลาในการเจริญของเซลล์ ปริมาณการใช้กลูโคสในระหว่างการหมักของ *A. succinogenes* ATCC 55618 แสดงดังรูปภาพ 12 ถึงแม้ว่ากรดซัคซินิคจะเป็นผลผลิตหลักแต่เชื้อก็ยังผลิตกรดอะซิติก กรดฟอร์มิก และกรดแลคติก เป็นผลพลอยได้ของกระบวนการ ความเข้มข้นของกลูโคสลดลงอย่างรวดเร็วใน 10 ชั่วโมงแรก จากนั้นนักวิจัยได้ทำการเติมน้ำเชื่อมเข้มข้นลงไปเพิ่มเติมจนได้ความเข้มข้นของน้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร ซึ่งการควบคุมปริมาณน้ำตาลในถังหมักให้มีค่าต่ำอยู่เสมอ นั้น จะส่งผลดีต่อกระบวนการหมักคือความดันออสโมติกของน้ำหมักจะต่ำ ทำให้ไม่เกิดการยับยั้งจากสารตั้งต้น lag time จะไม่เกิด และจะทำการเติมน้ำเชื่อมเข้มข้นอีกเมื่อปริมาณของน้ำตาลในระบบหมดลง และเมื่อทำการเติมเรื่อย ๆ พบว่ากลูโคสถูกใช้หมดภายในเวลา 40 ชั่วโมง เชื้อมีการเจริญแบบ lag phase ในช่วง 3 ชั่วโมงแรก ตามด้วยการเจริญแบบ exponential เซลล์เจริญได้สูงสุด 4.3 g/L ผลผลิตกรดซัคซินิคสูงสุดคือ 130.4 g/L คิดเป็น 0.62 gSA/gglucose แสดงให้เห็นว่าผลการทดลองให้ค่าที่ดีกว่าแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ นอกจากนี้ผลผลิตสุดท้ายของการหมัก กรดแลคติก กรดอะซิติก กรดฟอร์มิก และไพรูวิก คือ 2.3 g/L, 16.7 g/L, 1.22 และ 50.5 g/L ตามลำดับ รูปภาพ 12 แสดงการการเจริญของเซลล์ การใช้กลูโคส และการเกิดผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ในระหว่างการหมักแบบกึ่งกะ



รูปภาพ 12 แสดงการการเจริญของเซลล์ การใช้กลูโคส และการเกิดผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ในระหว่างการหมักแบบกึ่งกะ

3.3 การทำบริสุทธิ์กรดซัคซินิคจากกระบวนการหมักด้วยการศึกษาการแยกเซลล์แบคทีเรียโดยไมโครฟิลเตรชัน

เมื่อกระบวนการหมักเสร็จสิ้นลงแล้ว น้ำหมักจะถูกทำบริสุทธิ์ในขั้นแรกโดยการแยกเซลล์ออกก่อน ทั้งนี้เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการหมัก ในน้ำหมักนั้นจะยังคงมีสารปนเปื้อนต่าง ๆ มากมาย เช่นเซลล์แบคทีเรียกรดแล็กติก สารโมเลกุลใหญ่อื่น ๆ จำพวก polysaccharide โปรตีน คอลลอยด์ รวมถึงสารโมเลกุลเล็ก ๆ เช่นอามอนิอัมต่าง ๆ และเกลือต่าง ๆ ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์หลักของกระบวนการ ในการทดลองนี้จะใช้ระบบการแยกด้วยเมมเบรนคือ ไมโครฟิลเตรชัน (microfiltration) ในการแยกเซลล์แบคทีเรีย โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีลักษณะเป็นสารละลายกรดแล็กติกที่มีลักษณะใส ในโครงการวิจัยนี้ได้ใช้ไมโครฟิลเตรชันเมมเบรนชนิดที่เป็นท่อม้วน (Spiral wound) มีขนาดของพื้นที่เมมเบรนเท่ากับ 12 ตารางเมตร ชื้อจากบริษัท Synder Filtration, USA และมีการใช้ปั๊มในการไหลเวียนน้ำหมักในแบบไหลตามขวาง (cross-flow microfiltration) โดยจะทำการไหลเวียนส่วน retentate หรือส่วน concentrate กลับเข้าสู่ถังป้อน ส่วนกรองหรือ permeate จะทำการแยกออกไปจากระบบ (รูปภาพ 13)



รูปภาพ 13 ระบบไมโครฟิลเตรชันและนาโนฟิลเตรชันสำหรับการแยกเซลล์แบคทีเรียและโปรตีนที่ใช้ในโครงการวิจัยนี้

น้ำหมักกรดซัคซินิค น้ำหมักจากกระบวนการหมักข้างต้นถูกนำมาใช้เป็นสารป้อน เยื่อแผ่นชนิดนาโนฟิลเตรชัน (NF) และ microfiltration (MF) ที่เป็นเมมเบรนโมเลกุลของสารอินทรีย์ที่ไม่มีประจุ สั่งซื้อจากบริษัท LPE ประเทศไทย ลักษณะของเมมเบรนแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน เมมเบรนเหล่านี้ถูกใช้สำหรับการกำจัดสารประกอบที่ไม่ต้องการออก สำหรับการศึกษาด้านไมโครฟิลเตรชัน (MF) และ นาโนฟิลเตรชัน (NF) นั้นประกอบด้วย housing ที่เป็นสแตนเลสที่มีถึงรับสองถึง เริ่มจากไมโครฟิลเตรชัน จากนั้นจะเข้าสู่ นาโนฟิลเตรชัน กระบวนการ นาโนฟิลเตรชันนี้ดำเนินการโดยสองส่วนที่แตกต่างกันคือส่วนที่มีความเข้มข้นและส่วนของ diafiltration เพื่อเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ สำหรับโหมดความเข้มข้น (concentration side) นั้น permeate จะถูกแยกออกอย่างต่อเนื่องเพื่อหาค่า ประสิทธิภาพการกำจัด หรือ flux rejection โดยเฉพาะโปรตีนและไอออนต่างๆ ประสิทธิภาพการกำจัด เมื่อฟลักซ์มีค่าต่ำ ส่วน diafiltration จะเริ่มขึ้น และดำเนินการไปเรื่อยๆจนกว่าจะมีความเข้มข้นของกรดซัคซินิคในส่วนของ retentate ต่ำกว่า 2.0 กรัมต่อลิตร ในขั้นตอนนี้ปริมาณของสารป้อนจะควบคุมให้คงที่โดยการเติมน้ำ DI (pH 3.0 ปรับได้โดย H_2SO_4) เพื่อเพิ่มปริมาณในส่วนของ permeate นอกจากนั้นยังมีการทดสอบการแยกสารอินทรีย์อื่นๆโดยจะทำให้ตัวอย่างที่ต้องการใสและบริสุทธิ์ขึ้นได้ ค่าฟลักซ์ของการทดลอง จะทำการศึกษาจากค่าเฉลี่ยของการทดลองสามซ้ำ การปฏิเสธหรือการกำจัด (rejection) (R%) สามารถคำนวณได้ดังนี้

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

โดยที่ CP และ CR คือความเข้มข้นของ permeate และ retentate stream ที่ได้จากระบวนการนาฟิเลตชั่น ขั้นตอนการทำความสะอาดเมมเบรนในการทดลองนี้โดยใช้น้ำ DI, NaOH 2% และ 2% H₃PO₄ จากนั้นทำการวิเคราะห์การเกิด fouling ที่เป็นสาเหตุทำให้เมมเบรนประสิทธิภาพในการที่สารละลายจะผ่านได้ผ่านต่ำลง ทั้งนี้สามารถหาได้จากสูตรของ Darcy's law (Al-Amoudi and Lovitt. 2007)

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

โดยที่ RNF คือ ความต้านทานการกรอง(m-1), R_m เป็นเมมเบรนต้านทานไฮดรอลิก, R_f คือความต้านทานเนื่องจากคราบและ การปิดกั้นการดูดซับ, R_c คือความต้านทานทำให้เกิดจากการก่อตัวเค้ก, J คือ permeate flux (m³/m².h), TMP คือแรงดันทรานส์เมมเบรน (Pa) และ μ คือความหนืดของการซึมผ่านที่ (Pa.s) อัตราส่วนปริมาณความเข้มข้น(VCR) สามารถคำนวณได้จาก อัตราส่วนของ V₀ ปริมาณเริ่มต้นหารด้วยปริมาณ V_R retantate ในเวลาที่แน่นอน

$$VCR = \frac{V_0}{V_R}$$

สำหรับอัตราการกำจัดคำนวณดังนี้

$$D = \left(1 - \frac{M_F}{M_P}\right) \times 100\%$$

โดยที่:

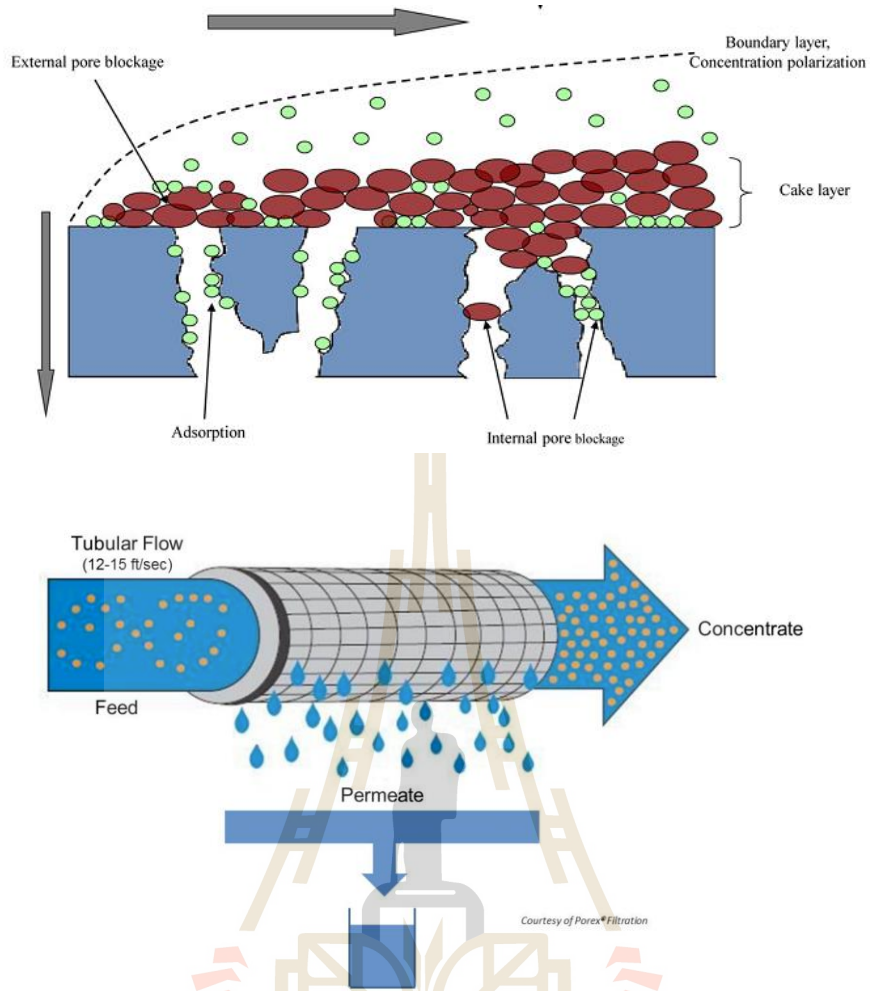
DG/P คือ กลูโคสหรือโปรตีนในอัตราการถูกกำจัดออก (%)

MF คือ มวลของสารประกอบใน feed phase (g)

MP คือ มวลของสารประกอบใน permeate phase (g)

ตาราง 3 คุณลักษณะของเยื่อแผ่นเมมเบรนไมโครฟิลเตชั่น

ชนิด	การจำกัด	ความเร็วตรง (เมตรต่อ วินาที)	พื้นที่ผิว (ตาราง เมตร)	อุณหภูมิ (องศา เซลเซียส)	ความดัน (psi)	pH
ไมโคร ฟิลเตชั่น						



รูปภาพ 14 แสดงหลักการทำงานของระบบไมโครฟิลเตรชัน

เพื่อที่จะทำการศึกษถึงระบบการทำงานของไมโครฟิลเตรชันในเชิงลึก ในที่นี้จึงจำเป็นที่จะต้องใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ (mathematical modeling) มาช่วยในการวิเคราะห์ ซึ่งแบบจำลองนี้เรียกว่า resistance-in-series model ดังที่ได้แสดงในรูปภาพ 14 จะเห็นได้ว่าเมมเบรนไมโครฟิลเตรชันนี้จะมีรูพรุนที่มีขนาดเล็กกว่าเชื้อแบคทีเรีย แต่อย่างไรก็ตามการก็จะยังมีสิ่งที่มีขนาดเล็กอื่น ๆ ที่อาจจะเข้าไปดูดซับ (adsorption) หรืออุดตันภายในรูของเมมเบรนก็ได้ ซึ่งจะเรียกการอุดตันในแบบนี้ว่าการอุดตันภายใน (internal pore blockage) โดยที่การอุดตันแบบนี้จะเกิดขึ้นในช่วงแรก ๆ ของกระบวนการกรอง ในขณะที่เดียวกันก็จะเกิดการอุดตันสะสมบริเวณพื้นผิวของเมมเบรนอันเนื่องมาจากเกิดการสะสมตัวของเซลล์แบคทีเรียเรียกว่าการอุดตันภายนอก (external pore blockage) โดยการสะสมตัวของเซลล์แบคทีเรียภายนอกนี้ จะมีความหนาของชั้นเค้ก (cake layer) เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ โดยเฉพาะหากมีการไหลเวียนของเหลวในอัตราที่ต่ำ จะทำให้เกิดการไหลแบบชั้น (laminar flow) ก็จะทำให้ชั้นเค้กมีความหนาเพิ่มมากขึ้น ค่าฟลักซ์ของน้ำก็จะลดลง ซึ่งสามารถแก้ไขได้โดยการเพิ่มอัตราการไหลของของเหลวให้

สูงขึ้นเป็นแบบปั่นป่วน (turbulent) เกิดน้ำวน (eddies) ที่จะทำให้การสะสมตัวของชั้นเค้กลดลง กล่าวโดยรวมแล้ว ปัจจัยต่าง ๆ ที่จะทำให้ฟลักซ์หรืออัตราการไหลผ่านเมมเบรนลดลงนั้น จะเกิดขึ้นจากแรงต้าน (resistance) หลัก ๆ อยู่ 4 ตัว ได้แก่ แรงต้านทานจากตัวของเมมเบรนเอง (membrane resistance, R_m) แรงต้านทานที่เกิดขึ้นจากการดูดซับภายในรูของเมมเบรน (Adsorption resistance, R_a) แรงต้านทานที่เกิดขึ้นจากการสะสมตัวของชั้นเค้ก (Cake resistance, R_c) และแรงต้านทานที่เกิดขึ้นจากเกิดโพลาไรเซชัน (Solute concentration polarization, R_p) ซึ่งแรงต้านแบบนี้จะเกิดขึ้นเมื่อทำการกรองไปนาน ๆ ส่วนของสารป้อนจะมีความเข้มข้นของส่วนที่ละลายได้ soluble matter สูงมากขึ้นเรื่อย ๆ จนกระทั่งทำให้สมบัติของของไหลโดยเฉพาะความหนืดเพิ่มขึ้น (increasing in bulk viscosity) และเปลี่ยนไปเป็นแบบ non-newtonian ซึ่ง R_p นี้จะมีอิทธิพลเป็นอย่างมากเมื่อค่าสัดส่วนความเข้มข้นเชิงปริมาตร (Volumetric Concentration Ratio, VCR) สูงขึ้นมาก ซึ่งค่านี้หาได้จากปริมาตรของสารป้อนเริ่มต้นหารด้วยผลต่างของปริมาตรของสารป้อนเริ่มต้นต่อปริมาตรของเพอร์มิเอท (Feed volume/(Feed volume-permeate volume) โดยเป็นที่น่าสังเกตว่า ค่าฟลักซ์สูงสุดของระบบไมโครฟิลเตรชันนี้จะเกิดขึ้นเมื่อไม่มีความต้านทานหรือสิ่งปนเปื้อนใด ๆ อยู่บนเมมเบรนนั้น ซึ่งค่าฟลักซ์สูงสุดจะเกิดขึ้นเมื่อทำการทดสอบระบบตอนเริ่มแรกเสมอ และความต้านทานในช่วงนี้ก็จะหมายถึงความต้านทานที่เกิดขึ้นจากเมมเบรนเท่านั้น (R_m)

ในโครงการวิจัยนี้ได้ทำการทดลองหาค่า R_m จากการทดสอบการกรองโดยใช้น้ำสะอาดและทำการวัดค่าฟลักซ์ (J_w) ของระบบ ณ ความแตกต่างของความดัน (Transmembrane pressure, Δp) ต่าง ๆ กัน ซึ่งโดยหลักการแล้ว การเพิ่มค่าความแตกต่างของความดันจะส่งผลทำให้ค่าฟลักซ์ของระบบเพิ่มสูงขึ้น และความสัมพันธ์ระหว่างสมบัติต่าง ๆ ของระบบที่มีต่อค่าฟลักซ์เป็นไปตามกฎของดาร์ซี (Darcy's law) ดังสมการ

$$J_w = \frac{\Delta p}{\mu(R_t)}$$

โดยที่ J_w คือค่าฟลักซ์ของระบบ

μ คือความหนืดของน้ำหมัก

R_t คือ ค่าความต้านทานโดยรวม และ R_t จะมีค่าเท่ากับ R_m เมื่อเริ่มต้นระบบ

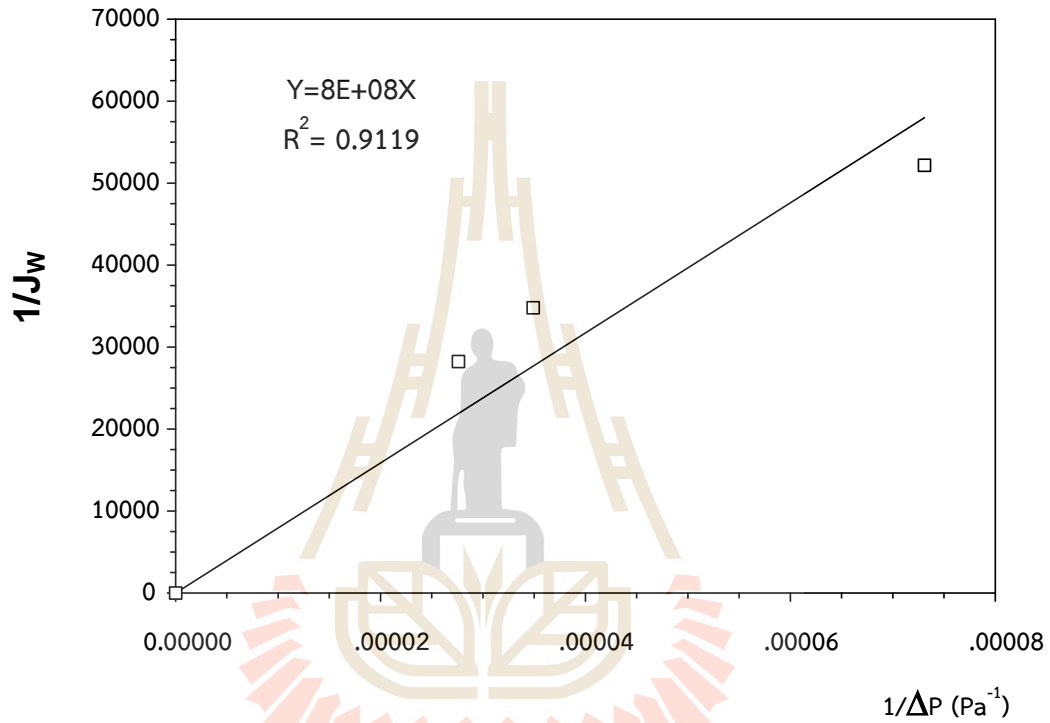
และ Δp คือความแตกต่างของความดัน ซึ่งหาได้จาก

$$\Delta p = \frac{P_1 + P_2}{2} - P_3$$

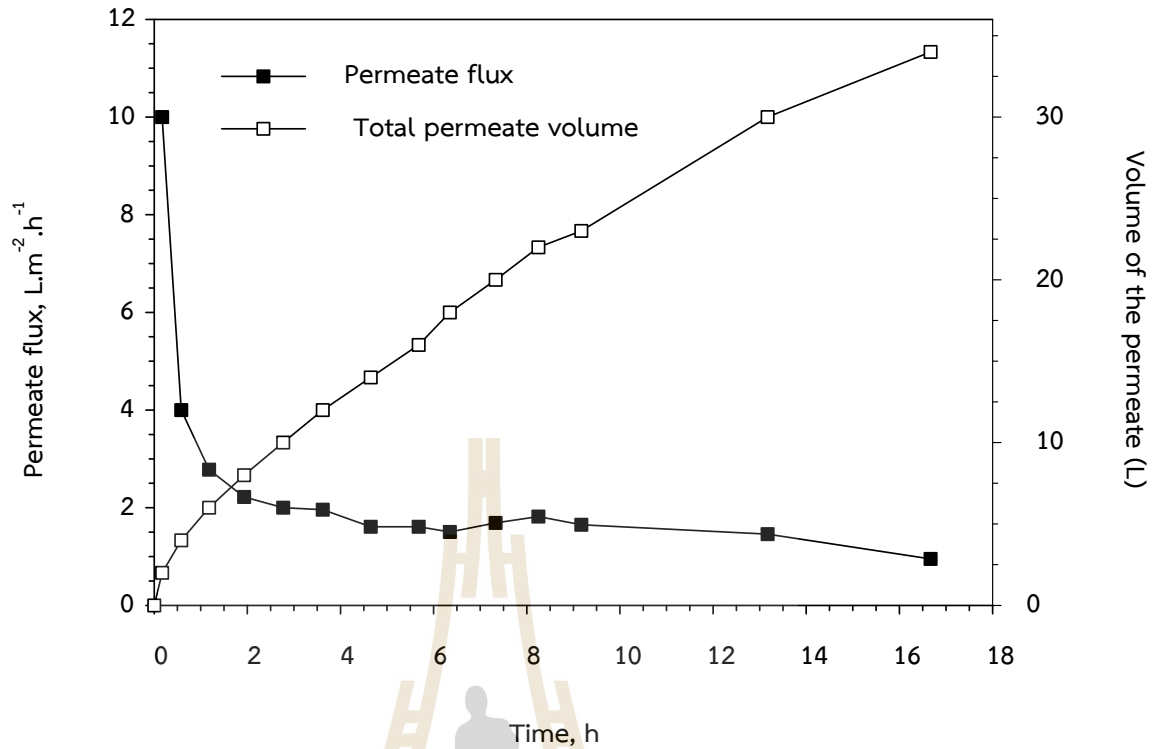
โดย P_1 หมายถึงความดันในด้านของสารป้อน P_2 หมายถึงความดันในด้านของรีเทนเนต และ P_3 หมายถึงความดันในด้านของเพอร์มิเอท ตามลำดับ

ตาราง 4 ผลการทดลองอิทธิพลของความแตกต่างของความดันต่อค่าฟลักซ์ของน้ำ

ความแตกต่างของความดัน (Pascal)	ค่าฟลักซ์ของน้ำ ($\text{m}^3 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)
0	0
36175	3.54×10^{-5}
28675	2.88×10^{-5}
13675	1.92×10^{-5}



รูปภาพ 15 กราฟแสดงการคำนวณหาค่าความต้านทานที่เกิดขึ้นจากเมมเบรน $R_m = 1.02 \times 10^{12} \text{ m}^{-1}$



รูปภาพ 16 การลดลงของฟลักซ์เมื่อเวลาผ่านไปและปริมาตรสะสมของเพอร์มิเอทที่ได้

รูปภาพ 16 การลดลงของฟลักซ์เมื่อเวลาผ่านไปและปริมาตรสะสมของเพอร์มิเอทที่ได้ ซึ่งในระหว่างที่ทำการทดลองระบบไมโครฟิลเตรชันอยู่นั้น เพอร์มิเอทจะถูกแยกออกจากระบบอยู่ตลอดเวลา ซึ่งจะเรียกว่า concentration mode ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในสารป้อน เนื่องจากเซลล์แบคทีเรียจะมีความเข้มข้นมากขึ้น ในขณะที่ปริมาตรของสารป้อนจะลดลงอยู่ตลอดเวลา และจากการที่มีความเข้มข้นของเซลล์แบคทีเรียที่มากขึ้นนี้ ก็จะเกิดการอุดตันหรือ fouling ในแบบต่าง ๆ ดังที่ได้กล่าวมาแล้วในข้างต้น ทั้งจากการอุดตันภายในรูเมมเบรน การเกิดชั้นเค้กบนผิวหน้าของเมมเบรน รวมทั้งการเกิดโฟลราไรเซชันภายในชั้นขอบเขต (boundary layer) ซึ่งแรงต้านทานทั้งหมดนี้ จะส่งผลโดยตรงทำให้ค่าฟลักซ์ของส่วนกรองหรือเพอร์มิเอทลดลงอยู่ตลอดเวลา ซึ่งสมการที่ (1) สามารถเขียนใหม่ได้ดังนี้

$$Jw = \frac{\Delta p}{\mu(R_m + R_a + R_p + R_c)}$$

โดยในที่นี้ R_t ก็จะมีค่าเท่ากับ $R_m + R_a + R_p + R_c$ นั่นเอง สำหรับการวิเคราะห์ค่าความต้านทานต่าง ๆ นั้น จำเป็นที่จะต้องใช้จากการคำนวณฟลักซ์ที่ลดลง (decline flux) ซึ่งได้จากการทดลองดังแสดงในรูปภาพ

16

ค่าความต้านทานที่เกิดจากการอุดตัน R_a สามารถหาได้จากสมการ

$$R_a = R_{a,ss}(1 - e^{-bt})$$

โดยที่ $R_{a,ss}$ หมายถึงแรงต้านทานที่เกิดจากการดูดซับภายในของรูพรุนในสถานะ steady state ส่วนค่า b เป็นค่าคงที่และ t คือเวลา ตามลำดับ นอกจากนี้แล้วค่าแรงต้านทานที่เกิดขึ้นจากการสะสมตัวของชั้นเค้ก (R_c) สามารถคำนวณได้จากสมการ

$$R_c = \frac{m}{A} \alpha_0$$

โดยที่ m คือ มวลของเชื้อแบคทีเรียที่สะสมอยู่บนเมมเบรน A คือพื้นที่ผิวของเมมเบรน ส่วนค่า α_0 คือค่าแรงต้านทานจำเพาะของชั้นเค้ก (Specific cake resistance) ซึ่งค่านี้เป็นค่าที่ขึ้นอยู่กับความต่างของแรงดันตั้งสมการ

$$\alpha_0 = \alpha \Delta P^n$$

โดยที่ค่า n นั้นจะหมายถึง ดรรชนีของความสามารถในการอัดตัว (compressibility index) และค่า α นั้นจะเป็นค่าคงที่ซึ่งขึ้นอยู่กับรูปร่างของแบคทีเรียเป็นสำคัญ ส่วนมวลของเซลล์แบคทีเรียที่สะสมอยู่บนพื้นผิวของเมมเบรน สามารถคำนวณได้ตั้งสมการ

$$\frac{dm}{dt} = \left(JC - \frac{D}{\delta} C_m \right) A$$

โดยค่า C และ C_m นั้นจะหมายถึงความเข้มข้นของเซลล์แบคทีเรียในส่วนของรีเทนเนตและบนพื้นผิวหน้าของเมมเบรนตามลำดับ ส่วน δ แสดงถึงความหนาของชั้นเค้ก JC แสดงถึงการไหลไปในทิศทางเข้าหาเมมเบรน ส่วน $D(C_m)/\delta$ นั้นคือการแพร่ของของไหลในทิศทางตรงกันข้าม เนื่องจากขณะนี้ นักวิจัยกำลังอยู่ในขั้นตอนของการคำนวณแบบจำลองทางคณิตศาสตร์อยู่ โดยที่ผลการคำนวณจะนำเสนอในรายงานความก้าวหน้าครั้งต่อไป

3.4 การทำบริสุทธิ์น้ำหมักด้วยเทคนิคนาโนฟิลเตรชัน

3.4.1 การทดสอบระบบโดยใช้สารสังเคราะห์

3.4.1.1 อิทธิพลของสภาวะการทำงานต่าง ๆ ที่มีต่อค่าการกักกันของกรดอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ

วัตถุประสงค์หลักของการศึกษาครั้งนี้คือการศึกษาลักษณะการแยกของกรดอินทรีย์โดยใช้ NF อิทธิพลของปัจจัยในการดำเนินการแยกโดยใช้สารละลาย แสดงในรูปภาพ 23 ซึ่งเป็นการประยุกต์ใช้เมมเบรนนาโนฟิลเตรชันในแบบที่เป็นท่อม้วน (spiral wound) เช่นเดียวกับกับไมโครฟิลเตรชัน แต่แตกต่างกันที่ค่า molecular weight cut off ของเมมเบรนชนิดนี้จะอยู่ที่ 300 ดาลตัน ใช้ของบริษัท GE

ประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งในขั้นแรกนั้น จะเป็นการศึกษาการแยกสารละลายผสมของกรดชนิดอินทรีย์ต่างๆ และภายใต้อิทธิพลของสภาวะการทำงานต่าง ๆ กันด้วย

ตาราง 5 คุณลักษณะของเยื่อแผ่นเมมเบรนนาโนฟิลเตชั่น

ชนิด	การจำกัด	ความเร็วตรง (เมตรต่อ วินาที)	พื้นที่ผิว (ตาราง เมตร)	อุณหภูมิ (องศา เซลเซียส)	ความดัน (psi)	pH
นาโน ฟิลเตชั่น	150-300 ดอลตัน	98	6.1	10-15	15-600	0.3-9.0

หมายเหตุ: ได้จากค่าเฉลี่ยที่มีการทดลองเป็นเวลา 24 ชั่วโมง อัตราการไหลทุกๆ $\pm 25\%$

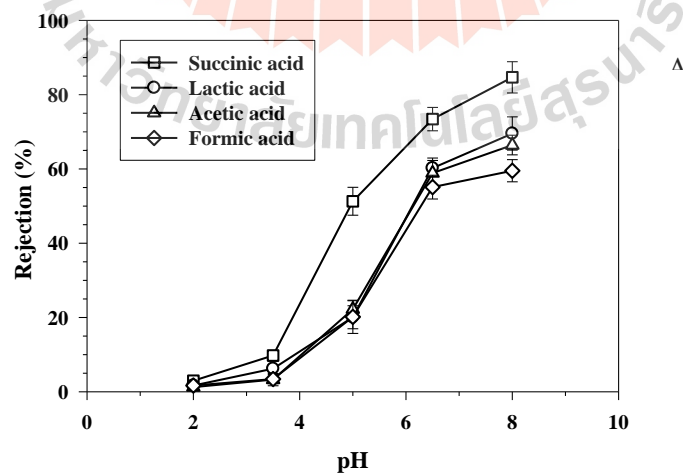
สภาวะการทดลองที่ 2,000 ppm, สารละลาย $MgSO_4$ ที่ความดัน 110 psi (760 kPa)
อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส, 15% recovery

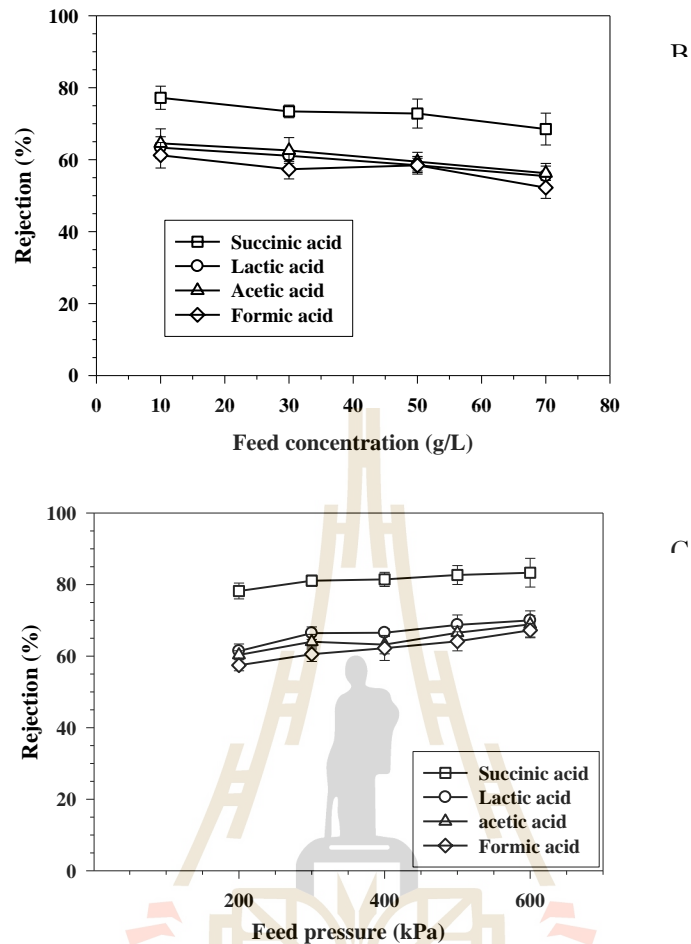
ผลของ pH ต่อการกักกันของ NF membrane โดยใช้สารละลายกรด ข้อมูลการทดลองการกักกันแสดงในรูปภาพ 17 กรดอินทรีย์แตกตัวเนื่องจาก pH ของสารละลายแสดงให้เห็นว่าการกักกันกรดแต่ละชนิดขึ้นอยู่กับ pH การกักกันของกรดที่ศึกษาส่วนใหญ่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อ pH สูงกว่าค่าคงที่การแตกตัว (pK_a) ในขณะที่ pH ลดลงต่ำกว่าค่าคงที่การแตกตัว กรดจะอยู่ในรูปไม่แตกตัว

ค่าการกักกัน (Rejection, R) หาได้จาก

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

โดยที่ C_P หมายถึงความเข้มข้นของตัวถูกละลายใน permeate และ C_R หมายถึงความเข้มข้นของตัวถูกละลายใน Retentate ตามลำดับ





รูปภาพ 17 อิทธิพลของสภาวะการทำงานต่าง ๆ ที่มีต่อค่าการกักกันของกรดอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ

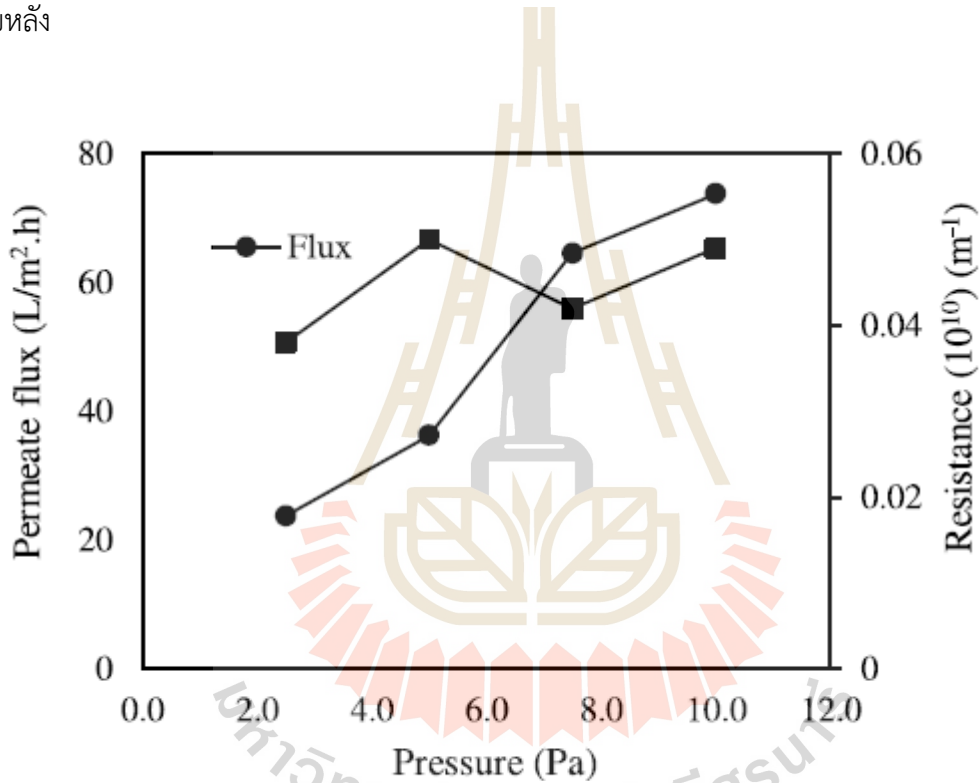
นอกจากนี้โดยทั่วไป NF membrane จะกักกัน monovalent ions ต่ำ แต่จะกักกัน multivalent ions สูง อย่างไรก็ตามการกักกัน divalent ions ขึ้นอยู่กับ pH ของสารละลาย ค่าคงที่การแตกตัวของกรดอะซิติก กรดฟอร์มิก และกรดแลคติก คือ 3.75, 4.76, และ 3.08 ตามลำดับ ในขณะที่ค่าคงที่การแตกตัวของกรดซักซินิกคือ 4.21 และ 5.64 ค่าการกักกันกรดซักซินิกคือ 2.96, 9.76, 51.28, 73.41, และ 84.66% ที่ pH 2.0, 3.5, 5.0, 6.5, และ 8.0 เมื่อค่าคงที่การแตกตัวของกรดซักซินิกอยู่ในช่วง 4.2–5.6 การสังเกตการเพิ่มการกักกันที่ pH สูงกว่า 5.5 อธิบายโดยเมมเบรนมีประจุส่งผลต่อ retention characteristic ที่ผิวหน้าเมมเบรนความหนาแน่นประจุมีความสัมพันธ์กับ zeta potential ของผิวหน้าเมมเบรน ค่า zeta potential ของเมมเบรนเซรามิกจะเป็นลบเมื่อ pH สูงขึ้นในช่วง 6-10 ในขณะที่ค่าจะเป็นบวกเมื่อ pH ต่ำกว่า isoelectric point ที่ pH ต่ำค่า zeta potential จะเป็นบวก แสดงให้เห็นว่าเมมเบรนมีประจุเป็นลบในช่วง pH นี้ ในทางตรงกันข้ามที่ pH ต่ำกว่า 4 ค่ากักกันของกรดซักซินิกลดลงมากกว่า 10 % แสดงให้เห็นว่า sieving effect มีบทบาทสำคัญต่อการกักกัน น้ำหนักโมเลกุลของกรดซักซินิก (118.09 g/mole) มีขนาดเล็กกว่า MWCO 300 ของเมมเบรนเซรามิก

นอกจากนี้ระดับการกักกันถูกกำหนดโดยน้ำหนักโมเลกุลโดยกรดอินทรีย์แต่ละชนิด ข้อมูลการทดลองแสดงให้เห็นว่าค่าการกักกันกรดอินทรีย์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อมีการเพิ่มขึ้นของขนาดโมเลกุล ที่ pH 3.5 ค่าการกักกันของกรดซัคซินิก กรดแลคติก กรดอะซิติก และกรดฟอเมิก คือ 9.26%, 6.22%, 3.41% และ 3.27% ตามลำดับ กรดฟอเมิกมีค่าการกักกันน้อยที่สุดเพราะขนาดโมเลกุลเล็กที่สุด การทดลองการกักกันของกรดแต่ละชนิดที่ความดัน feed และความเข้มข้น feed ต่างกัน เพื่อประเมินอิทธิพลของพารามิเตอร์ต่อค่าการกักกัน รูปภาพ 20 แสดงให้เห็นถึงอิทธิพลของความเข้มข้น feed ต่อการกักกันของเมมเบรน การทดลองจะใช้ความเข้มข้น feed เริ่มต้นที่ 10 ถึง 70 g/L สภาวะในการทดลองประกอบด้วยอุณหภูมิ feed 30 °C ความดัน 30 °C 400 kPa และ pH 6.5 พบว่าการเพิ่มความเข้มข้น feed ค่อยๆลดค่าการกักกันของกรด ค่าการกักกันของกรดซัคซินิกคือ 77.3%, 73.4%, 72.8% และ 68.5% และความเข้มข้น feed คือ 10, 30, 50, และ 70 กรัมต่อลิตร ผลคือการกักกันลดลง 11.3% ทุกช่วงการทดลอง ส่วนกรดอินทรีย์อื่นๆ ค่าการกักกันค่อยๆลดลง กรดอะซิติก กรดฟอเมิก และกรดแลคติก คือ 13.8%, 14.2% และ 12.9% ตามลำดับ พบว่าผลของความเข้มข้น feed ไม่มีผลต่อค่าการกักกันของเมมเบรน แต่ที่มีความสำคัญต่อการแยกของ NF คือ ความดัน feed เนื่องจากข้อจำกัดของอุปกรณ์ ความดัน feed สูงสุดคือ 600 kPa

รูปภาพ 17 แสดงให้เห็นถึงความดัน feed ต่อการกักกัน ความดัน feed ทดลองในช่วง 200 ถึง 600 kPa ในขณะที่ความเข้มข้น feed อุณหภูมิ และ pH อยู่ที่ 50 g/L, 30 °C และ 6.5 ตามลำดับ ค่าการกักกันของกรดซัคซินิกที่ความดัน feed คือ 200, 300, 400, 500 และ 600 kPa อยู่ที่ 78.2, 81.1, 81.5, 82.6 และ 83.3% ตามลำดับ ผลการทดลองชี้แนะว่าการเพิ่มขึ้นของความดัน feed ไม่มีผลต่อการกักกันของกรดซัคซินิก การกักกันสูงของกรดซัคซินิกอาจเป็นเพราะขนาดของโมเลกุลใหญ่กว่า MWCO ของเมมเบรน เนื่องจากการแตกตัว การกักกันของกรดแลคติก กรดอะซิติก และกรดฟอเมิก ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า MWCO ของเมมเบรน ค่อยๆเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่ม ความดัน feed ค่าการกักกันคือ 12.25%, 11.6%, และ 14.58% ของ กรดแลคติก กรดอะซิติก และกรดฟอเมิก สรุปว่าสภาวะที่มีผลต่อการกักกันของ NF membrane มากที่สุดคือ pH ของสารละลาย ผลของความดันและความเข้มข้น feed มีผลเล็กน้อยต่อการกักกัน นอกจากนี้การแยกของกรดซัคซินิกจากกรดอินทรีย์ตัวอื่นๆไม่ได้ผลเพราะกรดแต่ละตัวมีความคล้ายคลึงกันทางกายภาพและเคมี อันดับแรกคือกรดเหล่านี้สามารถแตกตัวที่ pH เดียวกัน อันดับสองคือน้ำหนักโมเลกุลไม่แตกต่างกันมาก น้ำหนักของกรดซัคซินิกประกอบด้วยสารโมเลกุลขนาดใหญ่ ชิ้นส่วนโปรตีน และโมเลกุลที่ให้สี การมีโปรตีนในน้ำหมักส่งผลให้มีปัญหาหาระหว่างการทำบริสุทธิ์ โดยเฉพาะการสร้างกรดอะมิโน ดังนั้นข้อดีของ NF คือการแยกสารโมเลกุลขนาดใหญ่ออกจากน้ำหมักก่อนการทำบริสุทธิ์ ผลคือกรดอินทรีย์สามารถซึมผ่าน permeate ส่วนโปรตีนและสารโมเลกุลขนาดใหญ่จะกลายเป็น retentate

3.4.1.2 ผลของ volumetric flux และการต้านทางของเมมเบรนในระบบ nanofiltration จากการทดลองด้วยตัวอย่างน้ำ DI

เริ่มจากการทดสอบระบบนาโนฟิลเตรชันโดยใช้น้ำ DI เพื่อหาค่าแรงต้านทานเมมเบรนไฮดรอลิก (membrane hydraulic resistance) โดยมีการปรับเปลี่ยนค่าความดันหลายๆค่าคือ ที่ 2.5, 5.0, 7.5 และ 10 Pa ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงดังรูปภาพ 18 เห็นได้ว่าค่า permeate flux ของน้ำ DI ไม่เพียงเพิ่มขึ้นเมื่อมีการเพิ่มความดัน แต่จะมีค่าเพิ่มขึ้นเรื่อยๆจึงได้ค่าสูงมากคือ 64.55 และ 73.77 L / m².h ณ สภาวะ 7.5 และ 10 Pa ตามลำดับ เนื่องจากว่าภายใต้แรงดันสูงก็จะช่วยเพิ่มการเคลื่อนไหวของ โมเลกุลของน้ำผ่านรูเมมเบรนโดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีที่มีความเข้มข้นของสารต่ำหรือไม่มีตัวถูกละลายใต ่ๆผสมอยู่เช่นเดียวกับน้ำ DI ที่เป็นตัวทดสอบ นอกจากนั้นเมมเบรนต้านทานไฮดรอลิกยังเพิ่มขึ้นตามการ เพิ่มขึ้นของความดัน แต่ที่ความดัน 7.5 อาจมีค่าลดลงเล็กน้อย (0.042 m⁻¹) หากเปรียบเทียบกับ 5 และ 10 Pa ที่มีค่า 0.05 และ 0.049 (m⁻¹) ตามลำดับ ดังนั้นดังกล่าวจึงใช้สำหรับการทดลองในหัวข้อต่อไป ภายหลัง

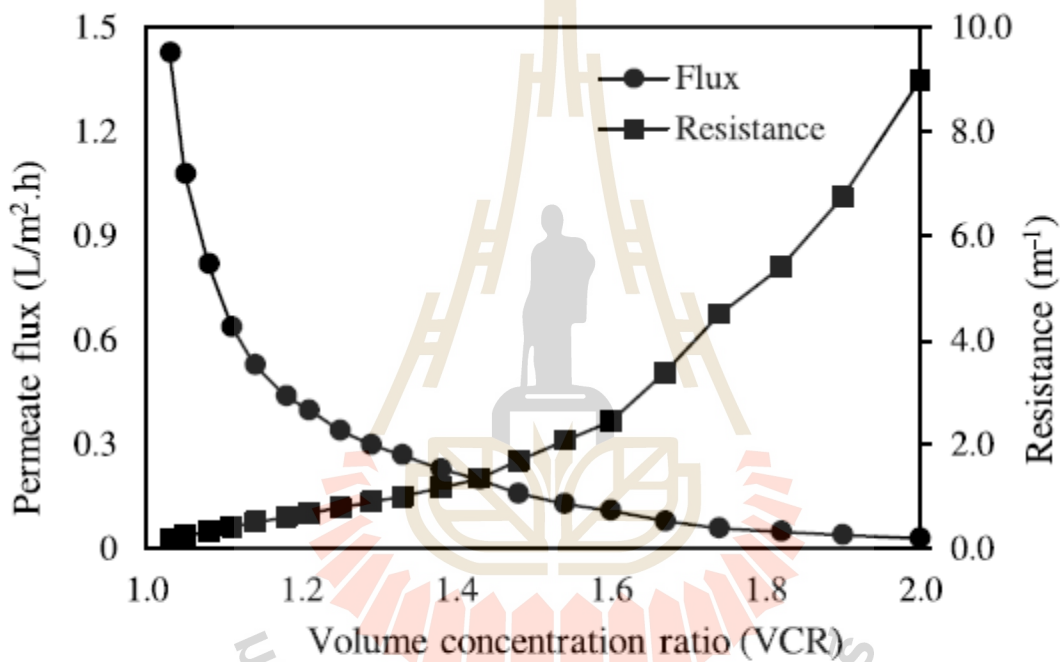


รูปภาพ 18 แสดง volumetric flux และการต้านทานของเมมเบรนในระบบ nanofiltration จากการทดลองด้วยตัวอย่างน้ำ DI ที่ความดันต่างๆ

3.4.2 การทดสอบระบบโดยใช้ตัวอย่างน้ำหมัก

หลังสิ้นสุดกระบวนการหมักน้ำหมักที่จะถูกแยกเซลล์ออกด้วยไมโครฟิลเตรชัน แต่ถึงแม้ว่าน้ำหมักที่ผ่านการแยกเซลล์ออกจะมีลักษณะใส่นั่น แต่ยังคงประกอบด้วยสารประกอบอื่นๆมากมาย เช่น โปรตีน โพลีแซคคาไรด์ โมเลกุลของสารสี ไอออนต่างๆ (MgSO₄) เป็นต้น จึงต้องมีกระบวนการแยกสารดังกล่าวออกโดยใช้เมมเบรนนาโนฟิลเตรชัน ที่มีการแปรผันค่า ปัจจัยต่างๆในระบบเพื่อให้ได้ประสิทธิภาพในการ

แยกที่ดีที่สุด กระบวนการแยกสารสังเคราะห์และน้ำหมักที่ได้แสดงดังรูปภาพ 19 ในการทดลองนี้จะดำเนินการโดยใช้สภาวะที่มีความดัน 7.5 Pa, pH 3.0 และอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส โดยหาค่าฟลักซ์และค่าการต้านของเมมเบรน ผลการทดลองพบว่าค่า permeate flux มีค่าลดลงตามระยะเวลาที่ลดลง แต่ VCR เพิ่มขึ้น สำหรับการศึกษานี้ด้วยน้ำ DI ค่า permeate flux เริ่มต้นที่ 1.43 L/m².h เมื่อทดลองไปจะมีค่าลดลงอย่างมาก ซึ่งอธิบายได้ว่าเกี่ยวข้องกับการมีโปรตีนอยู่ในสารละลายที่ทดสอบหรือไม่นั่นเอง นอกจากโปรตีนแล้วนั้น ยังมีสารที่เกี่ยวข้องหรือมีผลต่อค่าฟลักซ์ตัวที่ได้อีกหลายไป ยกตัวอย่างเช่น เซลล์แบคทีเรีย กรดนิวคลีอิก คาร์โบไฮเดรต ไขมัน ฯลฯ ส่วนประกอบเหล่านี้มีผลต่อค่าความหนืดของน้ำหมัก แต่สำหรับตัวอย่างที่นำมาทดสอบเป็นน้ำ DI จะไม่มีผลกระทบต่อค่าการต้านของเมมเบรน ดังนั้นจึงสามารถคาดการณ์ได้ว่าจากน้ำหมักจริงนั้นค่าการต้านของเมมเบรน (membrane resistance) จะเพิ่มขึ้นตามค่า VCR ที่เพิ่มขึ้นด้วย (แสดงดังรูปภาพ 19)



รูปภาพ 19 การหาค่า membrane resistance และค่าฟลักซ์ในการทดสอบการใช้น้ำหมักจริงในระบบนาโนฟิลเตชัน

ในตอนสุดท้ายของการทดลองนี้พบว่าค่า membrane resistance มีค่ามากที่สุดถึง 9×10^{-10} (m⁻¹) และมีการรวบรวม permeate ได้ถึง 20 ลิตร ถือได้ว่าเป็นค่า RNF หลังจาก concentration mode ในระบบนาโนฟิลเตชันนั่นเอง ส่วนค่า permeate flux จะมีค่าลดลง สอดคล้องกับการลดลง 98% จากค่า permeate flux เริ่มต้นเนื่องมาจากโมเลกุลอื่นๆที่เป็นพวก macromolecule ติดอยู่ที่พื้นผิวเมมเบรน

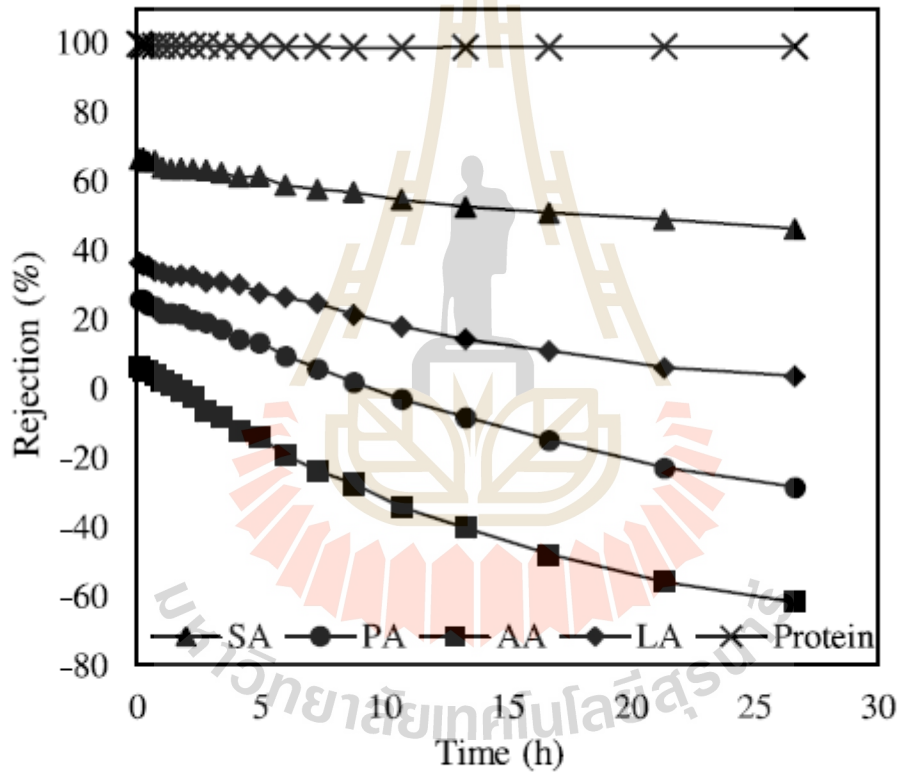
หลังจากการทดลองนี้เมมเบรนเริ่มมีการอุดตันเช่นเดียวกับผลการทดลองของวารสารอื่นๆที่ได้รายงานไว้ว่าจะมีการเกิดเป็นชั้นแค้ก เมมเบรนจะเกิดแรงต้านเพิ่มขึ้น (Choi *et al.*, 2008) เพื่อที่จะศึกษาการเกิด fouling ของเมมเบรนชนิดนาโนฟิลเตชันนี้ จะทำการศึกษาโดยตรงทำการล้างด้วยน้ำ จะ

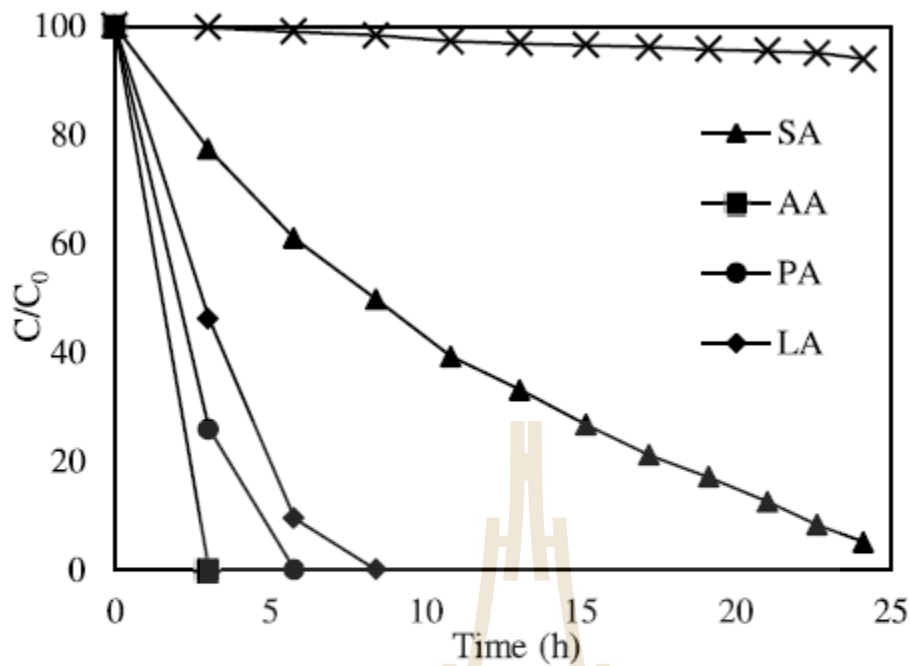
ทำให้ได้ผลของ water flux การล้างด้วยน้ำจะทำการทดลองแบ่งเป็น 2 ขั้นตอน คือ ขั้นแรกจะล้างเมมเบรนด้วยน้ำ DI จนสีของสารต่างๆที่มีสีในตัวอย่างถูกชะออกมาจนหมด ซึ่งถือว่าเป็นส่วนที่เรียกว่า retentate (R1) จากนั้นทำการล้างเมมเบรนด้วย NaOH 2% เป็นเวลา 15 นาที ตามด้วยชะล้างด้วยน้ำ DI จนกระทั่งค่า pH เป็นกลาง จากนั้นล้างด้วยกรด H_3PO_4 2% เป็นเวลา 15 นาที ตามด้วยชะล้างด้วยน้ำ DI จนกระทั่งค่า pH เป็นกลาง (R2) ค่าของ membrane hydraulic resistance (Rm) สามารถทำการคำนวณได้ที่ค่าความดันต่างๆกัน โดยที่ผลของ membrane hydraulic resistance (Rm) จากการทดลองนี้เท่ากับ $0.042 (m^{-1})$ ที่ค่าความดัน 7.5 Pa หลังจากการล้างด้วยน้ำ DI ส่วนของค่า permeate flux จะเพิ่มขึ้นเป็น $45.9 (L/m^2.h)$ และค่าความต้านทาน หรือ resistance (R1) สามารถคำนวณได้เท่ากับ $0.059 \times 10^{10} (m^{-1})$ จากผลนี้การเกิดความต้านทานของเมมเบรนโดยการเกิดชั้นเค้กที่พื้นผิวของเมมเบรน(RC) โดยมีค่าRNF และ ค่า R1 เป็น $8.941 \times 10^{10} (m^{-1})$

นอกจากนี้หลังจากการทำความสะอาดเมมเบรนด้วยสารเคมีแล้วนั้น ค่า permeation flux จะเพิ่มขึ้นเป็น $50.38 (L/m^2.h)$ และค่าความต้านทานหรือ resistance (R2) สามารถคำนวณได้เป็น $0.054 \times 10^{10} (m^{-1})$ ต่อมาการเกิดความต้านทานนั้นเกิดขึ้นจากการที่รูของเมมเบรนเกิดการอุดตันและค่า adsorption (Rf) มีค่าต่างจาก R1 และ R2 คือได้ $0.013 \times 10^{10} (m^{-1})$ ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าการเกิด fouling ของเมมเบรนนาโนฟิลเตชันนั้นสามารถหาได้จากกระบวนการล้างเมมเบรน ทั้งนี้ค่า Rm, Rc และ Rf เป็น 0.47%, 99.39% และ 0.14% ของค่าการต้านทั้งหมด (RNF) จากผลการทดลองที่ได้นี้มีผลคล้ายคลึงกับงานวิจัยที่ได้ศึกษาก่อนหน้านี้ด้วยว่ามีการเกิดชั้นเค้กบนเมมเบรนเซรามิกเช่นเดียวกัน (Lubsungneon *et al.*, 2014) ในการจำกัด หรือ rejection ของกรดอินทรีย์ต่างๆจะศึกษาในส่วนของ concentration mode ในระบบนาโนฟิลเตชัน ผลการทดลองพบว่าค่า rejection จะมีการลดลงตามระยะเวลา และที่มีการลดลงมากจะเป็นกรดอะซิติก ตากที่เริ่มต้นมีความเข้มข้น 6.61% สุดท้ายมีการลดลงถึง 61.7% จากความเข้มข้นเริ่มต้น รองลงมาตามด้วยกรดไพรูวิก กรดแลคติก และกรดซัคซินิก การลดลงของค่า rejection มีความแตกต่างกันระหว่างกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ เนื่องจากปัจจัยดังนี้คือ การแตกกันของมวลโมเลกุล และเมมเบรนค่าค่า molecular weight cut off ต่างๆกัน กรดอะซิติกที่มีมวลโมเลกุลหรือน้ำหนักโมเลกุล 60.05 Da กรดไพรูวิก 88.06 Da กรดแลคติก 90.08 Da และกรดซัคซินิก 118.05 Da กรดอะซิติกมีมวลโมเลกุลน้อยกว่าค่า molecular weight cut off คือที่ 300 Da ดังนั้นจึงมีค่า rejection ต่ำ ตรงกันข้ามกับกรดซัคซินิกที่มีมวลโมเลกุลใหญ่มีค่าการ rejection ไม่ให้ผ่านออกมาที่สูงกว่า อีกทั้งผลการศึกษาโปรตีนในการทดลองนี้พบว่า มีค่า rejection ที่สูง เนื่องจากโปรตีนเป็นโมเลกุลใหญ่ นอกจากนี้โมเลกุลใหญ่จะเกิดชั้นเค้กที่พื้นผิวของเมมเบรน เกิดการอุดตัน ด้านการผ่านของสารถึง 98% ทำให้สารสามารถผ่านเมมเบรนนาโนฟิลเตชันเพียง 2% เท่านั้น (แสดงดังรูปภาพ 23)

ความเข้มข้นของตัวถูกละลายแสดงดังรูปภาพ 20 โดยสารผสมกรดอินทรีย์จะมีการแยกออกอย่างต่อเนื่อง จนกระทั่งกรดซัคซินิกในส่วนทางด้าน feed stream มีความเข้มข้นต่ำกว่า 2 กรัมต่อลิตร ในกราฟจะแสดงอัตราการลดลงของกรดอะซิติก, กรดไพรูวิก, กรดแลคติก โดยเฉพาะอย่างยิ่งสำหรับกรดอะซิติกที่เป็นโมเลกุลที่เล็กที่สุดจะถูกแยกหรือกำจัดออกจากสารป้อนหรือน้ำหมักภายใน 3 ชั่วโมง เนื่องจากไม่เพียงแต่มีโมเลกุลต่ำเท่านั้นแต่น้ำหมักยังมีความเข้มข้นของกรดอะซิติกต่ำด้วยคือที่ 1.88 กรัมต่อลิตร กราฟสำหรับกรดซัคซินิกจากการทดลองพบว่ามีส่วนถูกแยกออกไปบ้างแต่ต้องใช้เวลานานถึง

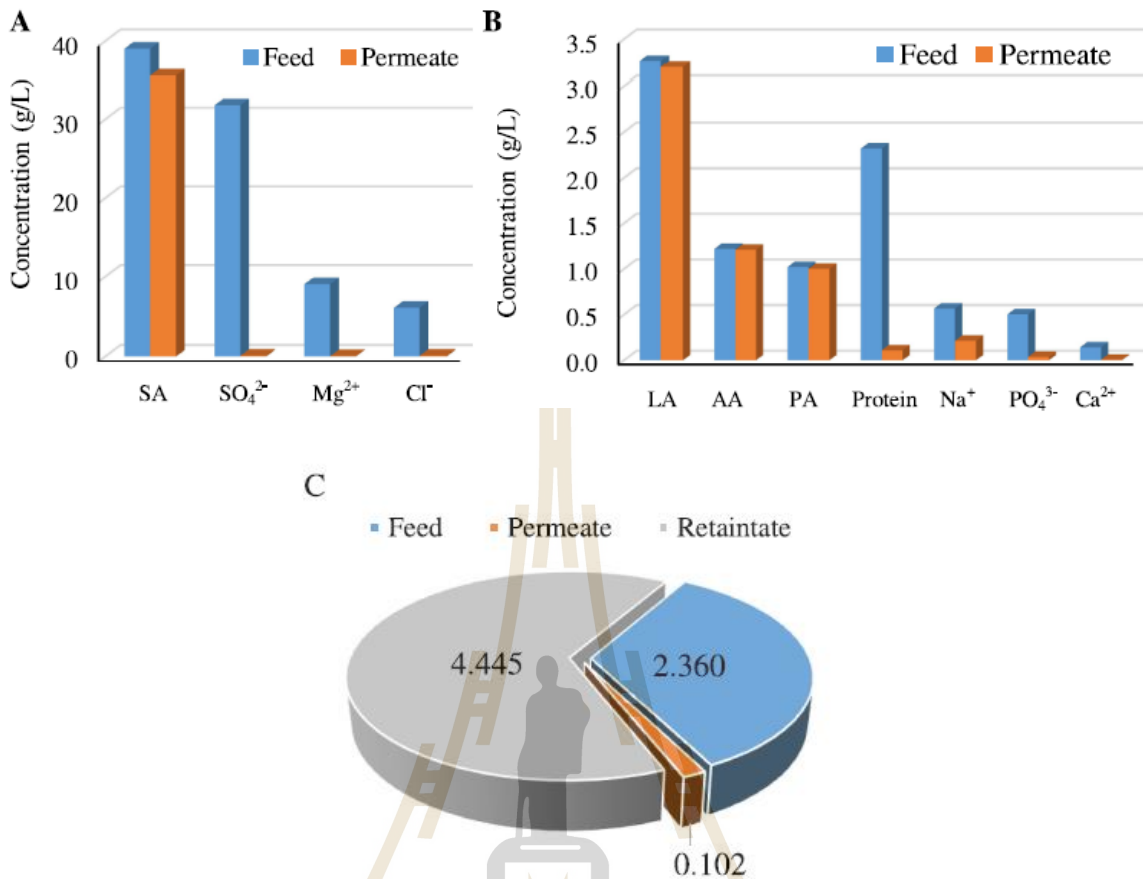
24 ชั่วโมง นับว่ามีการเปลี่ยนแปลงค่าความเข้มข้นในสารป้อนเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ถึงได้ว่านาโนฟิลเตชันเป็นเทคนิคที่สามารถเก็บเกี่ยวกรดซัคซินิกได้ดีอีกวิธีหนึ่ง แต่ส่วนของโปรตีนนั้นพบว่ามีการแยกออกต่ำมาก ยังคงมีความเข้มข้นในส่วนของ permeate ใกล้เคียงกับส่วนของสารป้อน ดังนั้นส่วนของ diafiltration mode จะถูกนำมาใช้ในการเก็บสารอื่นๆและเก็บเกี่ยวกรดซัคซินิกที่ต้องการต่อไป ผลที่ได้คล้ายคลึงกับการศึกษาอื่นที่มีการใช้นาโนฟิลเตชันที่เป็น diafiltration mode ในการแยกสารยับยั้งออกจากกากของมะกอกเพื่อให้ได้น้ำตาล xylose เพื่อใช้เป็นสารตัวต้นในกระบวนการหมัก จากซึ่งได้ผลเป็นอย่างดีเช่นเดียวกัน (Brás *et al.*,2014) จึงสรุปได้ว่าสองส่วนที่สำคัญในระบบนาโนฟิลเตชันนั้นคือการแยกโปรตีนออกจากน้ำหมักและสารประกอบอื่นต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง $MgSO_4$ นั้นเอง





รูปภาพ 20 แสดงค่า rejection ของกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆในระบบนาโนฟิลเตชัน ใช้เวลา 24 ชั่วโมง

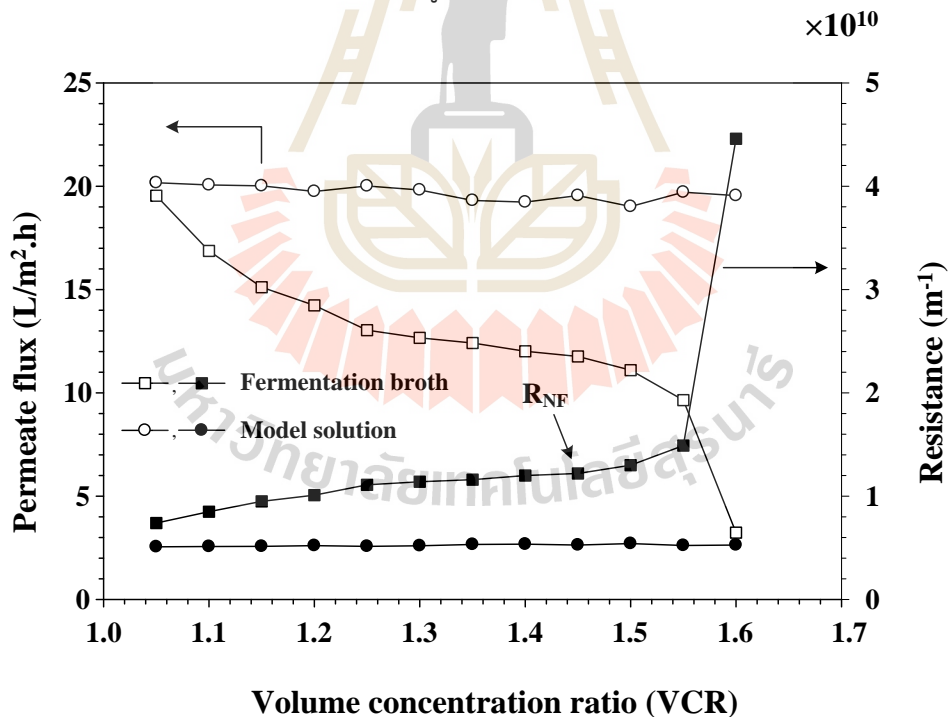
รูปภาพ 21 เป็นกราฟแท่งที่แสดงความเข้มข้นของกรดอินทรีย์, โปรตีน, สารประกอบไอออนิก และสารสีในตัวอย่างน้ำหมักและ permeate ผลการทดลองพบว่ากรดอินทรีย์เป็นตัวหลักที่พบใน permeate ขณะที่โปรตีนและไอออนต่างๆโดยเฉพาะ Mg^{2+} และ SO_4^{2-} เกือบจะไม่เปลี่ยนแปลงในด้านสารป้อนหรือ feed stream (รูปภาพ 21A และ 21B) ผลนี้แสดงข้อดีของนาโนฟิลเตชันที่สามารถจำกัดโปรตีน ความเข้มข้นของโปรตีนในสารป้อนและใน permeate คือ 2.32 และ 0.11 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ นั่นหมายความว่าเมื่ออัตราการแยกออกถึง 95.26% ถ้าตัวอย่างน้ำหมักไม่สามารถแยกโปรตีนออกได้ ในขั้นตอนการทำบริสุทธิ์กรดซัคซินิคต่อไปจะทำให้เกิดเป็นสีเหลือง ส่งผลต่อการเกิดผลึกได้ ทำให้ได้ผลึกที่ไม่ใสเหมือนกับผลึกกรดซัคซินิคทางการค้า ทำให้มีคุณภาพไม่เท่าที่ควร ดังนั้นสารสีในตัวอย่างที่จะนำมาทำบริสุทธิ์นั้น จำเป็นต้องแยกออกให้มากที่สุด โดยจะทำการศึกษาปริมาณความเข้มข้นของสีจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 420 nm ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ พบว่าได้ค่าเป็น 2.360, 4.445 และ 0.102 ตามลำดับ (ดังรูปภาพ 21C) หมายความว่าสารที่ทำให้เกิดสีสามารถแยกออกไปจากตัวอย่างได้ถึง 95.68%



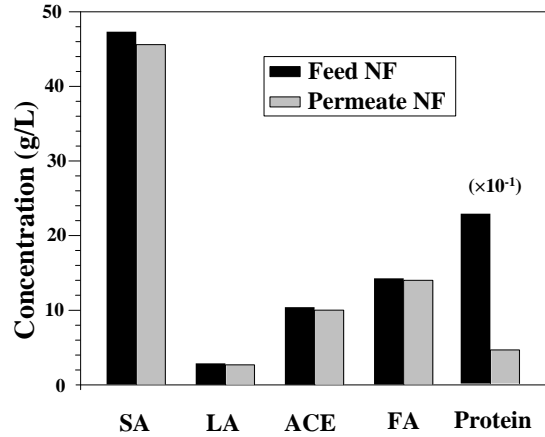
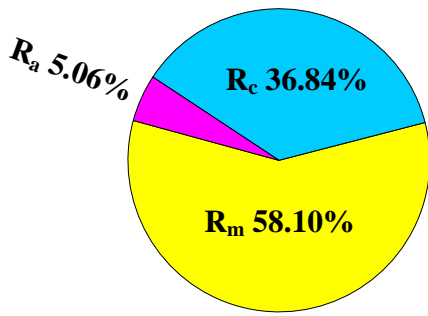
รูปภาพ 21 กราฟแท่งแสดงสารประกอบที่ผสมอยู่ในสารป้อนและส่วน permeate จากนาโนฟิลเตชัน (A) คือ กรดซัคซินิค, SO₄²⁻, Mg²⁺, Cl⁻ (B) คือ กรดแล็คติก, กรดอะมิโน, กรดโพธิโธนิค, โปรตีน, Na⁺, PO₄³⁻, Ca²⁺ (C) คือ ความเข้มข้นของสีในสารป้อน, retentate และ permeate จากนาโนฟิลเตชัน จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 420 nm

ค่าการแยกของ NF ระหว่างสารละลายกับ clarified fermentation broth เปรียบเทียบในรูปภาพ 22A แสดงให้เห็นว่า membrane flux and resistance คือ function ของ volume concentration ratio (VCR) VCR คำนวณได้จาก feed เริ่มต้น ทารด้วย retentate volume NF คือ กระบวนการที่อาศัยผลต่างของความดัน-แรงดันขับ ดังนั้นความดันจึงเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อ permeation flux โดย flux จะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความดัน feed แต่ที่ flux เริ่มต้นสูงจะทำให้เกิดการอุดตันของเมมเบรนอย่างรวดเร็ว ความดันควรจะถูกควบคุมไม่ให้ flux เริ่มต้นสูงเกินไป อันจะส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพของการกรองที่ต่ำ ในการทดลองนี้ความดัน feed 400 kPa, pH 2.5 และ temperature 30.5 °C ใช้ในการศึกษา flux และความต้านทาน flux เริ่มต้นของสารละลายคือ 20.17 L/m².h และคงที่ มีการเปลี่ยนแปลงน้อย เมื่อสิ้นสุดการทดลอง permeation rate คือ 19.56 L/m².h นอกจากนี้การคำนวณความต้านทานมีค่าระหว่าง 0.51-0.54×10¹⁰ m⁻¹ ค่าคงที่เมมเบรน flux และ resistance

เนื่องจากการมีโมเลกุลขนาดใหญ่อยู่บนผิวหน้าเมมเบรน ในทางกลับกันกับสารละลาย permeation rate ของน้ำหมักลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 2-3 นาทีแรก จาก 19.54 ถึง 16.87 L/m².h และค่อยๆลดลงอย่างต่อเนื่อง ค่าความต้านทานเพิ่มขึ้นที่ $1.22 \times 10^{10} \text{ m}^{-1}$ permeation rate ลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงสุดท้ายของ NF เมื่อค่าคือ 3.23 L/m².h คิดเป็น 83.5% ของ initial flux หลังจากทดลองเมมเบรนถูกอุดตันไปด้วยโปรตีนและสารโมเลกุลขนาดใหญ่ที่ผิวหน้า เพื่อหาค่า fouling characteristic ของ NF เมมเบรน ซึ่งในที่นี่จะใช้เทคนิคการล้าง (cleaning method) โดยตรงใช้ในการหาค่า flux ในระหว่างกระบวนการล้าง 2 ขั้นตอน ล้างด้วยน้ำ 40 °C จนสารละลายใสไม่มีสี คือ (R₁) ล้างด้วย 2% phosphoric acid at 50 °C เป็นเวลา 10 นาที ตามด้วยล้างด้วยน้ำอุ่น จน pH เป็นกลาง คือ (R₂) ค่าความต้านทานเมมเบรนคือ (R_m) คำนวณโดยหาค่าฟลักซ์ของน้ำในเมมเบรน คือ 20.52 L/m².h ทำให้ได้ค่า R_m คือ $0.70 \times 10^{10} \text{ m}^{-1}$ หลังจากล้างด้วยน้ำเปล่าค่าเพิ่มขึ้นเป็น 18.60 L/m².h และ R₁ คือ $0.77 \times 10^{10} \text{ m}^{-1}$ ผลของความต้านทาน cake (R_c) คือผลต่างระหว่าง R_{NF} and R₁ คือ $0.45 \times 10^{10} \text{ m}^{-1}$ ค่าฟลักซ์ของน้ำเปล่าเพิ่มขึ้นเป็น 20.21 L/m².h ความต้านทาน R₂ คือ $0.71 \times 10^{10} \text{ m}^{-1}$ ดังนั้นความต้านทานที่เกิดการอุดตันและการดูดซับ (R_f) คือผลต่างระหว่าง R₁ and R₂ คือ $0.06 \times 10^{10} \text{ m}^{-1}$ กล่าวโดยสรุปแล้ว การศึกษาการเกิดฟาวลิ่งของ NF เมมเบรน สามารถหาได้จากการทำความสะอาด ในรูปภาพ 25B ค่าความต้านทาน R_m, R_c, and R_f คือ 58.10%, 36.84%, และ 5.06% ตามลำดับ ส่วนกรองต่าง ๆ ที่ผลิตได้จากเทคนิคไมโครฟิลเตรชัน (MF) และนาโนฟิลเตรชัน (NF) แสดงดังรูปภาพ 23

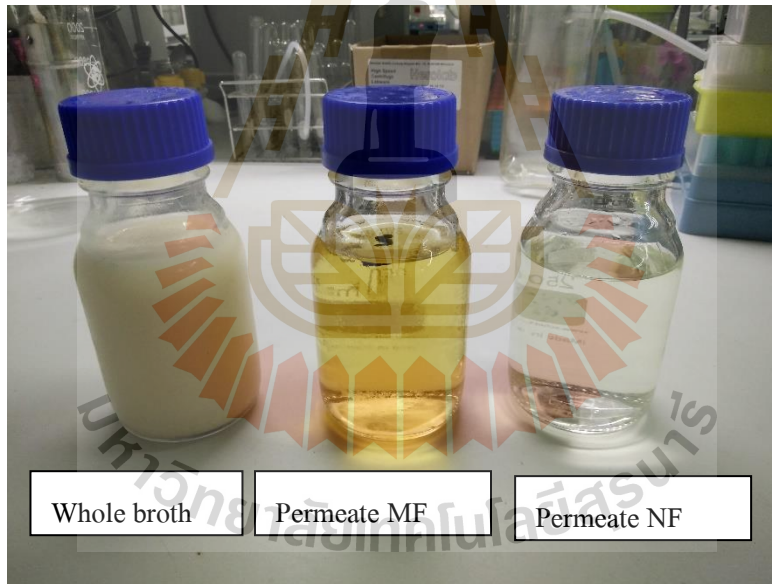


(A)



(B)

รูปภาพ 22 การศึกษากระบวนการนาโนฟิวเตรชั่นระหว่างน้ำหมักและของผสมของกรดอินทรีย์สังเคราะห์ และแสดงการวิเคราะห์แรงต้านทานต่าง ๆ



รูปภาพ 23 รูปภาพของส่วนกรองต่าง ๆ ที่ผลิตได้จากเทคนิคไมโครฟิลเตรชั่น (MF) และนาโนฟิลเตรชั่น (NF)

ตาราง 6 องค์ประกอบทางเคมีของส่วนกรองต่าง ๆ ที่ได้จากไมโครฟิลเตรชั่นและนาโนฟิลเตรชั่น

Components	Aqueous solutions		
	Whole broth	MF permeate	NF permeate

Biomass (g/L)	0.41	0.00	0.00
Proteins (g/L)	2.46	2.39	0.48
Succinic acid (g/L)	47.20	47.20	45.80
Lactic acid (g/L)	2.70	2.70	2.68
Acetic acid (g/L)	10.51	10.50	10.44
Formic acid (g/L)	12.32	12.32	12.29
Na ⁺ (mg/L)	347.81	346.87	344.23
Mg ²⁺ (mg/L)	2,388.54	2,327.54	40.24
Cl ⁻ (mg/L)	924.66	925.53	928.43
PO ₄ ³⁻ (mg/L)	285.98	286.42	2.06
pH	6.5	2.0	2.0

การใช้เมมเบรนนาโนฟิลเตรชันกำจัดสีในตัวอย่างน้ำหมัก แสดงดังรูปภาพ 24 ซึ่งผลการศึกษาเป็นไปในแนวทางเดียวกับรายงานจากวารสารนานาชาติ (Bouchoux et al.,2006) นอกจากนี้แล้วสารโมเลกุลใหญ่ต่างๆที่มีขนาดเล็กและอ็อนต่างๆ อาทิเช่น ก็จะสามารถกำจัดออกได้หมดเช่นเดียวกัน Mg²⁺, Ca²⁺, Na⁺, SO₄²⁻, PO₄³⁻ เป็นต้น ผลการทดลองพบว่า ความเข้มข้นของ Mg²⁺ และ SO₄²⁻ ในสารป้อนและ permeate เป็น 9.024 g/L, 0.044 g/L และ 31.84 g/L, 0.096 g/L ตามลำดับ อัตรา reduction rate อยู่ที่ 99.5% และ 99.69% ตามลำดับ ทั้งนี้อัตรา rejection rate ได้มีการศึกษาในการกำจัดแอมโมเนียมซัลเฟตออกจากน้ำหมักโดย Kang et al.,2004 โดยเมมเบรนนาโนฟิลเตรชันเช่นเดียวกัน ซึ่งสามารถกำจัดแอมโมเนียมได้เช่นเดียวกับการทดลองนี้ การที่สามารถแยกโปรตีนและอ็อนต่างๆออกได้ถือว่าเป็นข้อดีของระบบนาโนฟิลเตรชันนี้ เพราะหากไม่สามารถแยกออกจากตัวอย่างที่ต้องการได้นั้น โปรตีนอาจเกิดการแตกตัวเกิดเป็นกรดอะมิโน มีปัญหาในกระบวนการทำบริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไป อีกทั้งอ็อนต่างๆถ้าไม่ถูกแยกออกไปนั้น ก็จะทำให้เกิดผลต่อค่าความบริสุทธิ์และส่งผลกระทบต่อคุณภาพของคริสตัลเกรดซัคซินิคได้อีกด้วย

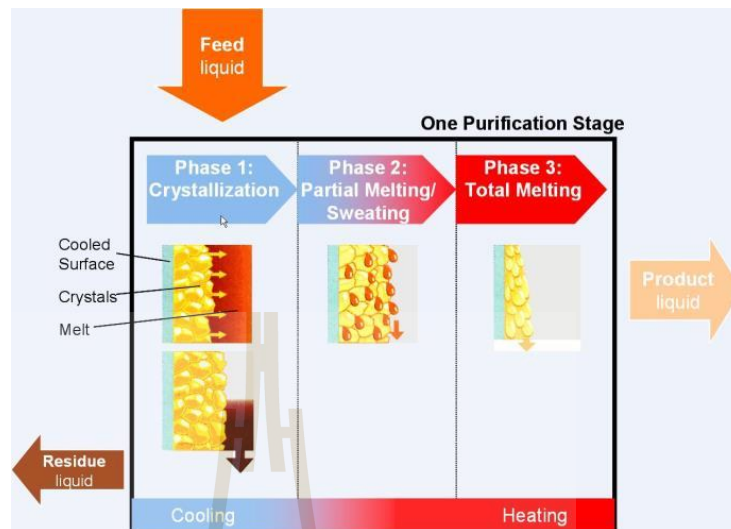


รูปภาพ 24 ตัวอย่างน้ำหมักที่ถูกกำจัดสื่อกด้วยเทคนิคนาโนฟิเตชั่น

3.5 การตกผลึกแบบชั้น (Layer melt crystallization)

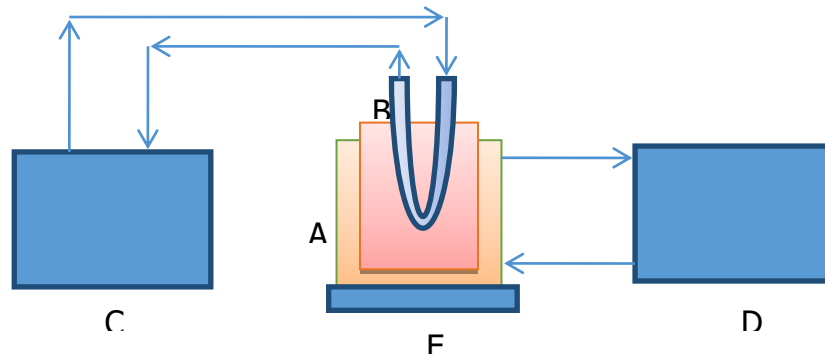
โดยหลักการทั่วไปแล้ว สารส่วนใหญ่จะละลายได้ดีในตัวทำละลายที่สูงมากกว่าที่อุณหภูมิห้อง ดังนั้นเมื่อทำให้สารละลายอิ่มตัวที่อุณหภูมิสูงเย็นตัวลง ก็จะทำให้สารแยกตัวออกมาจากสารละลายในรูปของของแข็ง ซึ่งกระบวนการนี้เรียกว่า การตกผลึก (crystallization) โดยในทางปฏิบัติการตกผลึกจะเป็นการนำสารไปละลายในตัวทำละลายที่เหมาะสมที่อุณหภูมิสูงจนกระทั่งได้สารละลายอิ่มตัว แล้วทิ้งไว้ให้เย็นจนสารค่อยๆ ตกผลึกออกมา โดยคาดหวังว่าจะได้สารที่ต้องการเพียงสารเดียวตกผลึกออกมาเท่านั้น และสารอื่นๆ ที่เจือปนยังคงละลายอยู่ในสารละลาย ซึ่งสารละลายส่วนที่เหลือนี้เรียกว่า mother liquor ซึ่งการตกผลึกกรดซัคซินิคนั้น พบว่ามีปัจจัยแวดล้อมที่ส่งผลทำให้ค่าการละลายของกรดซัคซินิคในน้ำเปลี่ยนไปคือ ค่าความเป็นกรดต่าง อุณหภูมิ ชนิดของเกลือซัคซิเนตและความเข้มข้น เป็นต้น ซึ่งกล่าวโดยทั่วไปแล้วกรดซัคซินิคจะมีค่าการละลายน้อยลงเมื่อค่าความเป็นกรดต่างลดลง อุณหภูมิต่ำลง และความเข้มข้นที่เพิ่มมากขึ้น ดังนั้นการทำการตกผลึกกรดซัคซินิคที่เหมาะสม จึงจำเป็นที่จะต้องทำการศึกษาสภาวะต่าง ๆ ให้เหมาะสมด้วย ซึ่งปัจจัยที่บ่งชี้ประสิทธิภาพของการตกผลึกมี 2 ประการคือ 1) การตกผลึกที่ทำให้ได้ผลึกที่บริสุทธิ์ที่สุดนั่นคือปริมาณของสารเจือปนต้องน้อยที่สุด 2) การตกผลึกให้ได้สารออกมาปริมาณมากที่สุด หรือมีสารคงเหลือละลายอยู่ใน mother liquor น้อยที่สุด นั่นคือมี % recovery สูง ซึ่งความสำเร็จทั้ง 2 ประการข้างต้น ขึ้นอยู่กับการเลือกระบบตัวทำละลายและความบริสุทธิ์เมื่อ เริ่มต้นของสารที่จะทำการตกผลึกเป็นอย่างมาก บ่อยครั้งที่การตกผลึกเพียงครั้งเดียวไม่สามารถทำให้ได้สารบริสุทธิ์ตามต้องการ จึงต้องมีการตกผลึกซ้ำ เพื่อให้ได้สารที่บริสุทธิ์ขึ้น ในการตกผลึกแต่ละครั้งจะมีการสูญเสียสารไปกับ mother liquor บ้าง จึงทำให้ % recovery ต่ำลง แต่ความบริสุทธิ์สูงขึ้น โดยทั่วไปแล้วการตกผลึกมักใช้กับของผสมที่มีสารมากและมีสิ่งเจือปนอยู่น้อย กล่าวโดยสรุปแล้ว การตกผลึกจะเริ่มจากการทำให้กรดอินทรีย์อยู่ในรูปที่ไม่แตกตัว (non-dissociate form) และการทำให้เข้มข้นขึ้นก่อนที่จะใช้ระบบทำความเย็นในการช่วยให้กรดซัคซินิคตกผลึก ในขณะที่กรดอินทรีย์ปนเปื้อน

อื่น ๆ จะยังมีสถานะเป็นของเหลว

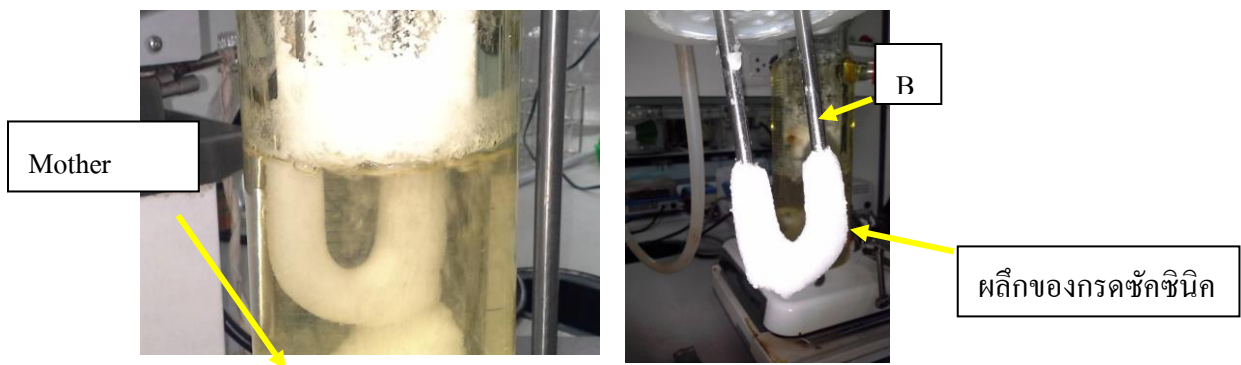
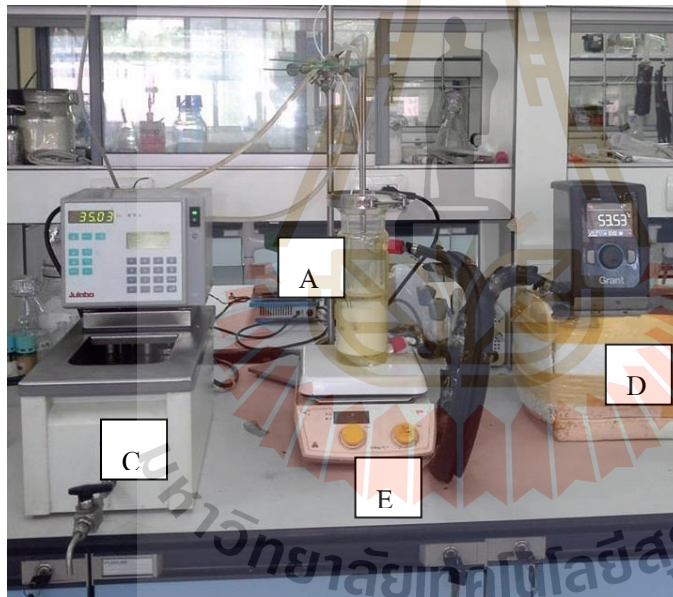


รูปภาพ 25 หลักการทำงานของระบบการตกผลึกแบบชั้น layer melt crystallization

ในโครงการวิจัยนี้จะใช้กระบวนการตกผลึกแบบชั้นหรือที่เรียกว่า layer melt crystallization ซึ่งการตกผลึกแบบนี้มักจะทำแบบกะ โดยทำการกวนให้ระบบมีความเป็นเนื้อเดียวกันและมีการประยุกต์ใช้สารทำความเย็นวิ่งผ่านท่อชุดซึ่งจุ่มอยู่ในสารละลายที่ต้องการตกผลึกนั้น หลักการทำงานจะอยู่ที่กระบวนการตกผลึกละลายด้วยการระบายความร้อน เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการตกผลึกลงบนพื้นผิว จากนั้นทำการขยายมวลของผลึกที่เกิดขึ้น (รูปภาพ 25) ก่อนที่จะนำผลึกของกรดซัคซินิกที่ผลิตได้ไปทำบริสุทธิ์ขั้นสุดท้ายต่อไป ในส่วนของโครงการวิจัยนี้ ส่วนที่กรองได้ (filtrate) จากระบบนาโนฟิวเตรชันจะประกอบด้วยกรดซัคซินิก กรดแลคติก กรดอะซิติก กรดฟอร์มิกและอออนต่าง ๆ ซึ่งดังที่ได้กล่าวมาแล้วว่ากรดซัคซินิกนั้น มีค่าการละลายที่ต่ำมาก ซึ่งสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตกผลึกได้ในขณะที่สารอื่น ๆ จะไม่สามารถตกผลึกได้ ซึ่งเทคนิคการตกผลึกกรดซัคซินิกจากน้ำหมักนี้ จะใช้เทคนิคที่เรียกว่า layer melt crystallization (รูปภาพ 18) ซึ่งจะประกอบด้วยขวดแก้วสองชั้น โดยในขวดแก้วนี้จะบรรจุส่วนที่กรองได้ (filtrate) ที่ทำให้เข้มข้นแล้ว ซึ่งอุณหภูมิของ filtrate นี้จะถูกควบคุมด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ จากนั้นจะใช้ท่อรูปตัวยู (cooling finger) จุ่มลงในสารละลายดังกล่าว ภายในท่อจะมีการหล่อด้วยน้ำเย็นที่อุณหภูมิต่าง ๆ โดยที่กรดซัคซินิกจะตกผลึกบนผิวของท่อรูปตัวยูดังกล่าว (รูปภาพ 26) ซึ่งอัตราการเกิดผลึกสามารถศึกษาได้จากกราฟวัดความหนาของชั้นผลึกที่เกิดขึ้น หรือวัดจากความเข้มข้นที่ลดลงของกรดอินทรีย์ในสารละลายก็ได้



รูปภาพ 26 การจัดการทดลองการตกผลึกแบบ layer melt crystallizer (A) โถแก้วสองชั้น ภายในบรรจุสารละลาย (B) ท่อรูปตัวยู (cooling finger) (C) เครื่องควบคุมอุณหภูมิของ cooling finger (D) เครื่องควบคุมอุณหภูมิของสารละลาย และ (E) เครื่องกวนผสมสาร (magnetic stirrer)



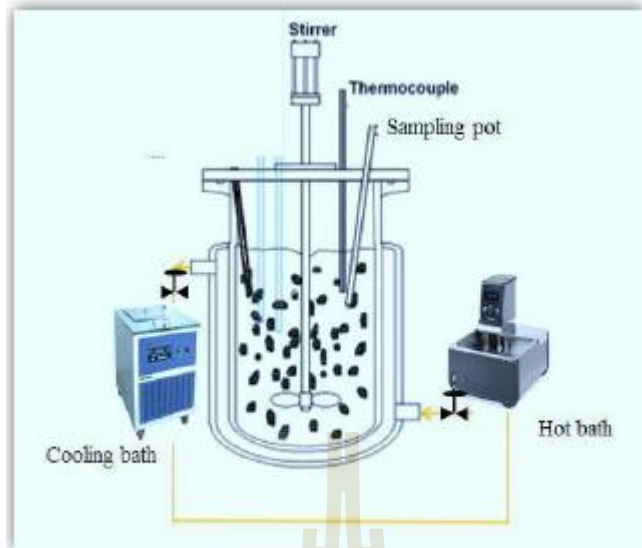
รูปภาพ 27 การตกผลึกแบบชั้นเพื่อแยกกรดซัคซินิกออกจากสารละลายกรดอินทรีย์ชนิดอื่น

3.6 การตกผลึกกรดซัคซินิก (Crystallization technique of succinic acid)

จากการทดลองข้างต้นจะเห็นได้ว่า ถึงแม้การใช้ระบบนาโนฟิวเตรชั่น จะสามารถแยกสารโมเลกุลใหญ่ได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่อย่างไรก็ตาม พบว่ากรดอินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ไม่สามารถแยกได้ด้วยเทคนิคดังกล่าว ทั้งนี้เนื่องจากขนาดของโมเลกุลของสารเหล่านี้ มีขนาดที่ใกล้เคียงกันเป็นอย่างมาก จึงต้องใช้เทคนิคอื่นในการแยกกรดอินทรีย์เหล่านี้อกจากกรดซัคซินิก เทคนิคหนึ่งพบว่าใช้ได้ผลเป็นอย่างดีคือการตกผลึก โดยหลักการทั่วไปแล้ว สารส่วนใหญ่จะละลายได้ดีในตัวทำละลายที่สูงมากกว่าที่อุณหภูมิห้อง ดังนั้นเมื่อทำให้สารละลายอิ่มตัวที่อุณหภูมิสูงเย็นตัวลง ก็จะทำให้สารแยกตัวออกมาจากสารละลายในรูปของของแข็ง ซึ่งกระบวนการนี้เรียกว่า การตกผลึก (crystallization) โดยในทางปฏิบัติการตกผลึกจะเป็นการนำสารไปละลายในตัวทำละลายที่เหมาะสมที่อุณหภูมิสูงจนกระทั่งได้สารละลายอิ่มตัว แล้วทิ้งไว้ให้เย็นจนสารค่อยๆ ตกผลึกออกมา โดยคาดหวังว่าจะได้สารที่ต้องการเพียงสารเดียวตกผลึกออกมาเท่านั้น และสารอื่นๆ ที่เจือปนยังคงละลายอยู่ในสารละลาย ซึ่งสารละลายส่วนที่เหลือนี้เรียกว่า mother liquor ซึ่งการตกผลึกกรดซัคซินิกนั้น พบว่ามีปัจจัยแวดล้อมที่ส่งผลทำให้ค่าการละลายของกรดซัคซินิกในน้ำเปลี่ยนไปคือ ค่าความเป็นกรดต่าง อุณหภูมิ ชนิดของเกลือซัคซินेटและความเข้มข้น เป็นต้น ซึ่งกล่าวโดยทั่วไปแล้วกรดซัคซินิกจะมีค่าการละลายน้อยลงเมื่อค่าความเป็นกรดต่างลดลง อุณหภูมิต่ำลง และความเข้มข้นที่เพิ่มมากขึ้น ดังนั้นการทำการตกผลึกกรดซัคซินิกที่เหมาะสมจึงจำเป็นที่จะต้องทำการศึกษาสภาวะต่าง ๆ ให้เหมาะสมด้วย ซึ่งปัจจัยที่บ่งชี้ประสิทธิภาพของการตกผลึกมี 2 ประการ คือ 1) การตกผลึกที่ทำให้ได้ผลึกที่บริสุทธิ์ที่สุดนั่นคือปริมาณของสารเจือปนต้องน้อยที่สุด 2) การตกผลึกให้ได้สารออกมาปริมาณมากที่สุด หรือมีสารคงเหลือละลายอยู่ใน mother liquor น้อยที่สุด นั่นคือมี % recovery สูง ซึ่งความสำเร็จทั้ง 2 ประการข้างต้น ขึ้นอยู่กับการเลือกระบบตัวทำละลายและความบริสุทธิ์เมื่อ เริ่มต้นของสารที่จะทำการตกผลึกเป็นอย่างมาก บ่อยครั้งที่การตกผลึกเพียงครั้งเดียวไม่สามารถทำให้ได้สารบริสุทธิ์ตามต้องการ จึงต้องมีการตกผลึกซ้ำ เพื่อให้ได้สารที่บริสุทธิ์ขึ้น ในการตกผลึกแต่ละครั้งจะมีการสูญเสียสารไปกับ mother liquor บ้าง จึงทำให้ % recovery ต่ำลง แต่ความบริสุทธิ์สูงขึ้น โดยทั่วไปแล้วการตกผลึกมักใช้กับของผสมที่มีสารมากและมีสิ่งเจือปนอยู่น้อย

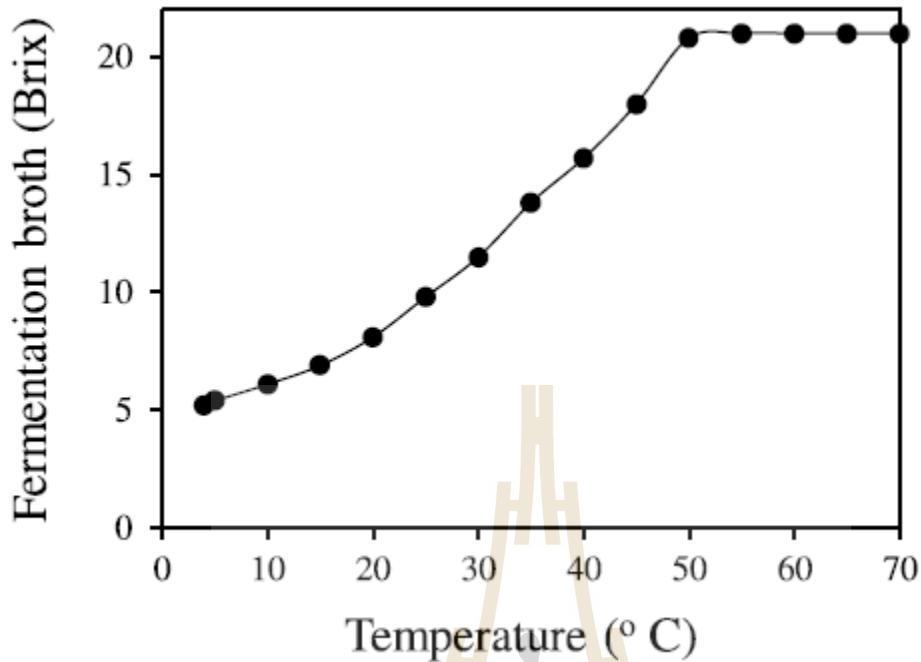
3.6.1 การจัดการทดลองการตกผลึก

ตัวอย่างใสในส่วน permeate จากนาโนฟิลเตรชั่นจะนำไประเหยน้ำออกที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ช่วยให้เข้มข้นขึ้น ทั้งยังช่วยระเหยสารที่ระเหยได้ เช่น กรดอะซิติกและกรดแลคติก ที่ผสมอยู่ในตัวอย่างบางส่วนออกไป จนกระทั่งได้ค่าความเข้มข้น ของของแข็งที่ละลายอยู่ในสารละลาย 21 บริกซ์ หลังจากนั้นจะเข้าสู่กระบวนการตกผลึก (crystallization) ต่อไป



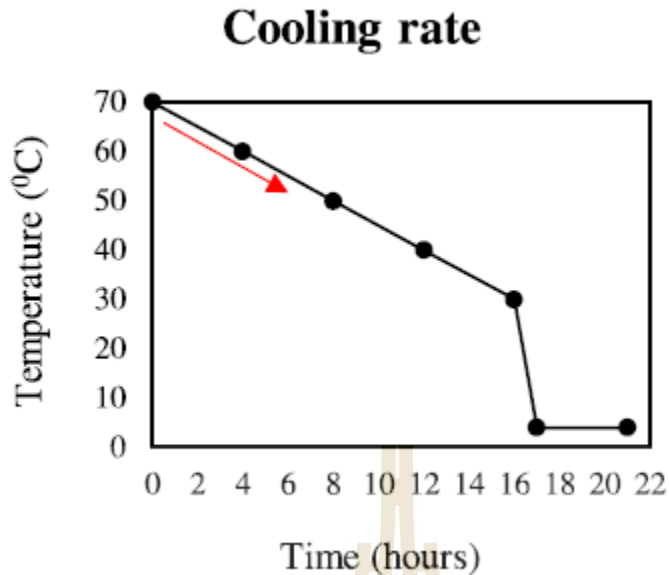
รูปภาพ 28 การจัดการศึกษากระบวนการตกผลึกของกรดซัคซินิค

จากรูปภาพ 29 แสดงกราฟความสามารถในการละลายของสารต่างๆที่ผสมอยู่ในตัวอย่างน้ำหมัก พบว่าจะมีการลดลงเมื่ออุณหภูมิลดลง หลังจากทำการระเหยน้ำออก (evaporation) ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของตัวถูกละลายจะมีค่าประมาณ 21 บริกซ์ เมื่ออุณหภูมิลดลงเหลือประมาณ 55 องศาเซลเซียสค่าการละลายจะลดลงไปเรื่อยๆจนเข้าสู่จุดที่มีการละลายอิมิตัวที่อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส ณ จุดนี้จะเลือกทำการเติม seeding เพื่อก่อให้เกิดการตกผลึกขึ้น ทั้งนี้สำหรับ high seeding ค่าจุดอิมิตัวสูงกว่าเพื่อให้เพียงพอในขั้นตอน secondary nucleation ตั้งแต่อุณหภูมิตั้งแต่ 30 องศาเซลเซียสลงไปที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นั่นคือ ค่า recovery rate ของ high seeding จะต่ำกว่า low seeding (Nagy et al., 2008)



รูปภาพ 29 Solubility curve ของตัวอย่างที่อุณหภูมิต่างๆ

การศึกษาการตกผลึกด้วยความเย็น หรือ cooling crystallization จะทำในถังแจ๊คเก็ตแก้วขนาด 500 มิลลิลิตร (รูปภาพ 28) ซึ่งสาสารตัวอย่างได้ 250 มิลลิลิตร อุณหภูมิในการควบคุมแจ๊คเก็ตด้านข้างมีการใช้อ่างน้ำร้อน/เย็น ควบคุม พร้อมทั้งภายในถังจะมีการกวนด้วยใบพัดชนิด two-bladed marine type ที่ความเร็ว 400 รอบต่อนาที ความเร็วในการกวนต้องเหมาะสมในการผสมตัวอย่างให้เข้ากัน หากกวนแรงไปจะทำให้เกิดเป็นฟองมีผลต่อการเกิดผลึกได้ มีการศึกษาลักษณะการเกิดผลึกและชนิดและปริมาณของ seed ที่เติมลงไปซึ่งจะทดลองจำนวน 3 ซ้ำ เพื่อให้ได้ผลการทดลอง เพื่อนำไปใช้ในกระบวนการตกผลึก สำหรับ seed ที่ใช้จะมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 600-850 ไมครอน โดยที่จะมีการศึกษาแบบที่ไม่เติม seed หรือ unseeding (0%), low seeding (5%) และ high seeding (10%) ในขั้นตอนการตกผลึกนั้นจะใส่ seed ลงในตัวอย่าง ให้อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส และเริ่มลดอุณหภูมิลงให้เหลือ 30 องศาเซลเซียส การลดลงของอุณหภูมินั้นจะมีการควบคุมให้มีอัตรา 2.5 องศาเซลเซียสต่อชั่วโมง จนถึง 30 องศาเซลเซียสและจะทำการลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็วที่ 4 องศาเซลเซียส และคงไว้เป็นเวลา 4 ชั่วโมง (ดังรูปภาพ 30) จะเกิดเป็นผลึกของกรดซัคซินิกขึ้น จากนั้นจะทำการล้างด้วยน้ำเย็นเพื่อชะล้างสิ่งปนเปื้อนอื่นๆออก และนำไปทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง



รูปภาพ 30 Cooling rate ในกระบวนการตกผลึก

3.6.2 การเตรียม seed (Seed preparation)

Seed สำหรับเป็นตัวเร่งการเกิดผลึกนั้นมีขนาดมาตรฐานที่ต่าง ๆ กัน เช่น 1000, 800, 650, 400, 270, 180 และ 100 ไมครอน วิธีการเตรียม feed ทำตามวารสารอ้างอิง (Aamir, Nagy, & Rielly, 2010; Gerberding, 2012) สุดท้ายจะได้ seed ที่มีขนาด 600 ไมครอน สำหรับใช้ในการตกผลึกต่อไป

3.6.3 กระบวนการตกผลึกกรดซัคซินิกในตัวอย่างน้ำหมัก

กรดอินทรีย์มีการแตกตัวเป็น acid form หรือ anion form จะขึ้นอยู่กับค่า dissociation constant (K_a) ที่แตกต่างกัน ยกตัวอย่างเช่น กรดอะซิติก ($K_a = 6.2 \times 10^{-5}$), กรดแล็กติก ($K_a = 1.37 \times 10^{-4}$), กรดไพรูวิก ($K_a = 2.8 \times 10^{-3}$) และกรดซัคซินิก ($K_{a1} = 2.1 \times 10^{-4}$, $K_{a2} = 2.3 \times 10^{-6}$)

$$\delta_{HA} = \frac{[HA]}{[HA] + [A^-]} = \frac{[H^+]}{[H^+] + [K_a]} \quad \delta_{A^-} = \frac{[A^-]}{[HA] + [A^-]} = \frac{[K_a]}{[K_a] + [H^+]}$$

$$\delta_{H_2A} = \frac{[H^+]^2}{[H^+]^2 + K_{a1}[H^+] + K_{a1}K_{a2}} \quad \delta_{HA^-} = \frac{K_{a1}[H^+]}{[H^+]^2 + K_{a1}[H^+] + K_{a1}K_{a2}}$$

$$= 1 - \delta_{HA^-} - \delta_{H_2A}$$

โดยที่ $[H^+]$ เป็นความเข้มข้นที่มีการควบคุมค่า pH ซึ่งแต่ละค่า pH จะมีการแตกตัวที่แตกต่างกัน ตามผลการทดลองของ Li et al. ที่แสดง ณ ค่า pH 2.0 กรดคาร์บอกซิลิกจะเกิดกรดอิสระ หรือ free

acid ที่สามารถละลายได้ประมาณ 73% และประมาณ 80% ที่ค่า pH 3.0 ส่วนเมื่อ pH 1.0-14 ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียสนั้นมีเพียงกรดซัคซินิคมีการปล่อยกรดอิสระออกมา ขณะที่กรดคาร์บอกซิสิกชนิดอื่นๆผสมอยู่ในสารละลาย นอกจากนี้กราฟความสามารถในการละลายของกรดซัคซินิคมีการลดลงเมื่ออุณหภูมิลดลง (Li *et al.*, 2010) นั้นสามารถอธิบายได้ว่าเมื่อที่อุณหภูมิต่ำกรดซัคซินิคก็จะสามารถตกผลึกได้ง่ายนั่นเอง

ส่วนของ NF permeate ที่เป็นขั้นตอนการกำจัดสีของจากตัวอย่าง หลังจากนั้นจะทำการระเหย ซึ่งถือเป็นกระบวนการที่สามารถกำจัดสารปนเปื้อนที่ระเหยได้ออกไปอาทิเช่น กรดอะซิติก กรดแล็คติก (ดังตาราง 7) ผลการทดลองพบว่าอัตราส่วนของกรดอะซิติกและกรดแล็คติกขณะก่อนและหลังกระบวนการระเหย (evaporation) เป็น 1 และ 2.7 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าต่ำกว่าอัตราของกรดซัคซินิคที่มีค่าเป็น 3.21 จากผลที่ได้นี้แสดงให้เห็นว่า evaporation สามารถแยกสารอื่นๆที่ไม่ต้องการออกจากตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่ต้องการได้ ส่งผลต่อผลิตภัณฑ์ที่จะมีการตกผลึกในขั้นตอนสุดท้าย ทั้งนี้ตรงกับการศึกษาของ Meynial –Salles ที่มีการหมักกรดซัคซินิคและทำการระเหยน้ำออก จากนั้นเข้าสู่ขั้นตอน acidification ก็จะสามารถแยกเซลล์ สารที่ไม่ต้องการอื่นๆ จนได้น้ำหมักที่มีความเข้มข้นสูงสำหรับกระบวนการทำบริสุทธิ์ต่อไป (Meynial-Salles & Soucaille, 2008) นอกจากนี้ตาราง 7 แสดงกระบวนการตกผลึก โดยมีการดำเนินการที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ pH 3.0 ละจากกระบวนการหมักที่ค่า pH ประมาณ 6.8 ซึ่งสูงกว่าค่า pKa ผลผลิตสุดท้ายจะเกิดเป็นเกลือ (salt form) ขึ้นได้มากกว่า เกิดเป็นกรดอิสระ ดังนั้นเมื่อมีการพรีทริทเมนต์แยกเซลล์แบคทีเรีย เพื่อทำตัวอย่างน้ำหมักให้ใสแล้วนั้น พร้อมทั้งการปรับค่า pH เป็น 3.0 ด้วย H_2SO_4 กรดซัคซินิคจะสามารถตกผลึกได้ ในขณะที่ผลิตภัณฑ์อื่นๆในตัวอย่างน้ำหมักจะละลายอยู่ในน้ำหมัก ซึ่งถือว่าจะสามารถแยกกรดซัคซินิคออกจากสารปนเปื้อนอื่นๆได้โดยง่าย (Li *et al.*, 2010) แต่อย่างไรก็ตามค่า purity ของน้ำหมักก่อนจะเข้าสู่กระบวนการตกผลึกเป็นตัวสำคัญในการกำหนดขนาด รูปร่าง และโครงสร้างลักษณะของผลึกที่จะเกิดขึ้น

ตาราง 7 แสดงส่วนประกอบในตัวอย่างน้ำหมักหลังจากผ่านนาโนฟิลเตชัน

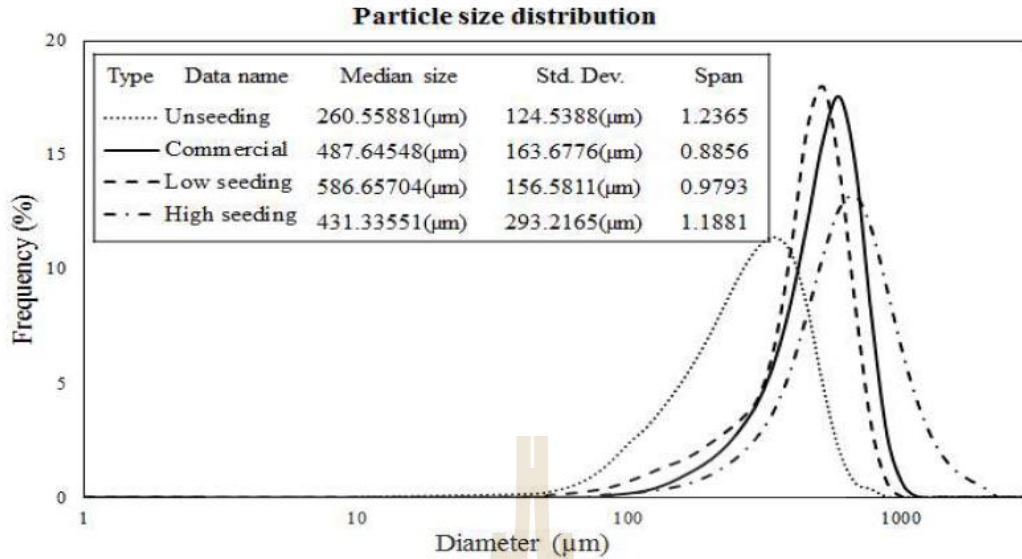
ส่วนประกอบ	ตัวอย่าง					
	น้ำหมัก	MF permeate	Acidification	NF permeate	Evaporation	Crystallization (%) (w/w)
ซีววมล (g/L)	3.26	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
โปรตีน (g/L)	4.44	4.32	0.51	0.08	0.21	1.95×10^{-3}
กรดซัคซินิค (g/L)	108.27	108.25	107.96	64.42	200.57	99.35
กรดไพรูวิก (g/L)	4.56	4.55	4.55	4.48	14.04	0.17
กรดอะซิติก (g/L)	2.25	2.25	2.23	2.21	2.22	0.04
กรดแล็คติก (g/L)	9.99	9.99	9.98	9.79	26.55	0.09
กลูโคส (g/L)	20.17	20.17	20.11	3.06	9.69	0.16
pH (g/L)	6.80	6.80	3.00	3.00	2.80	2.80
สี (g/L)	2.24	2.26	2.27	0.05	0.10	0.01

กระบวนการตกผลึกจะแบ่งออกเป็นสองวิธีการ คือการเติม seed โดยจะศึกษาผลของ seed ที่มีการเติมลงไปในช่วงขั้นตอนการตกผลึกอีกวิธีหนึ่งคือกระบวนการตกผลึกกรดซัคซินิกจากน้ำหมักโดยตรง ไม่มีการเติมสิ่งใดลงไป ปกติการเกิดการตกผลึกได้เอง โดยทั้งสองวิธีนี้จะต้องมีการศึกษาขนาด รูปร่าง และลักษณะผลึกที่เกิดขึ้น รวมทั้งมีการนำผลึกที่ได้ไปส่องดูลักษณะด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ทั้งนี้ผลจากกระบวนการ unseeding เกี่ยวข้องกับการตกผลึกที่มี metastable zone ที่ใหญ่ เกิดการจำกัดในขั้นตอนการเกิดนิวเคลียส (nucleation stage) ส่งผลต่อผลึกที่ได้มีคุณภาพต่ำ (แสดงดังตาราง 8)

ตาราง 8 แสดงการตกผลึกของกรดซัคซินิกที่การทดลองต่างกัน

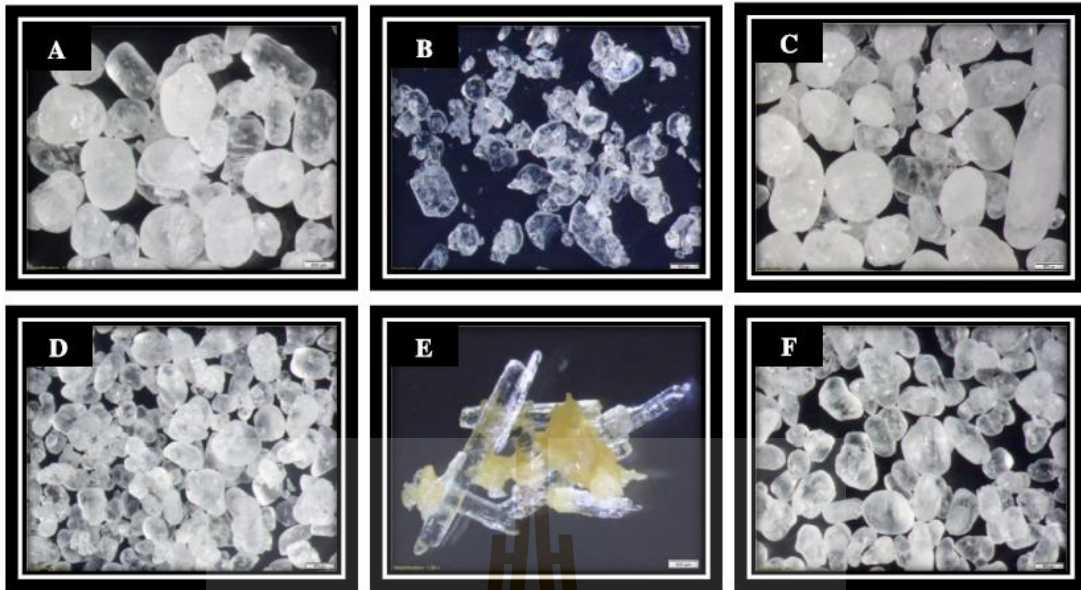
	Low seeding (10%)	High seeding (5%)	Unseeding (0%)
Recovery rate (%)	93.23	92.46	95.02
Purity (%)	99.18	99.35	96.86
Glucose removal	99.65	99.94	98.71
Protein removal (%)	99.85	99.97	99.50
Color	White	White	White
Optical density at 420 nm (100 g/L solution)	0.015	0.018	0.022

ขนาดของผลึก หรือ particle size distribution ที่เติม seeding ต่างๆกัน คือ 0%, 5% และ 10% แสดงดังรูปภาพ 31 และ 32 จากการที่เติม seeding นั้นพบว่าจะได้ขนาดของผลึกที่ใหญ่ขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับที่ไม่ได้เติม seed (unseeding) ที่ high seeding พบว่าจะได้ขนาดของผลึกที่ใหญ่กว่า มีลักษณะใสกว่าแบบ low seeding ทั้งยังเป็น high seeding ผลึกที่ได้ออกมาจะมีลักษณะที่ใกล้เคียงกับผลึกทางการค้า โดยมีขนาดประมาณ 431 ไมครอน ตรงกันข้ามกับ unseeding จะมีขนาดเล็กประมาณ 260 ไมครอน ความกว้างของผลึกอยู่ที่ 1.24 (ดังรูปภาพ 32)



รูปภาพ 31 การเปรียบเทียบขนาดของผลึกกรดซัคซินิกที่ต่าง ๆ กัน รวมทั้งผลึกทางการค้า

จากรูปภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของผลึกกรดซัคซินิกนั้น ถ้าเป็นผลึกที่มีคุณภาพดีนั้น จะต้องมัลักษณะเหมือนกัน รูปร่างอาจมีลักษณะคล้ายเข็ม สีเหลืองขมปนเปือกปน วงกลม ตรงกันข้ามกับในรูปภาพ 32B เป็นผลึกจากกระบวนการ unseeding จะแสดงลักษณะของผลึกที่รูปร่างไม่แน่นอน มีคุณภาพไม่ดี เช่นเดียวกับผลจาก XRD ที่แสดงผลึกที่มีความหนาแน่นต่ำ มีผลต่อผลึกที่ได้ไม่สมบูรณ์ (รูปภาพ 32) แตกต่างจากผลึกที่ได้จากกระบวนการที่มีการเติม seeding ต่างๆ อีกทางหนึ่ง อัตราการเกิดนิวเคลียส (nucleation rate) ในกระบวนการ unseeding จะเกิดเป็นผลึกมากกว่าการสร้างนิวเคลียส (Nagy *et al.*, 2008) อีกทั้งหากมีสารประกอบอื่นๆ ในตัวอย่าง เช่น สารสีหรือเศษต่างๆ จะเกิดเป็นของแข็งผลึก จับตัวกันเอง ซึ่งจะสามารถเห็นได้อย่างง่ายดายโดยภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนในตัวอย่างที่ไม่ผ่านนาโนฟิลเตอร์ จะเห็นผลึกกรดซัคซินิกเกาะอยู่กับจับแมกนีเซียมซัลเฟตที่เป็นของแข็งอย่างแน่น



รูปภาพ 32 รูปถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของผลึกกรดซัคซินิคที่เกิดขึ้นจากการทดลองต่างๆ โดยที่ (A) คือ seed (B) คือ unseeding (C) คือ high seeding (D) คือ low seeding (E) คือ ตัวอย่างที่ไม่ผ่านนาโนฟิลเตรชัน และ (F) คือ ผลึกที่ขายทางการค้า

ตาราง 9 แสดงค่า relative crystallinity ของตัวอย่างจาก low seeding โดยสามารถคำนวณได้เป็น 96.77% เมื่อเทียบกับมาตรฐาน พบว่าได้ค่าสูงกว่า high seeding ซึ่งเท่ากับ 92.92% และ unseeding คือ 23.37%

ตาราง 9 ผลของกระบวนการที่มีผลต่อผลึก phase purity และลักษณะของผลึกที่ได้

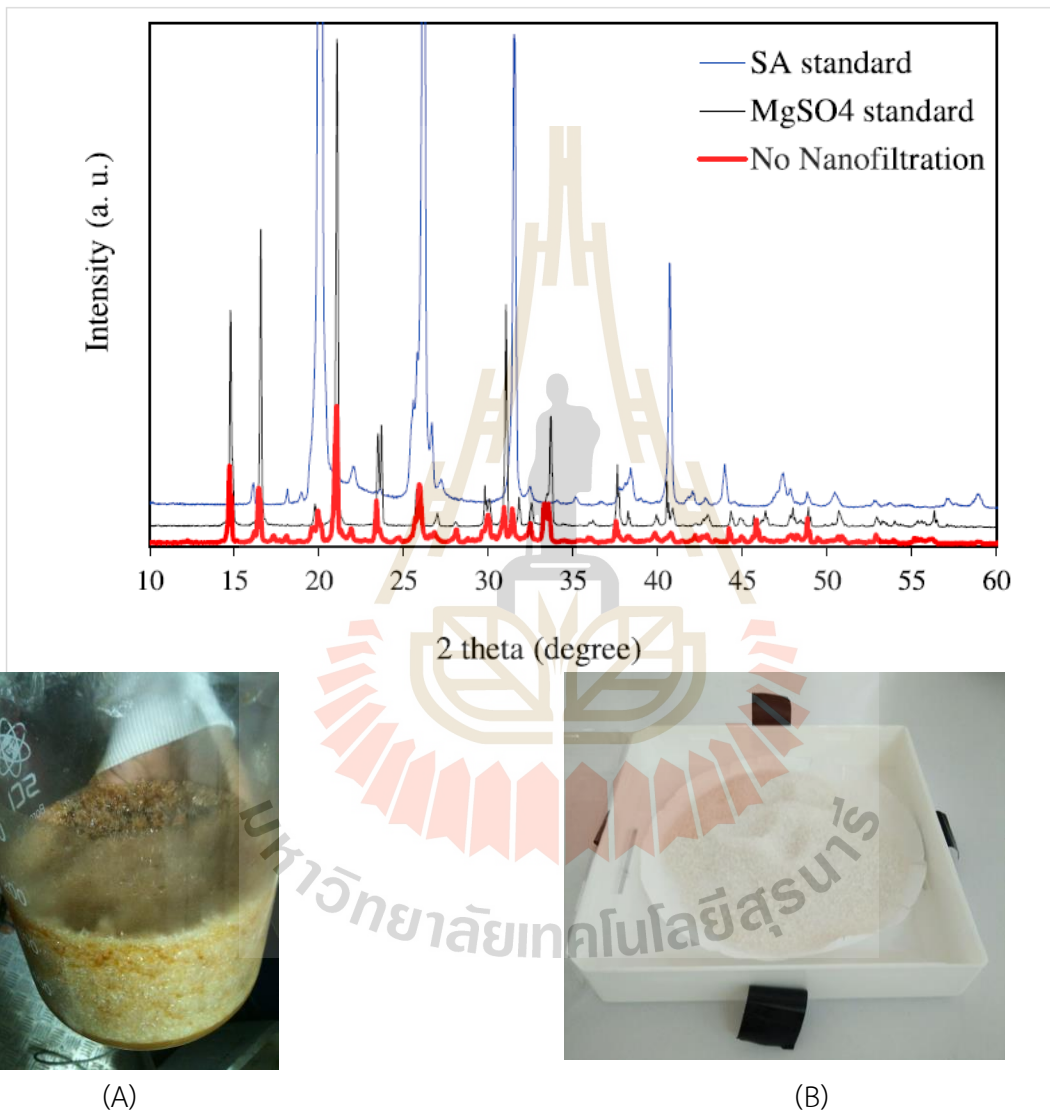
ตัวอย่าง	Relative crystallinity (%) ^a	Succinic acid-MgSO ₄ (%) ^b	รูปร่างของผลึก ^c
มาตรฐาน	100	100-0	รูปหกเหลี่ยม ทรงกลม ทรงกระบอกสั้น
Low seeding	92.92	100-0	รูปหกเหลี่ยม ทรงกลม ทรงกระบอกสั้น
High seeding	96.77	100-0	รูปหกเหลี่ยม ทรงกลม ทรงกระบอกสั้น
Unseeding	23.37	100-0	คล้ายแผ่นแก้วบางๆ สี่เหลี่ยมขนมเปียกปูน คล้ายเข็มแหลม
No Nanofiltration	3.37	42.95-57.05	คล้ายเข็มแหลม

หมายเหตุ: a คือ ได้จาก XRD data

b คำนวณจาก DIFFaX

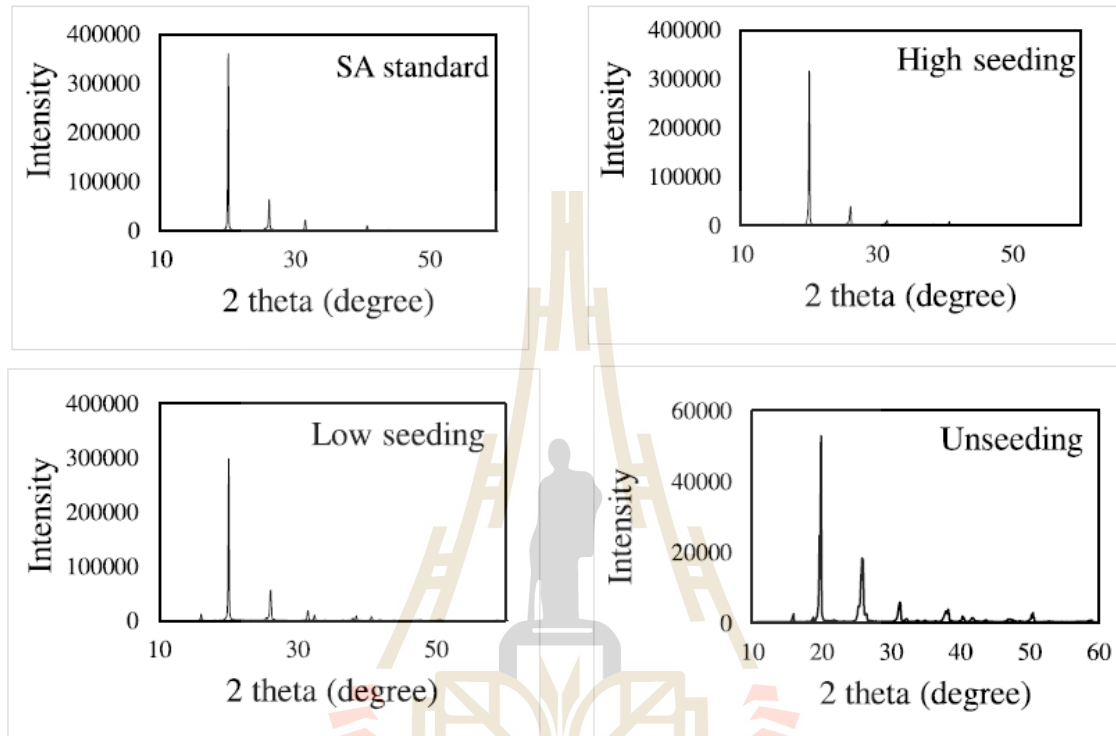
c จากรูปจากกล้องจุลทรรศน์แบบ SEM

นอกจากนี้ผลึกที่ติดอยู่บนพื้นผิวของ magnesium sulfate สามารถแสดงได้ดังรูปภาพ 33 ซึ่งแสดงเป็น XRD pattern แสดงเป็น intense peak สำหรับผลึกที่ได้จากตัวอย่างที่ไม่ผ่านนาโนฟิลเตรชัน โดยจะเห็นได้ว่ามี peak ที่ไม่สามารถระบุแน่ชัดอยู่จำนวนมาก



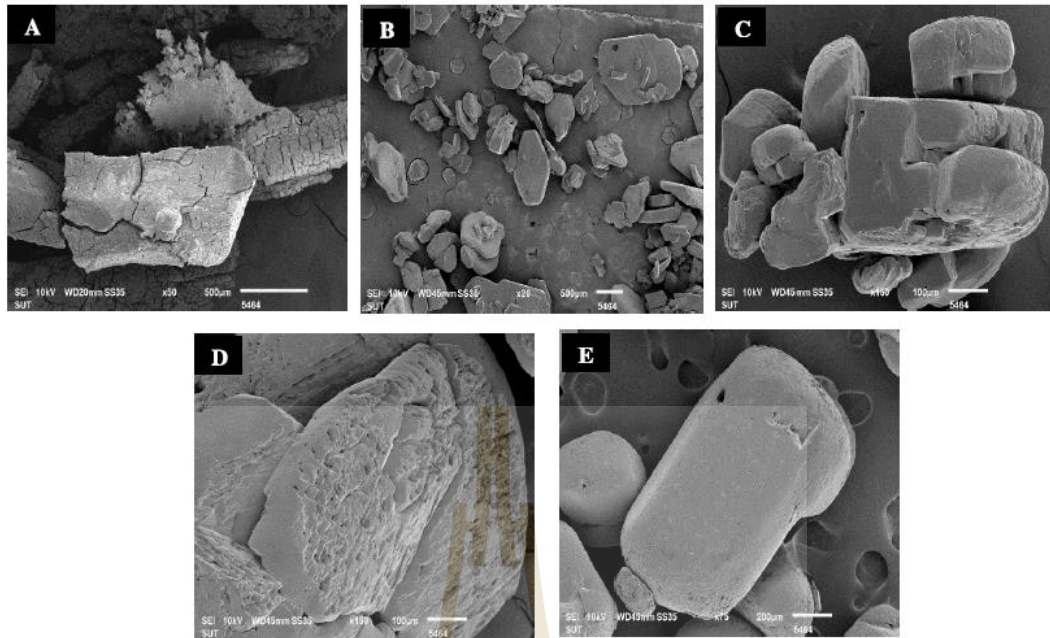
รูปภาพ 33 แสดง XRD pattern ของผลึกกรดซัคซินิกที่ได้จากตัวอย่างที่ไม่ผ่านนาโนฟิลเตรชัน, succinic acid standard และ magnesium sulfate standard และรูปผลึกที่ได้จากตัวอย่างที่ไม่ผ่านนาโนฟิลเตรชัน (A) และตัวอย่างที่ผ่านนาโนฟิลเตรชัน (B)

ผลึกที่มีขนาดใหญ่ขึ้นจะมีค่าความบริสุทธิ์ของผลึกเพิ่มขึ้นด้วย เนื่องจากมีพื้นที่ผิวสัมผัสมากกว่าผลึกที่มีขนาดเล็ก จึงสามารถกำจัดสิ่งสกปรกที่ปนเปื้อนมาในตัวอย่างออกจาก mother liquor นอกจากนี้โครงสร้างภายในรูปจาก XRD พบว่าผลึกที่มีค่า relative crystallinity สำหรับ seeding ต่ำจะมีค่าสูงกว่า seeding สูง (แสดงดังรูปภาพ 34)



รูปภาพ 34 แสดง XRD pattern ของผลึกกรดซัคซินิคที่ได้จากกระบวนการตกผลึกที่สภาวะต่างๆกัน

ผลึกที่ได้จะนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิด SEM จากรูปภาพ 35D เป็นรูปผลึกจาก high seeding พบว่าจะมีพื้นที่ผิวที่ขรุขระ และมีรูเล็กๆจำนวนมาก ต่างจากรูปภาพ 35C ที่เป็นผลึกจาก low seeding ลักษณะจะเป็นเหมือนคอนกรีต มีมุม มีเหลี่ยม จากผลการศึกษานี้จึงยืนยันได้ว่า seeding มีผลต่อลักษณะการเกิดผลึก ขนาด และรูปร่าง มีการบังคับในขั้น primary nucleation rate เพื่อให้ได้ขนาดผลึกที่ใหญ่ที่สุด เป็นการควบคุมการตกผลึกของกรดซัคซินิคที่สำคัญที่สุด



รูปภาพ 35 รูปภาพจาก SEM ของผลึกกรดซัคซินิก (A) ไม่ผ่านนาโนฟิลเตชัน (B) unseeding (C) high seeding (D) low seeding และ (E) ผลึกที่ขายทางการค้า

จากการทดลองการตกผลึกของกรดซัคซินิกนั้นพบว่า ตัวอย่างที่ไม่ผ่านกระบวนการนาโนฟิลเตชัน เมื่อเกิดการตกผลึก จะเกิดเป็นผลึกที่มีสีเหลือง ไม้ใส และคุณภาพต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ผ่านนาโนฟิลเตชัน พบว่ามีสีขาว ลักษณะใสคล้ายแก้ว คุณภาพของผลึกแตกต่างกันตามลักษณะการ seeding (ตามรูปภาพ 36)



รูปภาพ 36 ตัวอย่างผลึกที่เกิดขึ้นจากการทดลองที่ใช้กระบวนการต่างๆกัน

ผลึกจากกระบวนการ seeding ต่างๆกัน จะเกิดรูปร่างลักษณะของผลึกและคุณภาพผลึกที่ได้ ออกมาแตกต่างกัน ทั้งนี้เกิดจากขั้นตอนที่เรียกว่า primary nucleation เป็นกระบวนการเกิดนิวเคลียส ของผลึกชั้นปฐมภูมิ โดยทั่วไปแล้วกระบวนการ high seeding จะเกิดเป็นผลึกที่มีขนาดใหญ่กว่า low seeding เนื่องจากมีพื้นที่ผิวมากในการที่ตัวอย่างจะเกาะและเกิดเป็นผลึกขึ้นมา การเกิดนิวเคลียสชั้น ทุติยภูมิ (secondary nucleation) ถูกจำกัด ทำให้อัตราการเกิดเป็นผลึกเด่นขึ้นมากกว่าการเกิด นิวเคลียส (Wijaya *et al.*, 2013) ผลึกจาก high seeding มีขนาดที่ใหญ่กว่า low seeding ซึ่งผล การศึกษานี้คล้ายคลึงกับงานของ Wijaya และคณะ ดังนั้นหากมีสิ่งปนเปื้อนในตัวอย่างจะเกิดการดูดซับ บนผลึกของ seed ที่เติมลงไป และจับตัวกันเป็นของแข็งบนผิวผลึกผลิตภัณฑ์ที่ต้องการได้ ดังนั้น กระบวนการพรีทรีตเมนต์ด้วยไมโครฟิลเตชัน นาโนฟิลเตชัน รวมถึงการระเหยหรือ evaporation เพื่อ กำจัดสารประกอบรวมทั้งสารสีที่ไม่เกี่ยวข้องออกจนหมด ไม่เกิดการเจริญเป็นผลึกหรือของแข็งใดๆเกาะ อยู่บนผิวของผลึกกรดซัคซินิกที่ต้องการ เหลือแต่เพียงผลึกกรดซัคซินิกที่บริสุทธิ์สูง จะทำให้ผลึกที่ได้ใน ขั้นตอนสุดท้ายมีขนาด ลักษณะ และคุณภาพที่ดี เทียบเท่ากับผลึกมาตรฐานทางการค้าได้

บทที่ 4 บทสรุป

4.1 สรุปผลการทดลอง

กระบวนการทำบริสุทธิ์กรดซัคซินิกด้วยการตกผลึกนั้น ต้องอาศัยกระบวนการหลายขั้นตอนทำงานร่วมกัน เพื่อให้ได้ผลึกกรดซัคซินิกที่มีคุณภาพเทียบเท่ากับเชิงพาณิชย์เริ่มตั้งแต่ไมโครฟิลเตชันใช้สำหรับแยกเซลล์แบคทีเรียออกจากน้ำหมัก จากนั้นเข้าสู่โนฟิลเตชัน เป็นเทคนิคในการแยกผลิตภัณฑ์ประเภทกรดอินทรีย์ชนิดได้อย่างมีประสิทธิภาพ ถือว่าเป็นเทคนิคที่ทำบริสุทธิ์กรดซัคซินิกได้เป็นอย่างดี เนื่องจากสามารถกำจัดสารอื่นๆ ทั้งยังเป็นเทคนิคในการช่วยแยกสารอื่นๆ สารสี รวมถึงโปรตีนไม่ต้องการออกไป ซึ่งจะมีผลต่อกระบวนการตกผลึกในขั้นตอนสุดท้าย หากไม่มีขั้นตอนนี้แล้วนั้น ผลึกกรดซัคซินิกที่ได้จะไม่มีคุณภาพ ตามด้วยการระเหย จะแยกสารที่ระเหยง่ายออกไป ทำให้ได้ตัวอย่างที่ค่อนข้างบริสุทธิ์เพื่อเข้าสู่กระบวนการตกผลึก ดำเนินการที่อุณหภูมิต่ำ ทำให้ได้ผลึกกรดซัคซินิกที่มีคุณภาพ และมีความบริสุทธิ์สูง สีใส ผลึกไม่มีสีเหลือง ใกล้เคียงกับผลึกทางการค้าตามไปด้วย โดยไม่จำเป็นต้องเติมสารเคมีหรือส่วนประกอบเสริมใดๆ ถือว่าเกิดความคุ้มค่าทางเศรษฐกิจได้อีกผลงานหนึ่ง



เอกสารอ้างอิง

- Aamir, E., Nagy, Z. K., & Rielly, C. D. (2010). Optimal seed recipe design for crystal size distribution control for batch cooling crystallisation processes. *Chemical Engineering Science*, 65(11): 3602-3614.
- Abidin, S. Z., Ling, G. K. F., Abdullah, L. C., Ahmad, S., Yunus, R., & Choong, T. S. Y. (2009). Effects of temperature and cooling modes on yield, purity and particle size distribution of dihydroxystearic acid crystals. *European Journal of Scientific Research*, 33: 471-479.
- Al-Amoudi, A. and Lovitt, R. W. (2007). Fouling strategies and the cleaning system of NF membranes and factors affecting cleaning efficiency. *Journal of Membrane Science*, 303(1-2): 4-28.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2): 248-254.
- Brás, T., Guerra, V., Torrado, I., Lourenço, P., Carvalheiro, F., Duarte, L. C. and Neves, L. A. (2014). Detoxification of hemicellulosic hydrolysates from extracted olive pomace by diafiltration. *Process Biochemistry*, 49(1): 173-180.
- Bouchoux, A., Roux-de Balman, H. and Lutin, F. (2006). Investigation of nanofiltration as a purification step for lactic acid production processes based on conventional and bipolar electro dialysis operations. *Separation and Purification Technology*, 52(2): 266-273.
- Choi, J.-H., Fukushi, K. and Yamamoto, K. (2008). A study on the removal of organic acids from wastewaters using nanofiltration membranes. *Separation and Purification Technology*, 59(1): 17-25.
- Emrani, P., Fatemi, S., & Ashraf Talesh, S. (2011). Effect of synthesis parameters on phase purity, crystallinity and particle size of SAPO-34. *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering (IJCCE)*, 30(4): 29-36.
- Emrani, P. F., Shohreh. (2011). Effect of Synthesis Parameters on Phase Purity, Crystallinity and Particle Size of SAPO-34.
- Ferguson, S., Morris, G., Hao, H., Barrett, M., & Glennon, B. (2014). Automated self seeding of batch crystallizations via plug flow seed generation. *Chemical Engineering Research and Design*, 92(11): 2534-2541.
- Gerberding, S. J. (2012). Purification of succinic acid from the fermentation broth containing aminium succinate. Pub. No.: US 2012/0289742 A1.
- Kang, S. H., Chang, Y. K. and Chang, H. N. (2004). Recovery of ammonium lactate and

- removal of hardness from fermentation broth by nanofiltration. *Biotechnology progress*, 20(3): 764-770.
- Li, Q., Wang, D., Wu, Y., Li, W., Zhang, Y., Xing, J., & Su, Z. (2010). One step recovery of succinic acid from fermentation broths by crystallization. *Separation and Purification Technology*, 72(3): 294-300.
- Lubsungneon, J., Srisuno, S., Rodtong, S. and Boontawan, A. (2014). Nanofiltration coupled with vapor permeation-assisted esterification as an effective purification step for fermentation-derived succinic acid. *Journal of Membrane Science*, 459: 132-142.
- Meynial-Salles, I., Dorotyn, S., & Soucaille, P. (2008). A new process for the continuous production of succinic acid from glucose at high yield, titer, and productivity. *Biotechnol Bioeng*, 99(1): 129-135.
- Nagy, Z. K., Chew, J. W., Fujiwara, M., & Braatz, R. D. (2008). Comparative performance of concentration and temperature controlled batch crystallizations. *Journal of Process Control*, 18(3): 399-407.
- Nagy, Z. K., Fujiwara, M., & Braatz, R. D. (2008). Modelling and control of combined cooling and antisolvent crystallization processes. *Journal of Process Control*, 18(9): 856-864.
- Sander, A., & Kardum, J. P. (2012). Pentaerythritol crystallization – Influence of the process conditions on the granulometric properties of crystals. *Advanced Powder Technology*, 23(2): 191-198.
- Sosa, P. A., Roca, C. and Velizarov, S. (2016). Membrane assisted recovery and purification of bio-based succinic acid for improved process sustainability. *Journal of Membrane Science*, 501: 236-247.
- Sun, Y., Yan, L., Fu, H., & Xiu, Z. (2014). Salting-out extraction and crystallization of succinic acid from fermentation broths. *Process Biochemistry*, 49(3): 506-511. 23
- Wijaya Hermanto, M., Phua, A., Shan Chow, P., & Tan, R. B. H. (2013). Improved C-control of crystallization with reduced calibration effort via conductometry. *Chemical Engineering Science*, 97: 126-138.
- Wong, S. Y., Bund, R. K., Connelly, R. K., & Hartel, R. W. (2012). Designing a lactose crystallization process based on dynamic metastable limit. *Journal of food engineering*, 111(4): 642-654.

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ(ภาษาไทย) นาย.....อภิชาติ.....นามสกุล...บุญทาวน.....

(ภาษาอังกฤษ) Mr.....Apichat Boontawan.....

ตำแหน่งปัจจุบัน

รองศาสตราจารย์ ประจำสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
111 ถนน มหาวิทยาลัย ต.สุรนารี อ.เมือง จ.นครราชสีมา 30000
Tel: 044-224234; Fax: 044-224154; E-mail: apichat@sut.ac.th

ประวัติการศึกษา

ระดับการศึกษา	ปีที่สำเร็จการศึกษา	สถานศึกษา	วิชาเอก
ปริญญาตรี	2537	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร
ปริญญาโท	2543	University of Birmingham, U.K.	Biochemical Engineering
ปริญญาเอก	2548	Imperial College London, U.K.	Chemical Engineering

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
Bioreseparation Engineering, Membrane separation processes

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ

- 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 Lubsungneon, J., Srisuno, S., Rodtong, S., and Boontawan, A., (2014) Nanofiltration coupled with Vapor Permeation-Assisted Esterification as an Effective Purification Step for Fermentation-Derived Succinic Acid, *J Membr Sci*, 459: 132-142

งานประชุมทั้งในระดับชาติและนานาชาติ

1. **Boontawan, A.**, Schausberger, P., Boesch 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. (Poster presentation)
2. Boesch, 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. (Oral presentation)
3. 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. (Poster presentation)

4. **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. (Oral presentation)
5. **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 (Oral presentation)
6. 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. (Poster presentation)
7. **Boontawan, A.** Molecular Diffusion in PVA Membrane for Separation Dehydration of EtOH/H₂O Mixtures using Vapor Permeation Technique. *Nanotech Insight Conference*, 29th March-2nd April 2009, Barcelona, Spain. (Poster presentation)
8. Molina S., Lertsiriyothin W., and Boontawan A., Production and Purification of D-(-)-Lactic Acid from Concentrated Fermentation Broth using Esterification, Distillation, and Hydrolysis Techniques, *The 4th international on fermentation technology for value added agricultural products (FERVAAP 2011)*, 29th-31st August 2011, Khon Khan, Thailand (Oral presentation)