

รหัสโครงการ SUT3-304-56-12-14



รายงานการวิจัย

การทำบริสุทธิ์กรดซักซินิกจากน้ำหมักด้วยวิธีตกตะกอน
เอสเทอร์รีฟิเคชัน การกลั่นและไฮโดรไลซิส

Purification of succinic acid from fermentation
broth using precipitation, esterification,
distillation, and hydrolysis techniques

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT3-304-56-12-14



รายงานการวิจัย

การทำบริสุทธิ์กรดซักซินิกจากน้ำหมักด้วยวิธีตกตะกอน
เอสเทอร์รีฟิเคชัน การกลั่นและไฮโดรไลซิส
Purification of succinic acid from fermentation
broth using precipitation, esterification,
distillation, and hydrolysis techniques

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร. อภิชาติ บุญทาวิน

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

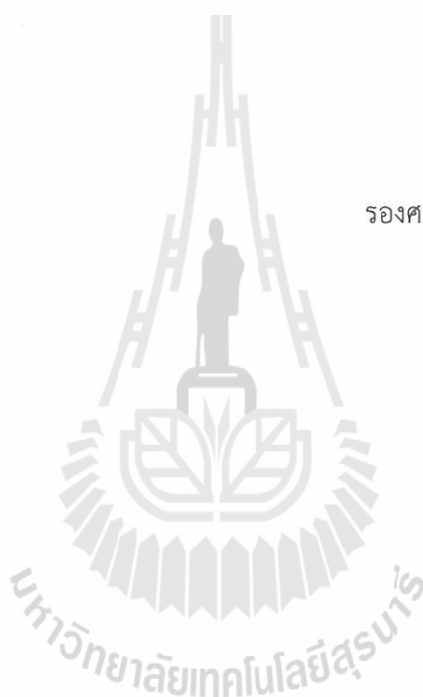
ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2555

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

กรกฎาคม 2558

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รองศาสตราจารย์ ดร. อภิชาติ บุญทาวัน
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อภาษาไทย

กระบวนการแยกแบคทีเรียนาโนพิวเตรชันและการแยกไอผ่านเยื่อแผ่น ได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการทำบริสุทธิ์กรดซัคซินิกที่ได้จากกระบวนการหมัก เชื้อแบคทีเรีย *Actinobacillus succinogens* ATCC 55618 ได้ถูกใช้เป็นตัวผลิตกรดซัคซินิกในถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ได้ทำการติดตั้งเมมเบรนแบบไมโครพิวเตรชันด้านใน น้ำหมักใสที่แยกออกมาได้จะถูกนำไปเข้าสู่กระบวนการทำบริสุทธิ์ในขณะที่เซลล์แบคทีเรียที่ถูกกักกัน ภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพจะถูกใช้ในกระบวนการหมักในรอบถัดไป และมีการใช้ปูนขาวในการปรับสภาพความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมัก โดยจะเกิดเป็นเกลือแคลเซียมของกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพของระบบนาโนพิวเตรชันนั้น ได้ทำการใช้เมมเบรนแบบเซรามิกในการทดสอบการแยกสารทั้งในระบบสารสังเคราะห์และน้ำหมักจริง โดยได้ทำการทดสอบการกักกันสารสังเคราะห์ภายใต้สภาวะต่างๆ เช่น ความดัน ความเข้มข้น และค่าความ เป็นกรด-ด่าง ตามลำดับ สำหรับการทดสอบน้ำหมักจริงนั้น พบว่าระบบนาโนพิวเตรชันจะมีจุดเด่น คือสามารถทำการกำจัดโปรตีนซึ่งเป็นสารโมเลกุลใหญ่ได้ ในขณะที่ระบบนี้ไม่สามารถแยกกรดอินทรีย์ออกจากกันได้ ปฏิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันระหว่างกรดซัคซินิกและเอทานอลได้ถูกศึกษา ผลผลิตของไดเอทิลซัคซิเนตขึ้นอยู่กับอัตราส่วนของสารตั้งต้น ในขณะที่อุณหภูมิจะมีอิทธิพลต่อค่าผลิตผลการทำบริสุทธิ์กรดซัคซินิกจากน้ำหมักที่ผ่านกระบวนการนาโนพิวเตรชันได้ถูกศึกษา ผลการทดลองพบว่าผลผลิตและผลิตผลของไดเอทิลซัคซิเนตขึ้นอยู่กับอัตราการกำจัดน้ำเป็นสำคัญ ซึ่งผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ากรดซัคซินิกได้ถูกเปลี่ยนเป็นไดเอทิลซัคซิเนตทั้งหมดเมื่อสิ้นสุดการ ทดลองที่ใช้ระบบการแยกไอผ่านเยื่อแผ่น ช่วยในปฏิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันภายหลังจากการกลั่นลำดับส่วน และการไฮโดรไลซิสแล้ว จะได้สารละลายกรดซัคซินิกที่มีความบริสุทธิ์สูง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

An integrated membrane process that consists of nanofiltration (NF) and vapor permeation (VP) was employed as a series of purification process for fermentation-derived succinic acid. *Actinobacillus succinogens* ATTC 55618 was employed as the succinic acid producer. A submerged microfiltration membrane was equipped in the bioreactor in order to detain bacterial cells inside the bioreactor. The cell-free fermentation broth can be further processed and the detained cells can be used in subsequent batch fermentation. CaCO₃ was used to neutralize the fermentation broth resulting the formation of calcium salts of organic acids. Separation performance of a ceramic NF membrane was examined for both model solutions, and fermentation broth. Rejection of organic acids were investigated for model solutions as a function of feed pressure, feed concentration, and pH, respectively. For fermentation broth, the NF showed its usefulness for protein and color removal rather than separation among organic acids. The esterification reactions of succinic acid with ethanol were initially investigated using model solutions. The yield of diethyl succinate was the function of initial reactant ratio whilst the operating temperature played an important role for productivity. Realistic purification was performed with NF-treated fermentation broth. The yield and volumetric productivity of DES strongly depended on the dehydration rate. Experimental results showed that most succinic acid was converted into DES at the end of the VP-assisted esterification reaction. After fractionation and hydrolysis, a high purity of succinic acid was obtained.

สารบัญเรื่อง

หน้า

กิตติกรรมประกาศ.....	3
บทคัดย่อภาษาไทย.....	4
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	5
สารบัญเรื่อง.....	6
สารบัญภาพ.....	9
สารบัญตาราง.....	13
บทที่ 1 บทนำ.....	16
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหางานวิจัย.....	16
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย.....	17
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม (Literature reviews)	18
2.1 กรดซัคซินิก.....	18
2.1.1 การผลิตกรดซัคซินิกโดยกระบวนการทางเคมี.....	19
2.1.2 การผลิตกรดซัคซินิกโดยกระบวนการหมัก.....	20
2.2 จุลินทรีย์ในการผลิตกรดซัคซินิก.....	23
2.3 การหมักกรดซัคซินิก.....	26
2.3.1 ข้อจำกัดในการหมักกรดซัคซินิก.....	30
2.4 การทำบริสุทธิ์กรดซัคซินิก.....	31
2.4.1 การตกผลึกโดยตรง.....	33
2.4.2 การแยกโดยใช้เทคนิคเมมเบรน.....	34
2.4.3 การตกตะกอน.....	34
2.4.4 การแยกผลิตภัณฑ์ควบคู่กระบวนการหมัก.....	35
2.4.5 ปฏิกริยาเอสเทอร์ริฟิเคชันและการกลั่น.....	36
2.5 การประยุกต์ใช้กรดซัคซินิกในอุตสาหกรรมพลาสติกชีวภาพ.....	40
2.5.1 การตลาดของกรดซัคซินิก.....	41
บทที่ 3 วิธีทำการทดลอง.....	44
3.1 อุปกรณ์และสารเคมี.....	44
3.2. การเลี้ยงเชื้อ <i>Actinobacillus succinogenes</i> ATTC 55618.....	44
3.3 การเตรียมกล้าเชื้อ.....	45

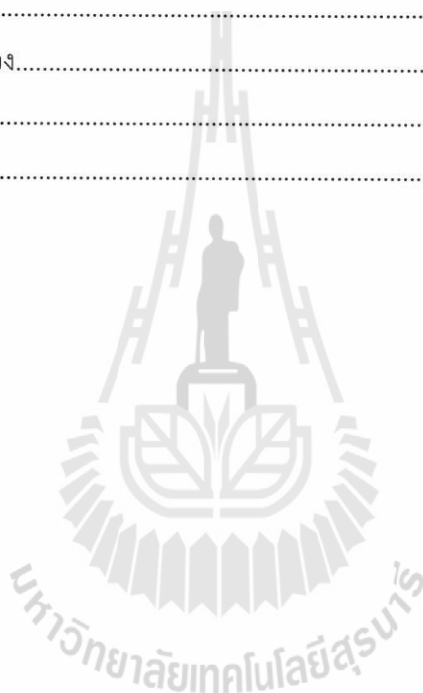
สารบัญเรื่อง (ต่อ)

	หน้า
3.4 กระบวนการหมักแบบกะ.....	45
3.5 กระบวนการหมักแบบกึ่งกะ.....	45
3.6 การวิเคราะห์.....	46
3.7 การเตรียมเอทานอลบริสุทธิ์สำหรับปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน.....	48
3.8 การเก็บและวิเคราะห์ตัวอย่างในขั้นตอนการทำกรดซัคซินิกให้บริสุทธิ์.....	52
3.9 อุปกรณ์และสารเคมี.....	53
3.10 การทำบริสุทธิ์กรดซัคซินิกด้วยเทคนิคนาโนฟิวเตรชัน (Nanofiltration, NF).....	54
บทที่ 4 ผลการทดลองและบทวิจารณ์.....	57
4.1 การหมักแบบกะและการหมักแบบกะซ้ำ (Batch and repeated batch fermentation) ของกรดซัคซินิกโดยใช้แบคทีเรียสายพันธุ์ <i>Actinobacillus succinogenes</i> ATCC 55618.....	57
4.1.1 ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นต่อการเจริญเติบโตของ <i>A. succinogenes</i> ATCC 55618.....	57
4.1.2 กระบวนการหมักแบบกะ.....	59
4.1.3 กระบวนการหมักแบบกึ่งกะ (Fed-batch fermentation).....	62
4.2 การทำบริสุทธิ์ด้วยระบบนาโนฟิวเตรชัน.....	66
4.2.1 การทดสอบระบบด้วยสารละลายกรดซัคซินิก.....	69
4.2.2 การทดสอบระบบด้วยสารป้อนสังเคราะห์ผสม.....	72
4.2.3 การทดสอบระบบด้วยน้ำหมักจริง.....	78
4.3 ตกตะกอนกรดซัคซินิก.....	82
4.4 ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันของกรดซัคซินิกและสารละลายเอทานอลโดยใช้เป็นสารละลาย ต้นแบบของระบบ.....	82
4.4.1 การศึกษาจลนพลศาสตร์ของปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันของกรดซัคซินิกกับ เอทานอล (Reaction kinetics of succinic acid esterification with ethanol).....	82
4.4.2 ผลของอัตราส่วนโดยโมลของสารละลาย.....	90
4.4.3 ผลของอุณหภูมิ.....	93
4.5 กระบวนการ VP-assisted esterification ของกรดซัคซินิกและเอทานอล.....	95
4.5.1 ประสิทธิภาพกระบวนการ Dehydration ของเยื่อแผ่นเซรามิค.....	95

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

หน้า

4.5.2. กระบวนการ VP-assisted esterification ของน้ำมันที่ได้ผ่านระบบนาโนฟิวเทชั่น (Nanofiltration, NF).....	96
4.5.3 กระบวนการ Fractionation และไฮโดรไลซิส.....	97
4.5.4 การคำนวณต้นทุนการผลิต และการคำนวณอัตราการใช้พลังงาน (energy consumption).....	100
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	106
บรรณานุกรม.....	107
ประวัติผู้วิจัย.....	110



สารบัญภาพ

	หน้า
รูปภาพ 1	โครงสร้างทางเคมีของกรดซัคซินิก.....18
รูปภาพ 2	วิธีปฏิกิริยาของ n – butane กลายเป็น Maleic anehydride (Hepburn, 2011)19
รูปภาพ 3	วิธีการเผาผลาญของกรดซัคซินิกที่ผลิตจุลินทรีย์โดยทั่วไป (McKinley <i>et al.</i> , 2007)21
รูปภาพ 4	แสดง Catabolic pathway ในกระบวนการผลิตกรดซัคซินิกด้วยน้ำตาล (Song <i>et al.</i> , 2006)28
รูปภาพ 5	แผนผังแสดงกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ของกรดซัคซินิก.....32
รูปภาพ 6	ขั้นตอนในการทำให้บริสุทธิ์ของกรดซัคซินิกจากน้ำหมักด้วยปฏิกิริยา Esterification และวิธีการกลั่น (ดัดแปลงจาก Londono, 2010).....37
รูปภาพ 7	กระบวนการ esterification ของกรดซัคซินิกและเอทานอล.....38
รูปภาพ 8	เคมีภัณฑ์ที่สามารถสังเคราะห์จากกรดซัคซินิก (Song and Lee, 2006).....41
รูปภาพ 9	อุปกรณ์ในการทดลองกระบวนการหมักขนาด 2 ลิตร (Fermentation processes).....46
รูปภาพ 10	แผนภูมิกระบวนการผลิตกรดแลคติกบริสุทธิ์โดยใช้เอทานอลในกระบวนการ esterification.....49
รูปภาพ 11	วัฏจักรของเอทานอลในระบบสำหรับปฏิกิริยา esterification กับกรดอินทรีย์.....50
รูปภาพ 12	แสดงการทดลองระบบการกลั่นเอทานอลบริสุทธิ์แบบต่อเนื่องจากน้ำหมัก.....52
รูปภาพ 13	การใช้ระบบนาโนฟิวเตรชันในการแยกกรดซัคซินิกจากน้ำหมัก แสดงเป็นแผนผัง การติดตั้งระบบ (A) และ การติดตั้งระบบการทดลองจริง (B) (Lubsungneon <i>et al.</i> , 2014).....54
รูปภาพ 14	<i>Actinobacillus succinogenes</i> ATCC 55618.....57
รูปภาพ 15	แผนภาพบรรยายการบริโภคน้ำตาลกลูโคสของเซลล์และความเข้มข้นของเซลล์ ในระหว่างกระบวนการหมักแบบกะเทียบกับเวลา โดย <i>A. succinogenes</i> . ATCC 55618.....61
รูปภาพ 16	แผนภาพบรรยายความเข้มข้นกรดซัคซินิกและกรดอินทรีย์ผลพลอยได้ในระหว่าง กระบวนการหมักแบบกะเทียบกับเวลาโดย <i>A. succinogenes</i> . ATCC 55618....61

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

รูปภาพ 17	แสดงผลการเจริญของเซลล์ การใช้กลูโคส และการเกิดผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ โดยทำการเปรียบเทียบระหว่างการทำแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ (บน) และผลที่ได้จากการ ทดลอง (ล่าง).....66
รูปภาพ 18	อิทธิพลของสภาวะการทดลองต่าง ๆ ต่อค่าการกักกัน ของสารละลายกรดซัคซินิก โดย รูป (A) แสดงอิทธิพลของแรงดัน (B) คือผลของความเข้มข้นเริ่มต้นและ (C) คืออิทธิพลของค่าความเป็นกรด-ต่าง.....68
รูปภาพ 19	แสดงปัจจัยในการกักกันสารของเยื่อแผ่นนาโนฟิวเดชั่น (NF membrane) ของสารละลายป้อนสังเคราะห์ ที่ค่า pH, ความเข้มข้นของสารป้อน และ ความดันที่แตกต่างกัน การทดลองทั้งหมดมีการควบคุมอุณหภูมิที่ 30.5 องศาเซลเซียส.....70
รูปภาพ 20	การเปลี่ยนแปลงค่า permeate flux และค่าการกักกันของเยื่อแผ่น ในระบบ นาโนฟิวเดชั่นโดยมีสารป้อนเป็นสารสังเคราะห์และน้ำหมักจริง โดยที่ดำเนินการ ทดลองที่สภาวะความดัน 400 kPa pH ที่ 2.5 และอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส....73
รูปภาพ 21	การหาความต้านทานของเมมเบรน NF โดยใช้กระบวนการล้าง (A) ฮีทโทแกรม ของแสดงสารละลายผสมที่มีในสารป้อนและ permeate ในระบบ NF (B) และรูปภาพ แสดงประสิทธิภาพการกำจัดสีของระบบ NF (C).....75
รูปภาพ 22	รูป SEM ที่ได้จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนที่มีการตัดขวาง เพื่อเห็นพื้นผิว ด้านบนของเยื่อแผ่นเซรามิก โดยที่ (A) แสดงเมมเบรนที่ถ่ายด้านข้างพบว่า ปกคลุมด้วยชั้นแค้กหนาที่บนผิวหน้า (B) คือ พื้นผิวด้านบนของเยื่อแผ่นที่มี ชั้นแค้กเกาะหนา (C) เป็นรูปที่ถ่ายด้านข้างของเยื่อแผ่นเมมเบรนที่สะอาด และ (D) คือพื้นผิวด้านบนของเมมเบรนที่สะอาด.....76
รูปภาพ 23	การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารละลายผสมในกระบวนการ diafiltration โดยเทียบกับเวลา (A) และจากน้ำหมัก (B) โดยที่มีการควบคุม สภาวะให้มีความดันอยู่ที่ 400 kPa ค่า pH 2.5 และอุณหภูมิ 30.5 องศาเซลเซียส.....77
รูปภาพ 24	การตกตะกอนของแคลเซียมคาร์บอเนตในถังตกตะกอนภายนอก.....79
รูปภาพ 25	ความเข้มข้นของโปรตีนคงเหลือจากการตกตะกอนแคลเซียมซัคซินेट.....82
รูปภาพ 26	แสดงปฏิกิริยาการเกิดเอสเทอร์ของกรดซัคซินิกกับเอทานอล.....82

สารบัญภาพ (ต่อ)

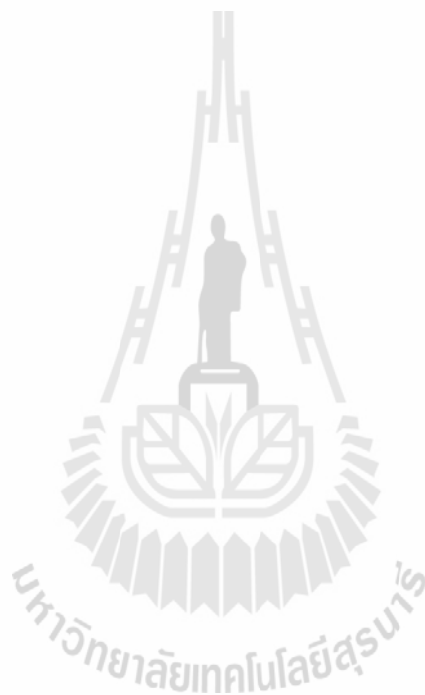
หน้า

รูปภาพ 27	ความเข้มข้นของสารประกอบ ที่ได้จากปฏิกิริยาเอสเทอร์ของกรดซัคซินิกกับเอทานอล.....	90
รูปภาพ 28	การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารชนิดต่างๆในสารละลายเทียบกับเวลา โดยที่ diethyl succinate คือ (-□-), monoethyl succinate คือ (-▽-), ethanol คือ (-○-) และ H ₂ O คือ (-◇-) ระหว่างปฏิกิริยา esterification ของกรดซัคซินิก และ เอทานอล น้ำหนักของกรดซัคซินิกต่อเอทานอลต่อน้ำ ณ เริ่มต้นเป็น 40:63.75:41.75 อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส pH 2.5.....	92
รูปภาพ 29	ค่าความเข้มข้นในปฏิกิริยาระหว่างกรดซัคซินิกและน้ำ ที่มีการควบคุมอุณหภูมิในระบบ ที่ 65 (A), 80 (B) และ 95 องศาเซลเซียส (C) ในทุกๆการทดลอง มีอัตราส่วนเริ่มต้นของกรดซัคซินิกต่อเอทานอลต่อน้ำ คือ 3.5:5.5:1.0, pH = 2.5 อัตราการกวนที่ 500 รอบต่อนาที.....	94
รูปภาพ 30	ความเข้มข้นของสารผสมที่เข้าสู่กระบวนการ VP-assisted esterification ของน้ำหมักที่ได้ผ่าน ระบบ NF โดยที่ในการทดลองมีสภาวะ คือ อุณหภูมิ 145 องศาเซลเซียส A/V ₀ ratio 470 ต่อตารางเมตร อัตราส่วนโมลาร์ของกรดซัคซินิก:เอทานอล:น้ำ = 3:12:5.5, pH = 2.5 และความดันด้านสารป้อน feed pressure ของระบบ VP = 400 kPa ตามลำดับ.....	97
รูปภาพ 31	โครมาโทแกรมของน้ำหมัก (รูปบน) และกรดซัคซินิกที่ทำบริสุทธิ์ (รูปล่าง) retention times ของกรดฟอร์มิก กรดแลคติก กรดอะซิติก และกรดซัคซินิก คือ ที่ 9.97, 12.05, 13.6 และ 19.60 นาที ตามลำดับ สำหรับสภาวะไฮโดรไลซิส คือ 3 %โดยน้ำหนักของ Amberlyst 15-E (Rhom & Haas) อัตราส่วนโมลของน้ำต่อ diethyl succinate เท่ากับ 15:1 และอุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ตามลำดับ.....	99
รูปภาพ 32	ภาพ SEM ของผลึกกรดซัคซินิก (A) ผลึกกรดซัคซินิกจากสารเคมีเชิงพาณิชย์ และ (B) ผลึกกรดซัคซินิกจากการตกผลึก.....	99
รูปภาพ 33	การวิเคราะห์สัณฐานต้นทุนทางด้านวัตถุสำหรับการหมักและการทำบริสุทธิ์กรดซัคซินิก จากน้ำหมักโดยวิธีเอสเทอร์ฟิเคชัน การกลั่นและไฮโดรไลซิส.....	102

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

รูปภาพ 34	การวิเคราะห์สัดส่วนการใช้พลังงานของหน่วยปฏิบัติการต่าง ๆ สำหรับการหมัก และการทำบริสุทธิ์กรดซัคซินิกจากน้ำหมักโดยวิธีเอสเทอร์ฟิเคชัน การกลั่นและ ไฮโดรไลซิส.....	105
-----------	---	-----



สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1	แสดงลักษณะทางเคมีและกายภาพของกรดซัคซินิก (http://en.wikipedia.org)..19
ตาราง 2	แสดงลักษณะความสัมพันธ์ในการผลิตกรดซัคซินิกโดยเชื้อแบคทีเรีย (<i>Zeikus et al.</i> , 1999).....24
ตาราง 3	แสดงกระบวนการหมักกรดซัคซินิกโดยใช้สายพันธุ์จุลินทรีย์แตกต่างกัน (<i>McKinley et al.</i> , 2007).....27
ตาราง 4	สมบัติทางกายภาพและเคมีของ ethyl ester ของ lactic acid, acetic acid, formic acid และ succinic acid.....38
ตาราง 5	ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด AS medium (<i>Liu et al.</i> , 2008).....44
ตาราง 6	ผลกระทบของความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นในการเจริญของ <i>A. succinogenes</i> และความเข้มข้นสุดท้ายของกรดซัคซินิก.....59
ตาราง 7	การสรุปค่าคงที่ต่าง ๆ สำหรับจลศาสตร์การหมักกรดซัคซินิกจากน้ำตาลกลูโคส (<i>Lin et al.</i> , 2008).....64
ตาราง 8	ส่วนประกอบของน้ำหมักหลังจากผ่านกระบวนการฟิเลชั่น.....78
ตาราง 9	ร้อยละการตกตะกอนกรดซัคซินิกในสารละลายที่อุณหภูมิที่แตกต่างกัน ความเข้มข้นเริ่มต้นที่ของซัคซินเนตเริ่มต้นที่ 52 กรัมต่อลิตร.....80
ตาราง 10	ค่า pKa และค่าละลายตัวในน้ำ ที่ 20 ° C ของ การผลิตกรดโดยทั่วไป ในการหมักของ <i>A. succinogenes</i>80
ตาราง 11	เปรียบเทียบค่า binary parameter ของระบบ UNIQUAC และ NRTL.....84
ตาราง 12	ค่า binary parameter ของระบบเอสเทอร์ฟิเคชันของกรดซัคซินิกกับเอทานอล.85
ตาราง 13	ค่าพารามิเตอร์ทางจลศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาเอสเทอร์ของกรดซัคซินิกกับ เอทานอล.....86
ตาราง 14	ความเข้มข้นของสารประกอบ ที่ได้จากปฏิกิริยาเอสเทอร์ของกรดซัคซินิกกับ เอทานอล.....89
ตาราง 15	ปริมาณโมลของกรดซัคซินิกกับเอทานอลระหว่างปฏิกิริยา esterification ณ จุดเริ่มต้น และจุดสมดุล (equilibrium) ในทุกการทดลองจะมีการควบคุม อุณหภูมิที่ 70 องศาเซลเซียส pH 2.5 ค่าผลผลิตหรือ product yield ($Y_{DES/SA}$) ได้จากจำนวนโมลของ diethyl succinate ที่จุดสมดุลหารด้วยโมลของกรด ซัคซินิกที่เริ่มต้น.....91

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

ตาราง 16	พารามิเตอร์ของกระบวนการ fractionation และไฮโดรไลซิสของ diethyl succinate โดยที่ T_1 คือ อุณหภูมิของของเหลว และ T_2 คืออุณหภูมิของไอตามลำดับ.....	98
ตาราง 17	การคิดต้นทุนทางด้านวัตถุดิบของการหมักและการทำบริสุทธิ์กรดซัคซินิกด้วยวิธีเอสเทอร์ฟิเคชัน กับเอทานอลและไฮโดรไลซิส (คืดอน้ำหมัก 2 ลิตร).....	101
ตาราง 18	การวัดความต้องการพลังงานของหน่วยปฏิบัติการ (unit operation) ต่าง ๆ ของการทำบริสุทธิ์กรดซัคซินิกจากน้ำหมักในระดับห้องปฏิบัติการขนาด 2 ลิตร.....	103

คำอธิบายสัญลักษณ์

m^{-1}	คือ	ต่อตารางเมตร
SEM	คือ	กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด
mBar	คือ	มิลลิบาร์
DI	คือ	ปราศจากอออน
UV	คือ	แสงอุลตราไวโอเลต
kPa	คือ	กิโลปาสคาล
H ₂ O	คือ	น้ำ
g/L ⁻¹ , g/L	คือ	กรัมต่อลิตร
CO ₂	คือ	คาร์บอนไดออกไซด์



บทที่ 1 บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาทางวิจัย

เป็นที่ทราบกันดีแล้วว่า ปัจจุบันนี้ได้มีการพัฒนาและสนใจเกี่ยวกับพลาสติกชีวภาพเป็นอย่างมาก เนื่องจากภาวะโลกร้อนทำให้ทุกประเทศจำเป็นต้องหาแนวทางแก้ไข สำหรับประเทศไทยก็เช่นเดียวกัน ได้มีการส่งเสริมและสนับสนุนเกี่ยวกับการผลิตพลาสติกชีวภาพ ความสนใจในการผลิตกรดซัคซินิกเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมพลาสติกชีวภาพ ถือเป็นอุตสาหกรรมต้นน้ำหมายถึงอุตสาหกรรมการผลิตสารมอนอเมอร์ (monomer) เพื่อที่จะนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเม็ดพอลิเมอร์พลาสติกชีวภาพต่อไป ซึ่งประกอบไปด้วยกระบวนการหลักต่างๆ ได้แก่ กระบวนการหมัก (fermentation process) และกระบวนการทำบริสุทธิ์ (purification process) สำหรับประเทศไทยนั้นมีจุดแข็ง คือ มีวัตถุดิบทางการเกษตรที่มีคุณค่า และราคาถูกทำให้มีการนำมาเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการผลิตที่มีการเชื่อมโยงกับกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพในการผลิตผลต่างๆที่มีประโยชน์ให้เกิดขึ้น กรดซัคซินิกถือเป็นกรดอินทรีย์ชนิดหนึ่งที่สามารถนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตพลาสติกชีวภาพ โดยที่จะมีการใช้กลูโคสไซรัปที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นส่วนประกอบหลัก ถูกนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นหรือวัตถุดิบในการผลิต และยังเป็นผลิตภัณฑ์จากมันสำปะหลังในรูปแบบหนึ่ง ซึ่งมันสำปะหลังนี้มีอยู่มากในจังหวัดนครราชสีมา ซึ่งเป็นที่ตั้งของมหาวิทยาลัยที่ทำการวิจัย ส่งผลให้การจัดการงานวิจัยดำเนินไปได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้มีการพัฒนาทั้งกระบวนการหมักกรดซัคซินิกโดยเชื้อแบคทีเรีย ให้มีความเข้มข้นสูงในน้ำหมัก เพื่อจะส่งผลให้ง่ายต่อการแยกและทำบริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไป ทั้งนี้มีการดำเนินการทางกระบวนการหมักแบบกะและกึ่งกะ เพื่อให้ผลิตกรดซัคซินิกได้ความเข้มข้นที่มากขึ้นจากนั้นจะเข้าสู่กระบวนการแยกและทำให้บริสุทธิ์ ทั้งนี้ผู้วิจัยได้มีพื้นฐานและประสบการณ์ในแยกกรดอินทรีย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกรดแล็กติกอยู่ก่อนหน้านี้อแล้ว จึงทำให้การดำเนินงานมีความใกล้เคียงกัน อีกทั้งอุปกรณ์เครื่องมือต่างๆมีความพร้อม ส่งเสริมการดำเนินการทดลองตามเป้าหมายได้ ระหว่างกระบวนการวิจัยนั้น ทำให้ทราบถึงปัญหาและวิธีการแก้ไขในขั้นตอนทำให้บริสุทธิ์ ซึ่งถือเป็นขั้นตอนที่สำคัญและซับซ้อนอย่างหนึ่ง งานวิจัยนี้ได้มีการรวมวิธีการที่มีประสิทธิภาพ 2 เทคนิคเข้าด้วยกัน คือเทคนิค esterification และการกลั่นโดยหากลั่นประสิทธิภาพสูงที่ได้พัฒนาขึ้นภายในมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยที่จะสามารถกลั่นแยกแยกสารประกอบอื่นๆที่ไม่ต้องการออกจากระบบไป เหลือเพียงเอสเทอร์ของกรดซัคซินิกที่ต้องการ และทำให้ได้ความบริสุทธิ์สูง จากนั้นเอสเทอร์ดังกล่าวจะถูกนำไปทำปฏิกิริยากับน้ำเพื่อให้เกิดปฏิกิริยา

hydrolysis ได้กรดซัคซินิกบริสุทธิ์และเอทานอล เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในงานพลาสติกชีวภาพต่อไป โดยประสิทธิภาพของหอกลิ้นที่ได้ประดิษฐ์ขึ้นนี้ สามารถกลั่นเอทานอลออกจากน้ำหมักแบบต่อเนื่องได้เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 เปอร์เซ็นต์ในขั้นตอนเดียว โดยพบว่ามีประสิทธิภาพดี เท่ากันกับหอกลิ้นเอทานอลที่ใช้กันในอุตสาหกรรมทั่วไป ซึ่งมีจำนวนชั้นมากกว่า 75 ชั้น

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงจะพัฒนากระบวนการผลิตกรดซัคซินิกบริสุทธิ์สูง ให้มีคุณภาพและประสิทธิภาพที่ดี โดยถือเป็นอุตสาหกรรมต้นน้ำของอุตสาหกรรมพลาสติกชีวภาพ จึงเป็นโอกาสอันดีที่มีส่วนสำคัญในการพัฒนาเพื่อสร้างความเข้มแข็ง อีกทั้งเป็นการเพิ่มความสามารถในการแข่งขันของในประเทศไทยอีกระดับหนึ่ง

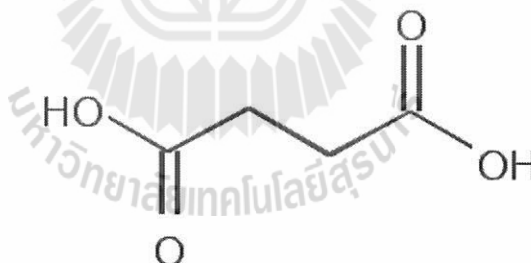
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- 1.2.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักกรดซัคซินิกแบบกะและกึ่งกะภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร โดยใช้แคลเซียมคาร์บอเนต (ปูนขาว) ในการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง เพื่อลดต้นทุนในการผลิต และลดความเป็นพิษที่มีต่อเชื้อแบคทีเรีย โดยจะได้ตะกอนของแคลเซียมซัคซิเนตซึ่งเป็นของแข็ง และสามารถแยกออกจากระบบได้ง่ายในระหว่างกระบวนการหมัก
- 1.2.2 ศึกษาจลศาสตร์ของการทำบริสุทธิ์กรดซัคซินิก จากตะกอนของแคลเซียมซัคซิเนตด้วยเทคนิคเอสเทอร์ริฟิเคชันกับเอทานอล ควบคู่กับการกลั่นเพื่อแยกเอาเอสเทอร์ของกรดอินทรีย์ชนิดอื่นออกไป โดยใช้หอกลิ้นประสิทธิภาพสูงที่ได้พัฒนาขึ้นมาเองภายในมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีและจะผลิตเอทานอลบริสุทธิ์สูงขึ้นมาใช้เองเพื่อลดต้นทุนการผลิต
- 1.2.3 ทำการผลิตกรดซัคซินิกบริสุทธิ์เพื่อเป็นสารตั้งต้น ในการสังเคราะห์พลาสติกชีวภาพตลอดจนศึกษาต้นทุนการผลิตของกระบวนการหมักและการทำบริสุทธิ์ต่อ 1 กิโลกรัมของกรดซัคซินิก
- 1.2.4 ศึกษาสมดุลมวลสาร (mass balance) และสมดุลพลังงาน (Energy balance) ในการออกแบบกระบวนการผลิตกรดซัคซินิก เพื่อที่จะใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการออกแบบโรงงานการผลิตในระดับอุตสาหกรรม

บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม (Literature reviews)

2.1 กรดซัคซินิก

กรดซัคซินิก และมีชื่อสากลตามระบบ IUPAC systematic name ว่า butanedioic acid มีสูตรทางเคมีคือ $C_4H_6O_4$ แสดงดังรูปที่ 1 คุณสมบัติและลักษณะทางกายภาพแสดงดังตารางที่ 1 ทั้งนี้กรดซัคซินิกถือเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่สามารถนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นประยุกต์ได้ในอุตสาหกรรมอย่างหลากหลาย เช่น อุตสาหกรรมอาหาร เภสัชกรรม เคมี ยา อุตสาหกรรมกระดาษ เครื่องสำอางค์ สิ่งทอ และพอลิเมอร์ เป็นต้น กรดซัคซินิกเป็นสารที่พบได้ในธรรมชาติของกระบวนการสร้างและสลาย (Metabolism) เป็นส่วนหนึ่งในวัฏจักรเครปส์ (วัฏจักรกรดซิตริก) กรดซัคซินิกถูกจัดเป็นสารเคมีที่มีการให้ความสำคัญในช่วงไม่กี่ปีที่ผ่านมา และกรดซัคซินิกได้มีความสนใจเพิ่มขึ้น ในการด้านการผลิตที่สามารถผลิตได้จากทรัพยากรทดแทน ผ่านกระบวนการหมักโดยจุลินทรีย์ และยังสามารถใช้เชื้อจุลินทรีย์หลากหลายสายพันธุ์ในการผลิต ทั้งนี้ กรดซัคซินิกถูกจำแนกโดยกรมพลังงานประเทศสหรัฐอเมริกาใน ค.ศ. 2004 ให้เป็นหนึ่งในสิบสองสารเคมีที่มีพื้นฐานมาจากชีวมวล



รูปภาพ 1 โครงสร้างทางเคมีของกรดซัคซินิก

สำหรับการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมทางเคมีนั้น กรดซัคซินิกสามารถนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นที่สำคัญในขั้นตอนการผลิตกรดอะดิพิค (adipic acid), 1,4-butanediol tetrahydrofuran, N-methyl pyrrolidinone, 2-pyrrolidione succinate salts และ gamma-butyrolactone (Song *et al.*, 2006) อย่างไรก็ตามในปัจจุบัน กรดซัคซินิกมีความสำคัญเป็นอย่างมากในการผลิตเป็นพลาสติกชีวภาพที่สามารถย่อยสลายได้ เพื่อทดแทนพลาสติกที่ใช้แพร่หลายในปัจจุบัน

ตาราง 1 แสดง ลักษณะทางเคมีและกายภาพของกรดซัคซินิก (<http://en.wikipedia.org>)

คุณสมบัติ	ปริมาณ
ลักษณะ (ความบริสุทธิ์สูง ที่อุณหภูมิห้อง)	ผลึกของแข็งสีขาวคล้ายคริสตัล ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น
มวลโมเลกุล	118.09 กรัมต่อโมล
ความหนาแน่น	1.56 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร
จุดหลอมเหลว	185-187 องศาเซลเซียส
จุดเดือด	235 องศาเซลเซียส
ความสามารถในการละลายน้ำ	58 กรัมต่อลิตร (20 องศาเซลเซียส)
ค่าความเป็นกรด (pK _a)	pK _{a1} = 4.2 pK _{a2} = 5.6

2.1.1 การผลิตกรดซัคซินิกโดยกระบวนการทางเคมี

กรดซัคซินิกที่ผลิตในเชิงพาณิชย์โดยกระบวนการทางปิโตรเลียมโดย Maleic anhydride ซึ่งเป็นการผลิตจาก n - butane ผ่านกระบวนการ ออกซิเดชัน โดยมี vanadium-phosphorous เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาออกไซด์วิธีปฏิกิริยาของ n - butane กลายเป็น Maleic anhydride (แสดงในรูปภาพ 2)



รูปภาพ 2 วิธีปฏิกิริยาของ n - butane กลายเป็น Maleic anhydride (Hepburn, 2011)

ปฏิกิริยาจาก Maleic anhydride มาเป็นกรดซัคซินิก เริ่มจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส การแตกของพันธะเดี่ยวหนึ่งพันธะระหว่างคาร์บอนและออกซิเจน และเกิดกลายเป็นกรดมาเลอิก

(Maleic acid) การเติมไฮโดรเจนทำให้การแตกพันธะคู่ของคาร์บอนกับคาร์บอน ถือว่าเสร็จสิ้น ปฏิกิริยากลายเป็นกรดซัคซินิก อย่างไรก็ตาม กรดซัคซินิกที่ผลิตจากเชื้อเพลิงฟอสซิลเป็นสิ่งที่ทำให้ผลิตภัณฑ์นั้นเป็นผลิตภัณฑ์ที่ไม่ได้มาจากธรรมชาติ (Song and Lee, 2006) ในขณะที่วิธีการของการผลิตนี้มีต้นทุนการผลิตสูงกว่าการแปรรูปโดยการหมัก แต่ก็มีข้อบกพร่องที่เป็นปัญหาใหญ่อยู่เช่นเดียวกัน

สำหรับการผลิตกรดซัคซินิกสามารถผลิตได้ทางเคมีโดยใช้ปิโตรเลียม

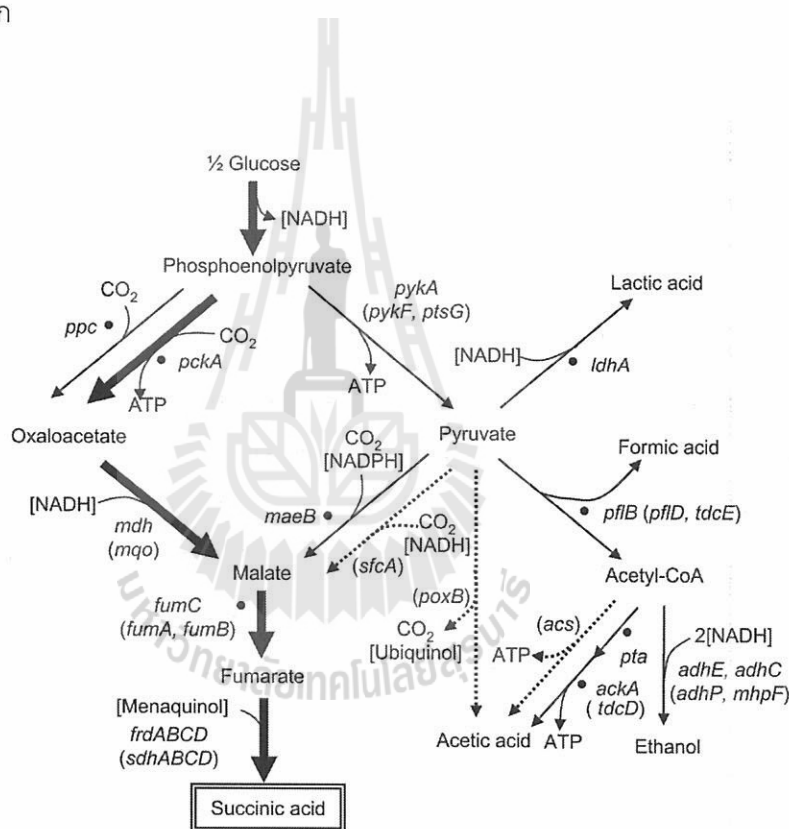
เป็นสารตั้งต้นการผลิต มีความจำเป็นที่จะต้องมีการใช้อุณหภูมิและความดันที่สูง อีกทั้งต้องมีการเพิ่มต้นทุนสำหรับตัวเร่ง ปฏิกิริยาในระบบ (Qiang et al., 2010) ในปี ค.ศ. 2004 พบว่า มีความต้องการกรดซัคซินิกและสาร derivative มากกว่า 270,000 ตันต่อปี ทั้งนี้เพื่อนำมาใช้ในอุตสาหกรรมหลัก สำหรับผลิตพอลิเมอร์ polysuccinate ester และ polyamides (Song et al., 2006) ในการผลิตกรดซัคซินิก ด้วยวิธีทางเคมีดังกล่าวมาแล้วนั้น กรดซัคซินิกจำนวน 1 กิโลกรัม ต้องมีการใช้ n-butane และ maleic anhydride ทำให้มีต้นทุนการผลิตประมาณ 1.30 ดอลลาร์ และในกระบวนการผลิต ยังอาจเกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมได้อีกด้วย ซึ่งหากมีการพัฒนากระบวนการผลิตกรดซัคซินิก บริษัทที่มีต้นทุนการผลิตที่ต่ำลงและเปลี่ยนการผลิตเป็นการใช้กระบวนการหมัก ถือเป็นการเพิ่มความสามารถ ในการแข่งขันทางด้านต้นทุน และเป็นการเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจของประเทศไทยโดยรวมอีกด้วย

อีกทั้งการแปรรูปผ่านกระบวนการทางปิโตรเคมีนั้น จะแสดงให้เห็นว่ากรดซัคซินิกที่ผลิตได้นั้นมาจากทรัพยากรที่ไม่หมุนเวียน เช่น ก๊าซธรรมชาติ ซึ่งจะก่อให้เกิดความยุ่งยากเมื่อเวลาผ่านไป เนื่องจากทรัพยากรมีการหมดไปจากปริมาณความต้องการผลิตภัณฑ์อย่างไม่มีสิ้นสุด ส่งผลให้กระทบต่อการหาวัตถุดิบสารตั้งต้นมาทดแทน สร้างค่าใช้จ่ายที่เพิ่มขึ้นด้วย กระบวนการนี้จึงถือได้ว่าเป็นกระบวนการที่ไม่มีความอย่างยั่งยืนและไม่สามารถแก้ปัญหาในด้านความต้องการ หากมีความต้องการอย่างต่อเนื่อง และเพิ่มมากขึ้นในด้านอุตสาหกรรมการผลิตกรดซัคซินิก

2.1.2 การผลิตกรดซัคซินิกโดยกระบวนการหมัก

กระบวนการหมักกรดซัคซินิกได้รับความสนใจมากขึ้น เนื่องจากสามารถใช้วัตถุดิบทดแทนเป็นสารตั้งต้นในการผลิตได้ และถูกมองว่าเป็นเทคโนโลยีสะอาด เมื่อเทียบกับกับการผลิตจากกระบวนการทางเคมี เพราะว่าเป็นทรัพยากรที่มีการหมุนเวียนและผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมที่เกิดขึ้น

น้อยมาก อีกทางเลือกหนึ่ง กรดซัคซินิกสามารถผลิตได้จากน้ำตาลกลูโคส โดยผ่านกระบวนการหมัก เมื่อผลิตกรดซัคซินิกโดยกระบวนการหมักนั้น น้ำตาลกลูโคสจะเป็นสารตั้งต้นทำการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกรดซัคซินิก และกระบวนการ ที่พบการสร้างกรดซัคซินิก คือ วัฏจักร Tricarboxylic acid (TCA) และกรดซัคซินิกยังเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย ในกระบวนการหมักแบบไร้ออกซิเจนของสิ่งมีชีวิตต่างๆ ในส่วนของการหมักแบบ reductive (Lee และคณะ., 2002) (แสดงในรูปภาพ 3) ในภาพแสดงให้เห็นถึงปฏิกิริยาและเอนไซม์ในกระบวนการหมักโดยทั่วไปที่เปลี่ยนแปลงน้ำตาลกลูโคสเป็นกรดซัคซินิก



รูปภาพ 3 วิธีการเผาผลาญของกรดซัคซินิกที่ผลิตจุลินทรีย์โดยทั่วไป (McKinley *et al.*, 2007)

เริ่มแรก น้ำตาลกลูโคสเปลี่ยนแปลงไป glucose-6-phosphate โดยเอนไซม์ hexokinase ซึ่งมีการเติมฟอสเฟตในโมเลกุล ถัดไปเป็นส่วนของ Embden-Meyerhoff-Parnas glycolytic วิธีที่นำไปสู่การผลิต phospho-enol-pyruvate (PEP) จาก PEP การเผาผลาญที่เกิดขึ้น

ต่อไปนั้นสามารถเกิดเผาผลาญได้สองวิถี ขึ้นอยู่กับระดับของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่สามารถใช้ได้ ในระบบ หากมี CO_2 ไม่เพียงพอในระบบวิถีของการเผาผลาญนั้นจะมีความต้องการสร้างผลิตภัณฑ์สุดท้ายให้อยู่ในรูป Formate (For) เอทานอล (EtOH) และ Acetic (Ace) ตามที่แสดงในด้านขวาของรูปภาพ 3 แต่ถ้าหากมีการก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เพียงพอในระบบ จุลินทรีย์จะมีการผลิตกรดซัคซินิกเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย โดยแสดงทางด้านซ้ายของรูปภาพ 3 (McKinlay และคณะ, 2007) โดยวิถีนี้ PEP จะเปลี่ยนแปลงเป็น Oxaloacetate (OAA) โดยเอนไซม์ PEP Carboxykinase (PEPCK) ด้วยการเติมของ CO_2 ซึ่งจะสร้างคาร์บอนสี่อะตอม โดยให้ชุดของปฏิกิริยานี้มีชื่อเรียกว่า “C-4 pathway” (Lee และคณะ, 2008)

การผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในระดับที่สูงภายในระบบจะเกิดการควบคุมการทำงานของ PEP carboxykinase (PEPCK) ปฏิกิริยาต่อไปคือการเพิ่มไฮโดรเจนใน oxaloacetate (OAA) ในการผลิต malate (Mal) ซึ่งจะถูกเปลี่ยนแปลงเป็น fumarate (FR) โดยเอนไซม์ fumarase (FR) ซึ่งมีการกำจัดของโมเลกุลน้ำ และทำที่สุดของกระบวนการคือการเติมไฮโดรเจน ซัคซินेट จะเกิดขึ้นอยู่ในสถานะของไอออน ซึ่งโดยทั่วไปช่วงค่าความเป็นกรดเบสของการผลิตจะสูงกว่าค่า pKa ของกรดซัคซินิก ผลผลิตทางทฤษฎีของกรดซัคซินิกจากกลูโคสรวมกับคาร์บอนไดออกไซด์ ควรจะมีค่าอยู่ที่ 1.17 โมลต่อโมลของกลูโคส ซึ่งขึ้นอยู่กับปริมาณสารสัมพันธ์ (McKinlay และคณะ, 2007) กระบวนการผลิตนี้ไม่ต้องการผลิตภัณฑ์ที่เป็นผลพลอยได้อื่นๆ อาทิเช่น กรดแอซติก (Acetic acid) และกรดฟอร์มิก (Formic acid) ค่าความเป็นกรดของกรดเหล่านี้ จะต่ำกว่าค่าความเข้มข้นสุดท้ายของกรดซัคซินิก เนื่องจากหากมีการปนเปื้อนจากสารอื่นๆจะส่งผลให้มีปัญหาในกระบวนการแยกกรดซัคซินิคบริสุทธิ์ ซึ่งมีการขั้นตอนและเวลามากขึ้น อีกทั้งมีค่าใช้จ่ายที่สูงด้วย

สำหรับการผลิตทางชีวภาพของกรดซัคซินิกในทางเศรษฐกิจนั้นมีความจำเป็นในการปรับปรุงกระบวนการทางชีวภาพเพื่อให้ได้มาซึ่งผลผลิตและความเข้มข้นที่สูง เช่นเดียวกับการใช้สารตั้งต้นในการเป็นแหล่งคาร์บอนนั้นควรมีราคาถูกเพื่อลดต้นทุนในการผลิต กระบวนการหมักต้องใช้ทั้งสารตั้งต้นและแหล่งพลังงาน เสริมด้วยสารอาหารและแร่ธาตุที่จำเป็นเพื่อให้อยู่ในอัตราส่วนการผลิตที่เหมาะสมเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ (Lee และคณะ, 2002) ทั้งนี้การผลิตกรดซัคซินิกโดยกระบวนการหมักก็ขึ้นอยู่กับจุลินทรีย์ ที่ถูกคัดเลือกนำมาใช้อีกด้วย สำหรับในกรณีที่มีการผลิตกรดซัคซินิก เมื่อพิจารณาจากแหล่งคาร์บอนที่สำคัญและให้พลังงานที่มากพอ พบว่า น้ำตาลกลูโคส เป็นตัวเลือกหลักที่มีถูกนำมาใช้ เป็นพลังงานชีวมวลที่สามารถใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากน้ำตาลกลูโคส ยังสามารถใช้น้ำตาล ฟรุคโตส น้ำตาลอะราบิโนส และน้ำตาลไซโรส (McKinlay และคณะ, 2007) น้ำตาลดังกล่าวมีต้นทุนค่าใช้จ่ายที่ต่ำ อีกทั้งแหล่งคาร์บอนอื่นๆ

ที่มีอยู่มากที่มีสารอาหาร เพียงพอสำหรับเชื้อจุลินทรีย์จะถูกนำมาพัฒนาและใช้ประโยชน์ โดยที่จะมีการคำนวณค่าพลังงาน ต้นทุนการผลิตต่อหน่วยผลผลิตที่ได้ และจากการศึกษาเบื้องต้น แสดงให้เห็นว่ากระบวนการหมัก กรดซัคซินิคมีความเป็นไปได้ที่จะสามารถผลิตได้ในระดับอุตสาหกรรม

2.2 จุลินทรีย์ในการผลิตกรดซัคซินิก

จุลินทรีย์จำนวนมากได้รับการแยกเชื้อและมีการดัดแปลงกระบวนการสร้างและสลาย เมแทบอลิซึมของเซลล์ด้วยเทคนิครีคอมบิแนนต์ดีเอ็นเอ (metabolically engineered) เพื่อนำมาใช้ในกระบวนการผลิตหมักกรดซัคซินิก ทั้งยังสามารถพบเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดซัคซินิกในกระเพาะ ส่วนรูเมนเป็นช่องหลักของกระเพาะ อาหารสัตว์เคี้ยวเอื้อง (Lee และคณะ, 2002) แบคทีเรียที่ผลิตกรดซัคซินิก ที่ให้ระดับความเข้มข้นที่สูง และผู้ทำการวิจัยด้านกรดซัคซินิก ให้ความสนใจ อาทิเช่น *Actinobacillus succinogenes*, *Anaerobiospirillum succinoproducens* และ *Mannheimia succiniciproducens* และยังมีสายพันธุ์ *Escherichia coli* หลากหลายสายพันธุ์ที่ได้รับการดัดแปลงพันธุกรรมให้มีความเหมาะสมในการผลิตกรดซัคซินิก ถูกนำมาใช้ในกระบวนการผลิต (Hepburn, 2011) ทั้งนี้ นักวิจัยหลายท่านได้มีความพยายามอย่างมากในการพัฒนากระบวนการทางชีวภาพสำหรับการผลิตกรดอินทรีย์โดยการใช้เชื้อรา เช่น *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Byssochlamys nivea*, *Lentinus degener*, *Paecilomyces varioti*, *Penicillium viniferum* และ ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สิ่งมีชีวิตเหล่านี้สามารถผลิตกรดซัคซินิก ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการเผาผลาญผ่านกระบวนการเมแทบอลิซึมแบบใช้ออกซิเจน และ/หรือไม่ใช้ออกซิเจน อย่างไรก็ตามการใช้เชื้อราส่วนใหญ่ยังมีข้อจำกัดในการนำไปผลิตอาหารและเครื่องดื่ม อันเนื่องมาจากความยุ่งยากซับซ้อนใน กระบวนการหมักการแยกและกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ ประสิทธิภาพไม่ดี นอกจากนี้ยังให้ผลผลิตที่ปริมาณน้อยอีกด้วย (Song and Lee, 2006) นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Corynebacterium glutamicum* และ *Enterococcus faecalis* ซึ่งมีการรายงานว่าเป็นสามารถผลิตกรดซัคซินิกได้ดีเช่นเดียวกัน

ประสิทธิภาพของกระบวนการผลิตกรดซัคซินิกในทางชีวภาพนั้นขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพความสามารถของจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ ว่ามีความสามารถในการเปลี่ยนแปลงของสารตั้งต้น ให้เป็นกรดซัคซินิก ได้มากเพียงใด และนอกจากนี้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นผลพลอยได้นั้น ต้องไม่มากจนเกินไป และควรมีการใช้สารตั้งต้นสำหรับการเจริญเติบโตของเซลล์ และการบำรุงรักษาการทำงานของเซลล์ ให้น้อยที่สุด เพื่อให้ได้ค่าผลผลิตที่สูง สำหรับในทางทฤษฎี 2 โมลของกรดซัคซินิกสามารถ

สร้างได้จาก 1 โมลของกลูโคส และ 2 โมลของคาร์บอนไดออกไซด์ (ผลผลิต 1.31 กรัมของกรดซัคซินิกต่อ 1 กรัมของการใช้น้ำตาล หรือเรียกว่า $Y_{P/S}$) โดยมีเงื่อนไขที่ว่าฟลักซ์ของคาร์บอนทั้งหมดจะต้องมีผลต่อการผลิตกรดซัคซินิก

การที่มีการใช้แหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน แหล่งที่มาของสารอาหาร และเกลือแร่ที่แตกต่างกันนั้นมีผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของจุลินทรีย์ในการผลิตกรดซัคซินิก แสดงตาราง 2 ซึ่งได้สรุปองค์ประกอบในน้ำหมักของการผลิตกรดซัคซินิกโดยใช้สายพันธุ์แบคทีเรียสายพันธุ์ที่แตกต่างกัน ในกระบวนการหมักกรดซัคซินิก แสดงให้เห็นว่าเชื้อสายพันธุ์ *Actinogenes succinogenes* เป็นแบคทีเรียที่ได้รับความสำคัญ ถูกนำไปในงานวิจัยด้านงานวิชาการและถูกคัดเลือกให้นำมาใช้มากที่สุดคือ *Actinogenes succinogenes* (สายพันธุ์ 130Z) และสายพันธุ์ American Type Collection ATCC 55618 แบคทีเรียดังกล่าวนี้ถูกแยกเชื้อออกจากกระเพาะของวัวที่สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพ Michigan international (Guettler และคณะ, 1999) นอกจากนี้สายพันธุ์ดังกล่าวยังเป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ดีในสภาวะที่ไม่มีอากาศแต่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีอากาศ เช่นเดียวกับแบคทีเรียจำพวกต้องการ CO_2 มากกว่าในบรรยากาศ (Capnophilic) และเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นแท่งหรือเป็นลักษณะเส้นใยในบางครั้ง ไม่สามารถเคลื่อนไหวได้ และถือว่าเป็นแบคทีเรียที่มีศักยภาพมากที่สุด ในการนำมาผลิตกรดซัคซินิกในการผลิตเชิงอุตสาหกรรม

ตาราง 2 แสดงลักษณะความสัมพันธ์ในการผลิตกรดซัคซินิกโดยเชื้อแบคทีเรีย (Zeikus et al., 1999)

จุลินทรีย์	ความสัมพันธ์กับออกซิเจน	วิธีการผลิตกรดซัคซินิก
<i>Anaerobiospirillum succiniciproducens</i>	Obligate anaerobe	PEP carboxykinase
<i>Actinobacillus succinogenes</i>	Facultative	PEP carboxykinase

เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์อื่นๆ ที่สามารถผลิตกรดซัคซินิกได้เช่นกันนั้น แบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวข้างต้นมีข้อดีหลายประการ อาทิเช่น ความสามารถในการทนสารตั้งต้นที่มีความเข้มข้นสูงของสารตั้งต้น มีความสามารถในการต้านทานผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้ ณ ความเข้มข้นสูง และให้อัตราการผลิตที่สูงอีกด้วย นอกจากนี้ยังมีความสามารถในการทนต่อออกซิเจนในปริมาณ

ความเข้มข้นสูง อีกทั้งมีการผลิตผลพลอยได้อื่นๆในปริมาณน้อย และสามารถใช้สารตั้งต้นได้อย่างหลากหลาย เมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียอื่นๆที่ผลิตกรดซัคซินิก หลายแหล่งข้อมูลยืนยันและได้ระบุไว้ว่า *A. succinogenes* เป็นจุลินทรีย์ที่เป็นทางเลือกที่ดีที่สุดสำหรับ กระบวนการผลิตกรดซัคซินิก (Lin และคณะ, 2008)

ปัจจัยที่จะต้องนำมาพิจารณาสำหรับกระบวนการหมัก คือ ปัจจัยหรือวิธีการที่มีผลต่อการยับยั้ง การเจริญเติบโตของเซลล์ การสะสมตัวของผลิตภัณฑ์ในน้ำหมัก หากมากเกินไปจนถึงจุดวิกฤติจะทำให้อัตราการผลิตลดลง เนื่องจากเซลล์เกิดการบังคับให้ใช้พลังงานมากขึ้นในการรักษาเซลล์ แต่ถ้าหากเซลล์มีความสามารถทนต่อผลิตภัณฑ์ที่มีความเข้มข้นสูงขึ้น จะสามารถดำเนินการผลิตได้อย่างรวดเร็วอย่างต่อเนื่อง และให้ความเข้มข้นสุดท้ายในช่วงการผลิตกรดซัคซินิกสูงขึ้น และสำหรับ *A. succinogenes* ซึ่งได้กล่าวไว้ก่อนหน้านี้ ได้มีรายงานว่าสามารถทนต่อความเข้มข้นของกรดซัคซินิกได้ถึง 66.4 กรัมต่อลิตร ก่อนที่จะหยุดการผลิตหลังจาก 84 ชั่วโมง นั้นแสดงให้เห็นว่าการผลิตสามารถดำเนินการต่อไปได้ให้ความเข้มข้นที่สูงระดับหนึ่งก่อนที่ระบบจะสิ้นสุดจากการยับยั้งของผลิตภัณฑ์ (Wanและคณะ, 2008)

แบคทีเรียทั้งหมดที่นำมาใช้ในกระบวนการผลิตกรดซัคซินิกโดยการใช้กลูโคส นั้นต้องการสภาวะแบบไม่ใช้ออกซิเจนซึ่งถือว่าเป็นการทำงานในสภาวะที่เหมาะสม แต่อย่างไรก็ตามในกรณีของ *A. succinogenes* มีความสามารถทนต่อออกซิเจนปริมาณน้อย ที่อยู่บริเวณช่องว่างระหว่างของเหลวกับถังหมัก (Urbance และคณะ, 2004) ความสามารถในการทนต่อสภาวะดังกล่าวนี้ จะสามารถเพิ่มคุณสมบัติที่พึงประสงค์ในสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียนี้ในการผลิตกรดอินทรีย์ที่อาจมีออกซิเจนภายในระบบ การใช้งานของ *A. succinogenes* สำหรับการผลิตกรดซัคซินิกนั้น ผลพลอยได้ที่เกิดขึ้น ในกระบวนการหมักนั้นจะมีน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ การทดสอบด้วยเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ ซึ่งเป็นข้อดี ทำให้กระบวนการแยกผลิตภัณฑ์ในขั้นตอนต่อไปนั้นง่ายขึ้น และมีค่าใช้จ่ายต่ำ ทั้งยังมีรายงานจากวารสารต่างประเทศ พบว่าสามารถผลิตกรดซัคซินิกมีความสามารถในการผลิตถึง 130 กรัมต่อลิตร (Guettler และคณะ, 1996) โดยที่ความเข้มข้นนี้แสดงให้เห็นว่า *A. succinogenes* เป็นตัวเลือกที่เหมาะสมในการใช้ในการผลิตกรดซัคซินิก *A. succinogenes* ยังเป็น moderate osmophile (แบคทีเรียที่ชอบอาศัยในสภาวะแวดล้อมที่มีแรงออสโมติกได้ปานกลาง เช่น ระดับน้ำตาลสูง) โดยที่ *A. succinogenes* สามารถทนต่อความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสได้สูงถึง 160 กรัมต่อลิตร (Lin และคณะ, 2008) และสามารถเจริญได้ในแหล่งคาร์บอน ที่มีความหลากหลายแตกต่างกัน โดยสามารถใช้แหล่งคาร์บอนในกระบวนการ

การ หมักกรดซัคซินิคอันได้แก่ L-arabinose, cellobiose, fructose, galactose, glucose, lactose, maltose, manitol, mannose, sucrose, D-xylose และ salacin (Zeikus และคณะ, 1999)

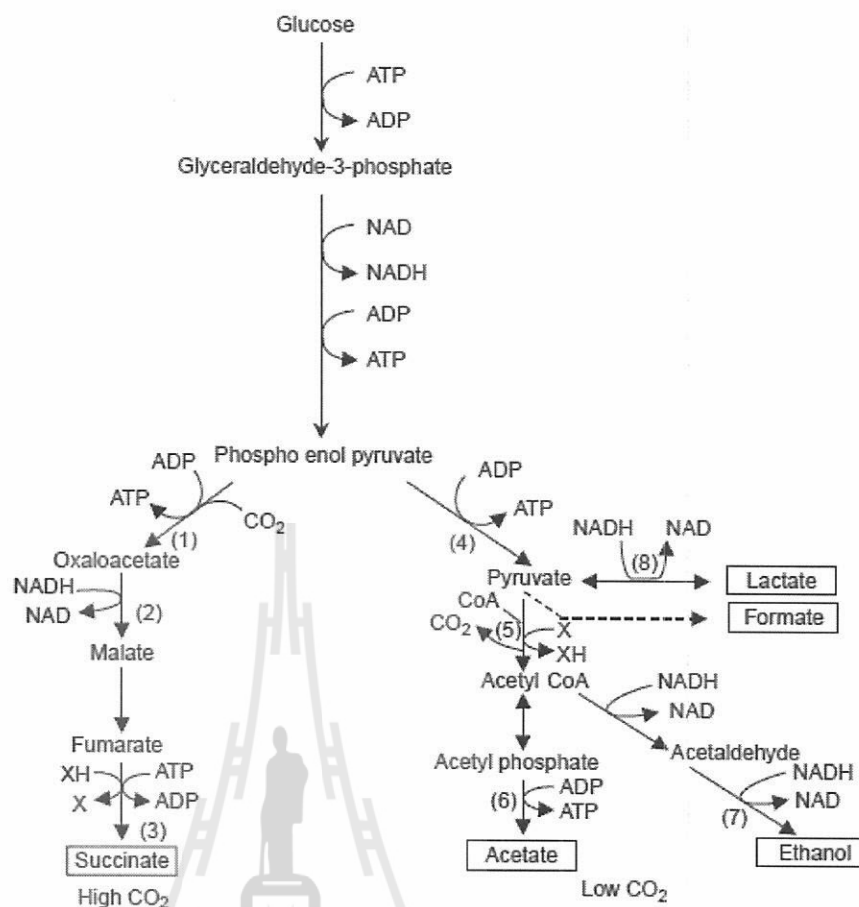
2.3 การหมักกรดซัคซินิก

กระบวนการหมักกรดซัคซินิก ได้มีการศึกษากันอย่างจริงจัง เมื่อปี ค.ศ. 1980 (Zeikus et al., 1999) อย่างไรก็ตามในปัจจุบันนี้ ได้มีการสนใจการผลิตกรดซัคซินิกดังกล่าว โดยใช้สารตั้งต้นที่มีการนำกลับมาใช้ใหม่ได้ (renewable resource) หรือวัตถุดิบทางการเกษตร จำพวก ข้าวโพด มันสำปะหลัง น้ำตาลอ้อย ฯลฯ กรดซัคซินิกสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์หลากหลายชนิด ยกตัวอย่างเช่น *Actinobacillus succinogenes* *Anaerobiospirillum succiniciproducens* และ *Mannheimia succiniciproducens* (Song et al., 2007) โดยจุลินทรีย์กลุ่มที่กล่าวมานี้ มีคุณสมบัติพิเศษ คือ มีความสามารถทนต่อความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสได้สูง โดยที่ไม่เกิดแรงดันออสโมติสและมีความสามารถในการผลิตกรดซัคซินิกสูงอีกด้วย (Huh et al., 2006) สำหรับกรดซัคซินิกนี้ยังเป็นสารตัวกลาง หรือ intermediate ในวัฏจักร TCA (tricarboxylic acid) และเป็นผลผลิตสุดท้ายในกระบวนการหมักที่ไม่มีออกซิเจนในกระบวนการหมัก และนอกเหนือจากกรดซัคซินิกแล้วนั้นอาจมีผลพลอยได้ที่เป็นกรดอะซิติก กรดฟอร์มิก กรดแล็กติก และเอทานอล เกิดขึ้นได้อีก

การผลิตกรดซัคซินิก ยกตัวอย่างเช่น เชื้อ *Anaerobiospirillum succiniciproducens* สามารถผลิตกรดซัคซินิกได้ความเข้มข้นที่สูง *Mannheimia succiniciproducer* ผลิตได้ มากกว่า 50 กรัมต่อลิตร และ *Actinobacillus succinogenes* ผลิตได้มากกว่า 100 กรัมต่อลิตร (Qiang et al., 2010) เป็นต้น แบคทีเรียที่ผลิตกรดซัคซินิกสามารถผลิตในรูปแบบ mixed-acid fermentation โดยสามารถผลิตผลผลิตได้มากกว่าหนึ่งชนิด ตัวอย่างคุณลักษณะทางกายภาพของแบคทีเรียในส่วนที่เกี่ยวข้องแสดงดังตาราง 3

ตาราง 3 แสดงกระบวนการหมักกรดซัคซินิกโดยใช้สายพันธุ์จุลินทรีย์แตกต่างกัน (McKinley et al., 2007)

สายพันธุ์จุลินทรีย์	ปริมาณกรดซัคซินิกที่ผลิตได้ (กรัมต่อลิตร)	สารตั้งต้น (ซึบสเตรต)
<i>A. succinogenes</i> FZ53 (based on ATCC55618)	105.8	กลูโคส
<i>A. succinogenes</i> FZ6 (based on ATCC55618)	70.6	Corn fiber hydrolysate
<i>A. succinogenes</i> CGMCC2650	97.8	กลูโคส
<i>A. succiniciproducens</i> ATCC53488	50.3	กลูโคส
<i>A. succiniciproducens</i> ATCC29305	19	กลูโคส
<i>M. succiniciproducens</i> KCTC 0769BP	8.8	กลูโคส
<i>M. succiniciproducens</i> KCTC 10626BP	52.4	กลูโคส
<i>S. cerevisiae</i> SUC-200 (based on CEN.PK113-6B)	34.5	กลูโคส
<i>S. cerevisiae</i> SUC-297 (based on CEN.PK113-6B)	43	กลูโคส
<i>E. coli</i> AFP111- <i>pyc</i> (based on ATCC202021)	99.2	กลูโคส
<i>E. coli</i> KJ073 (based on ATCC8937)	86.5	กลูโคส
<i>E. coli</i> KJ060 (based on ATCC8937)	78.8	กลูโคส
<i>E. coli</i> SBS550MG-PHL413 (based on ATCC47076™)	45	Corn stalk enzymatic hydrolysate
<i>E. coli</i> SD121 (based on ATCC12435)	57.8	กลูโคส



รูปภาพ 4 แสดง Catabolic pathway ในกระบวนการผลิตกรดซัคซินิกด้วยน้ำตาล (Song *et al.*, 2006)

สำหรับวิธีการผลิตกรดซัคซินิกแสดงดังรูปภาพ 4 โดยที่เข้าสู่วิถี PEP (phosphoenol pyruvate) carboxykinase สำหรับเชื้อ *A. succiniciproducens* และ *A. succinogenes* โดยจากแผนภาพจะเห็นได้ว่าปฏิกิริยาผลิตกรดซัคซินิกจะมีประสิทธิภาพดีในสภาวะที่มีก๊าซคาร์บอน-ไดออกไซด์อยู่ในปริมาณที่สูง (High CO₂) โดยน้ำตาลกลูโคสสามารถที่จะเปลี่ยนเป็นกรดซัคซินิกได้เกือบทั้งหมด ในขณะที่สภาวะคาร์บอนไดออกไซด์ต่ำ (Low CO₂) ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นหลายปฏิกิริยา ส่งผลให้เกิดผลพลอยได้ที่หลากหลาย (by product) เช่น กรดอะซิติก กรดฟอร์มิก กรดแล็กติก และเอทานอล เป็นต้น ดังนั้นจะเห็นว่าการบังคับให้เชื้อสามารถผลิต กรดซัคซินิกได้ในปริมาณที่สูงและแก้ปัญหาการเกิดผลพลอยได้อื่นๆนั้น จำเป็นที่จะต้องทำให้ปริมาณของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในระบบสูงอีกด้วย

การผลิตกรดซัคซินิกจากกากน้ำตาลอ้อย (molasses) ที่เป็นผลพลอยได้จากโรงงานน้ำตาล ซึ่งวัตถุดิบนี้ประกอบด้วย น้ำตาลชนิดต่างๆ (น้ำตาลซูโครส กลูโคส ฟรุกโตส) ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนัก สารคอลลอยด์ โลหะหนักต่างๆ วิตามิน และสารประกอบไนโตรเจน

เป็นต้น ซึ่งถือเป็นวัตถุดิบที่มีประโยชน์และมีราคาถูก นิยมใช้ในการผลิตเอทานอล กรดแล็กติก และน้ำตาล ซอร์บิทอล (Liu *et al.*, 2008) สำหรับการผลิตกรดซัคซินิกโดยกระบวนการหมักแบบกะโดยเชื้อ *A. succinogenes* จะสามารถผลิตได้ประมาณ 46.4 กรัมต่อลิตร และมีอีกหนึ่งงานวิจัยได้มีการนำ น้ำย่อยฟางข้าวที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลไซโลส มาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิต กรดซัคซินิก โดยเชื้อ *Actinobacillus succinogenes* ในกระบวนการหมักแบบกะที่สภาวะ ที่ไม่มีออกซิเจน พบว่า สามารถผลิตกรดซัคซินิกได้มากกว่า 45.5 กรัมต่อลิตร และในกระบวนการ หมักแบบกึ่งกะสามารถผลิตได้มากกว่า 53.2 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิต 1.21 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ที่ระยะเวลาหมัก 44 ชั่วโมง (Zhang *et al.*, 2009) หลังจากที่ทำการย่อยฟางข้าวจะได้เป็นน้ำตาลออกมา ทำให้ง่ายต่อการที่เชื้อแบคทีเรียนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นได้ แต่อย่างไรก็ตามวัตถุดิบจำพวกแป้งนั้นจะมีความน่าสนใจมากที่สุด เนื่องจากมี ปริมาณธาตุอาหารสูงและสามารถหาซื้อได้ง่าย ดังนั้นในประเทศไทยและจังหวัดนครราชสีมาเป็น พื้นที่ที่มีการผลิตมันสำปะหลังทั้งที่เป็นแบบสด แป้งมันสำปะหลัง และแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ ที่มีคุณภาพออกมาจำพวก กลูโคสไซรัปหรือกลูโคสเหลว ซึ่งล้วนแต่มีราคาถูกมีโรงงานหลายแห่ง ที่ตั้งอยู่ภายในจังหวัด ทำให้ได้รับความสนใจที่จะนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตกรดซัคซินิก เป็นอย่างมาก ทั้งยังสร้างมูลค่าให้กับวัตถุดิบมวลชีวภาพควบคู่กับการพัฒนาด้านเทคโนโลยี ชีวภาพ ก่อให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่เป็นประโยชน์ต่อไป

กระบวนการผลิตทางชีวภาพหรือกระบวนการหมักที่มีการใช้เชื้อจุลินทรีย์ร่วมด้วย ถือเป็นวิธีการที่ดีต่อสิ่งแวดล้อมและเป็นเทคโนโลยีสะอาด ทำให้ได้รับความสนใจศึกษาวิจัยกันอย่าง กว้างขวาง นอกจากนี้ในการผลิตกรดซัคซินิกด้วยวิธีการหมักถือเป็นเทคโนโลยีสีเขียวที่เป็น วิวัฒนาการ เพื่อใช้ในการจัดการแก้ไขเพื่อไม่ให้เกิดปัญหาและผลกระทบจากการใช้โดยการเปลี่ยน รูปแบบของการนำไปสร้างผลิตภัณฑ์ ร่วมกับการใช้เทคโนโลยีในการนำวัตถุดิบต่างๆให้สามารถ นำกลับมาใช้งานใหม่ได้ เพื่อสร้างศูนย์กลางทางด้านเศรษฐศาสตร์ให้เหมาะสมกับเทคโนโลยีและ ผลิตภัณฑ์ ให้เหมาะสมกับสภาพแวดล้อมและทำให้เกิดการกระทบกับสภาพแวดล้อมน้อยที่สุด อีกทั้ง เมื่อเปรียบเทียบกับกระบวนการผลิตเอทานอล พบว่า จากน้ำตาล กลูโคสเริ่มต้น 1 โมล สามารถ ผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ได้ 2 โมล แต่ในกระบวนการหมักกรดซัคซินิกนั้นจะมีการ ใช้ก๊าซ คาร์บอนไดออกไซด์ ถือเป็น CO₂-fixation fermentation ถือเป็นประโยชน์ เป็นอย่างมากด้วย

อย่างไรก็ตามในกระบวนการหมัก จำเป็นที่จะต้องมีการพัฒนาในระบบการบวนการหมัก เนื่องจากจะส่งผลต่อกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ในภายหลัง ดังนั้นจะมีการควบคุมค่า pH ให้อยู่ ในช่วงที่เหมาะสมกับการเจริญและสร้างกรดซัคซินิก และลดความเป็นพิษของเซลล์ที่ถูก สร้างขึ้นต่อเซลล์ (Lin *et al.*, 2008) ที่ควบคุมด้วยการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต หรือปูนขาวลงไป ทั้งนี้หลังกระบวนการหมักสิ้นสุดลง ผลที่ได้คือ กรดซัคซินิกจะทำปฏิกิริยากับแคลเซียมคาร์บอเนต เกิดเป็นแคลเซียมซัคซิเนต ซึ่งจะสามารถกรองผ่านชุดเยื่อแผ่น และเข้าสู่กระบวนการที่เรียกว่า

acidification โดยการเติมกรดซัลฟูริกลงไปทำให้ได้กรดซัคซินิก กรดอินทรีย์อื่นๆและแคลเซียมซัลเฟต หรือเรียกว่า ยิปซัม ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ต่อไปได้ โดยเฉพาะอุตสาหกรรมก่อสร้าง นอกจากนี้ในกระบวนการหมักยังอาจมีการผลิตผลพลอยได้อื่นๆ ทำให้หลังจากกระบวนการ acidification ทำให้ไม่บริสุทธิ์มากนัก กรดซัคซินิกที่ได้ อาจมีการปนเปื้อนด้วยสารที่ไม่ต้องการ โดยเฉพาะจำพวกแคลเซียมแล็กเตต ดังนั้นเพื่อต้องการที่จะทำให้กรดซัคซินิกมีความบริสุทธิ์สูง เพื่อนำไปใช้ในอุตสาหกรรมพลาสติกชีวภาพตามวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ จึงต้องเข้าสู่กระบวนการอื่น ๆ ที่จะมีการกล่าวถึงต่อไป

2.3.1 ข้อจำกัดในการหมักกรดซัคซินิก

ในการศึกษาก่อนหน้านี้เกี่ยวกับการผลิตกรดซัคซินิกโดย *A. succinogenes* ในช่วงค่า pH ใน กระบวนการหมักอยู่ ระหว่าง 6.0 ถึง 7.2 สำหรับค่า pH ที่เหมาะสมในการหมักคือ 6.8 (Wan และคณะ, 2008) ค่า pH ที่สูงขึ้นอาจนำไปสู่การเจริญของเซลล์ที่ไม่เหมาะสม และส่งผลต่อการผลิตผลพลอยได้ในปริมาณที่เพิ่มขึ้นด้วยเช่นเดียวกัน และในขณะเดียวกันค่า pH ที่ต่ำกว่า 6.0 นั้นการเจริญของเซลล์จะน้อยตามไปด้วย เนื่องจากเกิดความต้องการในการบำรุงรักษาเซลล์ที่เพิ่มขึ้น (Leeและคณะ, 2002) แต่ค่า pKa ของกรดซัคซินิก มีค่าอยู่ที่ 4.20 - 5.61 ดังนั้นเมื่อกรดซัคซินิก ที่ผลิตนั้นเป็นโมเลกุลที่แยกตัวกัน (Dissociated molecule) จะทำให้เกิดปัญหาตามมาด้วยเหตุที่ว่า วิธีการแยกผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่จำเป็นต้องการผลิตภัณฑ์กรดในรูปแบบที่ไม่มีการแยกตัวของกรด (Undissociated molecule) ด้วยขั้นตอนที่เพิ่มขึ้นมานั้น จึงมีความจำเป็นในการลดค่า pH ในการสกัดผลิตภัณฑ์กรดออกมาตลอดกระบวนการหมัก กรดซัคซินิกถูกผลิตออกมานั้นยังมีกรดฟอร์มิก (Formic acid) และกรดอะซิติก (Acetic acid) เป็นกรดผลพลอยได้ในกระบวนการหมัก ด้วยเหตุนี้ตัวปรับค่า (Alkaline neutralizer) จึงเข้ามามีส่วนร่วมในกระบวนการหมักเพื่อควบคุมรักษาค่า pH ในกระบวนการหมักให้ได้ค่า pH ที่เหมาะสม ปฏิกริยาระหว่างการหมักที่มีปัญหาอีกประการคือ เนื่องจากเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ อาจก่อให้เกิดปัญหาการยับยั้งผลิตภัณฑ์เกิดขึ้นได้ สำหรับการเจริญของ เซลล์และการสังเคราะห์ สามารถหยุดได้เพราะพลังงานที่มากขึ้นจะต้องมีการนำไปการรักษาเซลล์ นอกจากนี้การเกิดกรดที่เป็นผลพลอยได้ในกระบวนการหมักนั้น สามารถขัดขวางการหมักได้เช่นเดียวกันเพราะให้ผลคล้ายกับการยับยั้งผลิตภัณฑ์ที่มีความเข้มข้นต่ำเช่นในกรณีกระบวนการหมักกรดซัคซินิกที่มีกรดผลพลอยได้อาทิเช่นอะซิเตต (Acetate) และฟอร์มेट (Formate) ผลพลอยได้เหล่านี้เป็นตัวจำกัดการผลิตกรดซัคซินิก เป็นการลดผลผลิตของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ (Huh และคณะ, 2006) แนวความคิดในการดัดแปลงสายพันธุ์เพื่อที่จะลดหรือกำจัดกรดที่เป็นผลพลอยได้นั้นเป็นแนวคิดที่ได้รับการแนะนำและมีการสนับสนุนความคิดดังกล่าว ซึ่งเห็นได้จากงานวิจัยบางงานที่ได้ดำเนินการในการดัดแปลงรหัสพันธุกรรมของแบคทีเรีย เพื่อให้แน่ใจว่ายีนเฉพาะมีการแสดงออกในการกำจัดกรดที่เป็นผลพลอยได้ทำให้แบคทีเรียดังกล่าวที่ผ่านการดัดแปลงพันธุกรรมนั้น

ได้กรดซ้คซินิกเป็นกรดส่วนใหญ่ในกระบวนการหมัก (Lee และคณะ, 2008) แต่อย่างไรก็ตาม แบบที่เรื้อยที่ผ่านการดัดแปลงพันธุกรรมนั้นมีความสามารถลดลงในการเจริญและให้อัตราการผลิตที่ต่ำเนื่องจากข้อจำกัดเหล่านี้ปริมาณการเก็บเกี่ยวและผลผลิตจึงไม่สูงพอที่จะใช้สายพันธุ์ดัดแปลงพันธุกรรมเหล่านี้ในกระบวนการหมักในระบบขนาดใหญ่

2.4 การทำบริสุทธิ์กรดซ้คซินิก

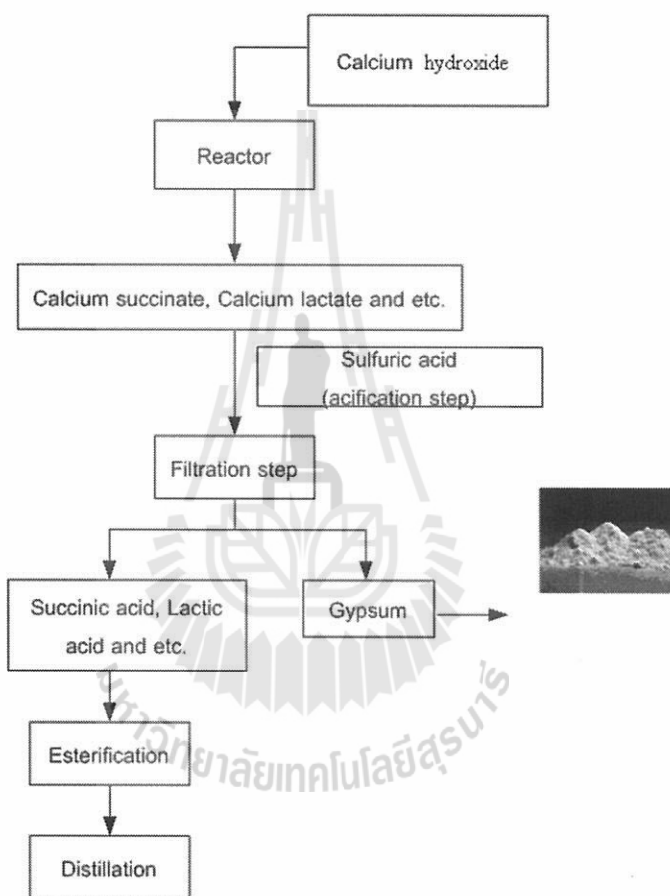
การผลิตกรดซ้คซินิกสามารถแบ่งออกเป็นสองส่วนหลัก คือ ขั้นแรกกระบวนการหมัก ในขั้นตอนการเปลี่ยนคาร์โบไฮเดรตให้ได้เป็นกรดซ้คซินิก และการแยกผลิตภัณฑ์และการทำให้บริสุทธิ์ ขั้นตอนการแยกผลิตภัณฑ์และการทำให้บริสุทธิ์นั้นถูกกำหนดให้เป็นกระบวนการที่สำคัญที่สุดของกระบวนการโดยรวมทั้งหมด เนื่องจากปัญหาที่กล่าวถึงไว้ก่อนหน้านี้เกี่ยวกับกระบวนการหมัก แต่ยังเป็นขั้นตอนที่มีแนวโน้มมากที่สุดที่จะต้องได้รับปรับปรุงของกระบวนการ (Zeikus และคณะ, 1999) การเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ ความเข้มข้นการเกิดกรด และการทำให้บริสุทธิ์เป็นการเก็บเกี่ยวกรดซ้คซินิกจากซ้คซินิกในน้ำหมัก และขณะนี้ยังไม่สามารถใช้วิธีการเพียงวิธีการเดียวในการทำบริสุทธิ์ของกรดซ้คซินิก

สำหรับการกำจัดกรดผลพลอยได้นั้นอาทิเช่น กรดอะซิติก กรดฟอร์มิก กรดแลกติก และกรดไพรูวิกในน้ำหมัก ถือเป็นกระบวนการที่สำคัญที่สามารถป้องกันการยับยั้งและสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกรดอินทรีย์ การศึกษาวิธีการแยกผลิตภัณฑ์และการเก็บเกี่ยวซ้คซินิกนั้นประกอบไปด้วย กระบวนการตกผลึกโดยตรง กระบวนการตกตะกอน การแยกโดยเทคนิคเมมเบรน กระบวนการสกัด โครมาโทกราฟี และการแยกในขณะทำการหมัก (*In situ separation*)

กระบวนการหลังการผลิตของกรดซ้คซินิกที่ผลิตทางชีวภาพมักจะมีสามขั้นตอนหลัก ขั้นตอนแรกคือการกำจัดของเซลล์ของจุลินทรีย์โดยใช้กระบวนการกรองหรือวิธีการหมุนเหวี่ยง ขั้นตอนต่อไป คือการกำจัดสิ่งสกปรกที่เจือปนในน้ำหมัก และการแยกผลิตภัณฑ์กรดซ้คซินิกจากน้ำหมักขั้นแรก เช่น การทำระเหยสำหรับการกำจัดน้ำหรือกรดอะซิติก กระบวนการตกตะกอน กระบวนการอิเล็กโทรไลซิส การสกัดด้วยตัวทำละลาย การสกัดปฏิกิริยา และการดูดซับด้วยการแลกเปลี่ยนเรซิน Molecule sieve หรือ ซีโอไลท์ และขั้นตอนสุดท้ายคือการทำให้บริสุทธิ์สุดท้ายของผลิตกรดซ้คซินิกโดยการระเหยสุญญากาศและการตกผลึก (Cheng และคณะ, 2012)

สำหรับกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ของกรดซ้คซินิกนั้น ต้นทุนในการทำบริสุทธิ์กรดซ้คซินิกมีมากกว่า 60% ของต้นทุนการผลิตทั้งหมด โดยกระบวนการทำให้บริสุทธิ์มีการสรุปดังแสดงในรูปภาพ 5 ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาและพิจารณาเลือกวิธีที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพสูงในการแยกกรดซ้คซินิกออกจากน้ำหมักและเข้าสู่กระบวนการทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

อย่างไรก็ตามด้วยคุณลักษณะเฉพาะของ ผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพจึงเป็นข้อจำกัดสำหรับกระบวนการแยกโดยทั่วไป ในบางครั้งอาจจะต้องพัฒนาวิธีใหม่ที่เหมาะสมขึ้นมาใช้ในการแยก สำหรับการออกแบบกระบวนการหรือการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ นอกจากต้องคำนึงถึงชนิดและคุณภาพของผลิตภัณฑ์แล้ว ยังต้องพิจารณาปัจจัยอื่นๆร่วมด้วย เช่น ตำแหน่งของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นอยู่ภายในเซลล์หรือนอกเซลล์ สารเจือปนในกระบวนการผลิต ความสำคัญและ ประโยชน์ของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ รวมทั้งความคุ้มค่าของ กระบวนการแยกที่นำมาใช้อีกด้วย



รูปภาพ 5 แผนผังแสดงกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ของกรดซัคซินิก

กรดซัคซินิกเป็นองค์ประกอบที่อยู่ภายในน้ำหมักซึ่งเป็นองค์ประกอบที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นมาและถูกขับออกนอกเซลล์ (extracellular) เมื่อเซลล์มีการเจริญเติบโตและสร้างผลิตภัณฑ์ ดังนั้นการทำให้บริสุทธิ์ของกรดซัคซินิกจึงมีอยู่หลายวิธี เช่น electrodialysis acidification และ extraction เป็นต้น สำหรับ electrodialysis เป็นกระบวนการแยกผลิตภัณฑ์ที่มีการใช้การแลกเปลี่ยนประจุไอโมเลกุลของสารนั้นๆ โดยใช้เยื่อแผ่นร่วมกับใช้ไฟฟ้ากระแสตรงเป็นตัวช่วยในการแตกตัวของประจุให้เกิดการแยกผลิตภัณฑ์ที่สมบูรณ์ แต่อย่างไรก็ตามเทคโนโลยีดังกล่าวนี้มีการลงทุนที่ค่อนข้างสูง ทั้งในด้านการจัดระบบการแยกและอุปกรณ์จัดสร้างระบบต่างๆ (Zeikus

et al., 1999) นอกจากนี้เทคนิคดังกล่าวไม่สามารถแยกกรดอินทรีย์หลายชนิดที่ได้จากกระบวนการหมัก เพราะเนื่องจากกรดอินทรีย์เหล่านี้สามารถแตกตัวเป็นไอออนได้เช่นกันและสำหรับกระบวนการ crystallization เป็นอีกเทคนิคหนึ่งที่ยิยมแยกกรดซัคซินิก แต่อย่างไรก็ตามยังคงมีปัญหามากมาย ยกตัวอย่าง เช่น มีการปนเปื้อนจากส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ โปรตีน กรดนิวคลีอิก ไขมัน หรือเกลือ ที่ส่งผลต่อผลผลิตและความบริสุทธิ์ของกรดซัคซินิกในขั้นตอนสุดท้ายที่มีความบริสุทธิ์ไม่ต่ำพอ คือที่ 90 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น (Qiang et al., 2010) แต่สำหรับการแยกกรดซัคซินิกที่มีการรวมกันของเทคนิค reactive extraction vacuum distillation และ crystallization ที่มีรายงานจากวารสารต่างประเทศและได้ทำการศึกษาโดยคณะผู้วิจัย พบว่าผลที่ออกมาจะได้ความบริสุทธิ์สูง 99.76 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหมัก ซึ่งถือว่าเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพที่ดีมาก (Zeikus et al., 1999)

2.4.1 การตกผลึกโดยตรง

การกลั่นระเหยสุญญากาศควบคู่การตกผลึกโดยตรง (Vacuum distillation-crystallization) ถูกนำมาใช้สำหรับการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์กรดซัคซินิกจากน้ำหมักโดย Luque และคณะ, (2009) ค่า pH ของน้ำหมักมีการปรับให้ได้ค่าที่ 4.2 โดยเติมของกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ก่อนที่จะกลั่นสุญญากาศ และมีการระเหยของกรดคาร์บอกซิลิก เช่น กรดอะซิติก กรดฟอร์มิก กรดแลคติก ในน้ำหมักที่ถูกกำจัดออกมากระทำภายใต้การกลั่นสุญญากาศที่ 60 °C จากนั้นกระทำการตกผลึกของกรดซัคซินิกดำเนินการที่ 4 °C เมื่อวิธีการนี้ถูกนำมาใช้ให้น้ำหมักจำลองให้ผลผลิตกรดซัคซินิกสูงที่สุดและความบริสุทธิ์ที่ได้คือ 75% และ 97% ตามลำดับ นอกจากนี้วิธีการตกผลึกโดยตรงได้ถูกนำมาใช้และศึกษาในการเก็บเกี่ยวของกรดซัคซินิก หลักการในวิธีนี้คือว่ากรดคาร์บอกซิลิกนั้นมีความแตกต่างในการแตกตัวระหว่างรูปของกรดที่มีการแตกตัว และรูปของกรดที่ไม่มีการแยกแตกตัวที่ pH ค่าต่างๆกัน และกรดคาร์บอกซิลิกมีการค่าการละลายที่แตกต่างกัน ในการศึกษาี้ความสามารถในการละลายของกรดซัคซินิก มีความสามารถละลายเพียง 3% ที่ 4 °C และที่ค่า pH 2.0 ในขณะที่กรดผลพลอยได้อื่น ๆ ละลายในน้ำได้อย่างสมบูรณ์ ดังนั้นกรดซัคซินิกสามารถตกผลึกโดยวิธีการเก็บเกี่ยวขั้นตอนเดียว ผลผลิตกรดซัคซินิกและความบริสุทธิ์เป็น 70% และ 90% ตามลำดับ (Li และคณะ, 2010) กระบวนการตกผลึกสามารถนำมาใช้เป็นขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์สุดท้ายของการผลิตกรดซัคซินิก การตกผลึกโดยตรงอาจให้ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการอยู่ในรูปแบบของแข็งหรือผลึก โดยกระบวนการตกผลึกนี้ไม่จำเป็นต้องมีการดำเนินการที่หลายขั้นตอน แต่อย่างไรก็ตามอาจให้ผลผลิตที่ต่ำเนื่องจากซัคซิเนตจำนวนมากยังคงตกค้างในน้ำหมักและอาจได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความบริสุทธิ์ต่ำไม่สามารถนำมาใช้เป็นโมโนเมอร์สำหรับการสังเคราะห์พอลิเมอร์ (Cheng และคณะ, 2012)

2.4.2 การแยกโดยใช้เทคนิคเมมเบรน

การศึกษาการใช้เทคโนโลยีการกรองโดยเมมเบรนนั้นได้มีการนำเทคนิคนี้มาใช้สำหรับการแยกและการทำบริสุทธิ์ของกรดซัลฟูริก น้ำหมักกรดซัลฟูริกถูกบำบัดโดยใช้ไมโครฟิวเทชัน (Micro-filtration) อัลตราฟิวเทชัน(Ultrafiltration) และการดูดซับด้วยถ่าน และส่วนที่กรองได้ (Filtrate) นั้น ถูกทำให้อยู่ในสภาวะกรดที่ประมาณ pH 2.0 - 3.5 และทำให้เข้มข้นขึ้นภายใต้สภาวะอากาศที่อุณหภูมิ 65 °C เพื่อกำจัดน้ำและกรดอะซิติก การตกผลึกของสารละลายที่มีความเข้มข้นของกรดซัลฟูริกนั้นให้ความบริสุทธิ์ของผลิตภัณฑ์ที่สูง (> 99.5%) ของกรดซัลฟูริก และมีผลผลิตสูงกว่า 75% (Cheng และคณะ, 2012) รายงานการศึกษาอีกหนึ่งรายงานในการใช้เทคโนโลยีการกรองโดยเมมเบรนน้ำหมัก กรดซัลฟูริกโดยกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนถูกควบคุมอย่างต่อเนื่องในการทำบริสุทธิ์ โดยไมโครฟิวเทชัน อัลตราฟิวเทชัน และนาโนฟิวเทชัน (Nanofiltration) ตามลำดับ โดยมีวัตถุประสงค์สำหรับการนำโมเลกุลหรืออนุภาคที่มีขนาดใหญ่กว่า 0.2 ไมโครเมตร ออกจากน้ำหมัก และน้ำหมักโมเลกุลมากกว่า 5000 และประมาณ 150-350 Da ถูกกำจัดออกตามลำดับ การกรองขั้นสุดท้ายนั้นทำให้น้ำหมักมีความเข้มข้นขึ้นกระทำภายใต้สภาวะอากาศและทำการตกผลึก ความบริสุทธิ์ที่ได้รับสูงถึง (> 99.4%) ของกรดซัลฟูริก (Wu และคณะ, 2007) ในขณะที่การกรองแบบนาโนฟิวเทชันนั้น ยังมีบางแง่มุมของกระบวนการที่ต้องได้รับการแก้ไข เช่นราคาของเมมเบรน การอุดตันของเมมเบรน และการประยุกต์ใช้วิธีการนี้ในน้ำหมักจริงยังคงมีปัญหาที่ต้องได้รับการแก้ไข

2.4.3 การตกตะกอน

วิธีการแบบดั้งเดิมสำหรับการแยกกรดอินทรีย์จากน้ำหมัก โดยกระบวนการตกตะกอนด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) หรือแคลเซียมออกไซด์ (CaO) การแยกของกรดแลคติกหรือกรดซิตริกโดยใช้วิธีการนี้ได้มีการนำมาใช้ในเชิงพาณิชย์ในการแยกผลิตภัณฑ์ กรดซัลฟูริกนั้น กระบวนการนี้ถูกเสนอเป็นครั้งแรกโดย Datta, 1992 นอกจากนี้การตกตะกอนกรดซัลฟูริก ยังมีบทบาทสำคัญในการเพิ่มแหล่งแคลเซียมไอออนสำหรับการปรับน้ำหมักให้เป็นกลาง นอกเหนือจากการตกตะกอนซัลไฟเนตให้เป็นแคลเซียมซัลไฟเนต เนื่องจากการละลายที่ต่ำในน้ำใน ขั้นตอนหลังจากกระบวนการหมักเสร็จสิ้น ผลิตภัณฑ์อยู่ในรูปของแข็งจะถูกนำไปเข้าสู่กระบวนการหมุนเหวี่ยงและแยกออกจากน้ำหมัก แคลเซียมซัลไฟเนตถูกแยกออกจากน้ำหมักโดยการกรองและ แคลเซียมซัลไฟเนตที่ได้จะทำปฏิกิริยากับกรดซัลฟูริก(H_2SO_4) ที่มีความเข้มข้นสูงซึ่งปฏิกิริยาดังกล่าว จะให้กรดซัลฟูริกและขั้นตอนนี้ทำให้เกิดแคลเซียมซัลเฟต (ยิปซัม) เป็นผลพลอยได้ ผลิตภัณฑ์กรด ซัลฟูริกที่ได้รับนั้นจะนำสู่การทำให้บริสุทธิ์ต่อไปโดยการดูดซับด้วยคาร์บอนหรือการแลกเปลี่ยนไอออนและทำให้ผลิตภัณฑ์มีความเข้มข้นมากขึ้น ด้วยการตกผลึกโดยการระเหย (Cheng และคณะ 2012) นอกจากนี้ในขั้นตอนการดังกล่าว อาจเกิดผลพลอยได้

เป็นแคลเซียมแลคเตท แต่อย่างไรก็ตามสิ่งเจือปนทั้งหมดจะต้องถูกกำจัดออก ทำให้ได้กรดซัคซินิก มีความบริสุทธิ์สูงเพื่อที่จะใช้สำหรับอุตสาหกรรมพลาสติก ในระหว่างขั้นตอนการตกตะกอน ปริมาณการใช้สารเคมี อาทิเช่น $\text{Ca}(\text{OH})_2$, CaO และ H_2SO_4 มีปริมาณมาก แคลเซียมในสารละลายทำปฏิกิริยากับซัลเฟต ในการผลิตแคลเซียมซัลเฟตหรือยิปซัมไม่สามารถจำหน่ายเชิงพาณิชย์ได้โดยตรง เนื่องจากมีกลิ่นและสีเจือปน ของแข็งนี้สามารถแยกออกจากสารละลายและกรดซัคซินิกได้ สามารถดำเนินการต่อไปในกระบวนการแยกอื่นๆ เช่น การกลั่นสุญญากาศ วิธีการตกตะกอน สามารถแยกกรดซัคซินิกได้ขณะทำการหมักผ่านการเติมแคลเซียมบัพเฟอร์ที่ช่วยรักษาความเป็นกรดต่างของระบบและสามารถตกตะกอนแยกผลิตภัณฑ์ได้ในเวลาเดียวกัน (Lee และคณะ, 2008)

2.4.4 การแยกผลิตภัณฑ์ควบคู่กระบวนการหมัก

จากวิธีการแยกผลิตภัณฑ์ที่แตกต่างกันนั้น สามารถนำข้อดีอย่างใดอย่างหนึ่งของแต่ละวิธีมารวมกันเพื่อเพิ่มการเก็บเกี่ยวกรดซัคซินิกให้ได้ผลผลิตที่สูงกว่า วิธีการที่ดำเนินการเพียงกระบวนการเดียว ทำให้มีข้อบกพร่องบางอย่างที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการยุ่งยากและอาจเกิดการสูญเสียผลิตภัณฑ์ การแยกผลิตภัณฑ์ควบคู่กระบวนการหมักเป็นกระบวนการที่เหมาะสมกระบวนการหนึ่งที่ไม่จำเป็นต้องมีการกำจัดเซลล์ออกจากระบบ และมีความต้องการด้านการใช้สารเคมีในจำนวนน้อย จุดมุ่งหมายสำคัญของการแยกผลิตภัณฑ์ควบคู่กระบวนการหมักคือก่อให้เกิดความสำเร็จในการแยกกรดซัคซินิกจากน้ำหมัก สามารถเป็นวิธีการที่จะนำไปใช้ในเทคโนโลยีการแยกระดับอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ มีความคุ้มค่าด้านค่าใช้จ่ายต้นทุนและด้านเวลาสามารถก่อให้เกิด ประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นในกระบวนการผลิตและผลผลิตจากวิธีการแยกดังกล่าว จะเห็นได้ชัดว่ามีความ จำเป็นในการศึกษาวิจัยอย่างต่อเนื่องในการพัฒนากระบวนการให้มีความง่ายต่อการดำเนินงานและการทำบริสุทธิ์ของกรดซัคซินิกจากน้ำหมักได้โดยตรงไม่มีกระบวนการซับซ้อน

สำหรับการพัฒนาในอนาคต เทคนิคการแยกแบบดั้งเดิมควรได้รับการปรับปรุงควบคู่ไปกับเทคโนโลยีในการผลิต แต่อย่างไรก็ตามการยับยั้งผลิตภัณฑ์เป็นปัจจัยสำคัญในการพัฒนากระบวนการ ทางชีวภาพของการผลิตกรดซัคซินิกและผลพลอยได้ของกรดอินทรีย์ที่เกิดขึ้นในระบบทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์แบคทีเรีย (Lin และคณะ, 2008) ก็ยังคงต้องมีการพัฒนาแก้ไขต่อไป เพื่อที่จะเพิ่มประสิทธิภาพการหมักกรดซัคซินิกต้องถูกแยกออกหลังจากเกิดปฏิกิริยาให้เร็วที่สุดเท่าที่จะทำได้ แนวคิดนี้เรียกว่าการแยกผลิตภัณฑ์ขณะดำเนินการหมัก หรือกระบวนการแยกผลิตภัณฑ์ควบคู่กับกระบวนการหมัก ซึ่งได้ทำการรวมปฏิกิริยาทางชีวเคมีและการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ไว้ในกระบวนการดำเนินงานเพียงขั้นตอนเดียว และสามารถลดต้นทุนในขั้นตอนการยับยั้งผลิตภัณฑ์ได้โดยตรง โดยการหมักจะเป็นไปอย่างต่อเนื่อง โดยการสกัดการใช้เทคนิคเมมเบรน

หรือการดูดซับ ในวิธีการเก็บเกี่ยวในขณะที่ทำการหมักสำหรับกรดซัคซินิก มีการใช้สารเคมีให้น้อยที่สุด รวมทั้งการใช้พลังงานน้อยที่สุด นอกเหนือจากการทำงานตามปกติและวิธีการนี้สามารถกำจัดชีวมวลที่เป็นอันตรายต่อการผลิต กรดซัคซินิกได้หลังจากมีการลดลงของการยับยั้งผลิตภัณฑ์สุดท้าย ข้อดีต่างๆเหล่านี้นำไปสู่ปริมาณที่ลดลงของผลพลอยได้ที่ไม่พึงประสงค์ (เมื่อเทียบกับการผลิตกรดซัคซินิกที่เป็นผลผลิตหลัก) สามารถลดต้นทุนการผลิตทั้งต้นทุนผันแปรและต้นทุนคงที่ งานวิจัยด้านกระบวนการแยกผลิตภัณฑ์ควบคุมกระบวนการหมักของกรดซัคซินิกนั้นยังไม่มีข้อมูลเท่าที่ควร มีรายงานข้อมูลไม่มากนัก มีเพียง 2 เทคนิค ที่ถูกตีพิมพ์คือการใช้ Electrodialysis (ED) และ Expanded bed adsorption.

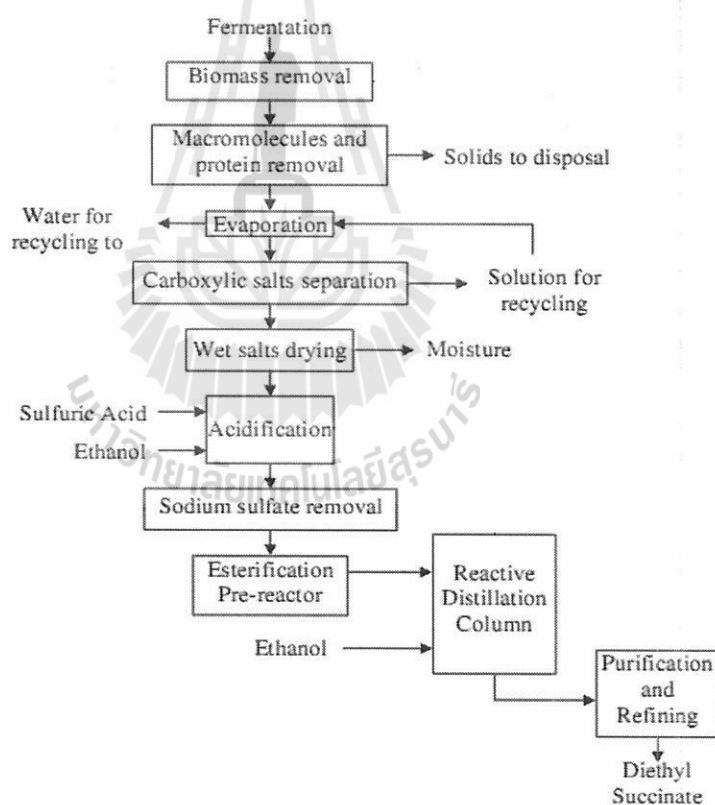
การแยกผลิตภัณฑ์ควบคุมกระบวนการหมักของกรดซัคซินิกสำหรับกระบวนการหมักอย่างต่อเนื่อง โดยใช้ *A.succiniciproducens* ในการผลิต ควบคุมไปกับการใช้ เทคนิค ED (Meynial-Salles และคณะ, 2008) เมมเบรนทั้งสองประเภท เมมเบรนที่มีประจุทั้งประจุลบและประจุบวก และเมมเบรนแลกเปลี่ยนไอออน มีการถ่ายโอนภายใต้สนามไฟฟ้าเกิดขึ้นโดยตรง โดยผ่านขั้วลบและขั้วบวกตามลำดับ ในระหว่างการแยกน้ำหมักมีการปรับค่า pH เพื่อให้ น้ำหมักอยู่ในสภาวะที่เหมาะสม ค่าคงที่ของการแตกตัวของกรดกรดซัคซินิกมีสองค่า คือที่ pH 4.2 และ 5.6 ซึ่งทำให้กรดซัคซินิกแยกออกจากกันเป็นไอออนของซัคซิเนต ไอออนและแคลเซียมไอออน ประจุลบของซัคซิเนตไอออนทำให้เกิดการเคลื่อนย้ายผ่านเมมเบรนแลกเปลี่ยนไอออนบวก ในขณะที่โซเดียมหรือ แคลเซียมไอออนจะถูกส่งผ่านเมมเบรนแลกเปลี่ยนไอออนลบ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ามีความเข้มข้นของเซลล์แบคทีเรียและอัตราการผลิตกรดซัคซินิกเป็น 42 กรัมต่อลิตร และอัตราการผลิตอยู่ที่ 14.8 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าการหมักแบบกะถึง 28 และ 20 เท่าตามลำดับ

กระบวนการหมักแบบบูรณาการสำหรับการผลิตกรดซัคซินิก โดย *A. succinogenes* ได้รับ การพัฒนาโดยใช้แนวคิดโดยการแยกผลิตภัณฑ์ควบคุมกระบวนการหมัก โดยกระบวนการจะดำเนินการควบคุมไปกับการใช้ Expanded-bed adsorption (EBA) ระบบการหมักโดยวิธีการดังกล่าวนี้ ช่วงเวลาระหว่างที่มีการยับยั้งผลิตภัณฑ์เกิดขึ้นนั้น *A.succinogenes* เพิ่มการเจริญจาก 48 ชั่วโมงถึง 126 ชั่วโมงและการผลิตกรดซัคซินิกมีการผลิตที่เพิ่มขึ้นถึง 145.2 กรัมต่อลิตร

2.4.5 ปฏิกริยาเอสเทอร์ริฟิเคชันและการกลั่น

ปฏิกริยา Esterification เป็นกระบวนการต่อเนื่องที่มีประสิทธิภาพ โดยสามารถแยกสิ่งเจือปนในกรดอินทรีย์ได้เป็นอย่างดี โดยการเปลี่ยนจุดเดือดของสารประกอบเอสเทอร์ตามลำดับ ผลพลอยได้ของกรดอินทรีย์ทั่วไปมักมีกรดฟอร์มิก กรดอะซิติกและกรดแลคติก ตามลำดับ Esterification ของกรดซัคซินิกที่เกี่ยวข้องกับการเกิดปฏิกริยาเคมีกับแอลกอฮอล์ เช่น เอทานอล

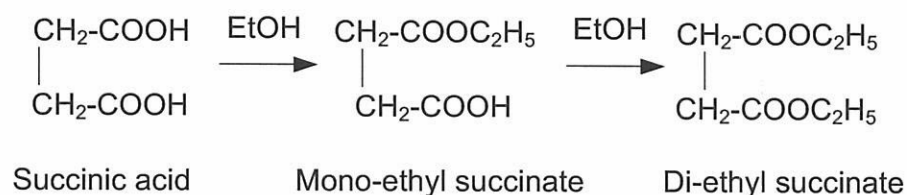
เพื่อทำการผลิต Monoethyl succinate (MES) และ Diethyl succinate (DES) นอกจากนี้ น้ำ 2 โมลถูกผลิตขึ้นจากปฏิกิริยาดังกล่าว ปฏิกิริยา Esterification มีลักษณะโดยจะจำกัด อุณหภูมิค่าความร้อนที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงผลผลิต ผลผลิต DES ที่สูงขึ้นจะเกิดขึ้นโดยการ เปลี่ยนแปลงความสมดุลอุณหภูมิค่าความร้อนในระบบเพื่อทำการแยกผลิตภัณฑ์ โดยทำการ กำจัดน้ำ การขจัดน้ำกระทำโดยการใส่เมมเบรนทำให้กระบวนการ Esterification นั้นได้รับความ สนใจเพิ่มมากขึ้นเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพในด้านการประหยัดพลังงาน กระบวนการแยกผลติ- ภัณฑ์โดยการกลั่นควบคู่กระบวนการ Esterification และการซึมผ่านไอน้ำของการกลั่นเอทานอล ได้ประสบความสำเร็จในการทำบริสุทธิ์ของกรดซัคซินิกจากน้ำหมัก (Lubsungneon และคณะ, 2014) (แสดง ดังรูปภาพ 6) ก่อนการเข้าสู่ปฏิกิริยา Esterification นั้นสิ่งจำเป็น คือ การเอาสิ่งเจือปนโมเลกุลขนาดใหญ่ออก การซึมผ่านไอน้ำ (VP) มีข้อดีเพราะสามารถดำเนินการ ได้ที่อุณหภูมิสูง และความดันสูงได้เป็นผลให้ค่าของแรงผลักดันเพิ่มขึ้น และหลังจากเสร็จสิ้น กระบวนการขจัดน้ำ กรดซัคซินิกส่วนใหญ่ได้เปลี่ยนแปลงเป็น DES ขั้นตอนต่อมาคือการกลั่น แยกน้ำตามลำดับส่วนของ DES ด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนให้ผลผลิตเอทานอลและกรด ซัคซินิก



รูปภาพ 6 ขั้นตอนในการทำให้บริสุทธิ์ของกรดซัคซินิกจากน้ำหมักด้วยปฏิกิริยา Esterification และวิธีการกลั่น (ดัดแปลงจาก Londono, 2010)

สารประกอบเอสเทอร์ เกิดจากการที่กรดอินทรีย์หนึ่ง ๆ ทำปฏิกิริยากับเอทานอล โดยหมู่ คาร์บอกซิลของกรดอินทรีย์จะทำปฏิกิริยากับหมู่ไฮดรอกซิลของอัลกอฮอล์ เช่น เอทานอล ได้เป็น

พันธะเอสเทอร์ เช่นเดียวกับกรดซัคซินิกที่สามารถเกิดเป็นสารประกอบเอสเทอร์ได้ แสดงดังรูปภาพ 7



รูปภาพ 7 กระบวนการ esterification ของกรดซัคซินิกและเอทานอล

ตาราง 4 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	0.917	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

นอกจากนี้แล้ว succinate ester มีความเป็นพิษต่ำ และเป็นสารตัวกลางในการผลิต poly-butylene succinate (PBS) สำหรับการผลิตพลาสติกชีวภาพอีกด้วย และสำหรับกระบวนการเกิดเอสเทอร์จำเป็นต้องมีตัวเร่งปฏิกิริยา เพื่อส่งเสริมการเปลี่ยนไปเป็นสารที่เราต้องการ และจากรายงานวิจัยทางวิชาการต่างประเทศ ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับสารเร่งนี้ทั้งทางชนิดและปริมาณ เพื่อกระตุ้นให้เกิดผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาเอสเทอร์ได้อย่างมีคุณภาพ ซึ่งได้มีการใช้

macroporous Amberlyst-15 ion exchange resin ที่ความเข้มข้น 1-5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนัก ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ระหว่าง 78 ถึง 120 องศาเซลเซียส (Kolah *et al.*, 2008) เพื่อให้เกิด mono-ethyl succinate และ di-ethyl succinate ตามลำดับ จากตาราง 4 แสดงให้เห็นว่า หลังจากที่เกิดปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของกรดอินทรีย์กับเอทานอลแล้วนั้น ทำให้จุดเดือด มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน ทำให้สามารถแยกโดยอาศัยหลักการกลั่นได้นั่นเอง แต่อย่างไรก็ตาม การออกแบบหอกลั่นนั้น จำเป็นที่จะต้องใช้ความชำนาญและเชี่ยวชาญเป็นอย่างมาก ทั้งนี้ เนื่องจากหากทำการกลั่นไม่ดีแล้ว ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการแยกสารออกจากกันจะไม่ดีตามมานอกจากนี้หากใช้หอกลั่นที่มีประสิทธิภาพต่ำจะทำให้สิ้นเปลืองพลังงานในการกลั่น มากขึ้นอีกด้วย

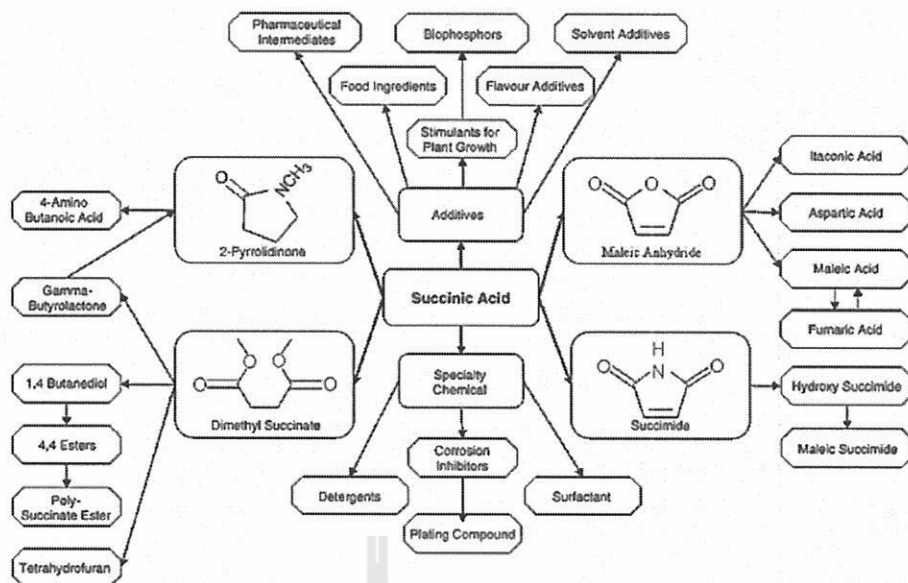
โดยในหลักการแล้ว การกลั่นลำดับส่วนเป็นวิธีการแยกของเหลวที่สามารถระเหยได้ตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไป มีหลักการเพื่อต้องการแยกองค์ประกอบในสารละลายให้ออกจากกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง การแยกองค์ประกอบที่มีความแตกต่างของจุดเดือดไม่มากนัก การกลั่นแบบกลั่นลำดับส่วนเหมาะ สำหรับใช้กลั่นของเหลวที่เป็นองค์ประกอบของสารละลายที่จุดเดือดต่างกันอย่างน้อยๆ เช่น การแยกเอทานอลกับน้ำ เป็นต้น โดยกระบวนการกลั่นลำดับส่วนจะเป็นการนำไอของแต่ละส่วนไปควบแน่น แล้วนำไปกลั่นซ้ำ และควบแน่นไอร่อย ๆ ภายในหอกลั่นหรือคอลัมน์ (distillation column) แต่โดยทั่วไปแล้วหอกลั่นจะมีลักษณะเป็นหอสูงซึ่งภายในจะมีการออกแบบให้มีการสัมผัสกันระหว่างไอที่ลอยขึ้นไปกับของเหลวที่ควบแน่นตกสู่ด้านล่างโดยการออกแบบภายในหอกลั่นนั้นมักจะนิยมทำเป็นแบบขั้นๆ ยกตัวอย่างเช่นการกลั่นเอทานอล ซึ่งความเข้มข้นของเอทานอลจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ในชั้นที่อยู่สูงขึ้นไป แต่ปัญหาหลักของการกลั่นเอทานอลก็คือจำนวนชั้นที่ต้องการเพื่อที่จะทำการกลั่นเอทานอลให้ได้ความบริสุทธิ์สูงสุดนั้นจะต้องมีจำนวนมากกว่า 75 ชั้น ซึ่งส่งผลกระทบต่อให้มีการลงทุนที่สูงและต้องใช้ความร้อนสูงในการกลั่นจากการที่คณะผู้วิจัยได้ทำการค้นคว้าวิจัย ในการศึกษากระบวนการผลิตเอทานอลสำหรับใช้เป็นเชื้อเพลิงด้วยระบบผสมระหว่างการแยกไอน้ำเยื่อแผ่นและการดูดซับ พบว่าได้ผลการกลั่นเอทานอลจากน้ำหมักเป็นอย่างดี โดยสามารถกลั่นเอทานอลได้ความเข้มข้นสูงถึงร้อยละ 95 ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงที่สุดที่สามารถกลั่นได้ด้วยความร้อน เนื่องจากเกิดของผสมที่เรียกว่า อะซีโอโทรป (azeotropic mixture) นั้นเอง โดยได้ทำการยื่นขอสิทธิบัตรเครื่องกลั่นประสิทธิภาพสูงด้วยระบบการปั่นผสมไอน้ำแบบต่อเนื่องเมื่อวันที่ 8 กุมภาพันธ์ 2553 เลขที่คำขอ 1001000226 แล้วนั้นเพื่อให้บรรลุจุดมุ่งหมายให้มีประสิทธิภาพในการกลั่นสูงสุด ด้วยเหตุนี้กระบวนการกลั่นจะมีประโยชน์และมีประสิทธิภาพในการแยกผลพลอยได้ (by-product) จากกระบวนการหมักกรดซัคซินิก เช่น กรดอะซิติก กรดฟอร์มิก และกรดแลคติกได้

2.5 การประยุกต์ใช้กรดซักซินิกในอุตสาหกรรมพลาสติกชีวภาพ

ปัจจุบันมีการผลิตกรดซักซินิกประมาณ 2,000-3,000 ตันต่อปี และเพิ่มปริมาณขึ้นเรื่อยๆ ในอัตรา 10 เปอร์เซ็นต์ต่อปี (Kidwell, 2008) กรดซักซินิกสามารถใช้เป็นสารตั้งต้นในสารเคมีสำคัญ ในหลายอุตสาหกรรม รวมถึงอนุพันธ์ของกรดซักซินิก อาทิ เช่น apidic acid, 1,4-butanediol, tetrahydrofuran, N-methyl pyrrolidinone, 2-pyrrolidinone, succinate salts และ gamma-butyrolactone (รูปภาพ 8) และที่สำคัญกรดซักซินิกถูกใช้ในการสังเคราะห์พอลิเมอร์ที่สามารถ ย่อยสลายได้ เช่น polybutyrate succinate (PBS) and polyamide (Nylon®x,4) ในการผลิตพลาสติกชีวภาพ (McKinley และคณะ, 2007)

การผลิตกรดซักซินิกจากกระบวนการหมักทางอุตสาหกรรมในประเทศไทยนั้น ยังมีข้อจำกัดอยู่บ้าง อาจเนื่องมาจากอุปกรณ์เครื่องมือที่มีความซับซ้อนและเฉพาะเจาะจง และต้องอาศัยความรู้ ความชำนาญ เมื่อเปรียบเทียบกับสารเคมีที่เป็นคู่แข่งกันอย่าง เช่น กรดมาเลอิกแอนดีไฮด์ (Maleic anhydride) ซึ่งผลิตได้จากกระบวนการปิโตรเลียม (กระบวนการทางเคมี) ที่มีการผลิตระดับอุตสาหกรรมอย่างกว้างขวาง อีกทั้งต้นทุนกระบวนการทางเคมีในการเปลี่ยนแปลงกรดมาเลอิก แอนดีไฮด์ให้กลายเป็นกรดซักซินิกโดยผ่านกระบวนการทางเคมีนั้นมีต้นทุนที่สูงซึ่งทำให้มีข้อจำกัดการในการใช้กรดซักซินิกถือเป็นข้อเสียเปรียบของกระบวนการผลิตกรดซักซินิก โดยกระบวนการทางเคมี

แต่ในขณะเดียวกันได้มีงานวิจัยในวารสารวิชาการต่างๆ ที่ทำการศึกษาพัฒนาการผลิตกรดซักซินิกจากกระบวนการหมัก โดยการใช้วัตถุดิบทดแทนในรูปแบบที่หลากหลายสามารถทำให้กระบวนการผลิตกรดซักซินิกมีประสิทธิภาพเพิ่มมากขึ้นเมื่อเทียบกับกระบวนการปิโตรเลียมซึ่งเป็นกระบวนการทางเคมี (Song and Lee, 2006) ทำให้นำไปสู่การใช้กรดซักซินิก ในวงกว้างขึ้นเพิ่มอุปสงค์และอุปทานในตลาดของโลก



รูปภาพ 8 เคมีภัณฑ์ที่สามารถสังเคราะห์จากกรดซัคซินิก (Song and Lee, 2006)

2.5.1 การตลาดของกรดซัคซินิก

ปัจจุบันทั่วโลกมีความต้องการในการใช้เม็ดพลาสติกชีวภาพอยู่ประมาณ 500,000 เมตริกตันต่อปี โดยพลาสติกชีวภาพที่เป็นที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย คือ พอลิแลคติกแอซิด (polylactic acid: PLA) อย่างไรก็ตาม กำลังการผลิตเม็ดพลาสติกชีวภาพชนิดพอลิแลคติกแอซิดทั่วโลกมีเพียง 200,000 เมตริกตันต่อปี ดังนั้นปัจจุบันพลาสติกชีวภาพชนิดอื่นๆ จึงได้เข้ามามีส่วนแบ่งในตลาดผลิตภัณฑ์พลาสติกชีวภาพมากยิ่งขึ้น กรดซัคซินิกที่ผลิตจัดจำหน่ายในเชิงพาณิชย์ส่วนใหญ่ได้จากกระบวนการเคมีโดยการออกซิเดชันลำดับส่วนของ n - butane ตามด้วยขั้นตอนของปฏิกิริยา Hydrogenation ของ Maleic anhydride โดยต้นทุนของ n -Butane อยู่ที่ 850 - 950 เหรียญสหรัฐฯต่อตัน (McKinley และคณะ, 2007) ราคาของกรดซัคซินิก มีการรายงานว่าอยู่ในช่วง 5.9 - 9.0 เหรียญสหรัฐฯต่อกิโลกรัม โดยขึ้นอยู่กับความบริสุทธิ์ของกรดซัคซินิก สำหรับต้นทุนการผลิตของกรดซัคซินิกนั้นเกิดจากปัจจัยหลายประการด้วยกัน ซึ่งรวมไปถึงขั้นตอนการผลิตกรดซัคซินิก และยังเกี่ยวข้องกับผลผลิตของกรดซัคซินิกที่ได้จากกระบวนการหนึ่งๆ สำหรับค่าใช้จ่ายของวัตถุดิบและค่าใช้จ่าย ในการเก็บเกี่ยวผลผลิตโดยเฉพาะอย่างยิ่งต้นทุนด้านวัตถุดิบของ Maleic anhydride ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่าเป็นส่วนสำคัญทำให้ต้นทุนโดยรวมของการผลิตกรดซัคซินิกเพิ่มมากขึ้น (Song และ Lee, 2006) อีกทั้งกระบวนการ Hydrogenation ยังมีการผลิตสารพิษในปริมาณมากทำให้ขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ของผลิตภัณฑ์กรดซัคซินิก นั้นมีค่าใช้จ่ายที่สูงขึ้นอย่างชัดเจน

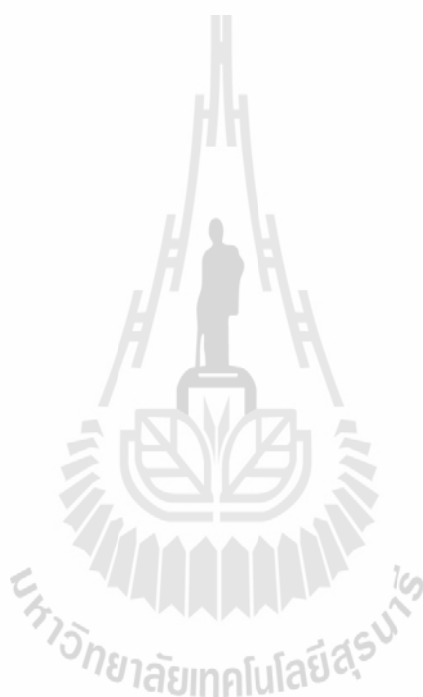
กระบวนการหมักซัคซิเนตที่มีกำลังผลิตขนาดใหญ่ นั้น ได้มีการเริ่มการผลิตขึ้นในช่วงต้นปี ค.ศ. 1980 และในปัจจุบันการผลิตซัคซิเนตจากกระบวนการหมักมีประมาณ 5,000 ตันต่อปี

และขายในราคา 2.20 เหรียญสหรัฐฯต่อกิโลกรัมในตลาดเชิงอุตสาหกรรมอาหาร อีกทั้ง เนื่องจากยังคงมีข้อจำกัด ของพลังงานฟอสซิลและปัญหาสิ่งแวดล้อมที่เพิ่มมากขึ้นนั้น ทำให้เกิดการกระตุ้นให้นักวิจัยมีความ ต้องการในการเปลี่ยนแปลงการผลิตจากกระบวนการปิโตรเคมีมาเป็น กระบวนการทางชีวภาพ และเป็นไปตามที่คาดการณ์ไว้ว่าราคาของกรดซัคซินิกที่ผลิตทางชีวภาพ จะลดลงประมาณ 0.55 เหรียญสหรัฐฯ ต่อกิโลกรัม หากขนาดการผลิตมีกำลังสูงกว่า 75,000 ตัน เนื่องจากสามารถใช้ประโยชน์จากสารตั้ง ต้นคาร์บอน (วัตถุดิบ) ที่มีราคาถูก เช่น ข้าวโพด แป้ง กากน้ำตาล และน้ำตาล (Zeikus และ คณะ, 1999)

อีกทางเลือกหนึ่งของกระบวนการหมักกรดซัคซินิกนั้น สามารถผลิตได้จากน้ำตาลกลูโคส โดยปัจจุบันมีกระบวนการหมักกรดซัคซินิกจากน้ำตาลกลูโคสได้มากกว่า 30,000,000 ตันต่อปี ของการผลิตทั่วโลก ราคาน้ำตาลกลูโคสจะอยู่ที่ประมาณ 220-250 เหรียญสหรัฐฯต่อตัน โดยหาก สมมติฐานได้ผลผลิตของกรดซัคซินิก 91% (w/w) ของน้ำตาลกลูโคส แต่โดยรวมแล้วยังคงมี ข้อจำกัดในด้านการประเมินค่าใช้จ่ายต้นทุนวัตถุดิบ สำหรับการผลิตกรดซัคซินิกทางชีวภาพระดับ การผลิตขนาดเล็ก ทำให้นักวิจัยมีการปรับปรุงและพัฒนาการผลิตกรดซัคซินิกโดยใช้ทรัพยากร ทางชีวภาพ จากที่มีอยู่ในแต่ละประเทศมาผ่านกระบวนการหมักเพื่อผลิตกรดซัคซินิกที่มี ความบริสุทธิ์สูงเทียบเคียงกับการผลิตทางเคมี ส่งผลให้สามารถแข่งขันกับกระบวนการผลิตทาง เคมีได้ ด้วยเหตุนี้ จึงได้มีงานวิจัยทางวิชาการจำนวนมากมีการให้ความสำคัญในการศึกษาด้านนี้ อีกทั้งในภาคส่วน อุตสาหกรรมการผลิตกรดซัคซินิกชีวภาพกำลังจะมาแทนที่การผลิตปิโตรเลียม เคมีของ Maleic anhydride (2.2 ล้านตันต่อปี) (กระทรวงพลังงานสหรัฐอเมริกา, 2004) และมีการจัดหาตลาดที่ เกิดขึ้นใหม่สำหรับกรดซัคซินิกและอนุพันธ์กรดซัคซินิก (30 ล้านตันต่อปี) โดยมี BioAmber, Reverdia, Myriant Technologies และ DSM-Purac เป็นบริษัทระดับแถวหน้าของอุตสาหกรรมการผลิตกรดซัคซินิก ทั้งสองบริษัทสามารถผลิตรวมกัน ซึ่งคาดว่าจะถึง 70,000 ตันต่อปี ในปี 2013 แต่อย่างไรก็ตามการผลิตที่คาดการณ์เอาไว้ นั้น สามารถผลิตเพียงได้เพียง 0.2% ของตลาดความต้องการ กรดซัคซินิกทั้งหมด (McKinley *et al*, 2007) แต่จากการประมาณขนาดของตลาดพบว่า มี ศักยภาพรองรับการผลิตกรดซัคซินิก ทางชีวภาพได้มาก ดังนั้นทำให้นักวิจัยนี้ตั้งจุดสำคัญข้างต้น เพื่อนำมาพัฒนากระบวนการผลิตที่มี ประสิทธิภาพที่ดียิ่งขึ้น ทั้งยังแสดงให้เห็นว่าปัจจุบันกระบวนการของกรดซัคซินิกโดยปิโตรเลียม จะสามารถถูกแทนที่ด้วยกระบวนการผลิตกรดซัคซินิกโดยการหมักได้ภายในอนาคตอันใกล้

นอกจากนี้พลาสติกชีวภาพที่กำลังได้รับความนิยมในลำดับถัดมา คือ พอลิบิวทิลีนซัคซิเนต (polybutylene succinate: PBS) เนื่องจากเม็ดพลาสติกชีวภาพชนิดนี้ สามารถนำไปขึ้นรูป ได้ใกล้เคียงกับพลาสติกทั่วไป เมื่อเร็วๆนี้บริษัท Mitsubishi Chemical แห่งประเทศญี่ปุ่น และบริษัท ปตท. แห่งประเทศไทย ได้ตกลงที่จะศึกษาการพัฒนา bio-polybutylene succinate (โพลิบิวทิลีน ซัคซิเนตชีวภาพ) ในการผลิตจากชีวมวลที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ ทั้ง 2 บริษัทจะทำ การศึกษาการพัฒนาธุรกิจ GS Pla ซึ่งเป็นเม็ดพลาสติกที่ผลิตโดยบริษัท Mitsubishi

และเม็ดพลาสติก bio-succinic acid ซึ่งจากข้อมูลนี้ถือเป็นอุตสาหกรรมปลายน้ำที่จะมีการพัฒนา อย่างไรก็ตามหากการผลิตกรดซัคซินิกที่เป็นสารตั้งต้น สามารถทำให้มีความบริสุทธิ์สูง และต้นทุนการผลิตต่ำ ถือเป็นความคุ้มค่าทางเศรษฐกิจ เพื่อส่งไปยังการผลิตเม็ดพลาสติกชีวภาพต่อไปได้ตั้งนั้นกระบวนการแยกและทำให้บริสุทธิ์นั้นถือเป็นขั้นตอนที่สำคัญเพื่อสนับสนุนให้ระบบการผลิตพลาสติกชีวภาพเป็นไปอย่างสมบูรณ์และมีประสิทธิภาพสูงในอนาคต



บทที่ 3 วิธีทำการทดลอง

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

สำหรับอุปกรณ์เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัยนี้ จะเป็นเครื่องมือที่มีอยู่แล้วบางส่วน ณ อาคารปฏิบัติการศูนย์เครื่องมือ 10 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยยกตัวอย่างเครื่องมือที่มีใช้อยู่แล้ว ในอาคารปฏิบัติการ เช่น

1. Laminar flow
2. Spectrophotometer
3. ถังปฏิกรณ์แก้ว พร้อมระบบการกวนและควบคุมอุณหภูมิ สำหรับปฏิกิริยา esterification
4. Hot plate stirrer
5. Autoclave
6. High performance liquid chromatography (HPLC)
7. ระบบแยกน้ำโดยใช้เทคนิคการแยกไอผ่านเยื่อแผ่นและการดูดซับ
8. หอกลั่นประสิทธิภาพสูง
9. Gas chromatography (GC)
10. Incubator shaker
11. Bioreactor ขนาด 5 ลิตร (Sartorius, Germany)

3.2. การเลี้ยงเชื้อ *Actinobacillus succinogenes* ATCC 55618

เชื้อแบคทีเรีย *A. succinogenes* จะถูกซื้อมาจาก American Type Culture Collection (ATCC, USA) จากนั้นจะทำการเลี้ยงด้วยอาหารชนิด AS medium ดังแสดงในตาราง 5

ตาราง 5 ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด AS medium (Liu *et al.*, 2008)

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น (g.L ⁻¹)
Na ₂ HPO ₄ . 12H ₂ O	1.5
NaH ₂ PO ₄ . 2H ₂ O	1.0
MgCl ₂	0.2
CaCl ₂	0.2
NaCl	1.0
Carbon source (glucose or glucose syrup)	10.0
Yeast extract	5.0

และทำการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อให้กับ pH 6.5 โดยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ จากนั้นนำมานิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.3 การเตรียมกล้าเชื้อ

เชื้อ *A. succinogenes* จะถูกถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อเตรียมเป็นหัวเชื้อ ในกระบวนการหมัก โดยมีการหมักในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนที่ทำการเติมก๊าซไนโตรเจนเพื่อไล่ออกซิเจนออก หลังจากนั้นทำการบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่อัตราการกวน 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 16 ชั่วโมง เพื่อเตรียมความเข้มข้นของเซลล์ให้ได้ 5-10 เปอร์เซ็นต์ เพื่อเตรียมไว้สำหรับถ่ายลงสำหรับกระบวนการหมักต่อไป

3.4 กระบวนการหมักแบบกะ

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 1.5 ลิตร ลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ขนาดปริมาตร 2 ลิตร (Sartorius, Germany) และนำกล้าเชื้อที่เตรียมไว้ถ่ายลงไปลงในถังหมัก ดำเนินกระบวนการหมัก โดยใช้ถังหมักที่จำเป็นต้องมีการควบคุมด้วยเครื่องควบคุมเฉพาะ มีการควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ตามต้องการ การแสดงค่า pH ที่มีการเปลี่ยนแปลงในระบบมีตัวแสดงผลทางมอนิเตอร์ อีกทั้งเครื่องควบคุมจะมีการเชื่อมต่อกับปั๊มที่ทำหน้าที่ปั๊มต่างลงในถังหมักเพื่อควบคุมค่า pH และอัตราการกวนที่สามารถควบคุมและอัตราความเร็วรอบได้ ระหว่างดำเนินการหมักที่มีการควบคุมค่า pH ให้คงที่นั้น จะมีการเตรียมสารละลายต่างแคลเซียมคาร์บอเนต (ปูนขาว) เข้มข้น โดยที่หลังจาก pH probe เกิดการตอบสนองและแสดงการลดลงของ pH ปั๊มจะปั๊มต่างนี้ลงไป โดยที่ไม่เปลี่ยนปริมาตรในถังหมักมากนัก เนื่องจากต่างที่ใช้มีความเข้มข้นสูงเพื่อที่จะควบคุมปริมาตรในการหมัก ทั้งนี้ควบคุมอุณหภูมิให้ได้ 37 องศาเซลเซียสโดยใช้อ่างน้ำร้อน อีกทั้งดำเนินการภายใต้สภาวะไม่มีอากาศ เพื่อให้เซลล์สามารถเจริญและสร้างผลผลิตเกิดขึ้นได้ จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างโดยดูดน้ำหมักมาครั้งละ 10 มิลลิลิตร โดยเริ่มเก็บตัวอย่างตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 และทุกๆ 3-4 ชั่วโมงเป็นระยะเวลาประมาณ 40-60 ชั่วโมง จนกว่าการสร้างกรดซัคซินิกจะหยุดลง หลังจากนั้นนำมาวิเคราะห์สารต่างๆต่อไป

3.5 กระบวนการหมักแบบกึ่งกะ

ในการหมักแบบกึ่งกะจะสามารถแบ่งออกเป็นสองส่วน คือ ส่วนแรกเป็นการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาตร 1.2 ลิตร (แสดงดังรูปภาพ 9) และเติมกล้าเชื้อที่มีความเข้มข้นของเซลล์เช่นเดียวกับแบบกะพร้อมกันกับการเตรียมอาหารสำหรับการป้อนในขั้นตอนกึ่งกะ โดยมีการใช้แหล่งคาร์บอนที่เป็นกลูโคสไซรัปที่มีความเข้มข้น 5 เท่า เพื่อที่จะควบคุมปริมาตรของน้ำหมักไม่ให้เปลี่ยนแปลงไปมากนัก อีกทั้งควบคุมระบบการหมักคล้ายกับแบบกะที่มีการควบคุมค่า pH

ตลอดการหมักให้เท่ากับ 6.5 และหลังจากที่กระบวนการหมักแบบกะดำเนินไปจนปริมาณของน้ำตาลกลูโคสเริ่มหมดลงหรือขณะที่เซลล์อยู่ในปลายระยะการเจริญแบบทวีคูณ (exponential phase) จึงเริ่มป้อนหรือเติมอาหารที่เตรียมไว้ถ่ายลงไปเข้าสู่การหมักแบบกึ่งกะ จากนั้น จะทำการศึกษากระบวนการหมัก พร้อมทั้งจลนศาสตร์การหมักเพื่อเปรียบเทียบหารูปแบบที่มีการผลิตกรดแล็กติกได้สูงและคุ้มทุนที่สุด



รูปภาพ 9 อุปกรณ์ในการทดลองกระบวนการหมักขนาด 2 ลิตร (Fermentation processes)

3.6 การวิเคราะห์

นำตัวอย่างที่เก็บได้จากถังปฏิกรณ์ชีวภาพ นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที โดยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง 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 เป็นการเกิดปฏิกิริยาของน้ำตาลกับสารละลายที่เติมลงไป ดังกล่าวเป็นเวลา 5 นาที และนำไปวิเคราะห์ผลหาค่าความขุ่นของตัวอย่างโดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร พร้อมทั้งทำกราฟมาตรฐานของน้ำตาล โดยแปรผันความเข้มข้นระหว่าง 0.2-1.0 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด

จะถูกนำมาเปรียบเทียบกับกราฟความเข้มข้นน้ำตาลมาตรฐาน (ในที่นี้ใช้น้ำตาลกลูโคส) ที่ทราบความเข้มข้นแล้ว เพื่อให้ได้กราฟมาตรฐานและเทียบกับค่าที่ได้จากตัวอย่างที่ต้องการ

(2) ความเข้มข้นของเซลล์ในน้ำหมักได้ถูกวัดโดยใช้เครื่องวัดความเข้มของการดูดกลืนแสง หรือ spectrophotometer (UV-vis Spectrometer) โดยอาศัยค่าความเข้มของแสง optical density (OD) measurement ที่ 660 นาโนเมตร เพื่อให้แน่ใจว่าไม่มี CaCO_3 ที่สามารถตกค้าง ในตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ ตัวอย่างน้ำหมัก 0.4 มิลลิลิตร จะถูกทำปฏิกิริยากับกรด HCl 7% (v / v) ปริมาณ 2.4 มิลลิลิตร โดยเมื่อน้ำหมักทำปฏิกิริยาดังกล่าวจะให้ แคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2) ที่สามารถละลายได้และให้แก๊ส CO_2 ตัวอย่างจะถูกปั่นหมุนเหวี่ยงโดยเครื่อง Vortex ไม่น้อยกว่า 20 วินาที ก่อนที่จะนำตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ใส่ลง corvette สำหรับการวัดค่าความเข้มแสงที่ OD 660 เท่ากับ 1.0 ในเซลล์ *A.succinogenes* มีความเข้มข้น 0.626 กรัม ของน้ำหนักแห้ง (DCW) ต่อลิตร , น้ำตาลกลูโคสวัดโดยใช้การวิเคราะห์ไบโอเซนเซอร์ ผลผลิตของกรดซัคซินิกขึ้นอยู่กับการใช้น้ำตาลของเซลล์แบคทีเรียในกระบวนการหมักที่มีการคำนวณดังนี้

$$\text{(Yield, g g}^{-1}\text{)} = \text{Succinic acid produced (g) / Glucose consumed (g)}$$

- กราฟมาตรฐาน (standard calibration curve)

สามารถสร้างได้โดยทำการกรองแบคทีเรียที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผ่านกระดาษกรองขนาดรูพรุน 13 มิลลิเมตร, 0.2 ไมโครเมตร (Whatman, England) ร่วมกับการใช้สุญญากาศดูดออก และนำกระดาษกรอง (ที่ซึ่งน้ำหนักไว้แล้ว) ที่มีเซลล์ติดอยู่ไปอบเพื่อระเหยน้ำออก โดยนำกระดาษกรองดังกล่าวไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานของการวัดความเข้มข้นของเซลล์ อยู่ที่ \pm ร้อยละ 5 ที่ระดับ ความเชื่อมั่น 95%

(3) การวิเคราะห์กรดอินทรีย์ชนิดต่างๆที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักกรดซัคซินิกและผลพลอยได้อื่นๆ โดยที่ 5.0 มิลลิลิตร ของตัวอย่างจากน้ำหมักในถังปฏิกรณ์ชีวภาพถูกเก็บอย่างปลอดภัยทุกๆ 6 ชั่วโมงและตัวอย่างน้ำหมัก 1.0 มิลลิลิตร ที่ถูกปั่นหมุนเหวี่ยงที่ 10×10^3 รอบต่อนาที โดยเครื่องหมุนเหวี่ยงเป็นเวลา 3 นาทีเพื่อแยกเซลล์และ CaCO_3 โดยที่ตัวอย่างน้ำหมักจะถูกกรอง ส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงนำไปผ่านแผ่นกรองขนาด 0.2 ไมครอน เพื่อกำจัดเซลล์แบคทีเรีย ก่อนที่จะทำการวิเคราะห์ ส่วนตัวอย่างในด้านตัวทำละลายอินทรีย์จะถูกฉีดเข้าเครื่องวิเคราะห์โดยตรง ซึ่งการวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารตัวอย่าง สามารถใช้ได้ด้วยเครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC) (Thermo Scientific, USA) ที่ใช้ detector เป็น UV นาโนเมตร คอลัมน์ที่ใช้แยกสารจะเป็นประเภท คอลัมน์รุ่น ZORBEX SB-Aq (4.6×150 mm) และถูกวิเคราะห์ด้วย UV ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร จากนั้นทำการคำนวณปริมาณของกรดซัคซินิกเปรียบเทียบกับพื้นที่ใต้กราฟของสารละลายตัวอย่างมาตรฐาน ที่ ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ใช้อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และมีเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) คือ

Acetonitrile 1.0% และ 20.0 mM Na₂HPO₄ (pH 2) 99% เพื่อเป็นตัวนำพาตัวอย่าง เข้าสู่คอลัมน์ เกิดการแยกสาร ที่อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นเวลา 40 นาที

ซึ่งผลที่ได้สามารถนำมาใช้หาค่าผลได้ (yield) อัตราผลผลิตของกรดแล็กติก (productivity) และชีวมวล (biomass) สำหรับค่าการเจริญจำเพาะ (μ) สามารถหาได้จากสูตร $1/X \cdot dX/dt$ โดยที่ X คือความเข้มข้นของเซลล์ และ t คือเวลา

(4) หลังจากการตกตะกอนด้วย CaCO₃ ในถังตกตะกอนภายนอกอย่างสมบูรณ์แล้ว น้ำหมักจะถูกแยกโปรตีนที่ตกค้างในน้ำหมักโดยใช้วิธีของ Lowry (Lowry และคณะ, 1951) ความบริสุทธิ์และผลผลิตของผลิตภัณฑ์กรดซัคซินิกในขั้นตอนการเก็บเกี่ยวที่ ถูกกำหนดให้เป็นตาม ความบริสุทธิ์

$$\text{Purity (\%)} = \frac{\text{Succinic concentration in crystals recovered (g L}^{-1}\text{)}}{\text{Total acid concentration in crystals recovered (g L}^{-1}\text{)}}$$

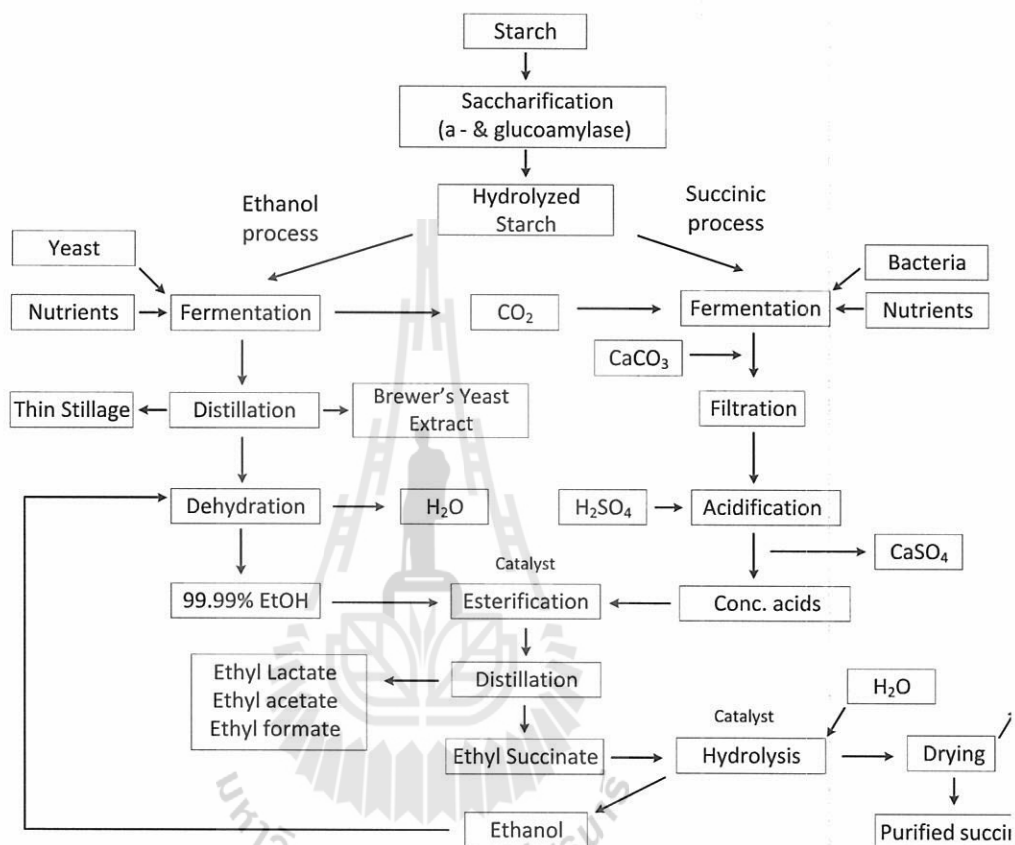
$$\text{Yield (\%)} = \frac{\text{Dry weight of succinic acid in crystals recovered (g)}}{\text{Weight of succinic acid in the initial fermentation broth (g)}}$$

สำหรับผลึกของกรดซัคซินิกถูกตรวจสอบทางสัณฐานวิทยาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (Scanning electron microscopy, (SEM)) (JEOL, JSM-6010 LV, ประเทศญี่ปุ่น)

3.7 การเตรียมเอทานอลบริสุทธิ์สำหรับปฏิกิริยาเอสเตอร์ริฟิเคชัน

จากรูปภาพ 10 แสดงการออกแบบกระบวนการผลิตในการผลิตกรดแล็กติก ภายใต้แนวความคิดที่เรียกว่า Dual fermentation biorefinery กล่าวคือจะมีการหมักและผลิตเอทานอล (Ethanol process) ควบคู่ไปกับการผลิตกรดซัคซินิก (succinic process) ทั้งนี้เนื่องจากว่ามีความจำเป็นต้องใช้เอทานอลใรน้ำในการทำปฏิกิริยา esterification ซึ่งเอทานอลนั้นหากต้องซื้อ เพื่อนำมาทำปฏิกิริยาจะมีราคาแพงมาก ยิ่งหากความบริสุทธิ์สูงถึง 99.99% แล้ว ราคาจะอยู่ที่ มากกว่า 200 บาทต่อลิตร หากจะต้องการทำให้ต้นทุนการผลิตลดลง จะต้องทำการผลิต เอทานอลใรน้ำขึ้นมาใช้เอง โดยสามารถผลิตขึ้นได้จากกระบวนการหมัก แป้งที่ย่อยแล้วด้วย เอ็นไซม์อะไมเลสและกลูโคสอะไมเลส (saccharification) โดยใช้ยีสต์ (yeast) ทำการเปลี่ยนน้ำตาล กลูโคสให้เป็นเอทานอลในสภาวะที่ไร้ออกซิเจน หลังจากนั้นน้ำหมักจะถูกนำไปกลั่นเพื่อให้ได้ เอทานอลความเข้มข้น 95% และเข้าสู่กระบวนการแยกน้ำ ในขั้นตอนสุดท้าย (dehydration) เพื่อที่จะทำให้ได้เอทานอลที่มีความบริสุทธิ์สูงต่อไป (99.99% EtOH) ส่วนเชื้อยีสต์จะถูกแยกออก และสามารถที่จะนำไปทำเป็นยีสต์สกัด (Brewer's yeast extract) สำหรับใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนของการหมักกรดแล็กติกต่อไป ซึ่งจะเป็นการประหยัด

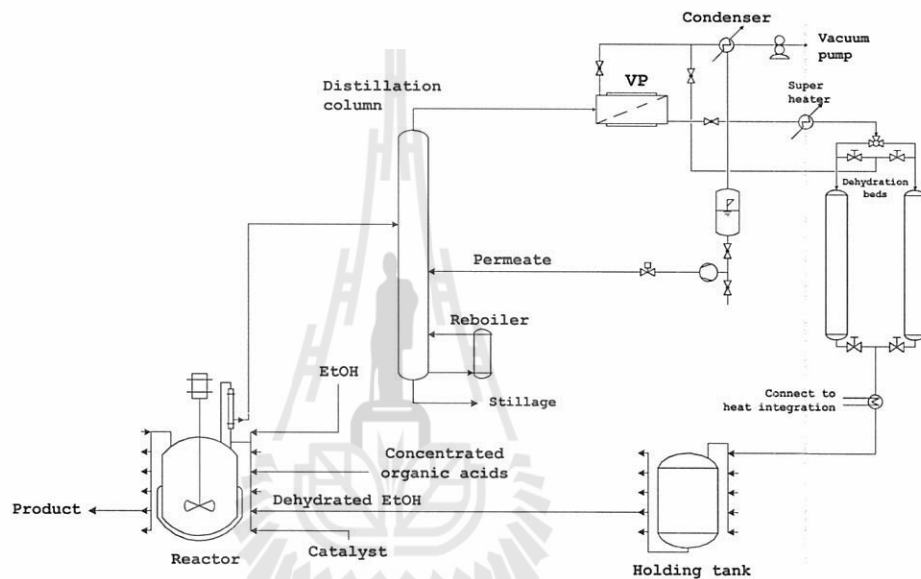
ต้นทุนในการหมักลงได้เป็นอย่างมาก ทั้งนี้เนื่องจากในทางการค้าผงยีสต์สกัดและเอทานอลไร้น้ำ เป็นสารเคมีที่มีราคาแพง อีกทั้งยังจำเป็นที่จะต้องใช้เป็นปริมาณมากอีกด้วย และจากการที่หัวหน้าโครงการวิจัยได้รับเงินสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ในการผลิตเอทานอลไร้น้ำ ด้วยวิธีการกลั่นการแยกไอผ่านเยื่อแผ่นและการดูดซับนั้นพบว่าต้นทุนการผลิตเอทานอลไร้น้ำ จากการหมักน้ำเชื่อมกลูโคสมีต้นทุนการผลิต ไม่ถึง 28 บาทต่อลิตร ซึ่งมีราคาถูกกว่าการซื้อมาใช้เป็นอย่างมาก



รูปภาพ 10 แผนภูมิกระบวนการผลิตกรดแลคติกบริสุทธิ์โดยใช้เอทานอลในกระบวนการ esterification

ส่วน succinic process นั้น สามารถใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการหมักเอทานอล ในการเพิ่มผลผลิต (yield) ของกรดซัคซินิก ส่งผลให้เกิด กรดอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ในปริมาณน้อย ทำให้ง่ายต่อกระบวนการทำบริสุทธิ์ ในระหว่างการหมักจะมี การใช้ปูนขาว (CaCO_3) ในการรักษาสมดุลกรด-ด่างและลดความเป็นพิษของกรดอินทรีย์ที่มีต่อเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งกรดอินทรีย์จะทำปฏิกิริยากับแคลเซียมได้เป็นเกลือที่มีค่าการละลายต่ำ และจะมีการตกตะกอนเป็นของแข็ง หลังจากที กระบวนการหมักสิ้นสุดลงแล้วเกลือแคลเซียมของกรดอินทรีย์ จะถูกแยกออกจากน้ำหมักด้วยระบบการกรอง (filtration) เพื่อแยกเซลล์แบคทีเรียและสารแขวนลอยออกไป จากนั้นจะทำการ

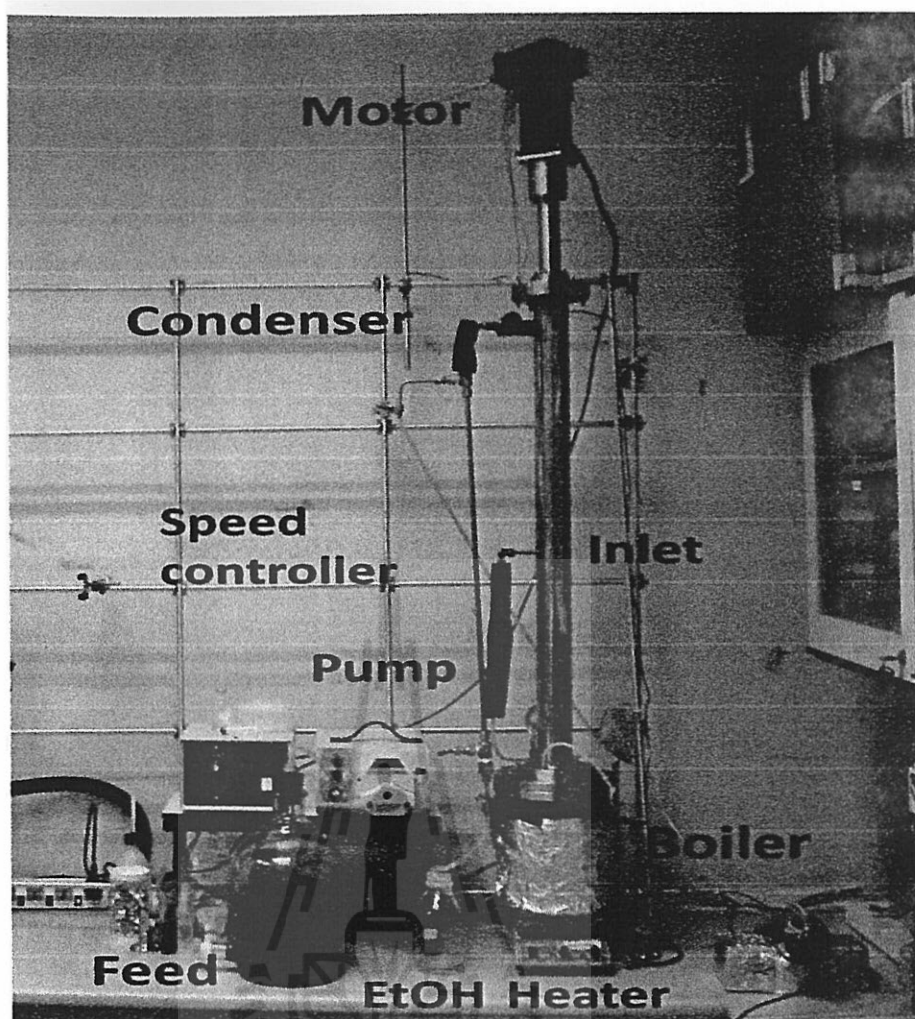
ละลายเกลือด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น ก่อนที่จะถูกนำไป ระเหยให้มีความเข้มข้นที่สูงขึ้นจนมีเนื้อกรดสูงถึงประมาณร้อยละ 85 โดยน้ำหนัก และจะถูก นำมาทำปฏิกิริยา esterification distillation และ hydrolysis ต่อไป ซึ่งขั้นตอนของการกลั่นนั้น อาจจะเรียกได้ว่าเป็นหัวใจของการทำบริสุทธิ์กรดซัคซินิก เนื่องจากจำเป็นที่จะต้องใช้เครื่องแยก (separator) ที่มีประสิทธิภาพสูง หากทำการออกแบบระบบการกลั่นเองก็จะสามารถ ขอยื่นจดสิทธิบัตรได้ ส่วนน้ำที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาเอสเทอร์ริฟิเคชันดังกล่าวนั้นสามารถนำไปกลั่น และแยกน้ำเพื่อนำกลับมาใช้ในปฏิกิริยาต่อไป (recycle) ซึ่งกระบวนการแยกน้ำนี้เป็นขั้นตอนที่สำคัญ มากที่สุด อีกขั้นตอนหนึ่ง ซึ่งจะทำให้ต้นทุนการผลิตต่อหน่วยถูกลงมาก



รูปภาพ 11 วัฏจักรของเอทานอลในระบบสำหรับปฏิกิริยา esterification กับกรดอินทรีย์

รูปภาพ 11 เป็นแผนผังกระบวนการซึ่งผู้วิจัยได้พัฒนาออกแบบเครื่องมือผลิตเอทานอล สำหรับใช้เป็นเชื้อเพลิงโดยเป็นการรวมเอาข้อดีของทั้งสองระบบระหว่างการแยกไอน้ำผ่านเยื่อแผ่น และ ระบบการดูดซับมารวมเข้าด้วยกัน การแยกไอน้ำผ่านเยื่อแผ่นจะแยกน้ำส่วนใหญ่ออกมา ในขั้นแรก ก่อนที่น้ำส่วนที่เหลือจะถูกแยกออกโดยใช้การดูดซับต่อไป สารละลายกรดซัคซินิกเข้มข้นที่ผลิตได้ จากการหมัก (concentrated organic acids) จะเข้าทำปฏิกิริยา esterification กับ เอทานอลบริสุทธิ์ภายในถังปฏิกรณ์แก้ว (reactor) ขนาด 20 ลิตร ที่มีอยู่แล้ว และมีการใช้ สัดส่วนโมลของเอทานอลต่อกรดซัคซินิกที่ 3 ต่อ 1 และใช้กรดซัลฟูริก ที่ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในขั้นตอนแรกจะทำการให้ความร้อนจนถึงจุดเดือด ของเอทานอล ซึ่งจะระเหย ออกจากถังปฏิกรณ์และพาเอาน้ำที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาออกไป เพื่อเป็นการเร่งอัตราการเกิดปฏิกิริยา จึงมีความจำเป็นที่จะต้องทำการกลั่นแยกน้ำออกจากระบบ (reactive distillation) โดยไอผสมของ เอทานอลและน้ำจะระเหยเข้าสู่หอกลั่น (distillation column) ซึ่งจะทำการสร้างให้เป็นแบบ หอกลั่นประสิทธิภาพสูง โดยจะมีการออกแบบและทำการผลิต

หอกลั่นเองซึ่งหน้าที่ของหอกลั่นนี้ จะทำการกลั่นลำดับส่วนเพื่อแยกน้ำออกจากระบบไป (stillage) จากนั้นไอเอทานอลที่ได้จาก การกลั่น (ความเข้มข้นเอทานอลประมาณร้อยละ 95 โดยน้ำหนัก) จะเข้าสู่โมดูลของเยื่อแผ่นโดยตรง (vapor permeation, VP) เพื่อทำการแยกน้ำส่วนใหญ่ออกใน ขั้นตอนแรกและไอของ เอทานอลที่ออกมาจากเยื่อแผ่นจะถูกป้อนเข้าสู่คอลัมน์ molecular sieve เพื่อเป็นการกำจัดน้ำในขั้นตอนสุดท้าย (dehydration bed) เพื่อที่จะได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็น เอทานอลไร้น้ำ (Dehydrate Ethanol, 99.9%) จะไหลเวียนเข้าสู่ถังเก็บและจะมีการป้อนเข้าสู่ถังปฏิกรณ์เพื่อเร่งปฏิกิริยา esterification กับกรดซัคซินิกต่อไป ส่วนน้ำที่ถูกแยก ออกจากระบบทั้งในด้านของการแยกไอผ่านเยื่อแผ่นและการดูดซับ จะถูกทำให้เกิดการควบแน่น และเก็บไว้ในถังเก็บ (permeate) และสามารถนำกลับไปกลั่นต่อได้ เป็นการลดการสูญเสีย ผลิตภัณฑ์อีกด้วย และการเนื่องจากกระบวนการแยกน้ำนี้เป็นกระบวนการทางกายภาพ จึงถือว่าเป็นกระบวนการที่สะอาดไม่มีการใช้สารเคมีอื่นใน กระบวนการหลังจากที่กระบวนการ esterification สิ้นสุดลง เอทิลซัคซินิกที่เกิดขึ้นจะถูกนำไป กลั่นเพื่อแยกเอทานอลของ กรดอินทรีย์ชนิดอื่นๆออกไป โดยอาศัยหลักของความแตกต่างกันของจุดเดือด ซึ่งเอทิลซัคซินิก จะมีจุดเดือดสูงสุด (218 องศาเซลเซียส) จะถูกกลั่นออกจาก ถังปฏิกรณ์เป็นขั้นตอนสุดท้าย และจะถูกนำไปทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) กับน้ำ และใช้ Amberlyst 15-E เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเพื่อทำให้กลับมาเป็น กรดซัคซินิกที่มีความบริสุทธิ์สูง อีกครั้งหนึ่ง โดยคาดว่าจะสามารถผลิตกรดซัคซินิก ได้ความบริสุทธิ์ตามที่ต้องการ คือ ไม่น้อยกว่า 99 เปอร์เซ็นต์ สำหรับอนุภูมิภาค ความดันและอัตราการไหล จะใช้อุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์วัด และควบคุมทั้งหมด โดยจะทำการออกแบบและจัดสร้างเองโดยหอกลั่นประสิทธิภาพสูงที่ได้ ทำการประดิษฐ์ขึ้นภายใน มทส (รูปภาพ 12)



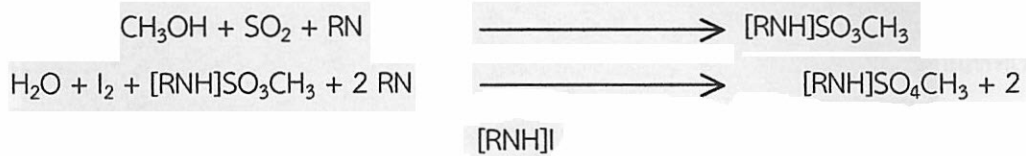
รูปภาพ 12 แสดงการทดลองระบบการกลั่นเอทานอลบริสุทธิ์แบบต่อเนื่องจากน้ำหมัก

3.8 การเก็บและวิเคราะห์ตัวอย่างในขั้นตอนการทำกรดซัคซินิกให้บริสุทธิ์

ทั้งนี้มีการติดตามการเพิ่มขึ้นและลดลงของทั้งสารตั้งต้นและผลิตภัณฑ์ในถังปฏิกรณ์ตามเวลาที่ใช้ไป โดยเฉพาะอย่างยิ่งเอสเทอร์ของกรดอินทรีย์ต่างๆที่เกิดขึ้น เช่น ปริมาณของเอทิลซัคซิเนต เอทิลแล็กเตต และอื่นๆ สามารถวัดได้โดยใช้เครื่อง Gas chromatography และความเข้มข้นของน้ำ สามารถวัดได้โดยใช้เครื่องไตเตรทอัตโนมัติ (Karl Fischer's automatic titration) ซึ่งเครื่องมือวิเคราะห์ทั้งหมดที่กล่าวมานี้มีอยู่แล้ว ภายในห้องปฏิบัติการ

การวัดประสิทธิภาพในการกลั่นโดยทั่ว ๆ ไปนั้น จะทำได้ 2 ส่วนหลัก ๆ คือ การวัดอัตราการไหลของส่วนควบแน่น (distillate) และการวิเคราะห์องค์ประกอบและปริมาณน้ำปนเปื้อน โดยการวัดอัตราการไหลนั้นสามารถทำได้ง่าย ๆ คือการใช้ขวดวัดปริมาตรเทียบกับเวลา ซึ่งอัตราการไหลจะมีหน่วยเป็นปริมาตรต่อเวลา เช่น ลิตรต่อชั่วโมง เป็นต้น ส่วนการวัดปริมาณน้ำในตัวอย่างมีความสำคัญเป็นอย่างมาก โดยจะเป็นตัวกำหนดประสิทธิภาพการกลั่นของระบบ ซึ่งโดยทั่วๆ ไปแล้วจะทำการวัดความเข้มข้นของน้ำด้วย การใช้เครื่อง Karl Fischer's titration (Schott, Germany) ซึ่งเป็นการใช้สารละลายไฮโอติน (Hydranal[®]) ทำปฏิกิริยากับน้ำ

ที่ปนเปื้อนในตัวอย่าง ซึ่งมีความเหมาะสมในการที่จะวัดปริมาณน้ำปนเปื้อนในตัวอย่างในระดับความเข้มข้นต่ำๆได้ ซึ่งปฏิกิริยา Karl's Fischer Titration เป็นการทำให้ปฏิกิริยา ดังสมการ



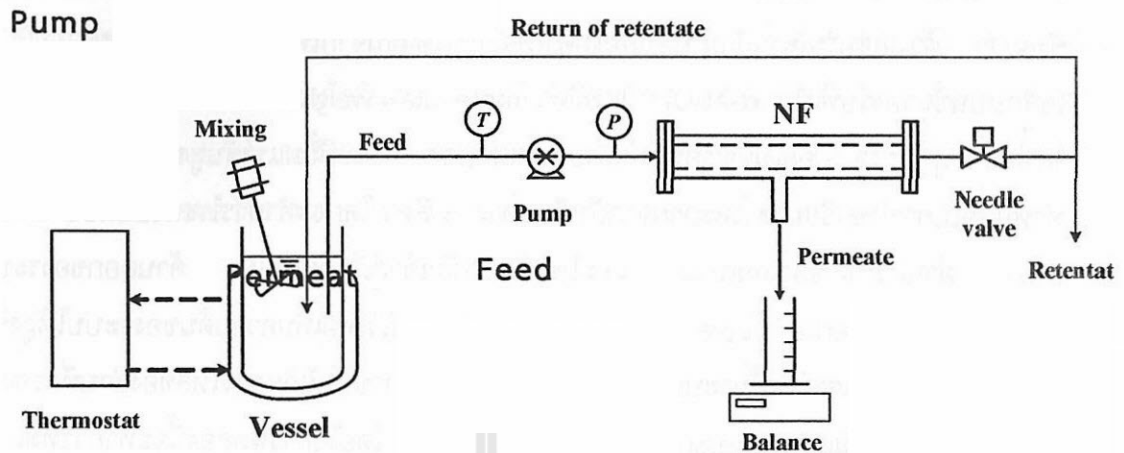
โดยปฏิกิริยานี้ จะเป็นการทำปฏิกิริยาของน้ำและไอโอดีนในอัตราส่วน 1:1 โมล ซึ่งวิธีวัดน้ำนี้ เป็นวิธีที่ดีที่สุดในการวัดปริมาณน้ำปนเปื้อนในเอทานอล

3.9 อุปกรณ์และสารเคมี

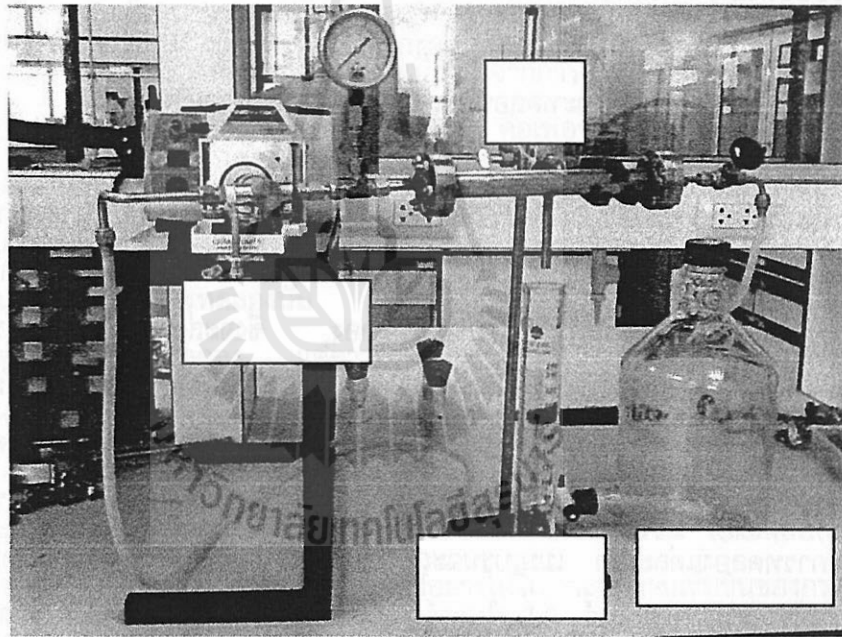
- อาหารเลี้ยงเชื้อต่าง ๆ เช่น เพปโตร สารสกัดจากยีสต์ น้ำตาลกลูโคส ซื้อมาจากบริษัท Hi media โซเดียมอัลจินเนทและเกลือแร่ต่าง ๆ ใช้ของบริษัท Fluka ในขณะที่กรดผสมระหว่าง L- และ D-แกล็กติก ใช้ของบริษัท Sigma

- ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (Bioreactor) ใช้ของบริษัท Sartorius
- เครื่องแก้วต่าง ๆ ใช้ของบริษัท VN supply
- ปั๊มหลอดฉีดยา (Syringe pump) ใช้ของบริษัท Cole parmer
- เมมเบรนเซรามิกแบบนาโนฟิวเตรชั่นใช้ของบริษัท Fraunhofer

3.10 การทำบริสุทธิ์กรดซัคซินิกด้วยเทคนิคนาโนฟิเตรชั่น (Nanofiltration, NF)



(A)



(B)

รูปภาพ 13 การใช้ระบบนาโนฟิเตรชั่นในการแยกกรดซัคซินิกจากน้ำหมัก แสดงเป็นแผนผังการติดตั้งระบบ (A) และการติดตั้งระบบการทดลองจริง (B) (Lubsungneon *et al*, 2014)

เนื่องจากสารป้อน YPD มีส่วนประกอบของโปรตีนซึ่งจะมีผลกระทบต่อการศึกษาการปฏิบัติวิทยาของไรโซเนียมในระดับขั้นสุดท้าย ดังนั้นจึงมีความจำเป็นในการที่จะต้องทำบริสุทธิ์สารละลายซัคซินิกที่เป็น effluent ก่อน โดยการกำจัดโปรตีนออกให้หมด ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาระบบนาโนฟิเตรชั่นดังแสดงในรูปภาพ 13 โดยได้ใช้เมมเบรนชนิดเซรามิก เนื่องจากมีคุณสมบัติที่แข็งแรง มีความทนทานเชิงกลสูง มีลักษณะเป็นท่อขนาดความยาว

25 ซม และมีเส้นผ่าศูนย์กลางด้านใน 0.7 ซม และด้านนอก 1.0 ซม (พื้นที่ผิว 55 ตารางเซนติเมตร) โดยมีชั้นผิวซึ่งทำหน้าที่คัดเลือกผ่านเคลือบอยู่ด้านในของท่อเมมเบรนเซรามิกดังกล่าว ตัวเมมเบรนเซรามิกนี้ประกอบไปด้วยชั้นผิวซึ่งทำขึ้นจากไทเทเนียมไดออกไซด์ (TiO_2) เคลือบบนชั้นรองรับที่เป็น $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ โดยมีค่า molecular weight cut off ที่ 400 ดาลตัน ซึ่งท่อนี้จะถูกบรรจุ อยู่ในตัวเรือนที่ทำด้วยท่อสแตนเลส และมีปั๊มแรงดันสูง (FMI, USA) ทำหน้าที่ในการไหลเวียน สารละลายจากถังเก็บขนาด 3 ลิตร โดยจะทำการไหลเวียนแบบ cross-flow ผ่านผิวหน้าของเมมเบรน และไหลเวียนกลับเข้าสู่ถังเก็บต่อไป ด้านออกของระบบ จะมีการติดตั้ง needle valve (Swagelok, USA) เอาไว้เพื่อเพิ่มความดันของระบบให้สูงขึ้น ทั้งนี้ระบบนาโนฟิวเตรชันเป็นระบบ ที่ต้องใช้ความดันในการขับให้เกิดการไหลของส่วนที่กรองได้ หรือ filtrate นั้นเอง (pressure driven process) โดยในการทดลองนี้จะทำการทดสอบ ประสิทธิภาพการกรองของระบบที่ความดันระหว่าง 200 ถึง 600 กิโลปาสคาล ในขั้นแรก จะใช้สารป้อนสังเคราะห์ในการทดสอบประสิทธิภาพการแยกของระบบก่อนโดยจะทำการทดสอบ ณ สภาวะต่าง ๆ เช่น ความเข้มข้นเริ่มต้น ของกรดแล็กติก 10 ถึง 70 กรัมต่อลิตร ความเป็นกรดต่างระหว่าง 2 ถึง 7 จากนั้นจึงจะทดสอบ การแยกด้วยสารละลายจริงต่อไป

ในระหว่างการทดสอบระบบด้วยสารป้อนสังเคราะห์นั้น ทั้งส่วนที่กรองได้ (permeate) และส่วนที่เหลือจากการกรอง (retentate) จะถูกปั๊มกลับเข้าไปยังถังของสารป้อนทั้งหมด ซึ่งจะเรียกปฏิบัติการในลักษณะนี้ว่า total recycle mode ทั้งนี้เพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลง ความเข้มข้นของสารป้อนในระหว่างการทำการทดลอง ซึ่งจะส่งผลทำให้ผลการทดลองมีความ ผิดพลาดได้ โดยประสิทธิภาพของการกรองจะแสดงในรูปของค่าฟลักซ์ หรืออัตราการถ่ายเท มวลจำเพาะ มีหน่วยเป็นกิโลกรัมต่อชั่วโมงต่อตารางเมตร สามารถคำนวณได้โดยการจับเวลา และทำการชั่งน้ำหนักของเพอร์มิเอท โดยทราบพื้นที่ผิวของเมมเบรนแล้ว (55 ตารางเซนติเมตร) เมื่อเสร็จการทดลองแต่ละครั้ง เมมเบรนจะถูกทำความสะอาดโดยการล้างด้วยน้ำกลั่น ตามด้วย สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 โมลาร์ และกรดฟอสฟอริก (H_3PO_4) ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์เท่ากัน จากนั้นทำการทดสอบค่าฟลักซ์ของน้ำเปล่า (น้ำกลั่น) โดยฟลักซ์ของน้ำเปล่าจะมีค่า เท่ากับค่าฟลักซ์ของน้ำเปล่าเมื่อตอนใช้เมมเบรนในครั้งแรก ค่าการกักกัน (Rejection, $R\%$) สามารถ คำนวณได้จากสมการ

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

โดย C_P และ C_R แสดงถึงค่าความเข้มข้นของสารในด้านของเพอร์มิเอทและในด้านของ retentate ตามลำดับ

สำหรับการศึกษาระบบนาโนฟิวเตรชั่นของสารละลาย YPD ที่ได้จากถังปฏิกรณ์ชีวภาพ นั้น จะทำการศึกษาในระบบ concentration mode กล่าวคือจะไหลเวียน retentate กลับเข้าสู่ถังของสารป้อนเท่านั้น ไม่มีการไหลเวียนเพอร์มิเอทกลับเข้าสู่ถังของสารป้อนแต่อย่างใด โดยค่าฟลักซ์และการค่าการกักกันต่างๆจะถูกศึกษาโดยเฉพาะการกักกันโปรตีน ซึ่งการวิเคราะห์ การอุดตัน (fouling) จะวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคการวัดค่าฟลักซ์ภายหลังจากการล้างด้วยขั้นตอนต่างๆ โดย สามารถ วิเคราะห์ความต้านทานได้จากสมการของดาร์ซี (Darcy's law) ดังนี้

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

โดยที่ R_{NF} นั้นหมายถึงความต้านทานของการกรอง (filtration resistance, m^{-1}), R_m คือความต้านทานไฮดรอลิกของเมมเบรน (membrane hydraulic resistance), R_f คือความต้านทานอันเนื่องมาจากการอุดตันของรูพรุนและการดูดซับ (pore blocking and adsorption) และ R_c คือความต้านทานเนื่องมาจากการเกิดเค้กบริเวณผิวหน้าของเมมเบรน (resistance due to cake formation) J คือเพอร์มิเอทฟลักซ์ ($m^3/m^2.h$), TMP คือความแตกต่างของความดันระหว่างทั้งสองด้านของเมมเบรน (trans membrane pressure, Pa) และ μ แสดงถึงค่าความหนืดของเพอร์มิเอท (Pa.s) ตามลำดับ

ในระหว่างที่ทำการทดลองนั้น เนื่องจากมีการดึงเอาเพอร์มิเอทออกตลอดเวลา ปริมาตรของสารละลายจะลดลง แต่ความเข้มข้นของโปรตีนจะมีมากขึ้นทำให้การอุดตันบริเวณ ผิวหน้าของเมมเบรนจะมากขึ้น ในที่สุดค่าฟลักซ์ของระบบจะเป็นศูนย์ ดังนั้นเพื่อเป็นการป้องกัน ปัญหาดังกล่าว มีความจำเป็นในการเติมน้ำกลั่นเพิ่มลงไปในระบบ เพื่อรักษาระดับของปริมาตร ของสารละลายให้คงที่อยู่เสมอ เรียกปฏิบัติการแบบนี้ว่าไดอะฟิวเตรชั่น (diafiltration mode) โดยในระหว่างการทดลอง จะทำการสูมตัวอย่างไปวิเคราะห์ความเข้มข้นของกรดในสารป้อน เป็นระยะๆและปฏิบัติการนี้ จะเสร็จสิ้นสมบูรณ์เมื่อความเข้มข้นของกรดเล็กตกในด้านของสาร ป้อนหมดลง จากนั้นนำเพอร์มิเอทที่ได้ทั้งหมดนี้ไปเพิ่มความเข้มข้นขึ้นโดยใช้เครื่อง ระเหยแบบสุญญากาศ (rotary vacuum evaporator) โดยทำการระเหยน้ำออกจนกระทั่งมี ความเข้มข้นของน้ำประมาณร้อยละ 30 โดยน้ำหนัก ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้วนี้ไปทดสอบต่อไป

บทที่ 4 ผลการทดลองและบทวิจารณ์

4.1 การหมักแบบกะและการหมักแบบกะซ้ำ (Batch and repeated batch fermentation) ของกรดซัคซินิกโดยใช้แบคทีเรียสายพันธุ์ *Actinobacillus succinogenes* ATCC 55618

ดังที่กล่าวก่อนข้างต้น *Actinobacillus succinogenes* ATCC 55618 เป็นจุลินทรีย์ที่มักถูกเลือกใช้สำหรับกระบวนการหมักกรดซัคซินิกซึ่งสามารถทนความเป็นกรดซัคซินิกได้สูง (Lin และคณะ. 2008) ซึ่ง *A. succinogenes* ATCC 556188 คัด แยกมาจากกระเพาะของวัว โดยสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพมิชิแกน อินเตอร์เนชันเนล (MBI) ในแลนซิง, มิชิแกน, ประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งสามารถผลิตกรดซัคซินิกให้ค่าความเข้มข้นที่สูงและให้กรดซัคซินิกเป็นผลิตภัณฑ์หลักมากกว่าแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น ๆ ที่ปราศจากการปรับแต่งยีนหรือปรับแต่งสายพันธุ์ (Zhu และคณะ., 2012) สายพันธุ์ดังกล่าวนี้มีลักษณะที่ตามต้องการทั้งหมดและถูกนำมาใช้ในกระบวนการหมักในการศึกษาครั้งนี้



รูปภาพ 14 *Actinobacillus .succinogenes* ATCC 55618

4.1.1 ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นต่อการเจริญเติบโตของ *A. succinogenes* ATCC 55618

อาหารเลี้ยงเชื้อในกระบวนการหมักซัคซินิกนั้นโดยทั่วไปมักประกอบไปด้วยสารอาหารที่มากและซับซ้อนและใช้น้ำตาลกลูโคสที่มีความเข้มข้นสูงและนอกจากนี้ยังประกอบไปด้วยวิตามินทั้ง 10 ชนิด ที่สำคัญในอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนประกอบของสารอาหารต่างๆ ที่ถูกเพิ่มเข้าไปในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดซัคซินิกนั้นนำไปสู่ค่าใช้จ่ายที่สูง และทำให้การดำเนินงานที่ซับซ้อนขึ้น โดยในการศึกษานี้ให้ความสนใจด้านสารอาหารที่มีความยุ่งยากซับซ้อนนั้น อาจให้ผลผลิตกรดซัคซินิกได้ไม่มากที่ควรหรือให้ความเข้มข้นต่ำการเพิ่มประสิทธิภาพของ

อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับ *A. succinogenes* ATCC 55618 นั้นความเข้มข้นสารตั้งต้นมีความสำคัญอย่างยิ่ง น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตกรดซัคซินิกเป็นส่วนสำคัญของอาหารเลี้ยงเชื้อในกระบวนการหมัก จากการศึกษาโดย Zhu และคณะ, (2012) ได้มีการรายงานว่าการเพิ่มประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อ *A. succinogenes* ATCC 55618 ผลการศึกษาพบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหมาะสม 84.6 g/L และพบว่าที่ 14.5 g/L คือความเข้มข้นที่เหมาะสมของ yeast extracts ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Zhu และคณะ, 2012) ผลในการผลิตกรดซัคซินิกและผลผลิตของกรดซัคซินิกโดยใช้น้ำตาลกลูโคสในระดับที่เหมาะสมเปรียบเทียบกับกรใช้น้ำตาลกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับกระบวนการหมักแบบพื้นฐานที่ใช้น้ำตาลกลูคอสที่มีความเข้มข้นสูงแล้วนั้น ผลการศึกษาพบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสลดลงตามเวลา ซึ่งเป็นลักษณะสำคัญของกระบวนการหมักแบบกะ จะเห็นได้ว่า ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นที่เซลล์แบคทีเรียนำไปใช้ในระหว่างการหมักนั้นมีความสำคัญ นอกจากนี้มีการศึกษาเกี่ยวกับช่วงของการผลิตกรดซัคซินิกในความเข้มข้นสุดท้ายพบว่าการผลิตกรดซัคซินิกมีขีดจำกัดเกี่ยวกับการใช้น้ำตาลของเซลล์แบคทีเรีย *A.succinogenes* ในการผลิตกรดซัคซินิก ซึ่งอาจจะเกิดจากการยับยั้งผลิตภัณฑ์ในขั้นสุดท้าย (Product inhibition) Urbance และคณะ, (2004) ได้ศึกษาและพบว่า *A.succinogenes* สามารถทนต่อความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ถึง 160 g/L ในกระบวนการหมักแบบกะ และจากการศึกษาโดย Lin, และคณะ, (2008) แสดงให้เห็นว่าการยับยั้งของสารตั้งต้นและผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของ *A.succinogenes* ATCC 55618 ในกระบวนการหมักโดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ที่สำคัญนั้น *A.succinogenes* ATCC 55618 สามารถทนความเข้มข้นน้ำตาลได้ถึง 143 g/L และการเจริญของเซลล์ยับยั้งอย่างสมบูรณ์ที่ความเข้มข้นกลูโคสมากกว่า 158 g/L การลดลงอย่างมีนัยสำคัญในผลผลิตกรดซัคซินิกนั้น และมีช่วงระยะพักที่ยาวนานในกระบวนการหมักนั้นคือการที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่สูงกว่า 100 g/L นอกจากนี้ในการตรวจสอบผลิตภัณฑ์สุดท้าย พบว่ากรดฟอร์มิกมีผลต่อยับยั้งการหมักกรดซัคซินิกมากที่สุด ดังนั้นจึงจำเป็นในการเพิ่มประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้แบคทีเรีย *A.succinogenes* ATCC 55618 ให้มีประสิทธิภาพเพิ่มมากขึ้น

ในการศึกษานี้ ทำการพิจารณาผลกระทบของความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นในการเจริญของ *A. succinogenes* ATCC 55618 และการผลิตกรดซัคซินิกโดยดำเนินการทดลองใน Shake flask (สภาพไร้อากาศ), โดยการทดสอบใช้ อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับกระบวนการหมัก 47.5 mL โดยที่ค่า pH เริ่มต้นที่ 6.8 จากนั้นบ่มด้วย หัวเชื้อ 2.5 mL กระบวนการหมักหมักดำเนินการที่อุณหภูมิ 37 ° C เป็นเวลา 36 ชั่วโมง ใน Rotary shaker ที่ 200 rpm

ตาราง 6 แสดงถึงผลการทดลองสำหรับการพิจารณาผลกระทบของความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น ในการเจริญของ *A. succinogenes* ATCC 55618 และการผลิตกรดซัคซินิก แสดงให้เห็นว่าการผลิตกรดซัคซินิกที่สูงสุดของ 45.8 g/L โดยใช้ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นที่ 85 g/L

จากการศึกษาพบว่าหากใช้ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสที่สูงเกินไปอาจส่งผลให้เกิดการยับยั้งสารตั้งต้น ในขณะที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลกลูโคสที่ต่ำเกินไปก็ส่งผลในการผลิตกรดในระดับต่ำและผลผลิตกรดซัคซินิกที่ได้นั้นอาจให้ผลผลิตน้อย อัตราการผลิตลดลง เพราะเซลล์ถูกบังคับให้ใช้พลังงานมากขึ้นในการรักษาเซลล์ไว้มากกว่าใช้ในกระบวนการหมัก ให้ได้ผลิตภัณฑ์และการเจริญโตของเซลล์ เซลล์ที่มีสามารถทนต่อความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ที่สูงได้นั้นก็จะสามารถดำเนินการผลิตได้อย่างรวดเร็วและให้ความเข้มข้นสุดท้ายที่สูงด้วยเช่นกัน

ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงได้มีการนำสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับกระบวนการหมักที่เป็นสูตรที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพ สำหรับ *A. succinogenes* ATCC 55618 เช่นเดียวกับการศึกษาของ Zhu และคณะ, (2012) โดยใช้เป็นสูตรอาหารเลี้ยงเชื้ออ้างอิงในการศึกษาครั้งนี้และความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่เหมาะสมอยู่ที่ 85 g/L

ตาราง 6 ผลกระทบของความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นในการเจริญของ *A. succinogenes* และความเข้มข้นสุดท้ายของกรดซัคซินิก

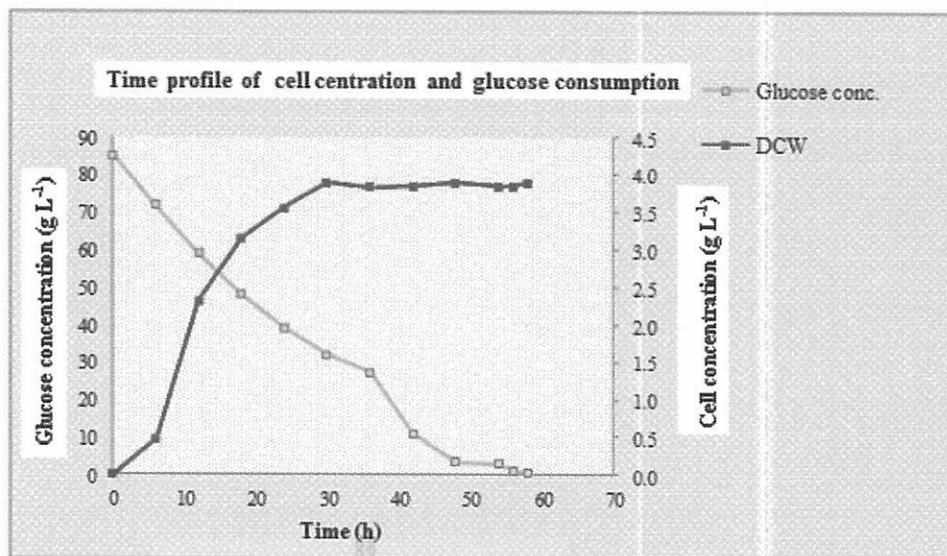
Glucose (gL ⁻¹)	Dry cell weight (gL ⁻¹)	Succinic acid production (gL ⁻¹)	Yield (g/g)
40	4.97	28.2	0.70
55	5.03	35.9	0.65
70	5.40	40.0	0.57
85	5.98	45.8	0.53
100	4.37	30.8	0.38
120	3.08	28.0	0.23

4.1.2 กระบวนการหมักแบบกะ

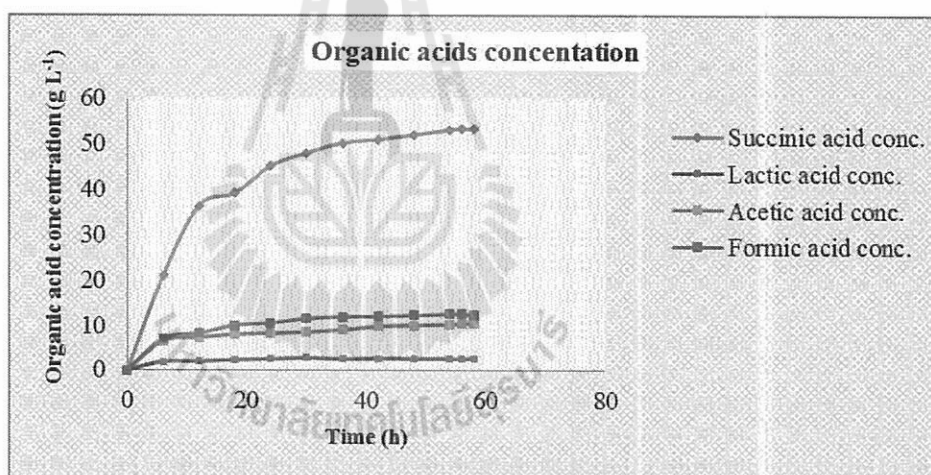
สำหรับกระบวนการหมักกรดซัคซินิกแบบกะในกระบวนการผลิตนั้นมีการใช้หัวเชื้อ 10% โดยปริมาตร โดยทำบ่มเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soya เป็นเวลา 24 ชั่วโมงและถ่ายเชื้อด้วยเทคนิคปลอดเชื้อลงถังปฏิกรณ์ชีวภาพ 2.0 L สำหรับการผลิตของ *A. succinogenes* ATCC 55618 โดยใช้น้ำตาลกลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอนหลักสำหรับการเพาะเลี้ยงจะเพาะในระบบไร้อากาศ ที่อุณหภูมิ 37 ° C ทั้งนี้มีการควบคุมสภาพในถังปฏิกรณ์ด้วยความเร็ว 200 rpm และมีการให้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ให้กับน้ำหมักในถังปฏิกรณ์ ด้วยอัตรา 0.5 vvm ค่า pH ในน้ำหมัก มีการควบคุมโดยอัตโนมัติที่ 6.8-7.0 ควบคุมด้วยการเติมสารละลายแคลเซียมคาร์บอเนต CaCO₃ 40 wt.%.

แผนภาพบรรยายการบริโภคน้ำตาลกลูโคสของเซลล์และความเข้มข้นเซลล์ ในระหว่างการหมักแบบกะโดย *A.succinogenes* ATCC 55618 แสดงในรูปภาพ 15 ความเข้มข้นของน้ำตาลลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 40 ชั่วโมงแรกของกระบวนการหมัก ต่อจากนั้นอัตราการบริโภคน้ำตาลจะค่อยๆ ลดลงและน้ำตาลกลูโคสถูกบริโภคจนหมดโดยเซลล์ แบคทีเรียที่ 58 ชั่วโมง การศึกษาครั้งนี้ได้มีการตั้งข้อสังเกตว่า *A.succinogenes* ATCC 55618 มีระยะพักของเซลล์ที่ค่อนข้างสั้นอยู่ที่ชั่วโมงที่ 8 ของกระบวนการหมัก และหากสังเกตจากกราฟจะเห็นได้ว่า ความเข้มข้นเซลล์มีค่าความเข้มข้น ช่วง plateau ของกราฟ ประมาณ 3.8 g/L และยังคงเป็นค่าความเข้มข้นดังกล่าวนี้จนถึงสิ้นกระบวนการหมัก ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเหลืออยู่ประมาณ 0.6 g/L ภายหลังจาก 58 ชั่วโมง และค่าความเข้มข้นของเซลล์ สูงสุดที่ 3.89 g/L ในระหว่างการเจริญของเซลล์ ความเข้มข้นของกรดซัคซินิกเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 30 ชั่วโมงแรกและจากนั้นความเข้มข้นก็คงที่ตามแนวโน้มการเจริญของเซลล์

กรดซัคซินิกเป็นผลิตภัณฑ์กรดที่ได้จากกระบวนการหมัก เมื่อเกิดการผลิตกรด น้ำหมักในถังปฏิกรณ์จะมีค่า pH ที่ลดลง ซึ่งจำเป็นต้องมีการใช้ตัวปรับต่าง (Alkaline neutralize) เพื่อควบคุมค่า pH ของน้ำหมัก ในกรณีนี้ค่า pH จะถูกควบคุมที่ 6.8 ± 0.2 โดยเป็นการควบคุมค่า pH แบบอัตโนมัติ ส่วนใหญ่ของการศึกษาเกี่ยวกับการผลิตกรดซัคซินิก จะมีการใช้ $MgCO_3$ เป็นตัว Alkaline neutralize และเพื่อให้ได้มาซึ่งความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ที่สูงในกระบวนการหมัก แต่ในทางปฏิบัติสำหรับอุตสาหกรรมการหมักกรดซัคซินิกแล้วนั้น ค่าใช้จ่ายของการใช้ $MgCO_3$ นั้นไม่มีความเหมาะสมเท่าที่ควร ในศึกษานี้ จึงได้มีการปรับเปลี่ยน ตัว Alkaline neutralize จาก $MgCO_3$ มาเป็น $Ca(OH)_2$ การทดลองจะเห็นได้ว่า ผลของความเข้มข้นของกรดซัคซินิกเมื่อใช้ $Ca(OH)_2$ เป็นตัว Alkaline neutralize ให้ผลการทดลองที่เด่นชัดเทียบกับการใช้ $MgCO_3$ โดยที่ความเข้มข้นสุดท้ายกรดซัคซินิกในถังปฏิกรณ์ชีวภาพมีความเข้มข้นที่ 53.25 g/L ส่งผลให้ได้ผลผลิตที่ 0.62 g/g โดยที่ค่าผลผลิตนี้ถือเป็นค่าผลผลิตที่ดีมีการยอมรับในงานเอกสารที่ใช้สายพันธุ์เดียวกัน (Li และคณะ, 2011) แม้ว่ากรดซัคซินิกจะเป็นผลิตภัณฑ์หลักแต่ก็ยังมีกรดอะซิติก, กรดฟอร์มิก, และกรดแลคติก เป็นกรดผลพลอยได้ โดยที่ความเข้มข้นสุดท้ายของกรดฟอร์มิก, กรดแลคติก, และกรดอะซิติกเป็น 12.3, 2.7 และ 10.5 g/L ตามลำดับ และความเข้มข้นของกรดซัคซินิกและความเข้มข้นกรดอินทรีย์ผลพลอยได้ ในระหว่างกระบวนการหมักแบบกะนั้นแสดงในรูปภาพ 16



รูปภาพ 15 แผนภาพบรรยายการบริโภคน้ำตาลกลูโคสของเซลล์และความเข้มข้นของเซลล์ ในระหว่างกระบวนการหมักแบบกะเทียบกับเวลา โดย *A. succinogenes*. ATCC 55618



รูปภาพ 16 แผนภาพบรรยายความเข้มข้นกรดซักซินิกและกรดอินทรีย์ผลพลอยได้ในระหว่าง กระบวนการหมักแบบกะเทียบกับเวลาโดย *A. succinogenes*. ATCC 55618

อย่างไรก็ตามการเจริญโตของเซลล์ขึ้นอยู่กับปริมาณสารอาหารและสารอาหารที่จำกัดอยู่ใน กระบวนการหมักแบบกะ สำหรับกระบวนการหมักขั้นแรก (Upstream process) นั้น สามารถปรับให้มีการเพิ่มผลผลิตทั้งตัวผลิตภัณฑ์ และการผลิตเชิงปริมาณของกระบวนการหมักได้ ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจที่จะศึกษากระบวนการหมักซ้ำแบบกะ (Repeat-batch mode) ที่ซึ่งสามารถแก้ปัญหาด้านความเข้มข้นของสารตั้งต้นให้สามารถเพิ่มสารตั้งต้นได้อย่างต่อเนื่องใน ถึงปฏิกรณ์ชีวภาพ

4.1.3 กระบวนการหมักแบบกึ่งกะ (Fed-batch fermentation)

เนื่องจากกรดซัคซินิกและกรดอินทรีย์ที่เป็นผลพลอยได้อื่น ๆ มีลักษณะที่เป็นพิษต่อเซลล์แบคทีเรียสูง ทำให้เกิดปรากฏการณ์ที่เรียกว่าการยับยั้งจากผลิตภัณฑ์ (product inhibition effect) อีกทั้งความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นก็มีอิทธิพลต่อประสิทธิภาพของการหมักเช่นกัน ดังนั้นจลศาสตร์ของการหมักจึงแตกต่างจากกระบวนการหมักแบบทั่ว ๆ ไป โดยสมการของโมนอดในรูปแบบของการยับยั้งจากสารอาหารสามารถแสดงได้ดังนี้

$$\mu = \mu_{\max} \left(1 - \frac{C_s}{C_s^*}\right)^n \frac{C_s}{C_s + K_s \left(1 - \left(C_s / C_s^*\right)\right)^m} \quad (1)$$

โดยสมการ xx สามารถที่จะลดรูปลงเมื่อค่าความเข้มข้นของสารตั้งต้นเพิ่มขึ้นได้ดังนี้

$$\mu = \mu_{\max} \left(1 - \frac{C_s}{C_s^*}\right)^n \frac{C_s}{C_s + K_s} \quad (2)$$

ในขณะเดียวกันค่าการยับยั้งจากผลิตภัณฑ์ที่ส่งผลกระทบต่ออัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อสามารถแสดงโดยสมการ

$$\mu = \mu_{\max} \left[\prod \left(1 - \frac{C_p}{C_p^*}\right)^{a_i} \right] \quad (3)$$

และแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของการเจริญเมื่อทำการรวมกันของการยับยั้งทั้งจากสารตั้งต้นและผลิตภัณฑ์แล้วจะได้สมการ

$$\mu = \mu_{\max} \left(1 - \frac{C_s}{C_s^*}\right)^n \frac{C_s}{C_s + K_s} \left[\prod \left(1 - \frac{C_p}{C_p^*}\right)^{a_i} \right] \quad (4)$$

ในที่นี้ μ = ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ Specific growth rate (h^{-1}), μ_m = ค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด Maximum specific growth rate (h^{-1}), K_s = ค่าคงที่ของโมนอดสำหรับการเจริญ Monod constant for growth ($g L^{-1}$), C_s = ความเข้มข้นของน้ำตาล Substrate concentration (g/L), C_s^* = ความเข้มข้นวิกฤติ ของน้ำตาลที่แบคทีเรียทนได้สูงสุด Critical substrate concentration (g/L), C_p = ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์หรือผลพลอยได้ product or by-product concentration (g/L), C_p^* = ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์หรือผลพลอยได้สูงสุดที่เกิดการยับยั้งต่อแบคทีเรีย Critical product concentration (g/L), เลขยกกำลัง n และ a_i เป็นค่าค่าที่สำหรับสารตั้งต้น และผลิตภัณฑ์ ตามลำดับ

นอกจากนี้ ช่วงเวลาของ lag phase ยังพบว่ามีความสัมพันธ์อย่างยิ่งกับค่าความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลกลูโคส โดยพบว่าช่วงเวลา lag phase (T_L) จะยาวนานขึ้นเมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลมีมากขึ้น โดยมีความสัมพันธ์ตามสมการของ Belehradek ต่อไปนี้

$T_L = (\kappa + \lambda C_S^\eta) \sigma_{C_S}$ โดยที่ κ , λ , และ η คือค่าคงที่ของสมการ ส่วนค่า σ_{C_S} คือค่า step function โดยมีค่าเท่ากับ 1 เมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลน้อยกว่าค่า C_S และมีค่าเท่ากับ ∞ เมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลมากกว่า C_S^*

การพลศาสตร์การเจริญของเชื้อ *A. succinogenese* ในการวิจัยนี้สามารถแสดงได้ดังสมการ

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad \text{โดยที่ } X \text{ คือความเข้มข้นของเซลล์ (g/L)}$$

ส่วนสมการของ Leudeking–Piret ได้ถูกออกแบบสำหรับค่าผลิตผล (productivity) ของผลิตภัณฑ์ดังสมการ

$$\frac{dC_P}{dt} = (\alpha_p \mu + \beta_p) X \quad \text{โดยที่ } \alpha_p \text{ และ } \beta_p \text{ คือ ค่าที่เกี่ยวข้องกับการเจริญ growth associate}$$

และค่าที่ไม่เกี่ยวข้องกับการเจริญ non-growth associate ตามลำดับ

ส่วนอัตราการใช้น้ำตาลของเชื้อจะขึ้นอยู่กับความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของเชื้อ

การเกิดผลิตภัณฑ์และการรักษาสถานะของเซลล์ดังสมการ

$$-\frac{dC_S}{dt} = \delta \frac{dX}{dt} + \gamma X$$

โดยที่

$$\delta = \frac{1}{Y_{X/S}} - \sum \frac{1}{Y_{P/S}} \quad \text{และ} \quad \gamma = \sum \frac{1}{Y_{P/S}} - m \quad \text{โดยที่ } m \text{ คือ ค่าการรักษา}$$

สถานะของเซลล์นั่นเอง

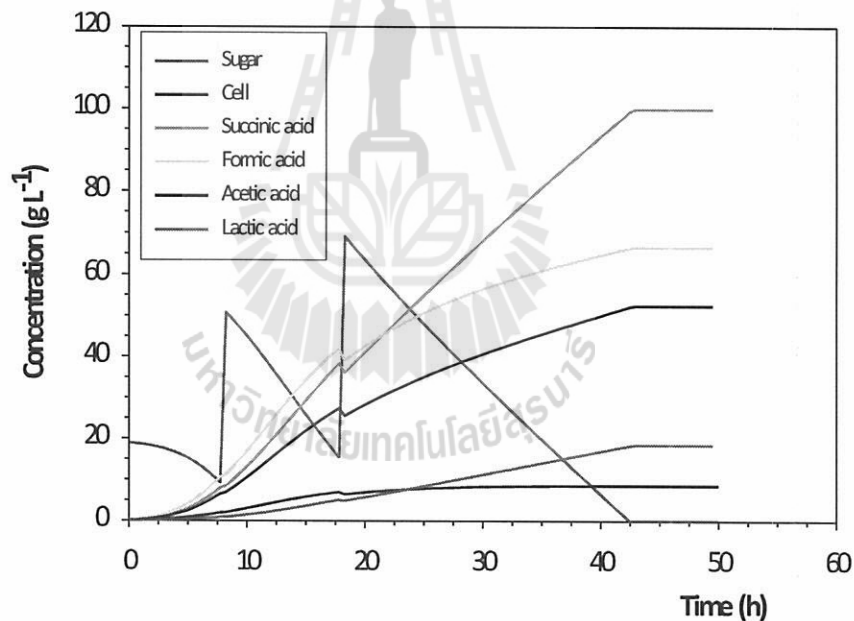
เนื่องจากค่าคงที่ทางจุลศาสตร์ต่าง ๆ ของการหมักกรดซัคซินิกมีจำนวนมาก ดังนั้นนักวิจัยจึงได้หาค่าเหล่านี้ จากการทบทวนวรรณกรรม โดยตาราง 7 ได้สรุปค่าต่าง ๆ ดังนี้

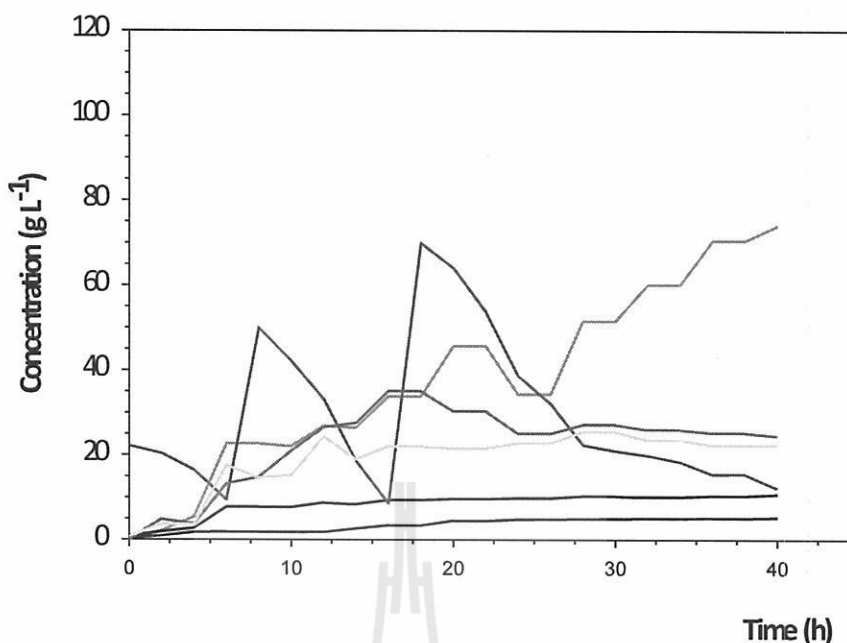
ตาราง 7 การสรุปค่าคงที่ต่าง ๆ สำหรับจลศาสตร์การหมักกรดซัคซินิกจากน้ำตาลกลูโคส (Lin *et al.*, 2008)

ค่าตัวแปร (parameters)	ค่า (Value)	หน่วย
μ_{\max}	0.5	h^{-1}
C_s	155	$g L^{-1}$
K_s	2.03	$g L^{-1}$
n	0.603	-
m	11.9	-
C_p		
ซัคซิเนต	104.2	$g L^{-1}$
ฟอร์มเมต	16	$g L^{-1}$
อะซีเตท	44.2	$g L^{-1}$
แล็กเตท	100	$g L^{-1}$
K	-1.82	-
λ	1.2	-
η	0.369	-
α_p		
กรดอะซีติก	1.43	$g g^{-1}$
กรดฟอร์มิก	0.881	$g g^{-1}$
กรดแล็กติก	0.2	$g g^{-1}$
กรดซัคซินิก	3.60	$g g^{-1}$
β_p		
กรดอะซีติก	0.045	$g g^{-1}$
กรดฟอร์มิก	0.013	$g g^{-1}$
กรดแล็กติก	0.049	$g g^{-1}$
กรดซัคซินิก	0.299	$g g^{-1}$
δ	4.35	$g g^{-1}$
γ	0.308	$g (g h)^{-1}$

สำหรับการออกแบบกระบวนการหมักแบบกึ่งกะนั้น มีจุดประสงค์หลักในการเพิ่มประสิทธิภาพของการหมักโดยทำการเติมอาหารเหลวเข้มข้นเป็นครั้งๆ เพื่อหลีกเลี่ยงการเกิดการยับยั้ง เนื่องจากสารตั้งต้น ในที่นี่ได้ใช้โปรแกรม Visual Basic for Applications (VBA) มาช่วยในการคำนวณออกแบบ โดยทำการแบ่งการหมักเป็น 3 ช่วง และใช้วิธีการ Runge-Kutta 4 มาใช้ในการทำแบบจำลองทางคณิตศาสตร์สำหรับอัตราการเจริญ

การใช้กลูโคสและการเกิดผลิตภัณฑ์ โดยเฉพาะกรดซัคซินิก ซึ่งรูปภาพ 17 แสดงการทำแบบจำลองทางคณิตศาสตร์และการเปรียบเทียบผลการทดลอง ซึ่งพบว่าได้ผลิตภัณฑ์ต่ำกว่าการทำแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ค่อนข้างมาก โดยผลการทดลองพบว่าสามารถทำการหมักกรดซัคซินิกได้ประมาณ 74 กรัมต่อลิตรซึ่งไม่เป็นตามที่ได้คาดคะเนไว้ ซึ่งสาเหตุนั้น อาจเกิดเนื่องมาจากการกำหนดค่าตัวแปรต่าง ๆ ที่ไม่ถูกต้อง ซึ่งการหาค่าที่เหมาะสม (optimization) นั้น ไม่ได้เป็นวัตถุประสงค์หลักของงานวิจัยนี้ ดังนั้นจึงขอมุ่งเน้นในการทำบริสุทธิ์กรดซัคซินิกที่ได้จากกระบวนการหมัก ซึ่งจะได้กล่าวถึงในลำดับถัดไป





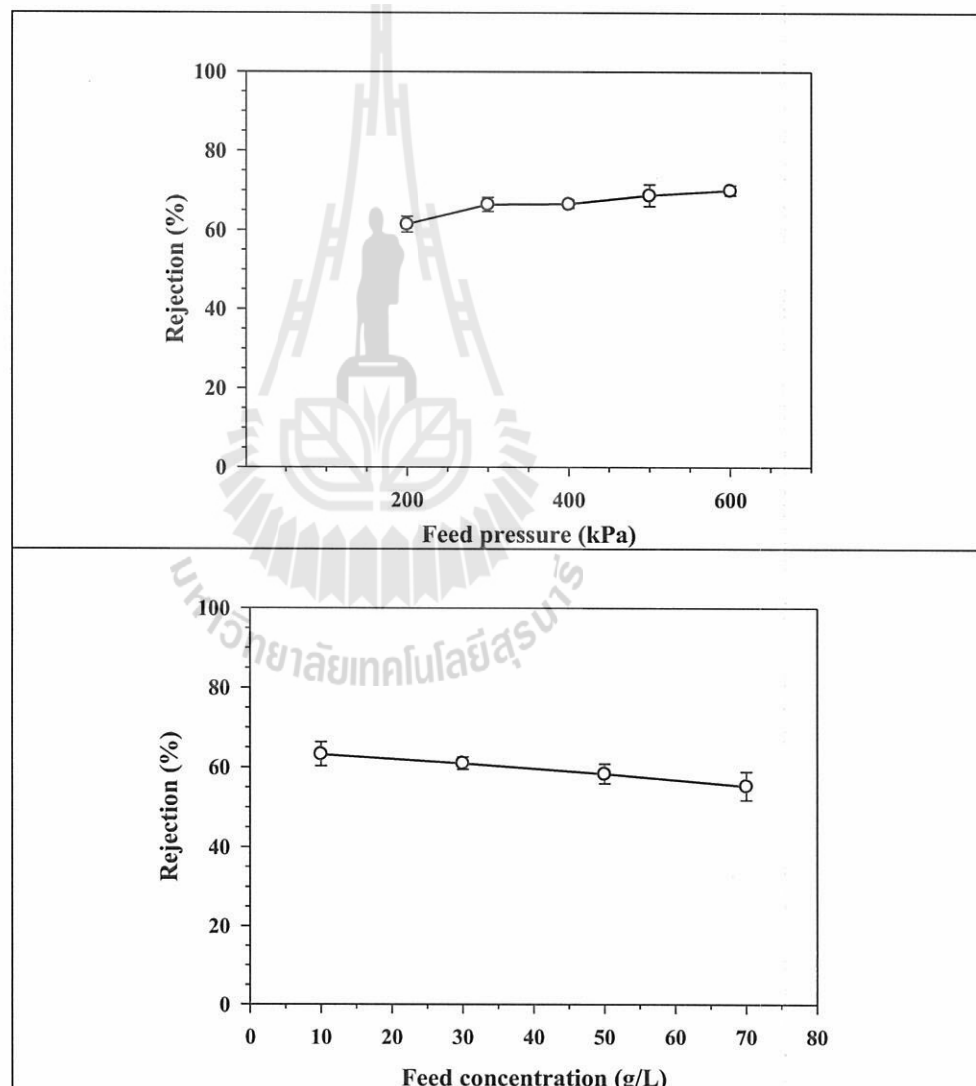
รูปภาพ 17 แสดงการการเจริญของเซลล์ การใช้กลูโคส และการเกิดผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ โดยทำการเปรียบเทียบระหว่างการทำแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ (บน) และผลที่ได้จากการทดลอง (ล่าง)

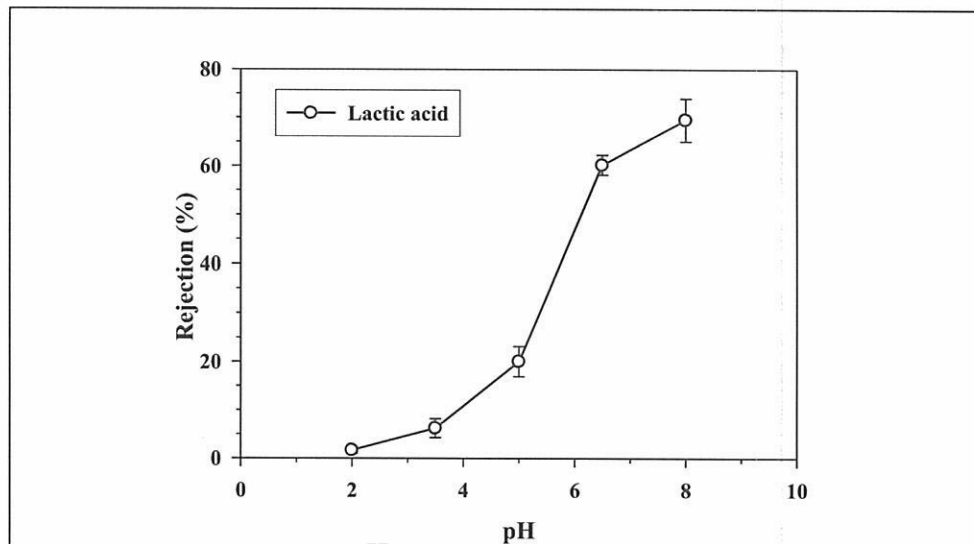
4.2 การทำบริสุทธิ์ด้วยระบบนาโนฟิวเตรชั่น

4.2.1 การทดสอบระบบด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก

จุดประสงค์หลักของการทดลองนี้ คือ การศึกษาถึงประสิทธิภาพการแยกสารละลายกรดซัลฟิวริกด้วยระบบนาโนฟิวเตรชั่น ในขั้นแรกจะเป็นการศึกษาด้วยสารป้องกันคราท์ก่อน โดยทำการทดลองที่สภาวะแตกต่างกัน ดังแสดงในรูปภาพ 18 ซึ่งรูปภาพ 18 (A) แสดงถึงอิทธิพลของแรงดัน ที่มีต่อการกักกัน (rejection) โดยได้ทำการทดสอบระบบที่ความดันอยู่ในช่วง 200 ถึง 600 kPa โดยทั่วไปแล้วความดันทั่ว ๆ ไปที่ใช้ในระบบนาโนฟิวเตรชั่นคือประมาณ 2-2.5 MPa แต่เนื่องจากข้อจำกัดของปั๊มที่มีอยู่ จึงสามารถทำความดันได้สูงสุดที่ 600 kPa ดังกล่าว ส่วนสภาวะต่าง ๆ ที่คงที่คือ ความเข้มข้นเริ่มต้นของกรดซัลฟิวริกในสารป้อนคือ 50 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 6.5 ตามลำดับ โดยผลการทดลองพบว่าอิทธิพลของความดันมีผลต่อค่าการกักกันน้อยมาก โดยดังกล่าว ณ ความดัน 200, 300, 400, 500 และ 600 kPa อยู่ที่ร้อยละ 61.4, 66.4, 66.5, 68.7, และ 70.1 ตามลำดับ ซึ่งการกักกันในระดับร้อยละ 60-70 นี้ อาจเกิดเนื่องมาจากการที่กรดซัลฟิวริกสามารถแตกตัวได้ในสภาวะที่เป็นกลาง ทำให้โครงสร้างของโมเลกุลมีขนาดใหญ่ขึ้น ส่วนรูปภาพ 18 (B) แสดงอิทธิพลของความเข้มข้นของสารป้อนต่อค่าการกักกัน โดยทำการแปรผันความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริก

อยู่ในช่วง 10 ถึง 70 กรัมต่อลิตรและการทดลองดังกล่าวได้กำหนดสภาวะที่คงที่ คือ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความดัน 400 kPa และค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 6.5 ตามลำดับ ซึ่งผลการทดลองพบว่าแนวโน้มของการกักกันนั้นเป็นไปในทิศทางที่คล้ายคลึงกัน กล่าวคือ อิทธิพลของความเข้มข้นมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าการกักกันไม่มากนัก โดย ณ ความเข้มข้นของกรดซัคซินิก ที่ 10, 30, 50, และ 70 กรัมต่อลิตร ค่าของการกักกันจะอยู่ที่ร้อยละ 63.3, 61.2, 58.5, และ 55.4 ตามลำดับ โดยจากความเข้มข้นเริ่มต้นจนถึงความเข้มข้นสุดท้าย พบว่าค่าการกักกันลดลงประมาณร้อยละ 12.5 เท่านั้น





รูปภาพ 18 อิทธิพลของสภาวะการทดลองต่าง ๆ ต่อค่าการกักกัน ของสารละลายกรดซัคซินิก โดยรูป (A) แสดงอิทธิพลของแรงดัน (B) คือผลของความเข้มข้นเริ่มต้นและ (C) คืออิทธิพลของค่าความเป็นกรด-ด่าง

ส่วนสภาวะสุดท้ายที่ได้ทำการทดสอบสำหรับสารป้อนสังเคราะห์ คือ อิทธิพลของค่าความเป็นกรด-ด่างซึ่งเป็นที่เข้าใจกันดีอยู่แล้วว่ากรดซัคซินิกสามารถแตกตัวได้ในสภาวะความเป็นกรด-ด่างที่แตกต่างกัน ซึ่งโดยธรรมชาติแล้วเมมเบรนสำหรับระบบนาโนฟิวเตรชันจะมีลักษณะของความเป็นประจุลบเล็กน้อยอยู่บนพื้นผิว ดังนั้นค่าของการกักกันจะมีมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับสมบัติของสารเป็นสำคัญ กล่าวคือขนาดของโมเลกุลและลักษณะของความเป็นขั้ว เช่น กรดอินทรีย์ เมื่ออยู่ในสภาวะที่แตกตัวจะมีประจุเป็นลบ โดยเมื่อโมเลกุลเคลื่อนเข้าใกล้ผิวหน้าของเมมเบรน จะทำให้เกิดการผลักกันของประจุลบจากเมมเบรนและจากกรดอินทรีย์นั้น ส่งผลให้การกักกันมีมากขึ้นนั่นเอง ซึ่งจะเห็นได้ว่าการกักกันจะเพิ่มขึ้นเมื่อความเป็นกรด-ด่างเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะในช่วงที่ค่ามากกว่า 3.5 การกักกันจะเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ โดยการกักกันมีค่าต่ำเมื่อความเป็นกรด-ด่างของสารละลายต่ำกว่าค่า pK_a ซึ่งโมเลกุลของกรดซัคซินิกมีขนาดเล็กกว่าค่า molecular weight cut off ของเมมเบรน (400 ดาลตัน) จึงทำให้สามารถเคลื่อนที่ผ่านเมมเบรนไปได้ อย่างง่ายดาย

กล่าวโดยสรุปแล้วทำให้ทราบว่าปัจจัยที่มีผลกระทบต่อค่าการกักกันมากที่สุดคือค่าความเป็นกรด-ด่าง ในขณะที่ความดันและความเข้มข้นจะไม่มีอิทธิพลต่อค่าดังกล่าวมากนัก ดังนั้นจึงต้องทำการพิจารณาเพิ่มเติมว่าวัตถุประสงค์หลักของการใช้ระบบนาโนฟิวเตรชันนั้น เราต้องการกักกันกรดซัคซินิก (ยังคงอยู่ในสารป้อน) หรือ ต้องการให้กรดซัคซินิกอยู่ในส่วนของเพอร์มิเอท และจาก องค์ประกอบทางเคมีของน้ำหมักชนิด YPD พบว่า มีองค์ประกอบของสารสกัดจากยีสต์ และเพปโตินซึ่งเป็นโปรตีน ซึ่งถือว่าเป็นประเภท macromolecule ที่มีขนาดใหญ่ ดังนั้นวัตถุประสงค์ ที่ต้องการของการใช้ระบบนาโนฟิวเตรชันนั้น ก็คือการแยกกรดซัคซินิกซึ่งมี

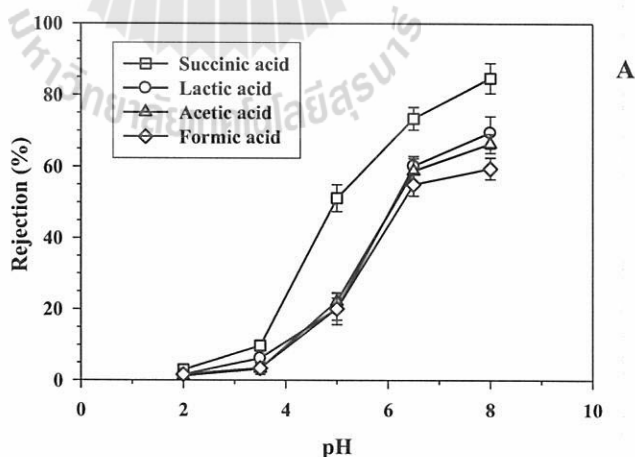
ขนาดเล็กออกจากโปรตีน ซึ่งเป็นสารที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่นั้นเอง ดังนั้นจึงควรเลือกสภาวะที่ทำให้ค่ากักกันมีค่าต่ำสุด ก็คือการทำสารละลายให้มีสภาวะที่เป็นกรด ในที่นี้หลังจากที่ได้สารละลาย YPD ที่ไหลผ่านถึง ปฏิกรณ์ชีวภาพเรียบร้อยแล้ว สารละลายดังกล่าวจะถูกปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้ได้ 2.0 ด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้นก่อนที่จะทำการทดสอบในลำดับถัดไป

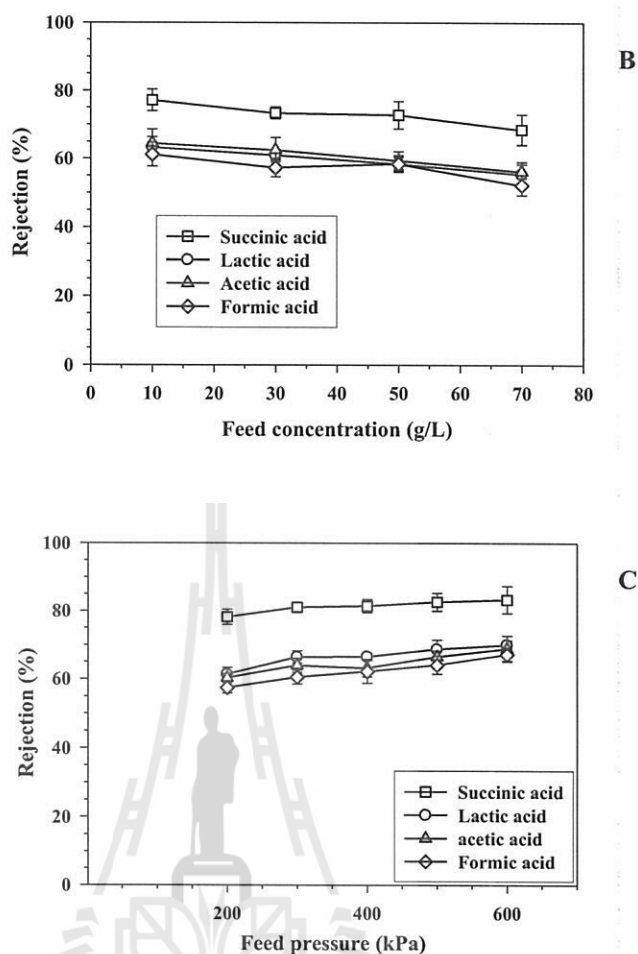
4.2.2 การทดสอบระบบด้วยสารป้อนสังเคราะห์ผสม

หลังจากเสร็จสิ้นกระบวนการหมัก จึงเข้าสู่กระบวนการ downstream processing ของกรดซัคซินิก ที่มีความท้าทายอยู่ 2 อย่าง คือ

1. การมีเซลล์แบคทีเรียและสารโมเลกุลขนาดใหญ่ในน้ำหมัก
2. การมีผลพลอยได้อื่นๆ ซึ่งมีคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีคล้ายกับกรดซัคซินิก

จึงมีการเลือกใช้ระบบนาโนฟิวเตรชั่น โดยในการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์หลักของการศึกษาคือ การศึกษาลักษณะการแยกของกรดอินทรีย์โดยใช้ระบบนาโนฟิวเตรชั่น ทั้งนี้อิทธิพลของปัจจัยในการดำเนินการแยกโดยใช้สารละลายแสดงในรูปภาพ 19 ผลของ pH ต่อการกักกันของ NF membrane โดยใช้สารละลายกรดผสมหลายชนิด ข้อมูลการทดลองการกักกันของสารป้อนแสดงในรูปภาพ 19A กรดอินทรีย์แตกตัวเนื่องจาก pH ของสารละลาย แสดงให้เห็นว่าการกักกันกรดแต่ละชนิดขึ้นอยู่กับ pH การกักกันของกรดที่ศึกษาส่วนใหญ่มีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อ pH สูงกว่าค่าคงที่ การแตกตัว (pK_a) ในขณะที่ pH ลดลงต่ำกว่าค่าคงที่การแตกตัว กรดจะอยู่ในรูปไม่แตกตัว





รูปภาพ 19 แสดงปัจจัยในการกักกันสารของเยื่อแผ่นนาโนฟิวเดชั่น (NF membrane) ของสารละลายป้อนสังเคราะห์ ที่ค่า pH, ความเข้มข้นของสารป้อน และความดันที่แตกต่างกัน การทดลองทั้งหมดมีการควบคุมอุณหภูมิที่ 30.5 องศาเซลเซียส

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 ในขณะที่ค่าคงที่การแตกตัวของกรดซัคซินิกคือ 4.21 และ 5.64 ค่าการกักกันกรดซัคซินิกคือ 2.96, 9.76, 51.28, 73.41, และ 84.66% ที่ pH 2.0, 3.5, 5.0, 6.5, และ 8.0 เมื่อค่าคงที่การแตกตัวของกรดซัคซินิกอยู่ในช่วง 4.2–5.6 ทั้งนี้พบว่าการเพิ่มการกักกันที่ pH สูงกว่า 5.5 อธิบายได้เนื่องจากเมมเบรนมีประจุส่งผลต่อ retention characteristic ที่มีผิวหน้าเมมเบรน ความหนาแน่นประจุมีความสัมพันธ์กับ zeta potential ของผิวหน้าเมมเบรน ค่า zeta potential ของเมมเบรนเซรามิกจะเป็นลบเมื่อ pH สูงขึ้นในช่วง 6-10 ในขณะที่ค่าจะเป็นบวกเมื่อ

pH ต่ำกว่า isoelectric point ที่ pH ต่ำค่า zeta potential จะเป็นบวก แสดงให้เห็นว่า เมมเบรนมีประจุเป็นลบในช่วง pH นี้ ในทางตรงกันข้ามที่ pH ต่ำกว่า 4 ค่ากักกันของกรดซัคซินิก ลดลงมากกว่า 10 % แสดงให้เห็นว่า sieving effect มีบทบาทสำคัญต่อการกักกัน และ น้ำหนักโมเลกุลของกรดซัคซินิก (118.09 กรัมต่อโมล) มีขนาดเล็กกว่าขนาดของโมเลกุลกักกัน (Molecular weight cut off, MWCO) ที่เท่ากับ 450 ของเมมเบรนเซรามิก นอกจากนี้ ระดับการกักกันถูกกำหนดได้โดยน้ำหนักโมเลกุลโดยกรดอินทรีย์แต่ละชนิด ข้อมูลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ค่าการกักกันกรดอินทรีย์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น เมื่อมีการเพิ่มขึ้นของขนาดโมเลกุล ที่ pH 3.5 ค่าการกักกันของกรดซัคซินิก กรดแลคติก กรดอะซิติก และกรดฟอร์มิก คือ 9.26%, 6.22%, 3.41% และ 3.27% ตามลำดับ กรดฟอร์มิกมีค่าการกักกันน้อยที่สุดเพราะ ขนาดโมเลกุลเล็กที่สุด การทดลองการกักกันของกรดแต่ละชนิดที่ความดันสารป้อน (feed) และความเข้มข้น feed ต่างกัน เพื่อประเมินอิทธิพลของพารามิเตอร์ต่อค่าการกักกัน (รูปภาพ 19B) แสดงให้เห็นถึงอิทธิพลของความเข้มข้น feed ต่อการกักกันของเมมเบรน ในการทดลองจะใช้ความเข้มข้น feed เริ่มต้นที่ 10 ถึง 70 กรัมต่อลิตร สภาวะในการทดลองประกอบด้วยอุณหภูมิ feed 30 องศาเซลเซียส ความดัน 400 kPa และ pH 6.5 พบว่าการเพิ่มความเข้มข้น feed ค่อยๆลดค่าการกักกันของกรดซัคซินิกคือ 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 กรดฟอร์มิก และกรดแลคติก คือ 13.8%, 14.2% และ 12.9% ตามลำดับ พบว่าผลของความเข้มข้น feed ไม่มีผลต่อค่าการกักกันของ NF membrane ทั้งนี้พารามิเตอร์ ที่มีความสำคัญอื่นๆต่อการแยกของ NF คือ ความดัน feed เนื่องจากข้อจำกัดของอุปกรณ์ ความดัน feed สูงสุดคือ 600 kPa รูปภาพ 16C แสดงให้เห็นถึงความดัน feed ต่อการกักกัน ความดัน feed ทดลองในช่วง 200 ถึง 600 kPa ในขณะที่ความเข้มข้น feed อยู่ที่ 50 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ pH เป็น 6.5 พบว่าค่าการกักกันของกรดซัคซินิกที่ความดัน feed คือ 200, 300, 400, 500 และ 600 kPa คือ 78.2, 81.1, 81.5, 82.6 และ 83.3% ตามลำดับ ผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่าการเพิ่มขึ้นของความดัน feed ไม่มีผลต่อการกักกันของกรดซัคซินิก การกักกันสูงของกรดซัคซินิกที่เกิดขึ้นอาจเป็นเพราะขนาดของโมเลกุลใหญ่กว่า MWCO ของเมมเบรน เนื่องจากการแตกตัว การกักกันของกรดแลคติก กรดอะซิติก และกรดฟอร์มิก ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า MWCO ของเมมเบรน ค่อยๆเพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มความดัน feed ทำให้มีค่าการกักกันคือ 12.25%, 11.6%, และ 14.58% ของ กรดแลคติก กรดอะซิติก และกรดฟอร์มิกตามลำดับ สรุปว่าสภาวะที่มีผลต่อการกักกันของ NF membrane มากที่สุดคือ pH ของสารละลาย สำหรับผลของความดัน และความเข้มข้น feed พบว่ามีผลเล็กน้อยต่อการกักกัน นอกจากนี้การแยกกรดซัคซินิกจาก กรดอินทรีย์ตัวอื่นๆไม่ได้ผล เพราะกรดแต่ละตัวมีความคล้ายคลึงกันทางกายภาพและทางเคมี โดยที่กรดต่างๆเหล่านี้สามารถ แยกตัวที่ pH เดียวกัน ต่อมาคือน้ำหนักโมเลกุลไม่แตกต่างกันมาก

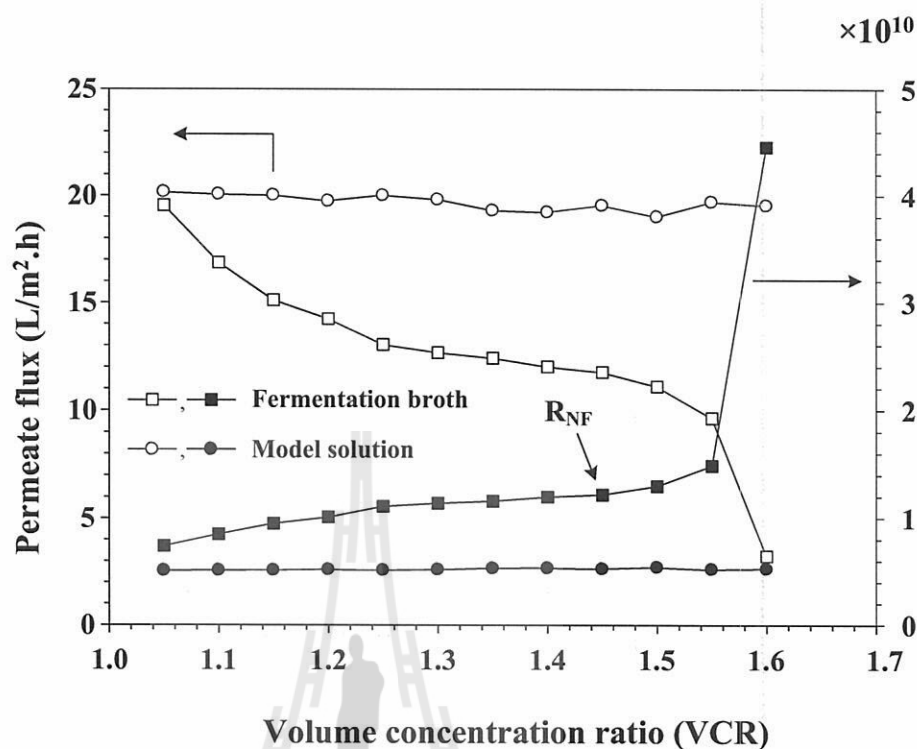
น้ำหมักของกรดซัคซินิก ที่ได้จากกระบวนการหมักนั้นจะประกอบด้วยสารโมเลกุลขนาดใหญ่ ชั้นส่วนโปรตีน และโมเลกุล ที่ให้สี การมีโปรตีนในน้ำหมัก ส่งผลให้มีปัญหาระหว่างการทำบริสุทธิ์ โดยเฉพาะการสร้างกรดอะมิโน ดังนั้นข้อดีของ NF คือการแยกสารโมเลกุลขนาดใหญ่ออกจาก น้ำหมักก่อนการ ทำบริสุทธิ์ ผลคือกรดอินทรีย์สามารถซึมผ่าน permeate ส่วนโปรตีนและสาร โมเลกุลขนาดใหญ่จะกลายเป็น retentate

4.2.3 การทดสอบระบบด้วยน้ำหมักจริง

เมื่อสิ้นสุดการทดลองน้ำหมักกรองโดย microfiltration เพื่อแยกเซลล์ออก อย่างไรก็ตาม clarified broth หรือของเหลวที่ได้จากการผ่านระบบไมโครฟิวเตรชันแล้ว ก็ยังมีสารละลายอื่นๆ ปนอยู่ เช่น โปรตีน polysaccharide โมเลกุลมีสี เป็นต้น หลักสำคัญหนึ่งของกรดซัคซินิก คือการแยกโปรตีนและสารอื่นๆออกจากน้ำหมัก ในกรณีนี้การดำเนินการแยกโปรตีนออก เป็นที่น่าสนใจเพราะโปรตีนสามารถ hydrolyzed เป็นกรดอะมิโน ซึ่งจะเพิ่มปัญหาในการทำบริสุทธิ์ หากโปรตีนถูกแยก ออกไม่หมดจะมีผลทำให้เกิดสีเหลืองในผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้สารโมเลกุล ที่มีขนาดเดียวกับโปรตีนก็จะถูกแยกออกไปด้วยสารโมเลกุลขนาดใหญ่และโปรตีน ส่งผลต่อการ เกิด การอุดตันใน NF membrane สาเหตุหลักคือการดูดซับไว้ที่หน้าของเมมเบรนและการอุดตัน ในรูเมมเบรน การพัฒนาการกรอง และการทำความสะอาด คือวัตถุประสงค์หลักของการวิจัย เพื่อยืดอายุการใช้งาน และคงความสามารถในการแยกของเมมเบรน

การศึกษาระบบนาโนฟิวเตรชันจากน้ำหมักที่ได้จากการกรองเซลล์ออกจากถังปฏิกรณ์ชีว ภาพ (effluent) จะถูกนำไปกรองผ่านระบบการกรองไมโครฟิวเตรชันอีกครั้งหนึ่ง เพื่อกำจัดเซลล์ ที่อาจจะหลุดออกมาจากถังปฏิกรณ์ชีวภาพ อย่างไรก็ตามระบบนี้ไม่สามารถกรองแยกโปรตีน ออกจากสารละลายได้ ซึ่งระบบนาโนฟิวเตรชันมีคุณสมบัติดังกล่าวโดยสามารถกรองโปรตีน หรือโพลีแซคคาไรด์ที่มีขนาดใหญ่และสารสีต่างๆได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งผลการทดลองการ กรองน้ำหมักดังกล่าวแสดง ในรูปภาพ 20 โดยทำการทดสอบเทียบกับสารป้อนสังเคราะห์ และได้ วิเคราะห์ในส่วนของคุณค่าฟลักซ์ และการคำนวณค่าความต้านทาน (resistance) อีกทั้งในการทดลอง นี้ได้ทำแยกส่วนเพอร์มิเอทจากการกรองตลอดเวลาโดยไม่ได้ไหลกลับเข้าสู่ถังของสารป้อน (concentration mode) ทำให้ปริมาณของสารป้อนจะลดลง โดยสามารถคำนวณความสัมพันธ์ ระหว่างปริมาณสารป้อนเริ่มต้นต่อปริมาณของสารป้อนที่เหลืออยู่ เรียกว่า volume concentration ratio (VCR) ซึ่งจากการทดลองพบว่า ค่าเพอร์มิเอทฟลักซ์นั้นจะมีความ สัมพันธ์กับค่า VCR นี้เป็นอย่างมาก เมื่อ VCR มีค่ามากขึ้นความเข้มข้นของโปรตีนและ สารโมเลกุลใหญ่ก็จะเพิ่มขึ้นด้วย โดยจะส่งผลกระทบต่อค่าเพอร์มิเอทฟลักซ์ที่ลดลง เนื่อง จากการอุดตัน (fouling) ของเมมเบรนจะเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากระบบนาโนฟิวเตรชันเป็นระบบ ที่ทำงานด้วยแรงดัน หากแรงดันน้อยเกินไปก็จะไม่เกิดการ ถ่ายเทมวลผ่านเยื่อแผ่น หากแรงดัน

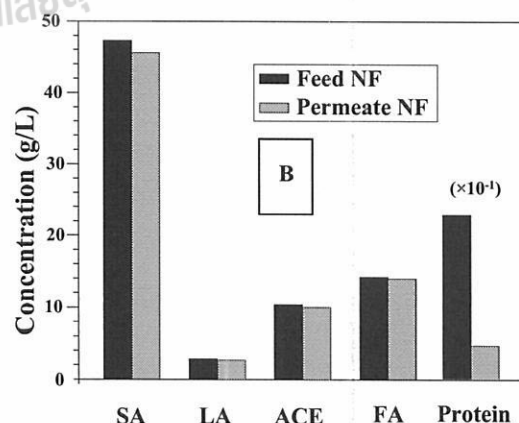
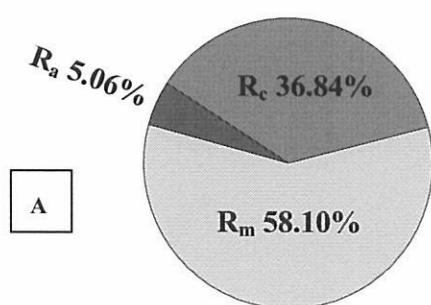
มากเกินไปในตอนแรกก็จะส่งผลให้เกิดการอุดตันที่ผิวหน้าของเมมเบรนอย่างรวดเร็ว ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้ใช้ค่าแรงดันที่ 400 kPa ตลอดการทดลอง

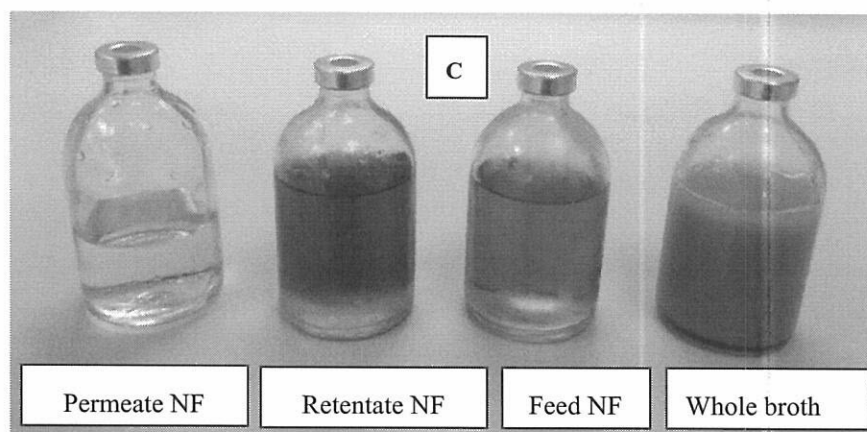


รูปภาพ 20 การเปลี่ยนแปลงค่า permeate flux และค่าการกักกันของเยื่อแผ่น ในระบบนาโนฟิวเทชั่นโดยมีสารป้อนเป็นสารสังเคราะห์และน้ำหมักจริง โดยที่ดำเนินการ ทดลองที่สภาวะความดัน 400 kPa pH ที่ 2.5 และอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

ค่าการแยกของ NF ระหว่างสารละลายกับ clarified fermentation broth เปรียบเทียบในรูปภาพ 21 แสดงให้เห็นว่า membrane flux และค่าความต้านทานของเมมเบรนจะเกี่ยวข้องสัมพันธ์กับ volume concentration ratio (VCR) VCR คำนวณได้จาก feed เริ่มต้น (3.0 ลิตร) ทารด้วย retentate volume NF โดยกระบวนการนี้จะอาศัยผลต่างของความดัน-แรงดันขับ ดังนั้นความดันจึงเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อ permeation flux โดย flux จะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความดัน feed แต่ที่ flux เริ่มต้นสูงจะทำให้เกิดการอุดตันของเมมเบรนอย่างรวดเร็ว ความดันควรจะถูกควบคุมไม่ให้ flux เริ่มต้นสูงเกินไป อันจะส่งผลต่อประสิทธิภาพการเลือกผ่านของเยื่อแผ่น ทั้งนี้ในการทดลองนี้ความดัน feed 400 kPa, pH 2.5 และ อุณหภูมิ 30.5 องศาเซลเซียส ใช้ในการศึกษา flux และความต้านทาน flux เริ่มต้นของสารละลายคือ 20.17 L/m².h และคงที่ หรือมีการเปลี่ยนแปลงน้อย เมื่อสิ้นสุดการทดลอง permeation rate คือ 19.56 L/m².h นอกจากนี้การคำนวณความต้านทาน (resistance) มีค่าระหว่าง 0.51-0.54×10¹⁰ m⁻¹ ต่อ

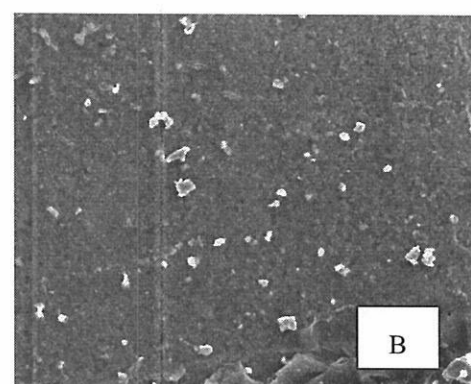
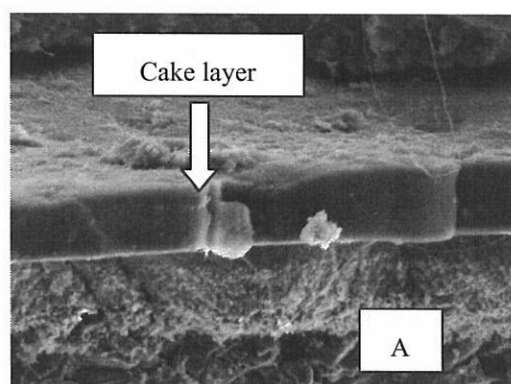
1,200 มิลลิลิตร ของตัวอย่างที่เก็บได้ เนื่องจากการมีโมเลกุลขนาดใหญ่อยู่บนผิวหน้าเมมเบรน ในทางกลับกัน กับสารละลาย permeation rate ของน้ำหมักลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 2-3 นาทีแรก จาก 19.54 ถึง 16.87 L/m².h และค่อยๆลดลงอย่างต่อเนื่อง จาก 1000 มิลลิลิตร ของ permeate (VCR = 1.5) ค่าความต้านทานเพิ่มขึ้นที่ $1.22 \times 10^{10} \text{ m}^{-1}$ permeation rate ลดลงอย่างรวดเร็ว ในช่วงสุดท้ายของ NF เมื่อค่าคือ 3.23 L/m².h คิดเป็น 83.5% ของ initial flux หลังจากทดลองเมมเบรนถูกอุดตันไปด้วยโปรตีนและสารโมเลกุลขนาดใหญ่ที่ผิวหน้า เพื่อหาค่าการฟาวลิงของเยื่อแผ่น NF membrane จะทำการล้างโดยตรงเพื่อใช้ในการหาค่า flux ในระหว่าง กระบวนการจะมีการล้าง 2 ขั้นตอน ล้างด้วยน้ำ 40 องศาเซลเซียส จนสารละลายใสไม่มีสี คือ (R₁) ล้างด้วย 2% phosphoric acid at 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ตามด้วยล้างด้วยน้ำอุ่น จน pH เป็นกลาง คือ (R₂) ค่าความต้านทานเมมเบรนคือ (R_m) คำนวณโดย flux ของน้ำใน new membrane จากสมการดังกล่าวข้างต้น initial permeation rate ของน้ำ คือ 20.52 L/m².h 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} และ R₁ คือ $0.45 \times 10^{10} \text{ m}^{-1}$ permeation rate เพิ่มขึ้นเป็น 20.21 L/m².h ความต้านทาน R₂ คือ $0.71 \times 10^{10} \text{ m}^{-1}$ ดังนั้นความต้านทานที่เกิดการอุดตันและการดูดซับ (R_f) คือผลต่างระหว่าง R₁ and R₂ คือ $0.06 \times 10^{10} \text{ m}^{-1}$ สรุปได้คือการฟาวลิงของเยื่อแผ่น NF membrane หาได้จากการทำความสะอาด ในรูปภาพ 21A ค่าความต้านทาน R_m, R_c, and R_f คือ 58.10%, 36.84%, and 5.06% (ดังรูปภาพ 21B) คือฮีทโทแกรมของ SA, lactic acid (LA), acetic acid (ACE), formic acid (FA) และความเข้มข้นของสารละลาย feed และ permeate แสดงว่ากรดจะอยู่ใน permeate และความเข้มข้นของโปรตีนใน feed และ permeate คือ 2.39, และ 0.48 กรัมต่อลิตร ผลคือโปรตีนถูกนำออกไป 79.92%

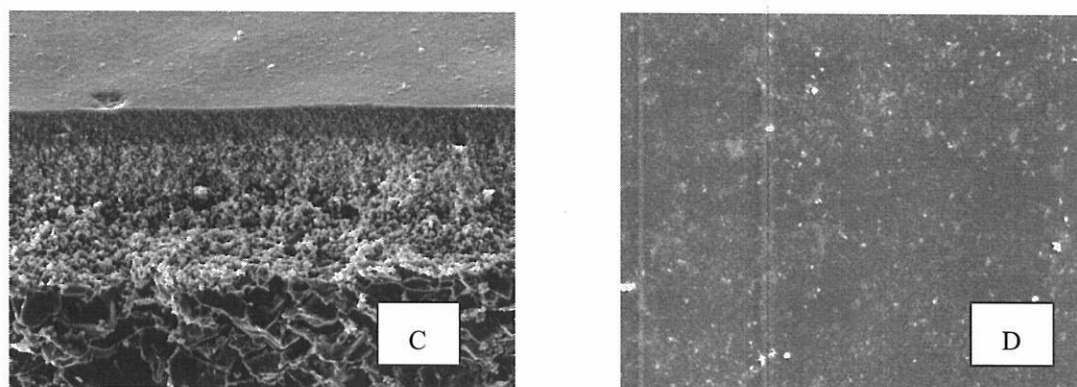




รูปภาพ 21 การหาความต้านทานของเมมเบรน NF โดยใช้กระบวนการล้าง (A) ฮีทโทแกรมของแสดงสารละลายผสมที่มีในสารป้อนและ permeate ในระบบ NF (B) และรูปภาพแสดงประสิทธิภาพการกำจัดสีของระบบ NF (C)

นอกจากนี้ข้อดีของ NF process คือมีค่ากักกันต่อกรดซัลฟิวริกต่ำ แต่กักกันโมเลกุลขนาดใหญ่สูงทำให้เกิดการลดลงของสี แสดงในรูปภาพ 21C ในขั้นตอนนี้ช่วยเอื้อประโยชน์ให้กับขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ เมื่อโปรตีนถูกแยกออกมาไปรูปที่ได้จากการนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (SEM) ของ เมมเบรนที่อุดตันและเมมเบรนทำความสะอาดแล้ว แสดงในรูปภาพ 22 เมมเบรนที่สกปรกจะปกคลุมด้วยชั้นเค้กหนาแสดงรูปภาพ 22A และ รูปภาพ 22B ขณะที่เมมเบรนที่สะอาด แสดงดังรูปภาพ 22C และ รูปภาพ 22D ซึ่งให้เห็นว่าการอุดตันของเมมเบรนได้ถูกเอาออก หรือชะล้างโดยกระบวนการล้างโดยการไหลตามขวางที่ทำให้เพิ่มจำนวนโมเลกุลขนาดใหญ่และโปรตีนในด้าน feed flux ต่ำสัมพันธ์กันกับ VCR ที่ระดับสูง ทำให้ยากในการเพิ่ม flux อย่างรวดเร็ว ดังนั้นระยะในการทำงานจึงสั้นลง

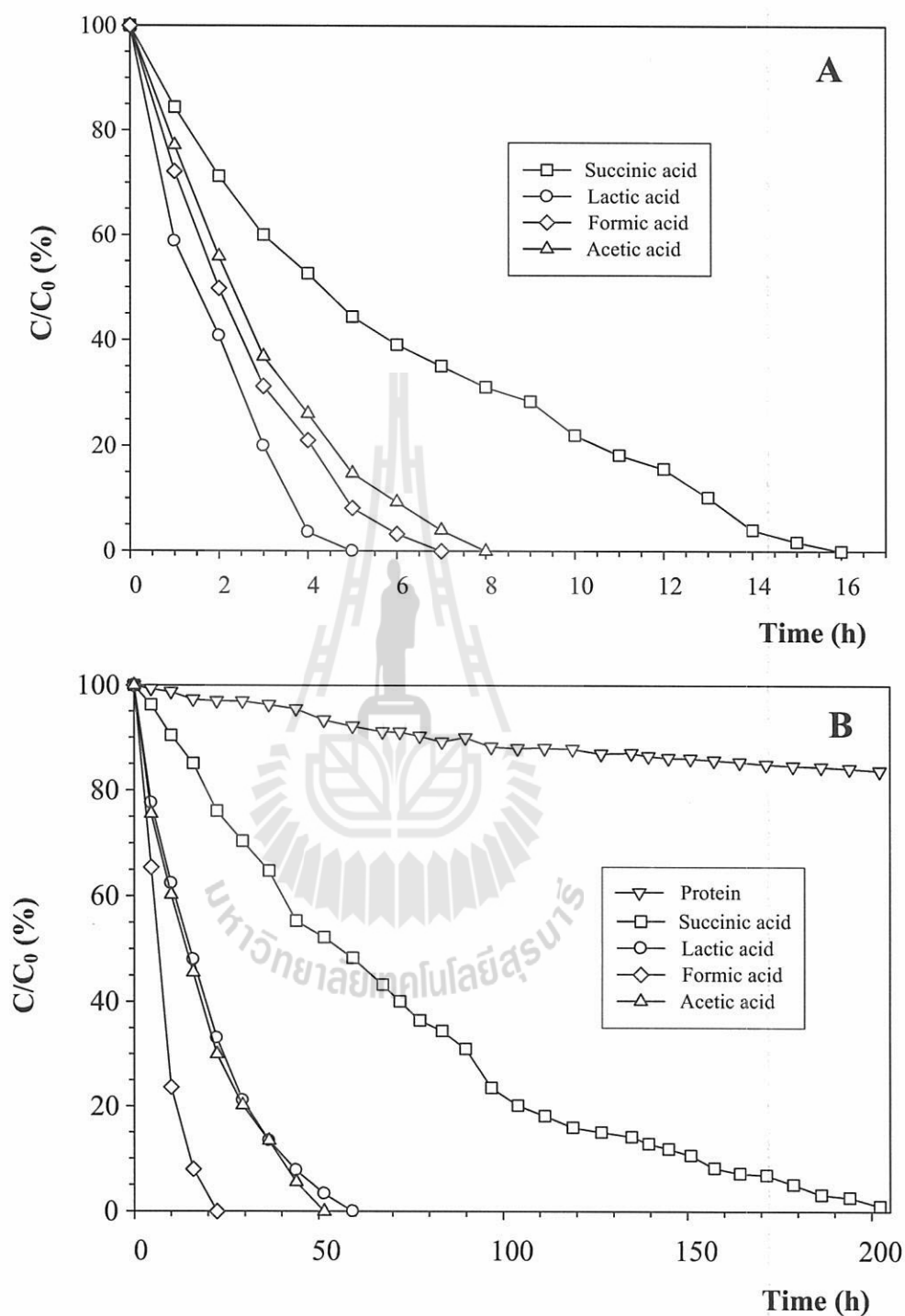




รูปภาพ 22 รูป SEM ที่ได้จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนที่มีการตัดขวาง เพื่อให้เห็นพื้นผิวด้านบนของเยื่อแผ่นเซรามิก โดยที่ (A) แสดงเมมเบรนที่ถ่ายด้านข้างพบว่าปกคลุมด้วยชั้นเค้กหนาที่บนผิวหน้า (B) คือ พื้นผิวด้านบนของเยื่อแผ่นที่มีชั้นเค้กเกาะหนา (C) เป็นรูปที่ถ่ายด้านข้างของเยื่อแผ่นเมมเบรนที่สะอาด และ (D) คือพื้นผิวด้านบนของเมมเบรนที่สะอาด

นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษากระบวนการแยก NF ของน้ำหมักถูกนำมาใช้ศึกษาซ้ำในกระบวนการ continuous diafiltration mode โดยที่ปริมาตรของน้ำหมักคงที่ และการเติมน้ำ DI เพื่อปรับค่าความเป็นกรดต่าง (pH 2.5) และตัวอย่างของสารละลายจะมีการศึกษาการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นเป็นระยะๆ ซึ่งแสดงดังรูปภาพ 23 ความเข้มข้นของสารละลายจากกระบวนการไดอะฟิลเตรชัน (diafiltration) แบบต่อเนื่องจะมีการแปรผันตามเวลา ผลการทดลอง diafiltration เปรียบเทียบกับสารละลาย (รูปภาพ 23 (A)) และน้ำหมักใส (รูปภาพ 23 (B)) รูปภาพ 23 (A) ความเข้มข้นเริ่มต้นของ succinic acid, lactic acid, acetic acid และ formic acid คือ 50, 2.5, 10.5 และ 12.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ทำการทดลองต่อเนื่อง 16 ชั่วโมง ที่ความดันของสารป้อน (feed) ที่ 400 kPa และควบคุมอุณหภูมิอยู่ที่ 30.5 องศาเซลเซียส ค่าฟลักซ์ของ permeate ของสารละลายคงที่ที่ $19.68 \text{ L/m}^2 \cdot \text{h}$ ความเข้มข้นของกรดซักซินิก ลดลงช้ากว่า กรดตัวอื่นๆ กรดฟอร์มิกมีค่าการลดลงสูงที่สุดเพราะมีขนาดเล็กสุด ความเข้มข้นของกรดแลคติก หดภายใน 4 ชั่วโมง เนื่องจากมีความเข้มข้นเริ่มต้นต่ำ เพียง 2.5 กรัมต่อลิตร ขณะที่ค่าเฉลี่ย flux ของน้ำหมักต่ำกว่าสารละลาย 12.4 เท่า flux ต่ำเป็นผลมาจากการใช้ระยะเวลาในการ diafiltration มากกว่า อีกทั้งยังเป็นผลมาจากการที่น้ำหมักมีสารละลายผสมอยู่หลายชนิด ทั้งนี้พบว่า กรด formic acid, acetic acid และ lactic acid อยู่ที่หลัง 24, 50 และ 65 ชั่วโมง กรดซักซินิกอยู่ที่ 205 ชั่วโมง บ่งชี้ว่ามีหลายพารามิเตอร์มีความสำคัญต่อการเกิดการอุดตัน นั้นอาจทำให้ permeate flux ลดลง การเพิ่ม diafiltration process โดยการเพิ่มความดัน พื้นผิวเมมเบรนต่อปริมาตรน้ำหมัก แต่ถึงแม้ว่าพารามิเตอร์เหล่านี้

จะไม่ได้ถูกศึกษาในงานนี้ก็ตาม แต่ค่าการแยกกรดซัคซินิกออกจากน้ำหนักเป็นที่น่าพอใจ
 ที่ได้ผลผลิตประมาณ 98% yield และโปรตีนมากกว่า 80% ถูกแยกออกไปจากระบบ



รูปภาพ 23 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารละลายผสมในกระบวนการ diafiltration โดยเทียบกับเวลา (A) และจากน้ำหมัก (B) โดยที่มีการควบคุมสถานะให้มีความดันอยู่ที่ 400 kPa ค่า pH 2.5 และอุณหภูมิ 30.5 องศาเซลเซียส

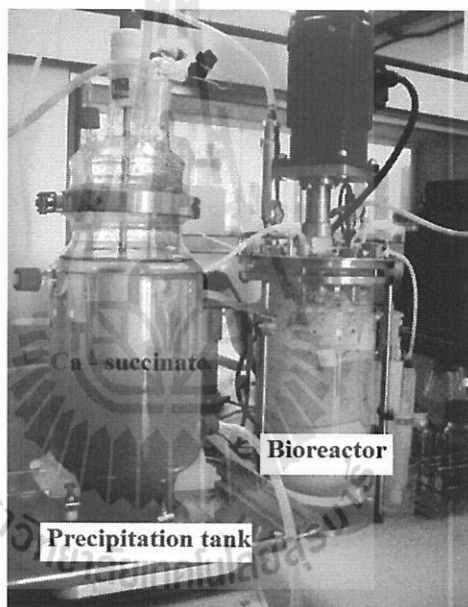
ตาราง 8 ส่วนประกอบของน้ำหมักหลังจากผ่านกระบวนการฟิเลตชั่น

ส่วนประกอบ	สารละลาย		
	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

4.3 ตกตะกอนกรดซัคซินิก

วิธีทางอุตสาหกรรมสมัยก่อนในการแยกของกรดคาร์บอกซิลิกจากน้ำหมัก มีการใช้วิธีการตกตะกอนโดยที่ใช้ Ca(OH)_2 หรือ CaO เป็นตัวแยกผลิตภัณฑ์กรดแลคติกและกรดซิตริก มีการศึกษาว่าสามารถแยกผลิตภัณฑ์ได้โดยวิธีนี้โดยมีการใช้ในทางอุตสาหกรรม นอกจากนี้การศึกษาการตกตะกอนของกรดซัคซินิกด้วย Ca(OH)_2 ถึงแม้จะเป็นเพียงการศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการหลังจากเติม Ca(OH)_2 หรือ เกลือแคลเซียมของกรดซัคซินิก จะถูกกรองออกจากน้ำหมักแต่อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้ตัวแยกผลิตภัณฑ์ที่ใช้คือ CaCO_3 โดยทำหน้าที่เป็นตัวปรับค่ากรดต่าง (Neutralization) ในเวลาเดียวกัน โดยที่ CaCO_3 ถูกใช้แทนที่การใช้ Ca(OH)_2 หรือ CaO ในวิธีการตกตะกอนแบบดั้งเดิมที่มีการแยกผลิตภัณฑ์เป็นแคลเซียมซัคซิเนต ด้วยการทำงาน of Microfiltration membrane ที่ถูกติดตั้งภายในถังปฏิกรณ์ น้ำหมักที่ได้จะมีบริสุทธิ์ระดับหนึ่งและมีส่วนผสมของแคลเซียมซัคซิเนตโดยถ่ายออกจากถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ทั้งนี้การตกตะกอนของแคลเซียมซัคซิเนตถูกชักนำให้เกิดขึ้น โดยการลดอุณหภูมิของถังตกตะกอนดังแสดงในรูปภาพ 24 ประสิทธิภาพของกระบวนการตกตะกอนนั้น จะแสดงให้เห็นในรูปของอัตราร้อยละของการตกตะกอน โดยค่าดังกล่าวสามารถคำนวณได้โดยอัตราส่วนของตะกอนและความเข้มข้นเริ่มต้นซัคซิเนตเริ่มต้น ตาราง 8 แสดงผลการศึกษาประสิทธิภาพของกระบวนการตกตะกอนแสดงในรูปร้อยละของการตกตะกอนกรดซัคซินิกในสารละลายที่อุณหภูมิที่แตกต่างกัน

กันและผลการศึกษาพบว่าที่อุณหภูมิ 2.5 องศาเซลเซียส นั้นแสดงให้เห็นถึงร้อยละการตกตะกอนที่ดีของกรดซัคซินิกซึ่งดีกว่าที่อุณหภูมิอื่น แต่อย่างไรก็ตามผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ร้อยละของการตกตะกอนซัคซิเนตนั้นตกตะกอนได้เพียง 12.6% ผลมาจากการตกตะกอนด้วย CaCO_3 ที่ต่ำนั้นอาจเป็นเพราะความเข้มข้นที่ต่ำของแคลเซียมซัคซิเนตในน้ำหมัก หากกระบวนการแยกของเหลวและของแข็งเพื่อการเก็บรวบรวมตะกอนและทิ้งสารละลายส่วนใส ซึ่งแคลเซียมซัคซิเนตส่วนใหญ่จะหายไปส่งผลให้ผลผลิตจากการเก็บเกี่ยวลดลง เพื่อเพิ่มการตกตะกอนกรดซัคซินิกให้มีความเข้มข้นที่สูงขึ้นหลังจากขั้นตอนการหมักเสร็จและเกลือแคลเซียมของซัคซิเนตถูกกรองออกจากถังปฏิกรณ์ชีวภาพ สารละลายจะมีความเข้มข้นมากขึ้นประมาณ 70% จากปริมาณเดิมและเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการรวบรวมตะกอนโดยการหมุนเหวี่ยงที่ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และตะกอนของแข็งแคลเซียมซัคซิเนตจะนำไปทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไป



รูปภาพ 24 การตกตะกอนของแคลเซียมคาร์บอเนตในถังตกตะกอนภายนอก

ตาราง 9 ร้อยละการตกตะกอนกรดซัคซินิกในสารละลายที่อุณหภูมิที่แตกต่างกัน ความเข้มข้นเริ่มต้นที่ของซัคซิเนตเริ่มต้นที่ 52 กรัมต่อลิตร

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	(%) ของแคลเซียมซัคซิเนตที่ตกตะกอน
37	0
30	0
20	2.2
10	3.9
5	8.6
2.5	12.6
0.5	12.5

ในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์กรดซัคซินิก ต้องมีการกำจัดกรดอินทรีย์ผลพลอยได้ออกให้หมดอย่างสมบูรณ์ ขั้นตอนการทำบริสุทธิ์เพื่อผลิตกรดซัคซินิกที่มีบริสุทธิ์ มีการใช้กระบวนการหลังการผลิตทางเทคโนโลยีชีวภาพในการผลิตกรดซัคซินิก โดยที่ไม่สามารถใช้กระบวนการตกตะกอนการหนึ่งได้เพียงกระบวนการเดียว ในการปรับปรุงพัฒนากระบวนการหลังการผลิต จึงมีความจำเป็นให้สามารถผลิตผลผลิตให้มีความบริสุทธิ์สูง ทั้งนี้ต้องให้ความสำคัญในการใช้พลังงานในกระบวนการด้วยเช่นเดียวกัน ในการแยกผลิตภัณฑ์กรดซัคซินิกจากน้ำหมักจากกระบวนการหมักนั้นค่าใช้จ่ายในส่วนนี้ มีถึง 50 % ของค่าใช้จ่ายทั้งหมดในการผลิตกรดซัคซินิกโดยจุลินทรีย์

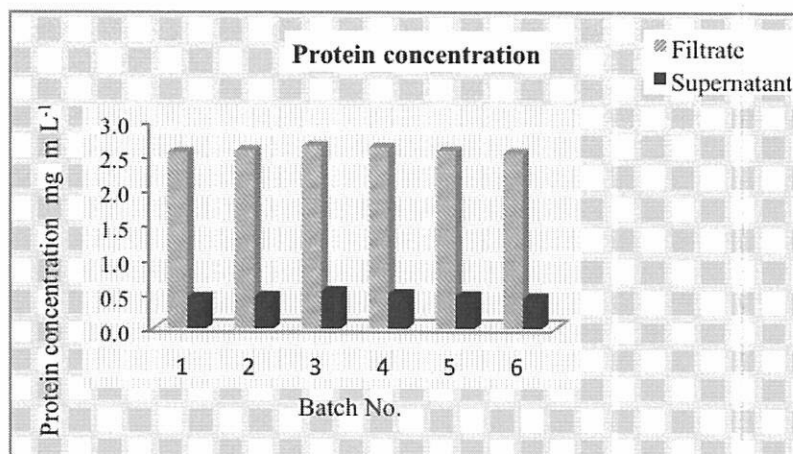
ด้วยเหตุนี้วิธีการใหม่จึงมีส่วนสำคัญในการพัฒนาและนำมาใช้ในการเก็บเกี่ยวกรดซัคซินิก (Kurzrock และ Botz 2010) โดยทั่วไปกระบวนการหลังการผลิตกรดซัคซินิกผลิตทางชีวภาพมักจะมีสามขั้นตอนหลัก ขั้นตอนแรกคือการกำจัดของเซลล์จุลินทรีย์ ส่วนใหญ่ใช้การกรองโดยเมมเบรนหรือการปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ออก ขั้นตอนที่สองคือการกำจัดสิ่งเจือปน และการแยกของกรดซัคซินิกจากน้ำหมัก และขั้นตอนสุดท้ายคือการทำให้บริสุทธิ์สุดท้ายของกรดซัคซินิก กระบวนการดังกล่าวข้างต้นถือเป็นกระบวนการหลังการผลิตที่มีประสิทธิภาพและไม่ซับซ้อน

ตาราง 10 ค่า pKa และค่าละลายตัวในน้ำ ที่ 20 ° C ของ การผลิตกรดโดยทั่วไปในการหมักของ *A. succinogenes*

Acid	pKa		Solubility in water 20°C	Melting point
	pKa ₁	pKa ₂		
Succinic acid	5.64	4.21	5.8 -6.8 % (wt)	184 °C
Acetic acid	4.7	-	Miscible	16.5 °C
Formic acid	3.84	-	Miscible	8.6°C
Lactic acid	3.86	-	Miscible	16.8°C

กรดอินทรีย์เหล่านี้มีสัดส่วนที่แตกต่างในรูปแบบการแยกตัวและรูปแบบการไม่แยกตัวที่ค่าพีเอชที่ แตกต่างกันและค่าการละลายของกรดเหล่านี้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ Li และคณะ (2010) แสดงให้เห็นว่าผลความสามารถในการละลายของ กรดซัคซินิก มีเพียงแค่ 3% ที่ 4°C และที่ค่า pH 2.0 ในขณะที่กรดผลพลอยได้อื่น ๆ เช่น กรดอะซิติก กรดแลคติก และ กรดฟอร์มิก ยังคงสามารถละลายในน้ำอย่างเต็มที่ จากการศึกษาการตกผลึกของกรดซัคซินิกจาก น้ำหมักซึ่งได้ดำเนินการที่ 4°C และควบคุมค่า pH ที่ 2.0 ผลปรากฏว่า ในขณะที่กรดที่เป็น ผลพลอยได้นั้นยังคงอยู่ในสารละลาย ส่วนกรดซัคซินิกสามารถเกิดการตกผลึกได้ (Li และคณะ 2010) สุดท้ายแล้วส่วนแขวนลอยของแคลเซียมซัคซิเนตที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงนั้นจะนำมาทำ ปฏิกิริยากับกรดซัลฟูริกหรือ H_2SO_4 ซึ่งปฏิกิริยาดังกล่าวจะแยกกรดซัคซินิกอิสระออกมา ตะกอนของแคลเซียมซัลเฟตจะกำจัดออกโดยการกรอง ต่อจากนั้นกรดซัคซินิกจะมีการทำให้ บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นโดยกระบวนการที่จะกล่าวในหัวข้อต่อไป

กระบวนการตกตะกอนของแคลเซียมถือเป็นกระบวนการที่มีประสิทธิภาพ สำหรับการกำจัด โปรตีน น้ำตาล และกรดผลพลอยได้อื่น ๆ รวมทั้งเกลือแคลเซียมในน้ำหมักออกไป ความเข้มข้น ของโปรตีนที่คงเหลือนั้นได้รับการวิเคราะห์ โดยใช้วิธีของ Lowry ดังที่แสดงในรูปภาพ 25 ความเข้มข้นของโปรตีนในส่วนใสที่ได้จากการกรอง (filtrate) และสารละลายส่วนใสที่ได้จาก ชั้นตอนการหมุนเหวี่ยง (supernatant) เมื่อนำมาเปรียบเทียบกัน ความเข้มข้นของโปรตีน คงเหลือมีค่าลดลงในแต่ละชุดของกระบวนการหมัก ความเข้มข้นของโปรตีนที่คงเหลือมีค่าระหว่าง 0.45-0.53 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร การตกตะกอนด้วย CaCO_3 ในการศึกษาครั้งนี้ ได้มีการนำ สารเคมีมาแทนที่การใช้ Ca(OH)_2 หรือ CaO ในวิธีการตกตะกอนแบบดั้งเดิม ซึ่งใช้ในการทำ น้ำหมักอยู่ในรูปแคลเซียมซัคซิเนต การเพิ่มของ CaCO_3 เข้มข้น สามารถลดปริมาณการใช้ Ca(OH)_2 หรือ CaO ในการตกตะกอนแบบดั้งเดิม การตกตะกอนด้วย CaCO_3 อาจจะเป็น กระบวนการที่สามารถนำไปใช้งานได้ในเชิงพาณิชย์สำหรับการผลิตไบโอซัคซิเนต ด้วยความที่มี อุปสรรคทางด้านเทคโนโลยีและความเสี่ยงที่น้อยมาก อย่างไรก็ตาม แคลเซียมซัคซิเนตเมื่อทำ ปฏิกิริยากับกรด H_2SO_4 เข้มข้นสูง ในระหว่างขั้นตอนการตกตะกอนซึ่งนำไปสู่การเกิด แคลเซียมซัลเฟตซึ่งเป็นผลพลอยได้หรืออิมพัสมที่เรารู้จักกันดี ซึ่งต้องที่การจัดการของเสียที่เกิดขึ้น ในระบบให้ดี (Kurzrock และ Bortz, 2010)

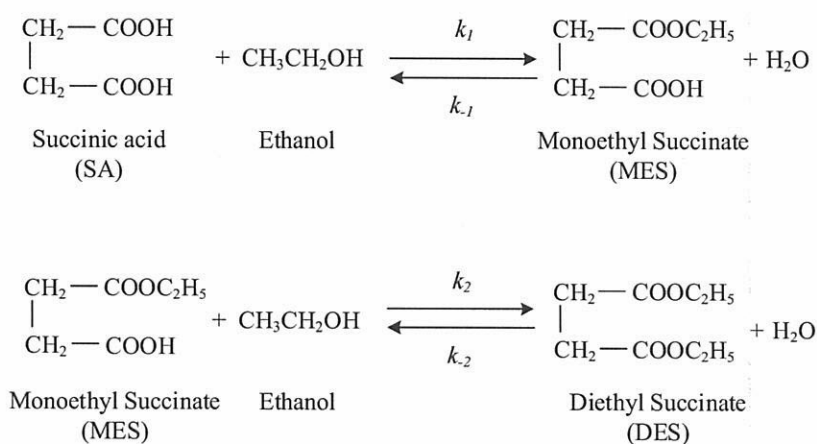


รูปภาพ 25 ความเข้มข้นของโปรตีนคงเหลือจากการตกตะกอนแคลเซียมซัคซิเนต

4.4 ปฏิกริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของกรดซัคซินิกและสารละลายเอทานอลโดยใช้ เป็นสารละลายต้นแบบของระบบ

4.4.1 การศึกษาจลนพลศาสตร์ของปฏิกริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของกรดซัคซินิกกับเอทานอล (Reaction kinetics of succinic acid esterification with ethanol)

วัตถุประสงค์ของการศึกษากระบวนการเอสเทอร์ฟิเคชันของกรดซัคซินิกกับเอทานอลเพื่อผลิตสาร ไดเอทิล ซัคซิเนต (Diethyl succinate, DES) ซึ่งสารดังกล่าวเป็นสารที่สามารถประยุกต์ใช้ได้หลากหลาย เช่น ใช้เป็นตัวทำละลาย, ใช้เป็นสารมัธยันตร์ (Intermediate substance) และโดยเฉพาะอย่างยิ่ง ใช้ในการผลิตสารโพลี บิวทิลีน ซัคซิเนต (poly butylene succinate) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของการผลิตพลาสติกชีวภาพ การศึกษาถึงจลนศาสตร์ของการเกิดปฏิกริยาจึงมีความสำคัญอย่างยิ่งในกระบวนการผลิตสารประกอบดังกล่าวในระดับอุตสาหกรรม



รูปภาพ 26 แสดงปฏิกริยาการเกิดเอสเทอร์ของกรดซัคซินิกกับเอทานอล

ปฏิกิริยาการเกิดเอสเทอร์ของกรดซัคซินิกกับเอทานอลแสดงดังรูปภาพ 26 โดยปฏิกิริยาดังกล่าวสามารถแบ่งออกได้เป็นปฏิกิริยาต่อเนื่อง 2 ชั้น โดยชั้นแรก กรดซัคซินิกทำปฏิกิริยากับเอทานอล ได้เป็นโมโนเอทิลซัคซิเนตกับน้ำและโมโนเอทิลซัคซิเนตทำปฏิกิริยากับเอทานอล ได้เป็น ไดเอทิลซัคซิเนตกับน้ำ สรุปคือ การผลิตไดเอทิล ซัคซิเนต 1 โมล ต้องใช้เอทานอล 2 โมล และได้ น้ำเป็นสารผลิตภัณฑ์ 2 โมล จากรูปภาพ 26 พบว่า ค่าพารามิเตอร์ที่ใช้ในการอธิบายจลนศาสตร์การเกิดปฏิกิริยาซึ่งมีทั้งปฏิกิริยาที่ไปข้างหน้าและผันกลับ ซึ่งสมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเกิดปฏิกิริยา (r) กับค่าคงที่ของการเกิดปฏิกิริยา (k) ในการเกิดเอสเทอร์ของกรดซัคซินิก แสดงได้ดังสมการที่ 1 และ 2

$$r_1 = w_{cat} \rho_{sol} k_0^1 \exp\left(\frac{-E_a^1}{RT}\right) \left[(x_{SA} \gamma_{SA}) (x_{EtOH} \gamma_{EtOH}) - \frac{(x_{MESYMES})(x_{H_2O} \gamma_{H_2O})}{K_{EQ}^1} \right] \quad (5)$$

$$r_2 = w_{cat} \rho_{sol} k_0^2 \exp\left(\frac{-E_a^2}{RT}\right) \left[(x_{MESYMES})(x_{EtOH} \gamma_{EtOH}) - \frac{(x_{DES} \gamma_{DES})(x_{H_2O} \gamma_{H_2O})}{K_{EQ}^2} \right] \quad (6)$$

โดย W_{cat} คือ น้ำหนักของตัวเร่งปฏิกิริยา (catalyst) (kg), ρ_{sol} คือ ความหนาแน่นของสารตัวอย่าง (kg m^{-3}), E_a คือ ค่าคงที่ของพลังงานกระตุ้น (activation energy) (kJ mol^{-1}), R คือ ค่าคงที่ของแก๊ส (gas constant) ($\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$), T คือ อุณหภูมิ (K), K_{EQ} คือ ค่าคงที่ของปฏิกิริยา ณ จุดอิ่มตัว, และ γ_i คือ ค่าสัมประสิทธิ์แอกทิวิตีของสารประกอบ (activity coefficient) ตามลำดับ

จากสมการการหาค่าจลนศาสตร์การเกิดปฏิกิริยาเอสเทอร์ของกรดซัคซินิก พบว่า ค่าพารามิเตอร์ที่สำคัญอีกค่าหนึ่ง คือ ค่าสัมประสิทธิ์แอกทิวิตี (activity coefficient, γ) ซึ่งเป็นค่าพื้นฐานที่สำคัญของการคำนวณทางอุณหพลศาสตร์เคมี และใช้ในการอธิบายถึงพฤติกรรมของสารผสมรวมไปถึงปฏิสัมพันธ์ของสารผสมแต่ละชนิด ในการคำนวณค่าสัมประสิทธิ์แอกทิวิตีของสารผสม สามารถคำนวณได้โดยใช้แบบจำลองของ non-random two-liquid (NRTL) โดยการกำหนดค่าพารามิเตอร์ของปฏิสัมพันธ์ของสารแต่ละชนิดลงในสมการ ซึ่งค่าพารามิเตอร์ดังกล่าว จะขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณหรือเศษส่วนโมลของสารผสมนั้นๆด้วย ตาราง 11 เปรียบเทียบค่าพารามิเตอร์ของวิธี NRTL และ UNIQUAC

ตาราง 11 เปรียบเทียบค่า binary parameter ของระบบ UNIQUAC และ NRTL

UNIQUAC				NRTL			
	H ₂ O EtOH	H ₂ O DES	EtOH DES		H ₂ O EtOH	H ₂ O DES	EtOH DES
a_{ij}	-2.39138	0	0	a_{ij}	0.514285	4.384591	0
a_{ji}	1.794768	0	0	a_{ji}	0.806535	-1.580000	0
b_{ij}	447.8363	25.73932	113.6074	b_{ij}	444.8857	184.7326	653.8819
b_{ji}	-573.038	-591.152	-503.063	b_{ji}	-266.533	1136.555	-158.856
				α_{ij}	0.4	0.36842	0.3
	H ₂ O	EtOH	DES				
r	0.92	2.10547	6.4733				
q	1.4	1.972	5.616				
q'	1	0.92	5.616				

สมการพื้นฐานในการคำนวณค่าสัมประสิทธิ์แอกทิวิตีของสาร i ในสารผสมที่มีปริมาณสารประกอบ เท่ากับ n แสดงได้ดังสมการที่ 7, 8 และ 9

$$\gamma_i = \exp \left[\frac{\sum_{j=1}^n x_j \tau_{ji} G_{ji}}{\sum_{k=1}^n x_k G_{ki}} + \sum_{j=1}^n \frac{x_j G_{ij}}{\sum_{k=1}^n x_k G_{kj}} \left[\tau_{ij} - \frac{\sum_{m=1}^n x_m \tau_{mj} G_{mj}}{\sum_{k=1}^n x_k G_{kj}} \right] \right] \quad (7)$$

$$G_{ij} = \exp(-\alpha_{ij} \tau_{ij}) \quad (8)$$

$$\tau_{ij} = a_{ij} + \frac{b_{ij}}{T} \quad (9)$$

จากสมการ NRTL พบว่า อัตราการเกิดปฏิกิริยาขึ้นอยู่กับค่าสัมประสิทธิ์แอกทิวิตี ซึ่งอีกนัยหนึ่งก็คือ อัตราการเกิดปฏิกิริยาขึ้นอยู่กับชนิด, เศษส่วนโมลที่มีอยู่ในระบบ รวมไปถึง อุณหภูมิของการเกิดปฏิกิริยา ค่า binary parameter ซึ่งบ่งบอกถึงปฏิสัมพันธ์ของสารสองชนิด ค่า G และค่า τ เป็นสมการที่ใช้อธิบายแอกทิวิตีที่เกี่ยวข้องกับอุณหภูมิ ในระบบเอสเทอร์ฟิคชัน ของกรดซัคซินิกกับเอทานอลนั้น มีสารเคมีที่เกี่ยวข้องทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ กรดซัคซินิก, เอทานอล, โมโนและไดเอทิลซัคซิเนต และน้ำ ค่า binary parameter ของสารประกอบ ในระบบดังกล่าว แสดงในตาราง 12

ตาราง 12 ค่า binary parameter ของระบบเอสเทอร์ฟิเคชั่นของกรดซัคซินิกกับเอทานอล

<i>i</i>	<i>j</i>	a_{ij}	a_{ji}	b_{ij}	b_{ji}	α_{ij}
H ₂ O	EtOH	0.514285	0.806535	444.8857	-266.533	0.4
H ₂ O	SA	0	0	296.7226	-328.506	0.3
H ₂ O	DES	4.384591	-1.58	184.7326	1136.555	0.36842
H ₂ O	MES	0	0	880.7603	-200.977	0.3
H ₂ O	DEE	8.412378	0.617494	-1496.24	547.9293	0.348988
H ₂ O	AcOH	3.3293	-1.9763	-723.888	609.8886	0.3
H ₂ O	EtOAc	3.853826	-2.34561	-4.42868	1290.464	0.364313
EtOH	SA	0	0	-605.634	113.4481	0.3
EtOH	DES	0	0	653.8819	-158.856	0.3
EtOH	MES	0	0	-292.308	400.6306	0.3
EtOH	DEE	4.3596	-3.5877	-1209.49	1381.066	0.3
EtOH	AcOH	0	0	225.4756	-252.482	0.3
EtOH	EtOAc	1.817306	-4.41293	-421.289	1614.287	0.1
SA	DES	0	0	1946.876	218.2243	0.3
SA	MES	0	0	-368.762	1039.777	0.3
SA	DEE	0	0	1947.928	248.4113	0.3
DES	MES	0	0	-44.2052	137.2218	0.3
DES	DEE	0	0	595.5747	-404.406	0.3
MES	DEE	0	0	100.6717	88.62851	0.3

ในการจำลองโมเดลทางคณิตศาสตร์ของปฏิกิริยาดังกล่าว มีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องทำการเปรียบเทียบโมเดลทางทฤษฎี หรือโมเดลอ้างอิง กับโมเดลที่ได้จากการทดลอง เพื่อทำการหาค่าพารามิเตอร์ที่เหมาะสมกับการทดลองนั้นๆ ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ ได้ใช้โมเดลทางคณิตศาสตร์ของ A. O. Londono (2010) มาเป็นโมเดลอ้างอิง ค่าพารามิเตอร์ทางจลนศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาเอสเทอร์ของกรดซัคซินิกกับเอทานอล แสดงดังตาราง 13

ตาราง 13 ค่าพารามิเตอร์ทางจลนศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาเอสเทอร์ของกรดซัคซินิกกับเอทานอล

Parameter	Mole Fraction
SA Esterification	
k_0^1 (kmol / kg CAT / s)	1.53×10^3
E_a^1 (kJ/kmol)	44400
K_{EQ}^1	8.83
k_0^2 (kmol / kg CAT) (1/s)	2.78×10^4
E_a^2 (kJ/kmol)	54700
K_{EQ}^2	1.35

ในการคำนวณจลนศาสตร์ของปฏิกิริยาสามารถคำนวณได้โดยใช้โปรแกรม MathCad ซึ่งต้องมีการกำหนดตัวแปรของสารและเศษส่วนโมลเริ่มต้น ดังนี้

$$x_F := \begin{pmatrix} 0.4 \\ 0.4 \\ 0.1 \\ 0 \\ 0.1 \end{pmatrix} \quad \begin{array}{l} \text{โดยที่ Succinic acid} = 1 \quad \text{Diethyl succinate} = 4 \\ \text{Ethanol} = 2 \quad \text{Water} = 5 \\ \text{Monoethyl succinate} = 3 \\ \text{Temperature} = 363 \text{ K } \quad K_{W_{cat}} = 0.08 \text{ kg } \quad \rho = 20 \text{ kmol m}^{-3} \\ \text{โดยมีค่าคงที่ของการเกิดปฏิกิริยา ดังนี้} \end{array}$$

Succinic acid to monoethyl succinate

$$\begin{aligned} k_1 &= 1530 \frac{\text{kmol}}{\text{kg s}} & E_{a1} &= 44400 \frac{\text{kJ}}{\text{kmol}} \\ k_{eq1} &= 8.83 & \Delta h_{R1} &= 0 \frac{\text{kJ}}{\text{kmol}} \\ k_{-1} &= \frac{k_1}{k_{eq1}} & E_{a-1} &= -\Delta h_{R1} + E_{a1} \\ k_{-1} &= 173.27 \frac{\text{kmol}}{\text{kg s}} & E_{a-1} &= 44400 \frac{\text{kJ}}{\text{kmol}} \end{aligned}$$

สำหรับ Monoethyl succinate to diethyl succinate

$$\begin{aligned} k_2 &= 2780 \frac{\text{kmol}}{\text{kg s}} & E_{a2} &= 54700 \frac{\text{kJ}}{\text{kmol}} \\ k_{eq2} &= 1.35 & \Delta h_{R2} &= 0 \frac{\text{kJ}}{\text{kmol}} \\ k_{-2} &= \frac{k_2}{k_{eq2}} & E_{a-2} &= -\Delta h_{R2} + E_{a2} \\ k_{-2} &= 2059 \frac{\text{kmol}}{\text{kg s}} & E_{a-2} &= 54700 \frac{\text{kJ}}{\text{kmol}} \end{aligned}$$

ค่า Δh_R หมายถึง ค่าพลังงานหรือเอนทาลปีที่แตกต่างกันของการเกิดปฏิกิริยา ซึ่งบ่งบอกถึงความยากง่ายของการเกิดปฏิกิริยาเดินหน้าและผันกลับ ถ้า Δh_R มีค่าเป็นบวก ปฏิกิริยาไปข้างหน้าจะเกิดมากกว่าปฏิกิริยาผันกลับ ในทางกลับกัน ถ้า Δh_R มีค่าเป็นลบ ปฏิกิริยาผันกลับจะเกิดมากกว่าปฏิกิริยาไปข้างหน้า ในกรณีของปฏิกิริยาการเกิดเอสเทอร์ของ กรดซัคซินิกกับเอทานอล พบว่า ค่า Δh_R มีค่าเท่ากับ 0 หมายความว่า การเกิดปฏิกิริยาไป ข้างหน้าและผันกลับมีอัตราที่เท่ากัน

ค่าพารามิเตอร์ NRTL ที่ใช้ในปฏิกิริยาเอสเทอร์รีฟิเคชันของกรดซัคซินิกกับเอทานอล สามารถทำได้โดยการประยุกต์ใช้กับ matrix และใช้ข้อมูลการเกิดปฏิกิริยาสัมพันธ์ของสารสองชนิด จากตาราง 10 โดยตัวเลขของแถวและคอลัมน์กำหนดดังนี้ succinic acid = 1, ethanol = 2, monoethyl succinate = 3, diethyl succinate = 4 และ Water =5 ดังนี้

$$a_{\text{NRTL}} := \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0.806535 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & -1.58 \\ 0 & 0.514285 & 0 & 4.384591 & 0 \end{pmatrix}$$

$$b_{\text{NRTL}} := \begin{pmatrix} 0 & 113.4481 & -368.762 & 1946.876 & -328.506 \\ -605.634 & 0 & 400.6306 & 653.8819 & -266.533 \\ 1039.777 & -292.308 & 0 & 137.2218 & -200.977 \\ 218.2243 & -158.856 & -44.2052 & 0 & 1136.555 \\ 296.7226 & 444.8857 & 880.7603 & 184.7326 & 0 \end{pmatrix} \text{K}$$

$$\alpha := \begin{pmatrix} 0 & 0.3 & 0.3 & 0.3 & 0.3 \\ 0.3 & 0 & 0.3 & 0.3 & 0.4 \\ 0.3 & 0.3 & 0 & 0.3 & 0.3 \\ 0.3 & 0.3 & 0.3 & 0 & 0.36842 \\ 0.3 & 0.4 & 0.3 & 0.36842 & 0 \end{pmatrix}$$

คำนวณค่าพารามิเตอร์ต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการทดลอง ดังนี้

$$\tau(T, i, j) := a_{\text{NRTL}_{i,j}} + \frac{b_{\text{NRTL}_{i,j}}}{T}$$

$$\tau(T, 1, 2) = 0.313$$

$$G(T, i, j) := e^{(-\alpha_{i,j}\tau(T, i, j))}$$

$$G(T, 1, 2) = 0.991$$

ค่า τ และ ค่า G คือค่าพารามิเตอร์ที่สัมพันธ์กับอุณหภูมิของสารประกอบที่ 1 และ 2 ซึ่งได้แก่ กรดซัคซินิกกับเอทานอล ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.313 และ 0.991 ตามลำดับ

การคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์แอกทิวิตี สามารถคำนวณได้จากสมการที่ (3) โดยใช้โปรแกรม MathCad ดังนี้

$$\gamma(T, x) := \left[\begin{array}{l} \text{for } i \in 1..n_{\text{comp}} \\ \gamma_i \leftarrow \exp \left[\frac{\sum_{j=1}^{n_{\text{comp}}} \tau(T, j, i) \cdot G(T, j, i) \cdot x_j}{\sum_{k=1}^{n_{\text{comp}}} G(T, k, i) \cdot x_k} \right] \dots \\ + \sum_{j=1}^{n_{\text{comp}}} \left[\frac{x_j \cdot G(T, i, j)}{\sum_{k=1}^{n_{\text{comp}}} G(T, k, j) \cdot x_k} \cdot \left(\tau(T, i, j) \dots \right. \right. \\ \left. \left. + \left(\sum_{m=1}^{n_{\text{comp}}} \frac{x_m \cdot \tau(T, m, j) \cdot G(T, m, j)}{\sum_{k=1}^{n_{\text{comp}}} G(T, k, j) \cdot x_k} \right) \right) \right] \end{array} \right]$$

$$\gamma(T, x) = \begin{bmatrix} 0.544 \\ 0.738 \\ 0.916 \\ 12.518 \\ 1.619 \end{bmatrix}$$

ค่าสัมประสิทธิ์แอกทิวิตีที่คำนวณได้นั้นคือค่าแอกทิวิตีที่สัมพันธ์ของสารประกอบแต่ละชนิดที่อยู่ในสารละลาย โดยตัวเลขของแถวแต่ละแถวหมายถึงสารแต่ละชนิดที่ได้ระบุไว้ข้างต้น ค่าสัมประสิทธิ์แอกทิวิตีสามารถนำมาแทนค่าในสมการเพื่อหาอัตราการเกิดปฏิกิริยาดังในสมการที่ (1) และ (2) ดังนี้

$$\begin{aligned} r1(T, x) &:= \left[\begin{array}{l} \gamma_1 \leftarrow \gamma(T, x) \\ \text{for } i \in 1..n_{\text{comp}} \\ a_i \leftarrow x_i \cdot \gamma_i \\ w_{\text{cat}} \cdot \rho \cdot k_{101} \cdot \exp\left(\frac{-E_{1a1}}{R_{\text{gas}} \cdot T}\right) \cdot \left(a_{\text{SA}} \cdot a_{\text{EtOH}} - \frac{a_{\text{MES}} \cdot a_{\text{H}_2\text{O}}}{K_{1\text{eq1}}} \right) \end{array} \right] \\ r2(T, x) &:= \left[\begin{array}{l} \gamma_1 \leftarrow \gamma(T, x) \\ \text{for } i \in 1..n_{\text{comp}} \\ a_i \leftarrow x_i \cdot \gamma_i \\ w_{\text{cat}} \cdot \rho \cdot k_{202} \cdot \exp\left(\frac{-E_{2a2}}{R_{\text{gas}} \cdot T}\right) \cdot \left(a_{\text{MES}} \cdot a_{\text{EtOH}} - \frac{a_{\text{DES}} \cdot a_{\text{H}_2\text{O}}}{K_{2\text{eq1}}} \right) \end{array} \right] \end{aligned}$$

$$r_1 = 0.062 \text{ mol m}^{-3} \text{ s}^{-1}$$

$$r_2 = 1.198 \times 10^{-3} \text{ mol m}^{-3} \text{ s}^{-1}$$

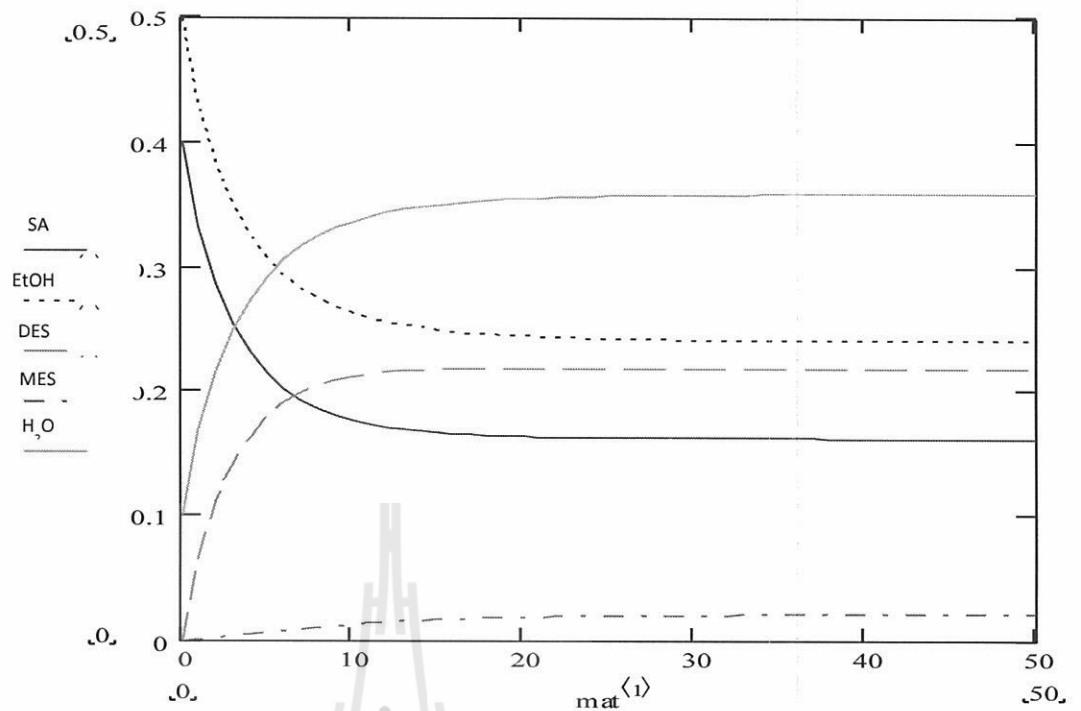
ซึ่งค่า r_1 และ r_2 ที่คำนวณได้เท่ากับ 0.062 และ $1.198 \times 10^{-3} \text{ mol m}^{-3} \text{ s}^{-1}$ ซึ่งคืออัตราการเกิดปฏิกิริยาเอสเทอร์ของกรดซัคซินิกเป็นโมโนเอทิลซัคซิเนต และ โมโนเอทิลซัคซิเนตเป็นไดเอทิลซัคซิเนต ตามลำดับ โดยสามารถหาความเข้มข้นของสารแต่ละชนิดในฟังก์ชันของเวลา ในช่วงของเวลา 50 วินาที ได้จากค่าอัตราการเกิดปฏิกิริยา และแสดงออกมาในรูปแบบของตารางและกราฟ ดังแสดงในตาราง 14 และรูปภาพ 27

$$r_{\text{vec}}(t, x) := \begin{pmatrix} -r_1(T, x) \\ -r_1(T, x) - r_2(T, x) \\ r_1(T, x) - r_2(T, x) \\ r_2(T, x) \\ r_1(T, x) + r_2(T, x) \end{pmatrix}$$

$$t_{\text{end}} := 50 \text{ s} \quad \text{mat} := \text{rkfixed}(x, 0, t_{\text{end}}, 50, r_{\text{vec}})$$

ตาราง 14 ความเข้มข้นของสารประกอบ ที่ได้จากปฏิกิริยาเอสเทอร์ของกรดซัคซินิกกับเอทานอล

เวลา (วินาที)	เศษส่วนโมล				
	กรดซัคซินิก	เอทานอล	MES	DES	น้ำ
0	0.4	0.4	0.1	0	0.1
5	0.254	0.246	0.238	7.79E-03	0.254
10	0.223	0.21	0.263	0.013	0.29
15	0.216	0.199	0.268	0.017	0.301
20	0.214	0.195	0.268	0.018	0.305
25	0.213	0.194	0.267	0.019	0.306
30	0.213	0.193	0.267	0.02	0.307
35	0.213	0.192	0.267	0.02	0.308
40	0.213	0.192	0.267	0.021	0.308
45	0.213	0.192	0.266	0.021	0.308
50	0.213	0.192	0.266	0.021	0.308



รูปภาพ 27 ความเข้มข้นของสารประกอบ ที่ได้จากปฏิกิริยาเอสเทอร์ของกรดซัคซินิกกับเอทานอล

จากตาราง 14 และรูปภาพ 27 แสดงความเข้มข้นของสารประกอบในปฏิกิริยาเอสเทอร์ของกรดซัคซินิกกับเอทานอล พบว่า อัตราส่วนของกรดซัคซินิกกับเอทานอลมีปริมาณลดลง เนื่องจากการเกิดปฏิกิริยา ในขณะที่ MES, DES และน้ำ มีอัตราส่วนที่มากขึ้น ซึ่งผู้ทดลองประสบความสำเร็จในการจำลองโมเดลทางคณิตศาสตร์ของการเกิดปฏิกิริยาเอสเทอร์ของกรดซัคซินิกกับเอทานอลจากโมเดลอ้างอิง (Londono, A.O., 2010) ขั้นตอนต่อไปของงานวิจัย คือ การปรับปรุงโมเดลของปฏิกิริยาที่ได้จากการทดลอง เทียบกับโมเดลอ้างอิง (model fitting)

4.4.2 ผลของอัตราส่วนโดยโมลของสารละลาย

วัตถุประสงค์เพื่อหาความเข้มข้นของกรด เอทานอล และ น้ำ ที่เหมาะสมในปฏิกิริยา esterification สัดส่วนมวลเริ่มต้นของเอทานอลต่อกรดซัคซินิกเริ่มจาก 1.60 เพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนถึง 3.44 ตามด้วยจาก 4.09 ถึง 8.82 จากการศึกษาพบว่ากรดซัคซินิกละลายได้น้อยในเอทานอล จำเป็นจะต้องเพิ่มความเข้มข้นของน้ำเพื่อละลายกรดซัคซินิกก่อนที่จะเริ่มปฏิกิริยา ทั้งนี้การละลายได้น้อยของกรดซัคซินิกในเอทานอลเป็นผลดีในการทำบริสุทธิ์ อีกทั้งเมื่อเอทานอลที่มีน้ำปนอยู่สามารถใช้ละลายกรดซัคซินิกแทนการใช้ anhydrous ethanol อย่างไรก็ตาม ความเข้มข้นของน้ำในสารละลายเริ่มต้น มีส่วนสำคัญในการเปลี่ยนกรดซัคซินิกเป็น diethyl succinate และที่ความเข้มข้นน้ำเริ่มต้นต่ำๆ มีผลทำให้กรดซัคซินิกละลายไม่หมด ในขณะที่ปริมาณน้ำเริ่มต้นสูง จะทำให้ yield and productivity ต่ำ

ตาราง 15 ปริมาณโมลของกรดซัคซินิกกับเอทานอลระหว่างปฏิกิริยา esterification ณ จุดเริ่มต้น และจุดสมดุล (equilibrium) ในทุกการทดลองจะมีการควบคุมอุณหภูมิที่ 70 องศาเซลเซียส pH 2.5 ค่าผลผลิตหรือ product yield ($Y_{DES/SA}$) ได้จาก จำนวนโมลของ diethyl succinate ที่จุดสมดุลหารด้วยโมลของกรดซัคซินิก ที่เริ่มต้น

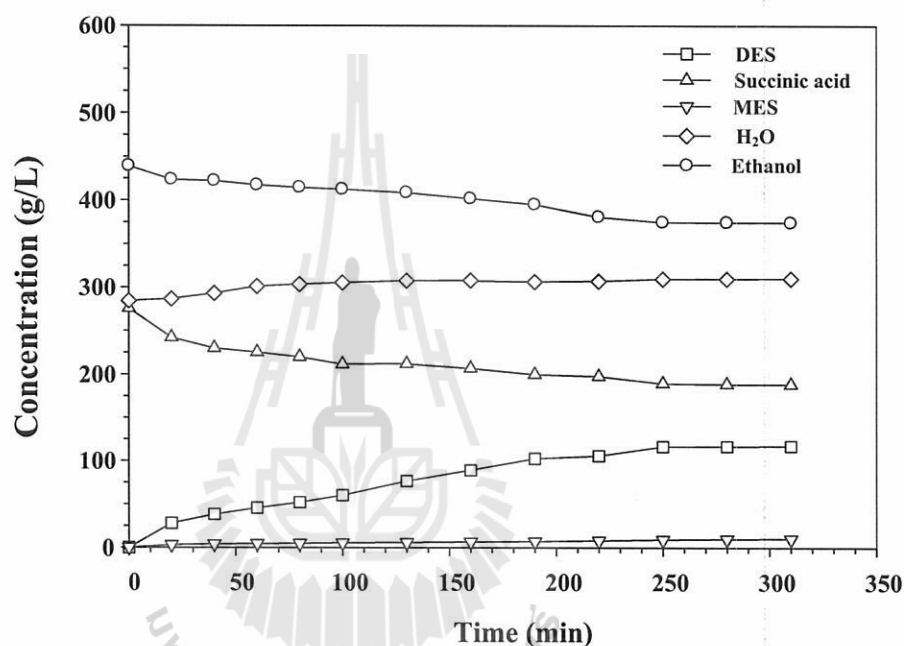
No.	At the beginning (g)			At equilibrium (g)					$Y_{DES/SA}$ mole (%)
	SA	EtOH	H ₂ O	SA	DES	MES	EtOH	H ₂ O	
1.	40.0	63.75	11.25	3.93	44.88	7.06	37.83	21.39	76.02
2.	40.0	63.75	41.25	27.34	16.99	1.47	54.31	44.94	28.77
3.	40.0	74.57	11.25	3.47	46.45	6.99	57.66	16.91	78.67
4.	40.0	90.22	11.25	3.27	46.89	6.88	73.18	16.94	79.41
5.	40.0	113.4	11.25	2.20	48.56	6.82	95.82	17.11	82.24
6.	40.0	137.65	11.25	0.87	50.52	6.86	119.40	17.32	85.56

SA = succinic acid, EtOH = ethanol, DES = diethyl succinate, MES = monoethyl succinate

ตาราง 15 เป็นการทดลองปริมาณผลิตภัณฑ์และสารตั้งต้นใน esterification ระหว่างกรดซัคซินิกกับเอทานอลและน้ำ โดยที่สารตั้งต้น 2 ตัวแรกผสมกันที่ 70 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นแล้วเติมน้ำจนกรดซัคซินิกละลายหมด ในการทดลอง no. 1 และ 2 พบว่า ผลจากความเข้มข้นน้ำเริ่มต้นที่เศษส่วนน้ำหนักจาก 0.1-0.28 ตามด้วย 0.27-0.57 เศษส่วนโมล ในการทดลองที่ 2 น้ำปริมาณมากมีผลต่อ yield ของ diethyl succinate เพียง 28.77%

ความเข้มข้นของ succinate และความเข้มข้นเอทานอลในการทดลองนี้แสดงใน รูปภาพ 28 ผลผลิตเริ่มต้นของ diethyl succinate อยู่ที่ 1.39 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง หลังจากนั้นค่าค่อยๆลดลงและเข้าสู่ภาวะคงที่หลังจากเวลาผ่านไป 250 นาที ค่าความเข้มข้น diethyl succinate คือ 117.2 กรัมต่อลิตร ขณะที่เหลือกรดซัคซินิก 188.52 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 68.34% ของค่าเริ่มต้น ทั้งนี้การเกิด diethyl succinate และ monoethyl succinate ในระบบทำให้น้ำเพิ่มขึ้นจาก 284.5 เป็น 309.9 กรัมต่อลิตร การเปลี่ยนของกรดซัคซินิกต่ำเป็นผลมาจากข้อจำกัดทางอุณหพลศาสตร์จากการเพิ่มขึ้นของน้ำ การทดลองที่ 2 พบว่าการเปลี่ยนแปลงเข้าสู่สมดุลจากกรดซัคซินิกเป็น diethyl succinate เพิ่มขึ้นจาก 28.77 เป็น 76.02% เมื่อเศษส่วนโมลของน้ำลดลงจาก 0.57 เป็น 0.26 แต่ในการทดลองที่ 1 คิดเป็นเพียง 9.83% ของกรดซัคซินิกที่ไม่ทำปฏิกิริยาในระบบ จากการทำการทดลองทั้งสองการทดลองสรุปได้ว่า ความเข้ม

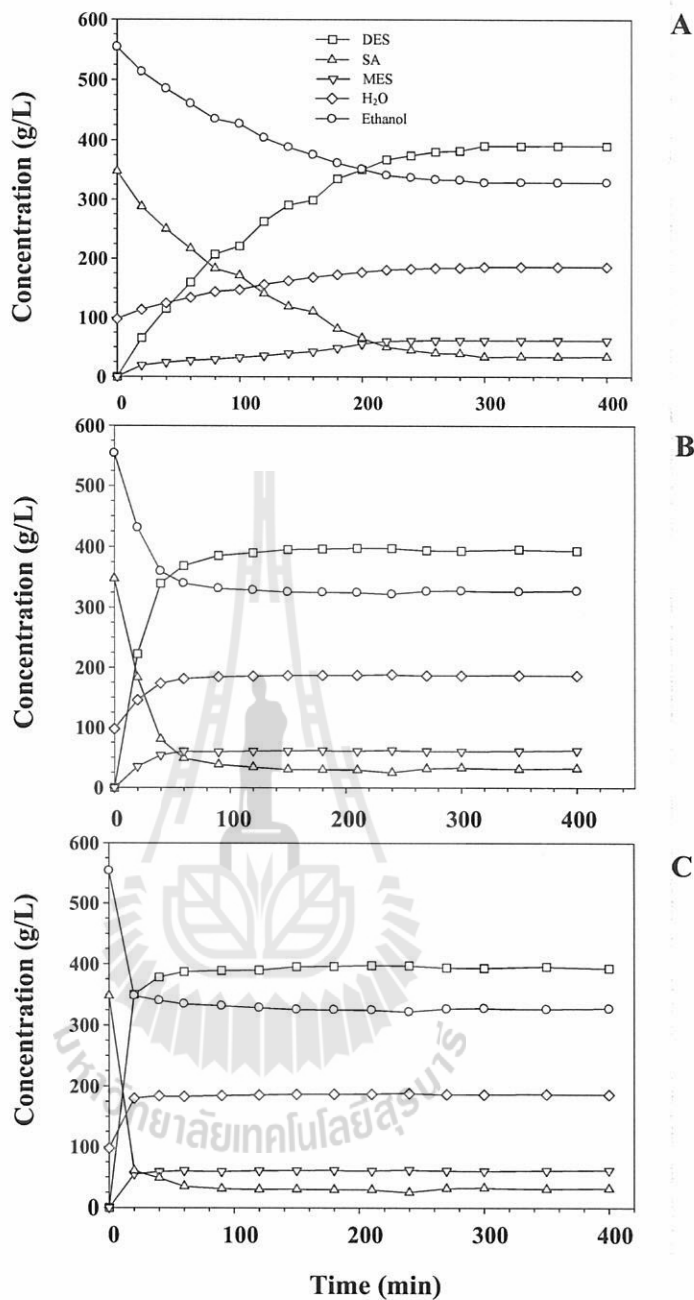
ชั้นเริ่มต้นของน้ำควรจะมีค่าน้อย แต่ไม่ควรต่ำกว่าความสามารถในการละลายของกรดซัคซินิก และในการทดลองที่ 3-6 อิทธิพลของความแตกต่างของสัดส่วนระหว่างเอทานอล และกรดซัคซินิก จากการศึกษาพบว่า การเพิ่มสัดส่วนเอทานอลต่อกรดซัคซินิกทำให้ yield ของ diethyl succinate เพิ่มขึ้น diethyl succinate สูงสุดคือ 85.56 mole% เมื่อสัดส่วนกรดซัคซินิกต่อเอทานอล คือ 8.82 โดยการใช้เอทานอลปริมาณมาก yield ของ diethyl succinate เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม วิธีนี้มีผลต่อมูลค่าในการลงทุน reactor ขนาดใหญ่มีผลต่อเงินลงทุน นอกจากนี้แล้วการ recovery diethyl succinate เจือจาง จะนำไปสู่ความยากทางเทคนิคและเศรษฐศาสตร์



รูปภาพ 28 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารชนิดต่างๆในสารละลายเทียบกับเวลา โดยที่ diethyl succinate คือ (—□—), monoethyl succinate คือ (—▽—), ethanol คือ (—○—) และ H₂O คือ (—◇—) ระหว่างปฏิกิริยา esterification ของกรดซัคซินิกและเอทานอล น้ำหนักของกรดซัคซินิกต่อเอทานอลต่อน้ำ ณ เริ่มต้น เป็น 40:63.75:41.75 อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส pH 2.5

4.4.3 ผลของอุณหภูมิ

รูปภาพ 29 คือระยะเวลาของความเข้มข้นผลิตภัณฑ์และสารตั้งต้นของกรดซัคซินิกและเอทานอล การทดลองทำที่อุณหภูมิระหว่าง 65 และ 95 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นเริ่มต้นของกรดซัคซินิกต่อเอทานอลต่อน้ำในทุกการทดลอง คือ 3.5:5.5:1.0 จากผลการทดลองพบว่าปฏิกิริยามีการเพิ่มขึ้นตามการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิ ค่าผลผลิตหรือ Volumetric productivity ของ diethyl succinate ที่ 65 องศาเซลเซียส คือ 2.59 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง โดยที่ 80 นาทีแรก ค่าค่อยๆลดลงจนกระทั่งคงที่หลังจาก 300 นาทีผ่านไป diethyl succinate สูงสุด คือ 390 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ค่าผลผลิต volumetric productivity diethyl succinate จะมีค่าสูงอยู่ที่ 80 และ 95 องศาเซลเซียส โดยได้ค่าประมาณ 11.13 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง สมดุลในการทดลองแรกอยู่ที่หลังจาก 90 นาทีเป็นต้นไป ในขณะที่การทดลองถัดมาใช้เวลา 60 นาที พบว่าผลของอุณหภูมิจะมีผลสำคัญต่อค่า volumetric productivity ของ diethyl succinate ค่าการเปลี่ยนสมดุลอยู่ใกล้ๆช่วงของอุณหภูมิในการทดลองนี้ ที่สมดุลการเปลี่ยนแปลงกรดซัคซินิกที่ 65, 80 และ 95 องศาเซลเซียส คือ 90.18, 90.32 และ 90.81% อีกทั้งขีดจำกัดทางอุณหพลศาสตร์ในการเปลี่ยนกรดซัคซินิกเป็น diethyl succinate เป็นลักษณะทั่วไปในปฏิกิริยา esterification ที่ทำให้เกิดการเพิ่มของ productivity และปฏิกิริยาจะเลื่อนหรือมีทิศทางไปทางผลิตภัณฑ์ โดยที่จำเป็นจะต้องปฏิบัติการในระบบที่อุณหภูมิสูง (เช่น ที่ใกล้จุดเดือดของน้ำ)



รูปภาพ 29 ค่าความเข้มข้นในปฏิกิริยาระหว่างกรดซัคซินิกและน้ำ ที่มีการควบคุมอุณหภูมิในระบบ ที่ 65 (A), 80 (B) และ 95 องศาเซลเซียส (C) ในทุกๆการทดลอง มีอัตราส่วนเริ่มต้นของกรดซัคซินิกต่อเอทานอลต่อน้ำ คือ 3.5:5.5:1.0, pH = 2.5 อัตราการกวนที่ 500 รอบต่อนาที

4.5 กระบวนการ VP-assisted esterification ของกรดซัคซินิกและเอทานอล

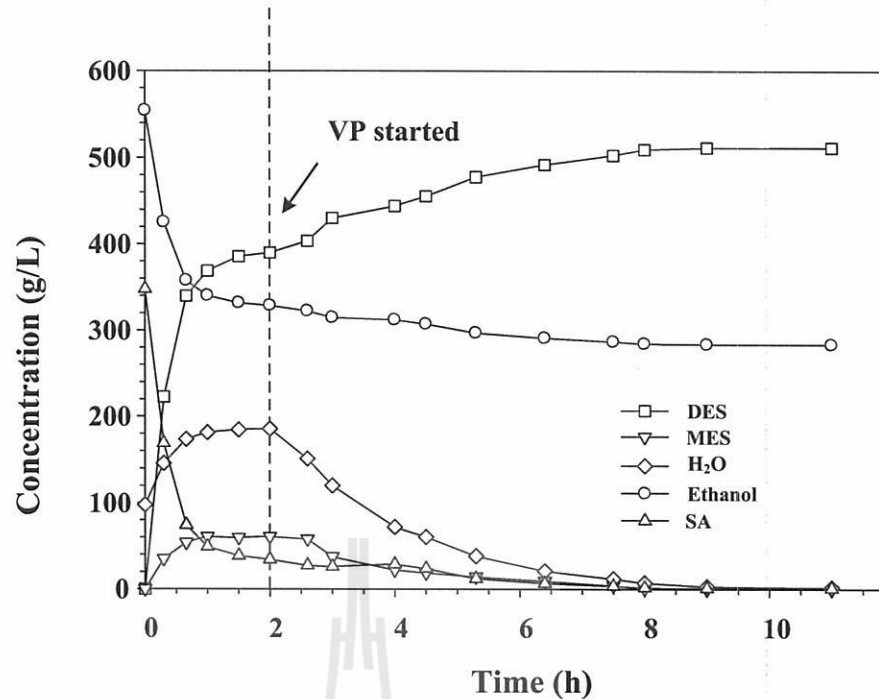
4.5.1 ประสิทธิภาพกระบวนการ Dehydration ของเยื่อแผ่นเซรามิก

เพื่อหลีกเลี่ยงไม่ให้ ceramic membrane สัมผัสกับกรดโดยตรง กระบวนการ esterification จะทำการทดลองโดยการกลั่นที่จุดเดือดของสารละลายและเอทานอลที่กลั่นได้ จะถูกเอาน้ำออกโดย vapor permeation (VP) ก่อนที่จะวนกลับเข้าไปที่ถังปฏิกรณ์ รายละเอียดการทดลองการแยกน้ำของ NaA zeolite membrane ที่สถานะต่างๆได้ทำการศึกษมาแล้ว อีกทั้งการทดลองนี้ได้ทำการเอาน้ำออกจากเอทานอลโดย VP membrane ซึ่งจะแสดงในตาราง 10

สถานะสำคัญ 2 สถานะ คืออุณหภูมิสารป้อน (feed) และความดันสารป้อน (feed) จะถูกศึกษาจาก permeation flux และค่า separation factor สำหรับประสิทธิภาพของอุณหภูมิสารป้อน (การทดลองที่ 1-4) ที่ความเข้มข้นน้ำ 5% โดยน้ำหนัก และความดัน สารป้อนที่ 100 kPa ผลการทดลองพบว่า total flux เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิ การแยกน้ำสูงขึ้นจากการเพิ่มอุณหภูมิเนื่องจากการเพิ่มแรงดันขับ permeate flux โดยมีการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วที่ความดัน feed เพิ่มขึ้น คิดเป็นค่า flux ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส มีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 6.3%, 19.61% และ 39.71% เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น 115, 130 และ 145 องศาเซลเซียส ตามลำดับ แสดงได้ว่า flux ของเอทานอลมีค่าเข้าใกล้ศูนย์ที่ทุกอุณหภูมิ การทดลอง ในทางกลับกันค่าการแยกเป็นสัดส่วนกลับกันกับ permeation flux ค่าลดลงจาก 2735 เป็น 1773 เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจาก 100 เป็น 145 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตามพบว่า ที่ความเข้มข้นน้ำสูงมากกว่า 98.9 %โดยน้ำหนัก ในด้าน permeate ผลคือ separation factors เพิ่มขึ้นเป็น 2735 ถือได้ว่าค่าการแยกอธิบายถึงผลจากการเลือกผ่านโมเลกุลของ zeolite NaA และสำหรับการทดลองที่ 5-8 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง total permeation flux กับความดัน feed ค่าคงที่อุณหภูมิ feed คือ 145 องศาเซลเซียส พบว่า VP มีแรงขับด้วยเช่นกัน แสดงว่า total flux เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่ม ความดัน feed แสดงถึงความสัมพันธ์แบบเส้นตรงระหว่าง water flux และความดัน feed ปรากฏที่ความดันจนถึง 300 kPa ก่อนที่ความสัมพันธ์แบบเส้นตรงจะเปลี่ยน เป็นกึ่งเส้นตรงที่ความดัน feed 300-400 kPa ที่ความดันเหล่านี้ permeation fluxes คือ 2.85, 3.98, 4.82 และ 5.11 กิโลกรัมต่อตารางเมตรต่อชั่วโมง ผลแสดงให้เห็นว่า ค่าการซึมผ่านของน้ำไม่คงที่เสมอไปที่ทุกความดัน นอกจากนี้ความเข้มข้นของน้ำใน feed เริ่มต้นระหว่าง 2.5-10 %โดยน้ำหนัก จะมีการเพิ่ม total flux และ separation factor สูงขึ้น (การทดลองที่ 9-12) ทดลองที่อุณหภูมิและ ความดัน feed คงที่ ที่ 145 องศาเซลเซียส และความดัน 400 kPa การทดลองแสดงให้เห็นว่า permeate flux เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มน้ำใน feed สูงกว่า water flux อธิบายได้จากความดันย่อยของน้ำมีผลทำให้เพิ่มแรงดันขับ total permeation flux สูงสุดคือ 10 %โดยน้ำหนัก ของน้ำใน feed คือ 11.13 กิโลกรัมต่อตารางเมตรต่อชั่วโมง มากกว่าที่ 2.5 %โดยน้ำหนักของน้ำใน feed

4.5.2. กระบวนการ VP-assisted esterification ของน้ำหมักที่ได้ผ่านระบบนาโนฟิวเดชั่น (Nanofiltration, NF)

ในการทดลองนี้การผสมระหว่าง esterification และการแยกน้ำ โดย vapor permeation ได้มีการศึกษาการเพิ่มขึ้นของ yield และ productivity ของ diethyl succinate ในการทดลองก่อนหน้านี้ยืนยันว่า ester yield ขึ้นอยู่กับอัตราการแยกน้ำ ที่มีการทดลอง โดยการเพิ่มพื้นที่เมมเบรนต่อปริมาตรเริ่มต้นของปฏิกิริยา นอกจากนี้ตัวแปรสำคัญคือ การออกแบบพื้นที่เมมเบรนเพื่อแยกน้ำ ช่วงเวลาของ succinic acid, ethanol, diethyl succinate, monoethyl succinate และ water concentrations ระหว่างปฏิกิริยา esterification ของน้ำหมักที่ผ่าน NF แล้ว และเอทานอลแสดงในรูปภาพ 30 โดยมีสภาวะการทดลองดังต่อไปนี้ คือที่อุณหภูมิสารป้อน (feed) คือ 145 องศาเซลเซียส ความดัน 400 kPa และ pH 2.5 สัดส่วนโมลเริ่มต้นของ succinic acid:ethanol:H₂O เท่ากับ 3:12:5.5 ผลคือ การเพิ่มขึ้นของพื้นที่ต่อปริมาตรที่ 157 ต่อตารางเมตร ถูกทดลองที่พื้นที่ต่อปริมาตรสูง คาดว่าการแยกน้ำและ ester yield จะสูง ที่เริ่มต้น esterification ทิ้งให้เข้าสู่สมดุลเป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง ตามด้วยเพิ่มอุณหภูมิไปที่จุดเดือด ด้วยคอลัมน์ของหอกลิ้นประสิทธิภาพสูง สารละลายเอทานอลที่แยกแล้วจะมีเอทานอลและน้ำโดยมี diethyl succinate และ monoethyl succinate เป็นจำนวนเล็กน้อยเท่านั้น (0.09 กรัมต่อลิตร และ 0.03 กรัมต่อลิตร) ณ ก่อนเข้าระบบ VP ปริมาณน้ำในของเหลวผ่านกระบวนการ esterification มีค่าเพิ่มขึ้นและลดลงหลังจากเข้า VP ที่เวลา 4 ชั่วโมงหลังจากเริ่มต้นเข้าระบบ VP ความเข้มข้นของน้ำลดลงจาก 188.32 กรัมต่อลิตร มาที่ประมาณ 35.54 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นค่าค่อยๆลดลงจนกระทั่งอยู่ที่ 1.98 กรัมต่อลิตรในเวลา 9 ชั่วโมง อีกทั้งพบว่าอัตราการแยกน้ำต่ำใน 5 ชั่วโมงสุดท้ายของ esterification เนื่องจากแรงดันขับต่ำ โดยมีน้ำในเอทานอลที่กลั่นได้ต่ำลง



รูปภาพ 30 ความเข้มข้นของสารผสมที่เข้าสู่กระบวนการ VP-assisted esterification ของ น้ำหมักที่ได้ผ่าน ระบบ NF โดยที่ในการทดลองมีสภาวะ คือ อุณหภูมิ 145 องศาเซลเซียส A/V_0 ratio 470 ต่อตารางเมตร อัตราส่วนโมลาร์ของ กรดซักซินิก:เอทานอล:น้ำ = 3:12:5.5, pH = 2.5 และความดันด้านสารป้อน feed pressure ของระบบ VP = 400 kPa ตามลำดับ

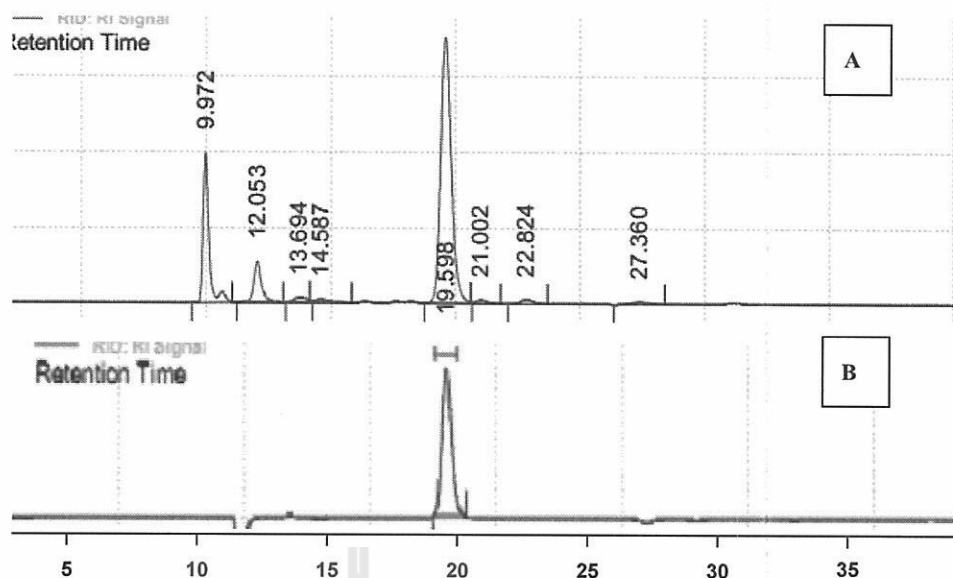
4.5.3 กระบวนการ Fractionation และไฮโดรไลซิส

เมื่อสิ้นสุด esterification น้ำจะถูกแยกออกเกือบทั้งหมด ในขณะที่กรดซักซินิกและ monoethyl succinate ถูกเปลี่ยนเป็น diethyl succinate เพราะกรดอินทรีย์ by-products ถูก esterified ด้วยเอทานอลเช่นกัน ในระบบมีความเข้มข้นของ ethyl formate, ethyl lactate และ ethyl acetate คือ 48.8 กรัมต่อลิตร, 28.2 กรัมต่อลิตร, and 55.3 กรัมต่อลิตร เมื่อจุดเดือดของ ethyl formate, ethyl lactate ethyl acetate และ diethyl succinate คือ 54.0, 77.1, 151.0 และ 218.0 องศาเซลเซียส สำหรับการกลั่นอย่างง่ายสามารถใช้แยก diethyl succinate ออกจากตัวอื่นๆได้ ในการทดลองนี้ Vigreux column ยาว 45 เซนติเมตรถูกติดตั้ง และมี condenser ขนาดเล็กอยู่ด้านบน เพื่อควบคุมอุณหภูมิของไอที่ออกจากคอลัมน์ ขั้นตอนนี้ควบคุมความบริสุทธิ์ของไอที่สูงกว่าจุดเดือดของสารละลายผสม และจากนั้นจะถูกควบแน่นไปที่ถังปฏิกรณ์ ในการทดลองนี้ การกลั่น 2 ขั้นตอนแสดงในตาราง 16 โดยในขั้นตอนแรก ethanol, ethyl formate, ethyl acetate และ ethyl lactate ถูกแยกออกเกือบทั้งหมด และถูกกลั่นโดยควบคุม อุณหภูมิของเหลวที่ 120 องศาเซลเซียส ความดันสุญญากาศที่ 250 mBar พบว่า diethyl succinate

จะถูกกลั่นในขั้นตอนสุดท้ายโดยการลดความดันสูญญากาศไปที่ 20 mBar อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส สุดท้ายนี้ diethyl succinate ที่แยกได้จะนำไป hydrolysis กับน้ำ DI โดยใช้ 3 % โดยน้ำหนัก และมี Amberlyst 15-E เป็นตัวเร่ง อุณหภูมิที่ 110 องศาเซลเซียส สัดส่วนน้ำต่อ DES คือ 15:1 ในระหว่าง hydrolysis แสดงให้เห็นว่า diethyl succinate จะทำปฏิกิริยากับน้ำได้ 1 โมลของ succinic acid และ 2 โมลของ ethanol โดยที่ขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ 2 ขั้นตอนถูกนำมาใช้ ขั้นตอนแรกคือเอทานอลที่เกิดจากปฏิกิริยาจะถูกแยกออกจากการกลั่นด้วย Vigreux column ในขั้นตอนสุดท้ายน้ำส่วนเกินจะถูกแยกออกโดย vacuum evaporation เพื่อให้ได้กรดซัคซินิกเข้มข้น และเนื่องจาก hydrolysis เป็นขั้นตอนอย่างง่าย จึงไม่ต้องใช้พารามิเตอร์อื่นๆจำนวนมาก สุดท้ายกรดซัคซินิกความเข้มข้นสูงจาก hydrolysis มาจาก diethyl succinate บริสุทธิ์ทำปฏิกิริยากับน้ำ DI แสดงในรูปภาพ 31

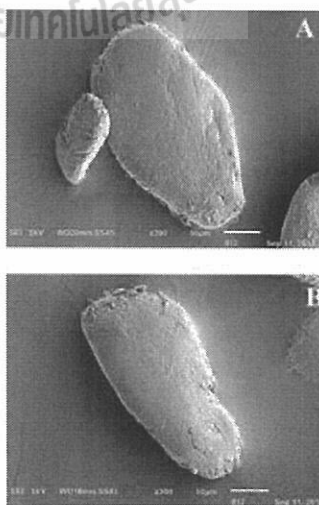
ตาราง 16 พารามิเตอร์ของกระบวนการ fractionation และไฮโดรไลซิสของ diethyl succinate โดยที่ T_1 คือ อุณหภูมิของของเหลว และ T_2 คืออุณหภูมิของไอ ตามลำดับ

Operation	Temperature (°C)		Vacuum pressure (mBar)	Distillate
	T_1	T_2		
Fractionation				
- 1 st step	120	79	250	74 % EtOH, 10% Ethyl formate, 6% Ethyl acetate, 2% Ethyl lactate, 8% DES
- 2 nd step	150	125	20	100 % DES
Hydrolysis				
- 1 st step	110	78.2	Atmospheric	94.2 % EtOH
- 2 nd step	75	57.1	250	~100 % H ₂ O



รูปภาพ 31 โครมาโทแกรมของน้ำหมัก (รูปบน) และกรดซัคซินิกที่ทำบริสุทธิ์ (รูปล่าง) retention times ของกรดฟอร์มิก กรดแลคติก กรดอะซิติก และกรดซัคซินิก คือ ที่ 9.97, 12.05, 13.6 และ 19.60 นาที ตามลำดับ สำหรับสภาวะไฮโดรไลซิส คือ 3 %โดยน้ำหนักของ Amberlyst 15-E (Rhom & Haas) อัตราส่วนโมลของน้ำต่อ diethyl succinate เท่ากับ 15:1 และอุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

ทั้งนี้ผู้วิจัยได้มีการทดลองกระบวนการตกผลึกกรดซัคซินิกที่ได้จากกระบวนการหมัก เพื่อทดสอบเปรียบเทียบกับกรดซัคซินิกเชิงพาณิชย์ ซึ่งผลปรากฏว่า จากการส่องกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนที่มีความชัดเจนสูงแล้วนั้น ผลึกที่ได้มีความคล้ายคลึงกันมาก (แสดงดังรูปภาพ 32) ซึ่งถือได้ว่ากระบวนการ หมักกรดซัคซินิกในการศึกษานี้ประสบความสำเร็จ



รูปภาพ 32 ภาพ SEM ของผลึกกรดซัคซินิก (A) ผลึกกรดซัคซินิกจากสารเคมีเชิงพาณิชย์ และ (B) ผลึกกรดซัคซินิกจากการตกผลึก

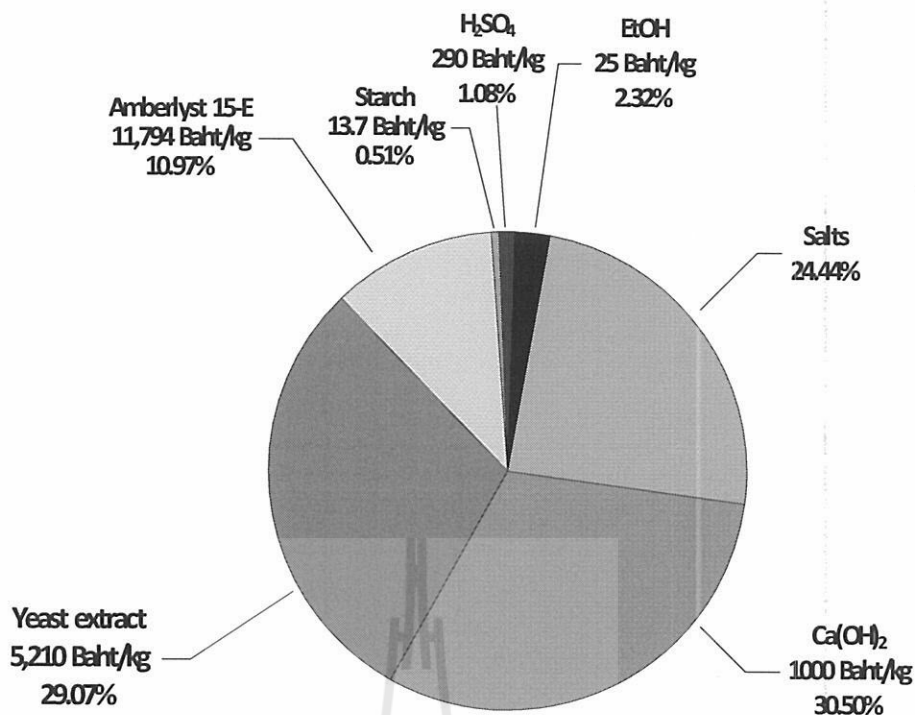
4.5.4 การคำนวณต้นทุนการผลิต และการคำนวณอัตราการใช้พลังงาน (energy consumption)

สำหรับการพัฒนากระบวนการผลิตและทำบริสุทธิ์กรดซัคซินิกจากน้ำหมัก โดยเริ่มจากกระบวนการหมักด้วยแบคทีเรียที่ผลิตกรดซัคซินิกแบบกะ เมื่อกระบวนการหมักสิ้นสุดลง ขั้นตอนแรกของการทำบริสุทธิ์จะเริ่มจากการใช้ระบบไมโครฟิวเตรชัน (MF) ในการแยกเซลล์แบคทีเรียออกจากระบบ ก่อนที่จะทำการเพิ่มความเข้มข้นโดยการระเหยน้ำด้วยเครื่องระเหย (evaporator) ออกไปให้เหลือน้ำประมาณร้อยละ 30 จากนั้นน้ำหมักเข้มข้นจะถูกทำให้ตกตะกอนภายในถังตกตะกอน (precipitation tank) โดยจะใช้อุณหภูมิในการตกตะกอนที่ 4 องศาเซลเซียส ก่อนที่จะทำการปั่นเหวี่ยง (centrifuge) เพื่อทำการกำจัดสีและโปรตีนออกไปกับสารละลายตะกอนของแคลเซียมซัคซิเนตจะถูกนำเข้าสู่ปฏิกรณ์เอสเทอร์ฟิเคชัน ซึ่งจะทำการเติมเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 โดยน้ำหนักและทำการเพิ่มอุณหภูมิของสารละลายเป็น 80 องศาเซลเซียส ปฏิกรณ์เอสเทอร์ฟิเคชันจะเริ่มต้นขึ้นเมื่อทำการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้ได้ 2.5 ด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น จากนั้นจะใช้ระบบการแยกไอผ่านเยื่อแผ่น (VP) ในการกำจัดน้ำที่เกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยากันของกรดซัคซินิกกับเอทานอล โดยทำการเพิ่มอุณหภูมิจนสารละลายเดือด และทำการควบแน่นไอของเอทานอล ก่อนที่จะป้อนเข้าสู่ระบบการแยกไอผ่านเยื่อแผ่น ซึ่งเอทานอลที่ทำการกำจัดน้ำออก แล้วจะถูกไหลเวียนกลับเข้าสู่ระบบ เมื่อทำการกำจัดน้ำออกจากปฏิกรณ์จนหมดแล้ว ขั้นตอนต่อไปคือการใช้ระบบการกลั่นลำดับส่วนแบบสุญญากาศในการกลั่นเพื่อให้ได้เอทิลแล็กเตทบริสุทธิ์ ก่อนที่จะนำไปทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสกับน้ำไร้ประจุโดยใช้ Amberlyst-15 E เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เพื่อผลิตเป็นกรดซัคซินิกบริสุทธิ์ต่อไป

เนื่องจากปฏิกรณ์เอสเทอร์ฟิเคชันเป็นปฏิกรณ์ค่อนข้างรุนแรง โดยมีค่า pH ที่ต่ำ และมีการใช้เอทานอลซึ่งเป็นสารที่ติดไฟได้ง่าย จึงสามารถเป็นเชื้อเพลิงได้เป็นอย่างดี ดังนั้นจึงต้องมีระมัดระวังเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะในหน่วยปฏิบัติการ esterification และไฮโดรไลซิส ดังนั้นอุปกรณ์ต่างโดยเฉพาะระบบการควบคุมจึงต้องใช้เป็น explosion proof เช่น ปุ่มสำหรับดูค่าสาร วาล์วเปิด-ปิดที่ทำการควบคุมโดยใช้ระบบลม เป็นต้น นอกจากนี้ควรจะต้องติดตั้งวาล์วนิรภัย (safety valve) ในส่วนที่ต้องใช้ความดันสูงโดยเฉพาะการแยกไอผ่านเยื่อแผ่น (vapor permeation) ซึ่งต้องใช้ความดันสูงถึง 4 บาร์ เป็นต้น ในส่วนของถังเก็บเอทิลแล็กเตทหรือเอทานอลที่ได้จากขั้นตอนต่าง ๆ ควรทำถังเก็บไว้ภายนอกตัวอาคาร มีติดตั้งระบบเตือนภัยและดับเพลิงฉุกเฉินภายในตัวอาคารไว้ด้วย นอกจากนี้ควรทำการซ่อมระบบป้องกันอัคคีภัยเป็นครั้งคราว เพื่อความปลอดภัยของผู้ปฏิบัติงานและของตัวโรงงานเอง

ตาราง 17 การคิดต้นทุนทางด้านวัตถุดิบของการหมักและการทำบริสุทธิ์กรดซัลฟูริกด้วยวิธี
เอสเทอร์ฟิเคชั่น กับเอทานอลและไฮโดรไลซิส (คิดต่อน้ำหมัก 2 ลิตร)

รายการ	ราคา (บาท/กก)	ปริมาณที่ใช้ (กก)	ราคา (บาท)	สัดส่วน (%)
การหมัก				
แป้งมันสำปะหลัง	13.7	0.2	2.74	0.51
Yeast extract	5210	0.03	156.30	29.07
Ca(OH) ₂	1000	0.164	164.00	30.50
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	6071	0.012	72.85	13.55
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	9972	0.006	59.83	11.13
MgCl ₂	2436.1	0.0006	1.46	0.27
CaCl ₂	5015	0.0006	3.01	0.56
NaCl	3391	0.00006	0.20	0.04
			460.40	
การทำบริสุทธิ์				
เอทานอล	25	0.5	12.5	2.32
กรดซัลฟูริก	290	0.02	5.80	1.08
Amberlyst 15-E	11794	0.005	58.97	10.97
รวม (บาท)			537.67	100



รูปภาพ 33 การวิเคราะห์สัดส่วนต้นทุนทางด้านวัตถุดิบสำหรับการหมักและการทำบริสุทธิ์กรดซัคซินิก จากน้ำหมักโดยวิธีเอสเตอร์ฟิเคชัน การกลั่นและไฮโดรไลซิส

ตาราง 17 และรูปภาพ 33 แสดงผลการวิเคราะห์ต้นทุนวัสดุของกระบวนการ ผลิต และการทำบริสุทธิ์กรดซัคซินิก โดยในงานวิจัยนี้ได้คำนวณต้นทุนด้านวัสดุและสารเคมี ของการผลิตทั้งหมดอยู่ที่ 537.67 บาทต่อการหมักและการทำบริสุทธิ์ 1 ครั้ง (2 ลิตร) โดยหากคิดต้นทุนต่อการหมักกรดซัคซินิก 1 กิโลกรัม จะมีต้นทุนทางด้านวัสดุและสารเคมีถึง 2,218.70 บาท ซึ่งหากแบ่งขั้นตอนการผลิตออกเป็นสองส่วนหลักคือกระบวนการหมัก (upstream) และกระบวนการทำบริสุทธิ์ (downstream) แล้ว จะพบว่าค่าต้นทุนวัสดุของกระบวนการหมักจะอยู่ที่ 460.4 บาทคิดเป็นร้อยละ 85.42 ในขณะที่ต้นทุนวัสดุของกระบวนการทำบริสุทธิ์จะอยู่ที่ร้อยละ 14.58 เท่านั้น และหากพิจารณาถึงวัสดุย่อยในส่วนของขั้นตอนการหมักแล้ว จะพบว่าแคลเซียมไฮดรอกไซด์ ซึ่งเป็นสารที่ใช้ในการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง มีสัดส่วนทางการลงทุนต้นทุนถึงร้อยละ 30.5 ในขณะที่สาร สกัดจากยีสต์ซึ่งเป็นสิ่งที่จำเป็น เนื่องจากเป็นแหล่งของไนโตรเจนมีสัดส่วนทางด้านต้นทุนอยู่ที่ร้อยละ 29.07 ตามลำดับ ในขณะที่ต้นทุนในด้านของแป้งนั้นจะอยู่ที่ร้อยละ 0.51 เท่านั้น ซึ่งเป็นต้นทุนที่ถูกที่สุด ส่วนสารจำพวกเกลือชนิดต่าง ๆ ที่มีความจำเป็นสำหรับใช้เป็น growth factor ให้กับเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตกรดซัคซินิกนั้น ถึงแม้ว่าจะมีราคาค่อนข้างแพง แต่มีการใช้ในปริมาณที่น้อย จึงคิดเป็นค่าต้นทุนที่ไม่มากนัก

แต่อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์ต้นทุนนี้将有ความคลาดเคลื่อนอยู่บ้าง ทั้งนี้เนื่องจากสารเคมีที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดซัคซินิก ในโครงการวิจัยนี้เป็นเกรดระดับห้องปฏิบัติการ (lab grade) ซึ่งนอกจากจะมีคุณภาพดีแล้ว ราคาของสารเคมีเหล่านี้ก็จะมีราคาสูงไปด้วย ซึ่งหากลดคุณภาพมาใช้เป็นสารเคมีในระดับอุตสาหกรรม (industrial grade) ก็จะทำให้มีราคาที่ถูกลง ส่งผลทำให้ต้นทุนทางด้านการหมักลดลงเป็นอย่างมาก นอกจากนี้หากต้องการลดต้นทุนทางด้านสารสกัดจากยีสต์ลง ควรที่จะทำการวิจัยเพิ่มเติมถึงการใช สารอื่นที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงมาทดแทน ทั้งนี้เนื่องจากสารสกัดจากยีสต์ในระดับอุตสาหกรรม ก็จะมีราคาสูงอยู่ ซึ่งจากการผลิตเอทานอลขึ้นมาใช้เองในห้องปฏิบัติการ จะทำให้มียีสต์เหลือทิ้งจากกระบวนการหมักเอทานอลเป็นปริมาณที่มากอยู่แล้ว (spent yeast) ดังนั้นหากหาวิธี ที่จะผลิตสารสกัดจากยีสต์เหล่านี้ได้ ก็จะทำให้สามารถลดต้นทุนลงไปได้อีกมาก ส่วนการวิเคราะห์ต้นทุนในส่วนของการทำบริสุทธิ์กรดซัคซินิกนั้น พบว่าใช้ต้นทุนไม่สูงมากนัก คิดเป็นร้อยละ 14.58 ทั้งนี้มีสาเหตุหลักเนื่องมาจากมีการผลิตเอทานอลขึ้นมาใช้เองในห้องปฏิบัติการ ซึ่งทำให้มีราคาต้นทุนในการผลิตประมาณ ลิตรละ 25 บาท ซึ่งจะถูกกว่าราคาในท้องตลาดที่ลิตรละประมาณ 100 บาท ส่วนกรดซัลฟูริกและ Amberlyst 15-E นั้น มีการใช้ในปริมาณเล็กน้อยอยู่แล้ว จึงไม่ส่งผลกระทบต่อต้นทุนโดยรวมมากนัก

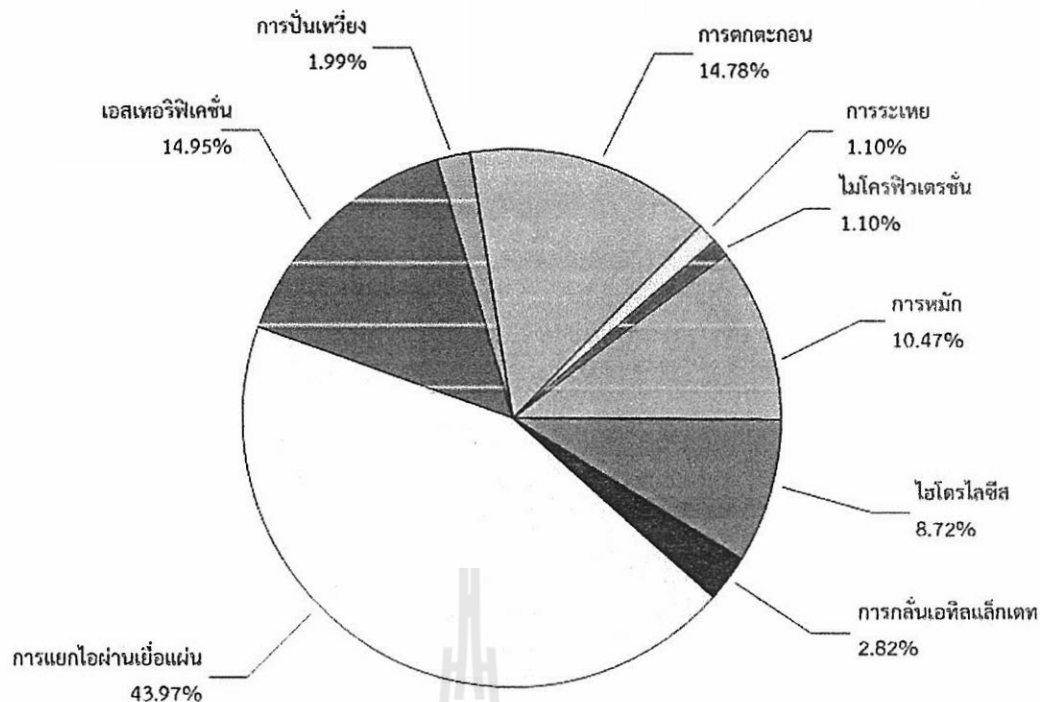
เนื่องจากสารเคมีต่าง ๆ ที่ใช้ในโครงการวิจัยนี้เป็นสารเคมีในระดับห้องปฏิบัติการ ซึ่งมีราคาแพง ดังนั้นหากมีการพัฒนาการผลิตในระดับโรงงานต้นแบบหรือในระดับอุตสาหกรรม จำเป็นที่จะต้องหาวัตถุดิบที่มีราคาถูกและหากสามารถผลิตได้เองภายในประเทศก็จะทำให้ต้นทุนการผลิตมีราคาถูกมากยิ่งขึ้น นอกจากนี้ในการทดลองนี้ยังได้ทำการศึกษาถึงอัตราการใช้

ตาราง 18 การวัดความต้องการพลังงานของหน่วยปฏิบัติการ (unit operation) ต่าง ๆ ของการทำบริสุทธิ์กรดซัคซินิกจากน้ำหมักในระดับห้องปฏิบัติการขนาด 2 ลิตร

หน่วยปฏิบัติการ	อุปกรณ์	กำลัง (kW)	ระยะเวลา (h)	พลังงานไฟฟ้า (kW.h)
การหมัก	มอเตอร์สำหรับการกวนถังหมัก 2 ลิตร	0.25	24	6.0
	ระบบควบคุมอุณหภูมิ 35 °C *	1.0	-	0.30
MF	มอเตอร์ปั๊ม	0.11	6	0.66
การระเหย	เครื่องระเหยแบบสุญญากาศ (มอเตอร์)	0.05	1.5	0.075
	อ่างน้ำร้อน 75 °C *	1.0	1.5	0.12
	ปั๊มสุญญากาศ (aspirator)	0.15	1.5	0.225
	ระบบทำความเย็นที่ 10 °C (condenser)	0.76	1.5	0.30

การตกตะกอน	อ่างน้ำเย็นควบคุมอุณหภูมิที่ 4 °C*	0.76	24	8.90
การปั่นเหวี่ยง	เครื่องปั่นเหวี่ยง	4	0.30	1.2
ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชั่น	มอเตอร์สำหรับการกวน	0.20	9	1.8
	อ่างน้ำมันสำหรับให้ความร้อน*	2.0	9	7.2
	ระบบทำความเย็นที่ 20 °C (condenser)	0.45	9	3.78
	*			
การแยกไอน้ำผ่านเยื่อแผ่น	อ่างน้ำมันสำหรับให้ความร้อน*	2.3	9	8.28
	ปั๊มแรงดันสูง (compressor)	0.25	9	2.25
	ระบบทำความเย็นที่ 20 °C (condenser)	0.45	9	3.78
	*			
	ระบบทำความเย็นที่ -25 °C (Cold trap)	0.76	9	5.32
	*			
	ปั๊มสุญญากาศ	0.76	9	6.84
การกลั่นเอทิลแอลกอฮอล์	อ่างน้ำมันสำหรับให้ความร้อน*	2.0	1.0	0.8
	ระบบทำความเย็นที่ 10 °C (partial condensation)	0.45	1.0	0.30
	*			
	ระบบทำความเย็นที่ -25 °C (total condenser)	0.76	1.0	0.60
	*			
ไฮโดรไลซิส	Heating mantle	1.2	5	2.4
	มอเตอร์สำหรับกวน	0.07	5	0.35
	ระบบควบคุมอุณหภูมิที่ 70 °C (partial condensation)	1.0	5	0.40
	*			
	ระบบทำความเย็นที่ 20 °C (condenser)	0.45	5	2.10
	*			
รวมพลังงานไฟฟ้าที่ใช้ (kW.h)				74.78

* หมายถึง- ใช้มิเตอร์วัดค่าไฟฟ้าโดยตรง



รูปภาพ 34 การวิเคราะห์สัดส่วนการใช้พลังงานของหน่วยปฏิบัติการต่าง ๆ สำหรับการหมักและการทำบริสุทธิ์กรดซัลฟิวริกจากน้ำหมักโดยวิธีเอสเทอร์ฟิเคชั่น การกลั่นและไฮโดรไลซิส

ตาราง 18 และรูปภาพ 34 แสดงการวิเคราะห์การใช้พลังงานของระบบ นอกจากการวิเคราะห์ค่าการใช้พลังงานไฟฟ้าในแต่ละหน่วยปฏิบัติการแล้ว โดยข้อมูลในตารางนั้น เป็นการคิดในรายละเอียดปลีกย่อยของอุปกรณ์ที่ใช้ไฟฟ้าของหน่วยปฏิบัติการนั้น ๆ ซึ่งอุปกรณ์บางอย่างสามารถคำนวณค่าการใช้พลังงานได้เช่นอุปกรณ์ที่ต้องใช้มอเตอร์ต่าง ๆ สำหรับการ ทำงาน ซึ่งสามารถคำนวณได้จากผลคูณกำลังของอุปกรณ์นั้น ๆ กับระยะเวลาที่อุปกรณ์นั้นทำงาน ส่วนอุปกรณ์ที่ใช้ในการควบคุมอุณหภูมินั้น ไม่สามารถใช่วิธีการคำนวณโดยตรงได้ เนื่องจากอุปกรณ์จะใช้กำลังไฟฟ้าเต็มทีในตอนเริ่มต้นของการทำงานเท่านั้น และเมื่อได้อุณหภูมิ ที่ได้กำหนดไว้แล้ว เครื่องจะทำงานเป็นบางช่วงระยะเวลาเท่านั้น ดังนั้นการที่จะหาค่าพลังงาน ไฟฟ้าที่ใช้ไปนั้น จะต้องใช้มิเตอร์วัดโดยตรงเป็นอุปกรณ์ ๆ ไปเท่านั้น ซึ่งผลการวัดและคำนวณ การใช้พลังงานของการหมักและการทำบริสุทธิ์กรดซัลฟิวริก พบว่ามีการใช้ไฟฟ้าไปเป็นจำนวน 74.78 หน่วย และเมื่อทำการวิเคราะห์ถึงสัดส่วนการใช้ไฟฟ้าของแต่ละหน่วยปฏิบัติ การแล้ว จะพบว่า ส่วนที่ใช้พลังงานมากที่สุดคือการทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชั่นและการแยกไอน้ำผ่านเยื่อแผ่น ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 14.95 และ 43.97 ของค่าพลังงานที่ใช้ไปทั้งหมด ทั้งนี้มีสาเหตุเนื่องมาจาก ระบบทั้งสองมีการใช้พลังงานความร้อนที่มากนั่นเอง

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง

กรดซัคซินิกสามารถผลิตได้โดยเชื้อแบคทีเรีย *Actinobacillus succinogenes* ATCC 55618 ซึ่งมีการผลิตกรดซัคซินิกอย่างมีประสิทธิภาพในกระบวนการหมัก โดยให้การผลิตสูง ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ มีการใช้ปูนขาว (CaCO_3) ในกระบวนการหมัก โดยทำหน้าที่ในการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างและตกตะกอนกรดอินทรีย์ต่าง ๆ ในกระบวนการหมัก การแยกน้ำหมักที่ปราศจากเซลล์แบคทีเรียสามารถกระทำได้โดยการติดตั้งเมมเบรนชนิดไมโครฟิวเตรชั่น (micro-filtration) ภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ อีกทั้งมีระบบนาโนฟิวเตรชั่นที่ทำหน้าที่หลักสำคัญในการแยกสารโมเลกุลใหญ่โดยเฉพาะโปรตีน ในกระบวนการทำบริสุทธิ์กรดซัคซินิกจากน้ำหมักนั้น ยังมักจะมีอุปสรรคจากการปนเปื้อนสิ่งเจือปน โดยเฉพาะกรดอินทรีย์อื่นๆที่เป็นผลพลอยได้จากกระบวนการหมัก ซึ่งกรดอินทรีย์เหล่านี้สามารถแยกออกจากกันได้โดยทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันกับเอทานอล โดยจุดเดือดของสารเหล่านี้จะมีค่าที่แตกต่างกัน ทำให้สามารถแยกออกจากกันได้โดยง่าย โดยใช้กระบวนการกลั่นลำดับส่วน (fractional distillation) และเมื่อกลั่นแยกไดเอทิลซัคซิเนตได้แล้ว สามารถทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสกับน้ำไร้ประจุเพื่อผลิตกรดซัคซินิกบริสุทธิ์ได้อีกครั้ง โดยมีเอทานอลเป็นผลพลอยได้ของปฏิกิริยา

กระบวนการเก็บเกี่ยวกรดซัคซินิกส่วนมาก ยังไม่สามารถเป็นกระบวนการที่มีคุ้มทุนทางเศรษฐกิจ เพราะอุปสรรคจากคุณสมบัติของกรดคาร์บอกซิลิกในส่วนผสมของกรดนั้น มีคุณสมบัติความคล้ายคลึงกันยากต่อการแยกให้บริสุทธิ์ โดยลักษณะทางเคมีกายภาพของกรดอินทรีย์ที่มีสายโซ่สั้นเหล่านี้ แต่จากการทดลองพบว่าทำให้บริสุทธิ์สุดท้ายของน้ำหมักกรดซัคซินิกโดยการกลั่นแบบสูญญากาศ กระบวนการทำบริสุทธิ์เหล่านี้เป็นกระบวนการที่มีประสิทธิภาพ อีกทั้งได้มีการตกผลึกของกรดที่ได้พบว่ามีลักษณะ เช่นเดียวกับที่จำหน่ายในเชิงพาณิชย์ ซึ่งนับว่าประสบความสำเร็จตามจุดประสงค์ของงานวิจัยที่ตั้งไว้

บรรณานุกรม

- Cheng, K.K., Zhao, X.B., Zeng J., Wu, R.C., Xu,Y.Z., Liu, D.H., Zhang, J.A., (2012). Downstream processing of biotechnological produced succinic acid, *Appl Microbiol Biotech* , 95. 841-850.
- Datta, R.,Glassner, D. A.,Jain,M. K.,Vicky Roy, J.R., (1992). Fermentation and purification process for succinic acid. US patent ,5,168,055.
- Guettler, M.V., Jain M.H., Soni B.K., (1996). Process for making succinic acid microorganism for the use in the process and method of obtaining the microorganism. US patents 5504004.
- Guettler, M.V., Rumler D., Jain M.K., (1999).Actinobacillus succinogenes sp. A novel succinic acid producing strain from the bovine rumen. *Int J syst Bacteriol*, 49. 207- 216.
- Hepburn, A. J., (2011).The synthesis of succinic acid and its extraction from fermentation broth using a two-phase partitioning bioreactor. Master of Applied Science, Department of Chemical Engineering .Queen’s University Kingston, Ontario, Canada.
- Hepburn, A.J., Daugulis, A.J., (2012). The use of CO₂ for reversible pH shifting, and the removal of succinic acid in a polymer-based two-phase partitioning bioreactor.*J Chem Technol Biotechnol*, 87. 42-50.
- Huh, Y.S., Jun, Y., Hong, Y.K., Song, H., Lee, S.Y., Hong, W.H., (2006). Effective purification of succinic acid from fermentation broth produced by *Mannheimia succiniciproducens*. *Process Biochem*, 41. 1461-1465.
- Kurzrock, T.,Weuster-botz, D.,(2010). Recovery of succinic acid from fermentation broth. *Biotechnol Lett*, 32.331-339.
- Lee, P.C., Lee, S.Y., Hong,S.H.,Chang,H.N., (2002). Isolation and characterization of a new succinic acid producing bacterium, *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E, from bovine rumen. *Appl Microbiol Biotechnol*, 58. 663-668.

- Lee,S.Y., Kim,J.M., Song, H., Lee, J.W., Kim, T.Y., Jang, Y., (2008). From genome sequence to integrated bioprocess for succinic acid production by *Mannheimia succiniciproducens*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 79. 11-22.
- Li,Q., Wang, D., Wu, Y., Li, W.L., Zhang ,Y.J., Xing, J.M., Su, Z.G., (2010). One step recovery of succinic acid from fermentation broths by crystallization. *Sep Purif Technol*, 72. 294-300.
- Lin, S.K.C., Du, C., Koutinas, A., Wang, R., Webb,W.C., (2008). Substrate and inhibition kinetics in succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes*. *Biochem Eng J*, 41. 128-135.
- Liu, Y.P., Zheng, P., Sun, Z.H., Ni, Y., Dong, J.J., and Zhu, L.L. (2008). Economical succinic acid production from cane molasses by *Actinobacillus succinogenes*. *Bioresource Technol*, 99: 1736-1742.
- Londono, O.A., (2010). Separation of succinic acid from fermentation broth and esterification by a reactive distillation method, Doctor of Chemical Engineering, Department of Chemical Engineering. Michigan State University. Michigan, USA.
- Luque, R. Lin, C.S.K. Du. C., Macquarrie, J.D., Koutinas. A., Wang, R., Webb, C., Clark, H.J., (2009). Chemical transformation of succinic acid recovered from fermentation broth by a novel vacuum distillation-crystallization method. *Green chem.*, 11.193-200.
- Lubsungnoen, J., Srisuno S., Boontawan A., Rodtong S.,(2014) Nanofiltration coupled with vapor permeation-assisted esterification as an effective purification step for fermentation-derived succinic acid. *J membr sci* ,459.132 -142.
- McKinley, J.B., Vieille, C., Zeikus, J.G.,(2007). Prospect for a bio-based succinate industry. *Appl microbiol Biotechnol*, 76.727-740.
- 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, 129-135.
- Song, H., Lee, S.Y.,(2006). Production of succinic acid by bacterial fermentation. *Enz Microb Technol*, 39. 352-361.

- Song, H., Jang, S.H., Park, J.M., Lee, S.Y., (2007). Modeling of batch fermentation kinetics for succinic acid production by *Mannheimia succiniciproducens*. *Biochem Eng*, 40. 107-115.
- Urbance, S.E., Pometto, A.L., DiSpirito, A.A., Denli, Y., (2004). Evaluation of succinic acid continuous and repeat-batch biofilm fermentation by *Actinobacillus succinogenes* using plastic composite support bioreactors. *Appl Microbiol Biotechnol*, 65.664-670.
- Wan, C., Li, Y., Shahbazi, A., Xiu, S., (2008). Succinic acid production from cheese whey using *Actinobacillus succinogenes* 130Z. *Appl Biochem Biotechnol*, 145.111-119.
- Wu, H., Li, Z., Zhou, L., Ye, Q., (2007). Improved Succinic acid production in the anaerobic culture of an *Escherichia coli* pflB ldhA double Mutant as a result of enhanced anaerobic activities in the preceding aerobic culture. *Appl Environ Microbiol*, 73.7837-7843.
- Zeikus, J. G., Jain, M. K., Elankovan, P. (1999). Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products. *Appl Microbiol Biotechnol*, 51. 545-552.
- <http://en.wikipedia.org>
- Patent number WO 2011082378 A2 (2010). Purification of succinic acid from the fermentation broth containing ammonium succinate.
- Kidwell H (2008). Bio-succinic to go commercial. *BioPharma-reporter*. <http://www.biopharma-reporter.com/Downstream-Processing/Bio-succinic-acid-to-go-commercial>
- Kolah, A. Orjuela, A., Hanna, N., Lira, C. T., and Miller, D. J. (2010). Reactive distillation for the biorefinery: Pilot plant synthesis of succinic acid esters 10AIChE - 2010 AIChE Spring Meeting and 6th Global Congress on Process Safety. 2010.

ประวัติผู้วิจัย

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

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

5. ประสบการณ์การทำงาน

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

6. สถานะภาพงานวิจัย

หัวหน้าโครงการ

- การศึกษาการพัฒนาการผลิตเอทานอลแบบต่อเนื่องจากกากน้ำตาลอ้อยโดยใช้เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ในถังหมักแบบใช้เยื่อแผ่น
แหล่งเงินทุน: มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี 100,000. บาท
สถานะภาพ เสร็จสิ้นโครงการ (ก.ย. 2548- ส.ค. 2549)
- การเก็บเกี่ยวกรด L-แล็คติกจากน้ำหมักด้วยระบบอิเล็กโตรดิอออนไนเซชัน
แหล่งเงินทุน: สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ/มทส สัญญาเลขที่ มทส -3-304-51-12-09
240,000. บาท (ธ.ค. 2550- พ.ย. 2551) งานวิจัยเสร็จสมบูรณ์
- การสังเคราะห์เมทานอลแบบต่อเนื่องด้วยเชื้อ *Methylosinus trichosporium* OB3b ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบรนโดยใช้เทคนิคเพอร์เวปเพอเรชัน
แหล่งเงินทุน: สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
305,000.- บาท (ต.ค. 2549- พ.ย. 2551) งานวิจัยเสร็จสมบูรณ์
- การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายกรดไขมันจากสบูดำ ในสภาวะไร้ออกซิเจน
แหล่งเงินทุน: สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
200,000. บาท (ก.ย. 2549- ส.ค. 2550) งานวิจัยเสร็จสมบูรณ์
- การพัฒนาท่อใยกลวงเชิงประกอบสำหรับใช้ในกระบวนการผลิตอะซีโตน-บิวทานอล-เอทานอลจากมันสำปะหลัง
แหล่งเงินทุน: สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
351,000. บาท (ธ.ค. 2552- พ.ย. 2553) งานวิจัยเสร็จสมบูรณ์

- การประยุกต์ใช้สเปกโตรสโกปีของรังสีใกล้คลื่นใต้แดงในการควบคุมการผลิตเอทานอลบริสุทธิ์โดยใช้ระบบการแยกไอน้ำผ่านเยื่อแผ่นและการดูดซับ

แหล่งเงินทุน: สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

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

- การประยุกต์ใช้ระบบอิลคโตรดิออสโนสเซนซ์ในการแยกโปรตีนเอ็นเทอโรโคเนสจากน้ำหมัก

แหล่งเงินทุน: สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

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

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

แหล่งเงินทุน: มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

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

- การวิเคราะห์สมดุลมวลและพลังงานของการผลิตเอทานอลบริสุทธิ์จากน้ำหมักในระดับโรงงาน ต้นแบบด้วยเทคนิคผสมระหว่างการกลั่น การแยกไอน้ำผ่านเยื่อแผ่น และการดูดซับ

แหล่งเงินทุน: สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

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

- การสร้างโรงงานต้นแบบการผลิตเอทานอลสำหรับใช้เป็นเชื้อเพลิงจากมันสำปะหลังโดยใช้เทคนิคผสมระหว่างการแยกไอน้ำผ่านเยื่อแผ่นและการดูดซับ

แหล่งเงินทุน: มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

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

- การทำบริสุทธิ์กรดซัคซินิคจากน้ำหมักด้วยวิธีตกตะกอน เอสเทอร์รีฟิเคชันและการกลั่น

แหล่งเงินทุน: สำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติ

537,200. บาท งานวิจัยเสร็จสมบูรณ์

- การทำบริสุทธิ์กรด D- และ L-แล็คติกด้วยวิธีเอสเทอร์รีฟิเคชันและการกลั่นจากน้ำหมัก

แหล่งเงินทุน: สำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติ (B10-52)

3,272,440. บาท (ธ.ค. 2552- พ.ย. 2553) งานวิจัยเสร็จสมบูรณ์

- การออกแบบถังปฏิกรณ์แบบท่อไหลสำหรับการทำบริสุทธิ์กรด D-แล็คติก

แหล่งเงินทุน: มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

683,290. บาท (ม.ค. 2554- ธ.ค. 2554) อยู่ในระหว่างการดำเนินการ

- การพัฒนาท่อใยกลวงเซรามิคเชิงประกอบสำหรับการผลิตเชื้อเพลิงเอทานอลด้วยระบบการแยกไอน้ำผ่านเยื่อแผ่น

แหล่งเงินทุน: สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

385,290. บาท (ม.ค. 2554- ธ.ค. 2554) อยู่ในระหว่างการดำเนินการ

- ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเมมเบรนสำหรับเซลล์เชื้อเพลิงเอทานอล

แหล่งเงินทุน: สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

350,290. บาท (ม.ค. 2554- ธ.ค. 2554) อยู่ในระหว่างการดำเนินการ

ผู้ร่วมโครงการ

- การทดสอบประสิทธิภาพกระบวนการทำบริสุทธิ์กรดดีแล็กติกโดยอิงเทคโนโลยีการกลั่นพร้อมการทำเอสเทอร์รีฟิเคชัน (สัญญา สนช-มก-มทส เลขที่ B10-52) จากน้ำหมักของบริษัท มิตรผลวิจัย พัฒนาอ้อยและน้ำตาล จำกัด

แหล่งเงินทุน: บริษัท มิตรผลวิจัย พัฒนาอ้อยและน้ำตาล จำกัด

หัวหน้าโครงการ: ผศ.ดร. วีระศักดิ์ เลิศศิริโยธิน

1,187,220. บาท (1 พ.ย 2553- เม.ย 2554) งานวิจัยเสร็จสมบูรณ์

- การพัฒนาเยื่อแผ่นเชิงประกอบจากยางธรรมชาติสำหรับการแยกเอทิลแล็กเตตจากปฏิกิริยาเอสเทอร์รีฟิเคชันด้วยระบบเพอร์แรว์ปพอเรชัน

แหล่งเงินทุน: สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

หัวหน้าโครงการ: อ.ดร. วีรัช ทวีปรีดา

665,000. บาท (23 ต.ค 2553- 22 ต.ค 2554) งานวิจัยเสร็จสมบูรณ์

7. งานวิจัยตีพิมพ์:

- 1 **Boontawan, A.**, Stuckey D.C. (2005), Mass Transfer of Terpenes through a Silicone Rubber Membrane in a Liquid-Liquid Contacting System, *Biotechnol Prog*, 21:1680-1687.
- 2 **Boontawan, A.**, Stuckey D.C. (2005), A Membrane Bioreactor for the Biotransformation of α -Pinene Oxide to Isonovalal by Resting Cells of

Pseudomonas fluorescens NCIMB 11671, *Appl Microbiol biotechnol*, 69:643-649.

- 3 **Boontawan, A.**, Schausberger, P., Bösch, P., and Friedl, A. (2008) Dehydration of Ethanol/Water Mixture using Pervaporation and Vapor Permeation Technique, *J Appl Membr Sci Technol*, 5:1-7
- 4 Boontawan, P., Kanchanatawee, S., and **Boontawan A.** (2011) Extractive Fermentation of L-(+)-lactic acid by *Pediococcus pentosaceus* using Electrodeionization (EDI) Technique, *Biochem Eng J*, 54: 192-199
- 5 Boontawan, P., and **Boontawan A.** (2011) Isolation and characterization of Jatropha oil-degrading *Enterococcus faecalis* and *Burkholderia cenocepacia* W-1 under anaerobic condition, *Afr J Biotechnol*, 10(63): 13841-13851
- 6 Khunnonkwao, P., Boontawan, P., Haltrich, D., Maischberger, T., and **Boontawan, A.** (2012) Purification of L-(+)-Lactic Acid from Pre-treated Fermentation Broth using Vapor Permeation-Assisted Esterification, *Process Biochem*, 47(12): 1948-1956
- 7 Pimkaew, S., and **Boontawan, A.** (2011) Process Optimization for Motor Fuel Grade Ethanol Production using Hybrid Vapor Permeation and Pressure Swing Adsorption Technique, *Euro J of Sci Res*, 64(4): 644-657

8. งานนำเสนอในงานประชุมทางวิชาการระดับนานาชาติ:

1. **Boontawan, A.**, Schausberger, P., Bösch, P., Brinkmann, T., and Friedl, A. Dehydration of Ethanol/Water Mixture using Pervaporation and Vapor Permeation Technique. *The 6th Regional Symposium on Membrane Science and Technology 2008*, 13rd-15th August 2008, Phuket, Thailand (นำเสนอด้วยวาจา)
2. **Boontawan, A.**, Schausberger, P., Bösch P., Brinkmann, T., and Friedl, A. Dehydration of Ethanol/Water Mixture using Vapor Permeation

- Technique. *2008 International Congress on Membranes and Membrane Processes*, 12nd-18th July 2008, Hawaii, United State of America. (นำเสนอแบบโปสเตอร์)
3. Bösch, P., Schausberger, P., **Boontawan, A.**, and Friedl, A. Modelling and Process Integration of Membranes for Ethanol Dehydration. *2008 International Congress on Membranes and Membrane Processes*, 12nd-18th July 2008, Hawaii, United State of America. (นำเสนอด้วยวาจา)
 4. Panvichit, P., **Boontawan, A.**, and Kanchanatawee, S. Selection of Lactic Acid Bacteria for L-Lactic Acid Fermentation from Cassava Starch. *The 3rd International Conference on Renewable Resources and Biorefineries 2007*, 4th-6th June 2007, Ghent University, Belgium. (นำเสนอแบบโปสเตอร์)
 5. Panvichit, P., Kanchanatawee, S. and **Boontawan, A.** Mass transfer characteristic of ethanol from diluted aqueous solution through silicone membranes in a liquid-liquid contacting system. *Membrane Science & Technology 2006*, 26th-29th April 2006, Nanyang Technological University, Singapore. (นำเสนอแบบโปสเตอร์)
 6. **Boontawan, A.** and Stuckey, D.C. A Membrane Bioreactor for Biotransformation of Monoterpene. *3rd Regional Symposium on Membrane Science & Technology 2005*, 27th-28th April 2005, Institut Teknologi Bandung, Indonesia. (นำเสนอด้วยวาจา)
 7. **Boontawan, A.** Molecular Diffusion in PVA Membrane for Separation Dehydration of EtOH/H₂O Mixtures using Vapor Permeation Technique. *Nanotech Insight Conference 2009*, 29th March-2nd April 2009, Barcelona, Spain. (นำเสนอแบบโปสเตอร์)
 8. **Boontawan, A.** and Pimkaew, S. Anhydrous ethanol production from fermentation broth using distillation, vapor permeation, and pressure swing adsorption technique. *The 8th International Conference on Membrane Science and Technology 2010*, 29th

November-2nd December 2010, Institute Teknologi Bandung, Indonesia. (นำเสนอด้วยวาจา)

9. Molina, S., Lertsiriyothin, W., and **Boontawan, A.** Production and Purification of D-(-)-Lactic Acid from Concentrated Fermentation Broth using Esterification, Distillation and Hydrolysis Technique. The 4th International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products (FerVAAP) Conferene, 29th -31st August 2011, Khon Kaen, Thailand. (นำเสนอด้วยวาจา)
10. Samnaknit, W., Kongkaew, A., and **Boontawan, A.**, Extractive Fermentation of Bio-Ethanol from Concentrated Sweet Sorghum Juice using Vacuum Fractionation Technique, ISSCT co-product workshop: successful utilization of co-product in the sugar industry, 19th-22nd March 2012, Bangkok, Thailand