



รายงานการวิจัย

การแยกกรดซัคซินิกควบคู่กับกระบวนการหมักโดยแป้งมันสำปะหลังด้วย
เทคนิคอิเล็กโตรไดอะไลซิส
Extractive fermentation of succinic acid from cassava starch
by using electrodialysis technique

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว



รายงานการวิจัย

การแยกกรดซัคซินิกควบคู่กับกระบวนการหมักโดยแป้งมันสำปะหลังด้วย
เทคนิคอิเล็กโตรไดอะไลซิส
Extractive fermentation of succinic acid from cassava starch
by using electrodialysis technique

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร. อภิชาติ บุญทาวิน

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2558

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

พฤษภาคม 2562

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง “การแยกกรดซัคซินิกควบคู่กับกระบวนการหมักโดยแป้งมันสำปะหลังด้วยเทคนิคอิเล็กโตรไดอะไลซิส (Extractive fermentation of succinic acid from cassava starch by using electrodialysis technique)” ได้ทำการวิจัยที่ห้องปฏิบัติการหมัก อาคารปฏิบัติการ 10 ซึ่งสามารถสำเร็จจุลวงได้ด้วยดี การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2558



รองศาสตราจารย์ ดร. อภิชาติ บุญทาวัน
สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ
สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
พฤษภาคม 2562

บทคัดย่อภาษาไทย

ปัจจุบันกำลังเผชิญกับปัญหาขยะมลพิษและสิ่งแวดล้อม ซึ่งส่วนมากจะมีการสังเคราะห์จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี ซึ่งก่อให้เกิดปัญหา เนื่องจากกำจัดได้ยากและไม่สามารถย่อยสลายเองได้ตามธรรมชาติหรือต้องใช้เวลานานมาก ดังนั้นพลาสติกชีวภาพย่อยสลายได้ หรือ biodegradable plastic ที่ เป็นอีกแนวทางหนึ่งในการพัฒนาวัสดุสำหรับการใช้งาน ด้วยเหตุนี้จึงได้มีการใช้วัตถุดิบทางการเกษตร อย่างเช่นมันสำปะหลัง ร่วมกระบวนการทางเคมีชีวภาพ ด้วยเชื้อจุลินทรีย์ *Actinobacillus succinogenes* ทั้งนี้มันสำปะหลังที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์จะถูกนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและนำไปเข้าสู่กระบวนการหมักแบบกะได้ผลผลิตกรดซัคซินิกประมาณ 53.25 กรัมต่อลิตรส่งผลให้ได้ผลผลิตที่ 0.62 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของกรดซัคซินิกสูงสุดที่ผลิตได้คือคือ 71.5 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่าผลผลิต 1.02 กรัมของกรดซัคซินิกต่อกรัมของกลูโคส จากนั้นศึกษาการทำบริสุทธิ์ตัวอย่างน้ำหมักด้วยการใช้เทคนิค เมมเบรนด้วยเทคนิคอิเล็กโตรไดอะไลซิสแบบสองขั้ว (electrodialysis bipolar membrane (EDBM) technique) ส่วนของของเหลวจากถังหมักสามารถดำเนินการผ่านระบบอิเล็กโตรไดอะไลซิส โดย แมกนีเซียมซัคซิเนตจะแยกออกจากกันและแยกออกเป็นไอออนแมกนีเซียมและแยกไอออนออกเป็น ส่วน ๆ ทั้งนี้แมกนีเซียมไอออนบวกจะทำปฏิกิริยากับเยื่อแลกเปลี่ยนไอออนบวกที่มีกลุ่มไฮดรอกซิล (OH-) ซึ่งแยกออกจากน้ำเกิดเป็นแมกนีเซียมไฮดรอกไซด์ ($Mg(OH)_2$) ในทำนองเดียวกัน anion succinate จะถูกย้ายข้าม anion exchange เมมเบรนและพร้อมกันทำปฏิกิริยากับโปรตอน (H^+) ที่แยกออกจากกันได้เป็นกรดซัคซินิก พบว่าสามารถได้กรดซัคซินิกได้สูงสุดที่ประมาณ 69.62 กรัมต่อลิตร หรือ 0.59 โมลต่อลิตร เทียบเท่ากับมีความสามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตถึงประมาณ 98% ผลการศึกษาวิจัยชี้ให้เห็นว่า การเก็บเกี่ยวและทำบริสุทธิ์กรดซัคซินิกด้วยเทคนิคเทคนิคอิเล็กโตรไดอะไลซิสจากน้ำหมักจริงที่ได้จาก กระบวนการหมักมีประสิทธิภาพที่ดีถือว่าเป็นระบบการทำงานที่มีประสิทธิภาพและคุ้มค่าทาง เศรษฐศาสตร์ แต่ในทางตรงกันข้ามพบว่ายังมีความซับซ้อน อีกทั้งในระบบตามผิวหน้าของเมมเบรนจะ เกิดการสะสมอุดตันจากเกลือแมกนีเซียม ส่งผลทำให้ประสิทธิภาพในการแยกสารของระบบลดลง อีกทั้งมีความจำเป็นต้องพิจารณาชนิดและวัสดุของเมมเบรนที่ใช้สำหรับเป็นเมมเบรนในการแลกเปลี่ยนไอออน ดังนั้นหากต้องการเพิ่มประสิทธิภาพการเก็บเกี่ยวกรดซัคซินิกในระดับขนาดใหญ่จึงควรใช้เทคนิคอื่น ๆ ไมโครฟิลเตชัน, นาโนฟิลเตชันและเทคนิคการตกผลึกร่วมด้วยเพื่อให้ผลเป็นไปได้อย่างดีสำหรับเพื่อใช้ใน อุตสาหกรรมพลาสติกชีวภาพ ที่ถือเป็นอุตสาหกรรมต้นน้ำนั่นคืออุตสาหกรรมการผลิตสารมอนอเมอร์ (monomer) เพื่อที่จะนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเม็ดพอลิเมอร์พลาสติกชีวภาพต่อไป

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Currently, there are severe environmental problems. Major issues include chemical products derived from the petrochemical industry which are difficult to discard. Most plastic is manufactured from petroleum-based which causes problems. It is difficult to decay and can not be decomposed naturally or takes a long time. Biodegradable plastic or biodegradable plastic is another way to develop materials for use. For this reason, agricultural raw materials such as cassava was used as a carbon source coupled with bio-chemical process by using microorganism *Actinobacillus succinogenes* ATCC55618. It can convert enzymatically-digested cassava to produce succinic acid with the titer of succinic acid of about 53.25 g/L resulting in a yield of 0.62 g/L. The highest concentration of succinic acid was 71.5 g / L, yielding 1.02 g of product per gram of glucose. The purification of fermentation broth was carried out using the electrodialysis (ED) membrane technique. The fraction of liquid from the fermenter can be processed through electrodialysis system. Magnesium salts were separated into magnesium ion and succinate ion. Magnesium cations react with hydroxyl groups (OH-) separated from water to form magnesium hydroxide ($Mg(OH)_2$). Similarly, the anion succinate was transferred across the anion exchange membrane, and simultaneously reacts with the separated protons (H^+) to form succinic acid. The highest concentration of succinic acid was found at approximately 69.62 g/L or 0.59 mol/L equivalent to about 98% of harvesting capacity. The experimental results indicated that harvesting and purification of succinic acid by electrodialysis bipolar membrane (EDBM) technique was an economically effective technique. Nevertheless, the technique was still complicated. Moreover, the membrane surface was accumulated with magnesium salt. As a result, the separation efficiency of the system decreased. It was also necessary to consider the type and materials of the membrane used for ion exchange membrane. In order to increase the separation efficiency, other techniques such as microfiltration, nanofiltration, and crystallization techniques should be used to achieve the desired results. In conclusion, this technique can be applied for the production of succinic acid as a monomer to be used as raw material for the production of bioplastic in the future.

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	3
บทคัดย่อภาษาไทย.....	4
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	5
สารบัญเรื่อง.....	6
สารบัญภาพ.....	8
สารบัญตาราง.....	10
คำอธิบายสัญลักษณ์.....	11
บทที่ 1 บทนำ.....	12
1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย.....	12
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย.....	13
1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย.....	13
1.4 สมมุติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย.....	13
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....	14
2.1 กรดซัคซินิก.....	14
2.2 การผลิตกรดซัคซินิกโดยกระบวนการทางเคมี.....	15
2.3 กระบวนการหมักกรดซัคซินิก.....	15
2.4 จลศาสตร์ของการหมักกรดซัคซินิก.....	17
2.5 การแยกผลิตภัณฑ์ควบคู่กับกระบวนการหมัก (Extractive fermentation).....	18
2.6 การทำบริสุทธิ์กรดซัคซินิก.....	18
2.6.1 การดูดซับ.....	18
2.6.2 Electrodialysis	19
2.7 การแยกกรดอินทรีย์ควบคู่กับกระบวนการหมักด้วยระบบอิเล็กโตรไดโอะไนเซชัน/อิเล็กโตรไดโอะไลซิส (Electrodeionization/electrodialysis)	19
2.8 การประยุกต์ใช้กรดซัคซินิกในอุตสาหกรรมพลาสติกชีวภาพ.....	21
2.9 การตลาดของกรดซัคซินิก.....	22
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย.....	24
3.1 สถานที่ทำการทดลอง.....	24
3.2 อุปกรณ์และสารเคมี.....	24
3.3 เชื้อจุลินทรีย์และการหมัก.....	24
3.4 การเตรียมกล้าเชื้อ.....	25
3.5 กระบวนการหมักกรดซัคซินิก.....	26
3.5.1 กระบวนการหมักแบบกะ.....	26

สารบัญเรื่อง

	หน้า
3.5.2 กระบวนการหมักแบบกึ่งกะ.....	26
3.6 การแยกกรดซัคซินิกควบคู่กับกระบวนการหมักด้วยเทคนิคอิเล็กโตรไดอะไลซิส.....	26
3.7 การวิเคราะห์.....	38
3.8 Electrodialysis analysis	39
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	40
4.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจากหัวมันสำปะหลังสดและการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในถังหมัก ขนาด 40 ลิตร.....	40
4.2 กระบวนการหมักกรดซัคซินิก (Succinic acid fermentation processes) โดยใช้แบคทีเรีย สายพันธุ์ <i>Actinobacillus succinogenes</i> ATCC 55618.....	42
4.2.1 กระบวนการหมักแบบกะ.....	42
4.2.2 กระบวนการหมักแบบกึ่งกะ (Fed-batch fermentation).....	45
4.3 การทำบริสุทธิ์เบื้องต้น.....	50
4.4 การศึกษาระบบอิเล็กโตรไดอะไลซิส (Electrodialysis)	52
4.4.1 การหาค่า Limit current density (LCD) และ constant voltage operation.....	55
4.5 การทดสอบระบบ electrodialysis bipolar membrane (EDBM) technique.....	56
4.5.1 การศึกษาปริมาณกระแสที่ใช้ในระบบ electrodialysis bipolar membrane (EDBM) technique.....	62
4.5.2 ความเข้มข้นของกรดซัคซินิกในระบบ electrodialysis bipolar membrane (EDBM) technique สำหรับการทดลองต่างๆ.....	65
4.5.3 การใช้พลังงาน (energy consumption) ในระบบ electrodialysis bipolar membrane (EDBM) technique สำหรับการทดลองต่างๆ.....	68
4.6 การแยกและทำบริสุทธิ์กรดซัคซินิกออกจากถังหมักโดยตรงด้วยระบบ electrodialysis bipolar membrane (EDBM) technique.....	71
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	73
เอกสารอ้างอิง.....	74
ภาคผนวก ก.....	77
ภาคผนวก ข.....	78
ภาคผนวก ค.....	81
ประวัติผู้วิจัย.....	99

สารบัญภาพ

	หน้า
รูปภาพ 1 โครงสร้างทางเคมีของกรดซัคซินิก.....	14
รูปภาพ 2 วิธีปฏิกิริยาของ n – butane กลายเป็น Maleic anhydride (Hapbern, 2011).....	15
รูปภาพ 3 แสดง Catabolic pathway ในกระบวนการผลิตกรดซัคซินิกด้วยน้ำตาล (Song et al., 2006).....	17
รูปภาพ 4 อิทธิพลของค่าความเป็นกรด-ด่างที่มีต่อการแตกตัวของกรดซัคซินิก (Li et al, 2010).....	20
รูปภาพ 5 หลักการทำงานของระบบ Electrodialysis (ED)	20
รูปภาพ 6 เคมีภัณฑ์ที่สามารถสังเคราะห์จากกรดซัคซินิก (Song and Lee, 2006).....	22
รูปภาพ 7 Electrodialyzer (Selemon™ DW-Lab Specification).....	27
รูปภาพ 8 Experimental setup สำหรับกระบวนการแยกกรดซัคซินิกควบคู่กับกระบวนการหมัก ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรไดอะไลซิส.....	28
รูปภาพ 9 อูรณ์อิเล็กโตรไดอะไลซิสที่ใช้ทดลองในงานนี้.....	29
รูปภาพ 10 ลักษณะและส่วนประกอบของระบบ ED ในส่วน cathode.....	30
รูปภาพ 11 ลักษณะและส่วนประกอบของระบบ ED ในส่วน anode.....	31
รูปภาพ 12 ลักษณะและส่วนประกอบของระบบ ED ในส่วน cation membrane.....	32
รูปภาพ 13 ลักษณะและส่วนประกอบของระบบ ED ในส่วน anion membrane.....	32
รูปภาพ 14 ลักษณะและส่วนประกอบของระบบ ED ในส่วน electrolyte frame.....	33
รูปภาพ 15 ลักษณะและส่วนประกอบของระบบ ED ในส่วน dilute frame.....	33
รูปภาพ 16 ลักษณะและส่วนประกอบของระบบ ED ในส่วน concentrate frame.....	34
รูปภาพ 17 ลักษณะและส่วนประกอบของระบบ ED ในส่วน Pt wire.....	34
รูปภาพ 18 ลักษณะและส่วนประกอบของระบบ ED ในส่วน softlon.....	35
รูปภาพ 19 ปุ่มที่ใช้ในระบบ ED.....	36
รูปภาพ 20 ถังหรือตัวรองรับของเหลว 3 ถัง ในระบบ ED	36
รูปภาพ 21 การต่อไฟฟ้าในระบบ ED.....	37
รูปภาพ 22 อุปกรณ์สำหรับการตรวจวิเคราะห์ค่า LCD point.....	37
รูปภาพ 23 แสดงการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจากหัวมันสำปะหลังสด	40
รูปภาพ 24 การเตรียมกล้าเชื้อในถังหมักขนาด 5 ลิตรและกระบวนการหมักกรดซัคซินิกแบบกะใน ถังหมักขนาด 40 ลิตร	42
รูปภาพ 25 แผนภาพแสดงการใช้น้ำตาลกลูโคสของเซลล์และความเข้มข้นของเซลล์ใน ระหว่างกระบวนการหมักแบบกะเทียบกับเวลาโดย <i>A. succinogenes</i> . ATCC 55618	44
รูปภาพ 26 แผนภาพแสดงความเข้มข้นกรดซัคซินิกและกรดอินทรีย์ผลพลอยได้ในระหว่าง กระบวนการหมักแบบกะเทียบกับเวลาโดย <i>A. succinogenes</i> . ATCC 55618.....	44

สารบัญภาพ

หน้า

รูปภาพ 27 แสดงการการเจริญของเซลล์ การใช้กลูโคส และการเกิดผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ โดยทำการเปรียบเทียบระหว่างการทำแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ (บน) และผลที่ได้จากการทดลอง (ล่าง)	49
รูปภาพ 28 แสดงการการเจริญของเซลล์ การใช้กลูโคส และการเกิดผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ในระหว่างการหมักจริงแบบกึ่งกะ.....	50
รูปภาพ 29 ระบบการกรองแบบไมโครฟิวเตรชั่นและนาโนฟิวเตรชั่น (บน) และตัวอย่างของน้ำหมักส่วนต่าง ๆ ที่ผ่านขั้นตอนการกรองแล้ว.....	51
รูปภาพ 30 หลักการทั่วไปของเซลล์ Electrodialysis ที่ใช้ในการศึกษานี้.....	53
รูปภาพ 31 อุปกรณ์ ED ในภาพรวมที่ใช้ในการศึกษานี้.....	54
รูปภาพ 32 การจัดชุดการทดลองอุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์เพื่อทดลองสารสังเคราะห์.....	55
รูปภาพ 33 การหาค่า LCD ระหว่างกระแสที่ให้กับความต่างศักย์ที่ได้รับ.....	56
รูปภาพ 34 แสดงความเข้มข้นของกรดซัคซินิกทั้งสองด้านของสารละลายในระบบอิเล็กโตรไดโอะไลซิส.....	58
รูปภาพ 35 แสดงแผนผังการประกอบจัดชุดการทดลองระบบ electrodialysis bipolar membrane (EDBPM)	59
รูปภาพ 36 การเกิด membrane fouling จากไอออนของแมกนีเซียม.....	60
รูปภาพ 37 ผลของปริมาณกระแส (voltage) ในเมมเบรนแต่ละส่วนเทียบกับเวลา โดยที่ (A) คือ Bipolar-Anion-bipolar, (B) คือ bipolar-Cation-bipolar, และ (C) คือ bipolar-Anion-Cation-bipolar ตามลำดับ.....	64
รูปภาพ 38 ความเข้มข้นของกรดซัคซินิกที่ configuration ต่างๆ โดยที่ (A) คือ Bipolar-Anion-bipolar, (B) คือ bipolar-Cation-bipolar, และ (C) คือ bipolar-Anion-Cation-bipolar ตามลำดับ..	68
รูปภาพ 39 แสดงความเข้มข้นของกรดซัคซินิกทั้งสองด้านของสารละลายในระบบอิเล็กโตรไดโอะไลซิส.....	71
รูปภาพ 40 การใช้พลังงาน (energy consumption) ที่ configuration ต่างๆกัน โดยที่ A คือ 10 mA/cm ² , B คือ 15 mA/cm ² และ C คือ 20 mA/cm ²	72
รูปภาพ 41 กราฟวิธีการเช็ค LCD point.....	78
รูปภาพ 42 กราฟสำหรับการหาค่า I (current)	79
รูปภาพ 43 การจัดชุดการทดลองโดยใช้ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ.....	79
รูปภาพ 44 ค่าจำเพาะของ electrodialyzer ที่ใช้ในการศึกษา.....	80

สารบัญตาราง

	หน้า
ตาราง 1 ลักษณะทางเคมีและกายภาพของกรดซัคซินิก.....	14
ตาราง 2 ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด AS medium (Liu <i>et al.</i> , 2008)	25
ตาราง 3 การสรุปค่าคงที่ต่าง ๆ สำหรับจลศาสตร์การหมักกรดซัคซินิกจากน้ำตาลกลูโคส (Lin <i>et al.</i> , 2008)	47



คำอธิบายสัญลักษณ์

CO_2	คาร์บอนไดออกไซด์
Na_2HPO_4 ,	ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต
MgCl_2	แมกนีเซียมคลอไรด์
NaH_2PO_4	โมนโซเดียมฟอสเฟต
CaCl_2	แคลเซียมคลอไรด์
NaCl	โซเดียมคลอไรด์
MgCO_3	แมกนีเซียมคาร์บอเนต
Na_2SO_4	โซเดียมซัลเฟต
Rpm	รอบต่อนาที
Ca(OH)_2	แคลเซียมไฮดรอกไซด์
g/L	กรัมต่อลิตร



บทที่ 1 บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

ปัจจุบันพลาสติกสังเคราะห์มีบทบาทต่อชีวิตประจำวันของมนุษย์สูงมาก โดยใช้เป็นวัสดุอุปกรณ์ชนิดต่างๆ อาทิเช่น เป็นส่วนประกอบของเครื่องใช้ไฟฟ้า ภาชนะบรรจุอาหาร และอุปกรณ์สำนักงานต่าง ๆ เป็นต้น โดยพลาสติกเหล่านี้สังเคราะห์ได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมีซึ่งก่อให้เกิดปัญหาขยะมลพิษและสิ่งแวดล้อมโดยรวม เนื่องจากกำจัดได้ยากและไม่สามารถย่อยสลายเองได้ตามธรรมชาติหรือต้องใช้เวลานานมาก ดังนั้นพลาสติกชีวภาพย่อยสลายได้ หรือ biodegradable plastic จึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการพัฒนาวัสดุสำหรับการใช้งานเพื่อจุดประสงค์หลักคือการอนุรักษ์สิ่งแวดล้อม ทั้งในด้านวัตถุดิบ กระบวนการผลิต และกระบวนการกำจัด โดยปัจจุบันพลาสติกชีวภาพย่อยสลายได้ ได้ถูกให้ความสำคัญเป็นอย่างมากจากทั้งภาครัฐและภาคเอกชน โดยมีการจัดตั้งสมาคมอุตสาหกรรมพลาสติกชีวภาพไทย เพื่อพัฒนาและยกระดับอุตสาหกรรมการผลิตพลาสติกชีวภาพครบวงจรตั้งแต่ระดับต้นน้ำ กลางน้ำและปลายน้ำ ซึ่งพลาสติกชีวภาพนั้น ผลิตมาจากวัตถุดิบที่สามารถผลิตทดแทนขึ้นใหม่ได้ในธรรมชาติ ใช้พลังงานในกระบวนการผลิตต่ำ และภายหลังจากการใช้งาน จะสามารถย่อยสลายเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำได้ด้วยจุลินทรีย์ในธรรมชาติ โดยพลาสติกชีวภาพนั้นจะมีคุณสมบัติทางกายภาพเทียบเท่ากับพลาสติกจากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี กรดซัคซินิกถือเป็นกรดอินทรีย์ชนิดหนึ่งที่สามารถนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตพลาสติกชีวภาพได้ โดยกรดซัคซินิกสามารถผลิตได้จากกระบวนการหมักของเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Actinobacillus succinogenes* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียที่ได้ถูกคัดเลือกจากกระเพาะของวัว (bovine rumen) โดยปกติแล้วกระบวนการหมักจะมีการใช้น้ำตาล กลูโคสเป็นสารตั้งต้นในการผลิต ซึ่งน้ำตาลกลูโคสเป็นสารที่มีราคาแพง ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีแนวคิดในการพัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้แป้งมันสำปะหลังดิบเป็นวัตถุดิบหลัก ซึ่งมันสำปะหลังเป็นพืชที่มีอยู่มากในพื้นที่จังหวัดนครราชสีมา โดยจะส่งผลให้สามารถเพิ่มมูลค่าของวัตถุดิบทางการเกษตรได้เป็นอย่างดี แต่อย่างไรก็ตามการหมักกรดซัคซินิกนั้น มักจะประสบปัญหาทางด้านเทคนิคคือเกิดการยับยั้งจากผลิตภัณฑ์หรือที่เรียกว่า product inhibition effect ซึ่งความเข้มข้นของกรดซัคซินิกที่มากขึ้นในระหว่างการหมักนั้น จะส่งผลในเชิงลบต่อความสามารถในการผลิตของเชื้อจุลินทรีย์ ดังนั้น หากทำการแยกกรดซัคซินิกออกจากระบบควบคุมกับกระบวนการหมัก จะทำให้ประสิทธิภาพการหมักสูงขึ้น ซึ่งในข้อเสนอโครงการวิจัยนี้จะใช้ระบบอิลคโตรไดอะไลซิส ซึ่งเป็นการประยุกต์ใช้เยื่อแผ่นมีประจุบวกและประจุลบ (cation and anion permeable membrane) ทำการเหนี่ยวนำให้เกิดการเคลื่อนที่ของประจุซัคซินเนตด้วยไฟฟ้ากระแสตรง ซึ่งผลลัพธ์ดังกล่าวจะทำให้การยับยั้งจากผลิตภัณฑ์ลดลง ทั้งนี้เนื่อง จากความเข้มข้นของกรดซัคซินิกภายในถังหมักจะมีค่าต่ำอยู่เสมอ เชื้อแบคทีเรียจะทำการผลิตกรดซัคซินิกได้มากขึ้นและสามารถทำการหมักแบบกึ่งกะ (fed-batch) โดยสามารถเติมแป้งมันสำปะหลังได้อีกเมื่อน้ำตาลในถังหมักหมดลง

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. พัฒนาระบบการแยกกรดซัคซินิกควบคู่กับกระบวนการหมักด้วยระบบอิเล็กโตรไดอะไลซิส โดยใช้แอมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนหลัก
2. เปรียบเทียบค่าผลผลิตและผลิตผลของกรดซัคซินิกที่ผลิตโดยเชื้อแบคทีเรีย *A. succinogenes* ในรูปแบบการหมักแบบกะ แบบกึ่งกะ
3. ศึกษาการทำบริสุทธิ์เบื้องต้นจากตัวอย่างน้ำหมัก โดยมีการศึกษาถึงปัจจัยต่างๆในระบบ
4. ศึกษาการแยกควบคู่กับกระบวนการหมักกรดซัคซินิกด้วยระบบอิเล็กโตรไดอะไลซิส

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

โครงการวิจัยนี้จะทำการศึกษาการแยกกรดซัคซินิกควบคู่กับกระบวนการหมัก โดยใช้เชื้อแบคทีเรียชนิดที่ผลิตกรดซัคซินิกสายพันธุ์ *Actinobacillus succinogenes* ATTC 55618 ทำการหมักในถังปฏิกรณ์ขนาด 5 ลิตร ซึ่งในระหว่างที่ทำกรหมักนั้น จะทำการไหลเวียนน้ำหมักออกนอกถังหมักผ่านระบบการกรองแบบไมโครฟิวเตรชั่น ซึ่งจะทำให้ได้แต่น้ำหมักส่วนใส ในขณะที่แบคทีเรียยังคงอยู่ภายในถังหมัก จากนั้นน้ำหมักส่วนใสดังกล่าวจะถูกนำเข้าสู่เซลล์ของระบบอิเล็กโตรไดอะไลซิสเพื่อทำการแยกซัคซินेट ซึ่งมีประจุลบออกจากระบบ จากนั้นจะทำการไหลเวียนน้ำหมักกลับเข้าสู่ถังหมัก เนื่องจากในน้ำหมักจะยังคงมีน้ำตาลกลูโคส และสารอาหารอื่น ๆ เหลืออยู่

1.4 สมมุติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

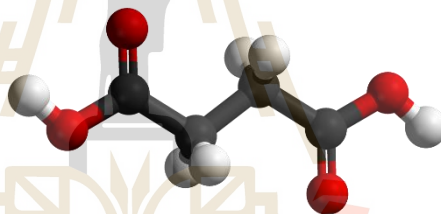
การหมักกรดอินทรีย์โดยทั่ว ๆ ไปแล้ว มักจะเกิดปัญหาจากการยับยั้งโดยผลิตภัณฑ์ ซึ่งส่งผลทำให้ความเข้มข้นสุดท้ายของผลิตภัณฑ์มีค่าต่ำกว่าที่ควรจะเป็น การแยกผลิตภัณฑ์ควบคู่กับกระบวนการหมักนั้น เป็นแนวความคิดที่จะทำให้เชื้อจุลินทรีย์อยู่ในสภาวะแวดล้อมที่มีแหล่งอาหารอุดมสมบูรณ์อยู่ตลอดเวลา ปราศจากสารที่มีพิษ ซึ่งก็คือกรดอินทรีย์ที่เขื่อนั้นสร้างขึ้นนั่นเอง โดยเทคนิคอิเล็กโตรไดอะไลซิสสำหรับการแยกกรดซัคซินิกควบคู่กับกระบวนการหมักในข้อเสนอโครงการวิจัยนี้นั้น เป็นเทคโนโลยีขั้นสูง กล่าวคือ สามารถแยกกรดซัคซินิกได้อย่างต่อเนื่อง และสามารถแยกกรดซัคซินิกออกจากสารชนิดอื่น ๆ ที่มีสภาวะที่เป็นกลางได้ เช่นน้ำตาลกลูโคสและโปรตีน เป็นต้น นอกจากนี้แล้ว สารละลายกรดซัคซินิกที่แยกได้นั้นจะมีความบริสุทธิ์สูงระดับหนึ่ง ซึ่งจะช่วยให้กระบวนการทำบริสุทธิ์ในขั้นสุดท้ายมีความง่ายขึ้น

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 กรดซัคซินิก

กรดซัคซินิก มีสูตรทางเคมีคือ $C_4H_6O_4$ แสดงดังรูปที่ 1 คุณสมบัติและลักษณะทางกายภาพแสดงดังตารางที่ 1 ทั้งนี้กรดซัคซินิกถือเป็นสารประกอบอินทรีย์ 1 ใน 12 ชนิด ที่ถูกประกาศโดยกระทรวงพลังงานของสหรัฐอเมริกา เพื่อให้เป็นสารที่สามารถนำไปใช้เป็นส่วนตั้งต้นประยุกต์ได้ในอุตสาหกรรมอย่างหลากหลาย เช่น อุตสาหกรรมอาหาร เคมี ยา และพอลิเมอร์ เป็นต้น สำหรับการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมทางเคมี กรดซัคซินิกสามารถนำมาใช้เป็นส่วนตั้งต้นที่สำคัญในขั้นตอนการผลิต กรดอะดิพิค (adipic acid), 1,4-butanediol tetrahydrofuran, N-methyl pyrrolidinone, 2-pyrrolidione succinate salts และ gamma-butyrolactone (Song et al., 2006) อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบัน กรดซัคซินิกมีความสำคัญเป็นอย่างมากในการผลิตเป็นพลาสติกชีวภาพที่สามารถย่อยสลายได้เพื่อทดแทนพลาสติกที่ใช้แพร่หลายในปัจจุบัน



รูปภาพ 1 โครงสร้างทางเคมีของกรดซัคซินิก

ตาราง 1 ลักษณะทางเคมีและกายภาพของกรดซัคซินิก.

คุณสมบัติ	ปริมาณ
ลักษณะ (ความบริสุทธิ์สูง ที่อุณหภูมิห้อง)	ของแข็งคล้ายคริสตัล ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น
มวลโมเลกุล	118.09 กรัมต่อโมล
ความหนาแน่น	1.56 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร
จุดหลอมเหลว	185-187 องศาเซลเซียส
จุดเดือด	235 องศาเซลเซียส
ค่าความเป็นกรด (pKa)	pKa ₁ = 4.2 pKa ₂ = 5.6

2.2 การผลิตกรดซัคซินิกโดยกระบวนการทางเคมี

กรดซัคซินิกที่ผลิตในเชิงพาณิชย์โดยกระบวนการทางปิโตรเลียมโดย Maleic anhydride ซึ่งเป็น การผลิตจาก n - butane ผ่านกระบวนการออกซิเดชัน โดยมี vanadium-phosphorous เป็นตัวเร่ง ปฏิกิริยาออกไซด์วิถีปฏิกิริยาของ n - butane กลายเป็น Maleic anhydride (แสดงในรูปภาพ 2)



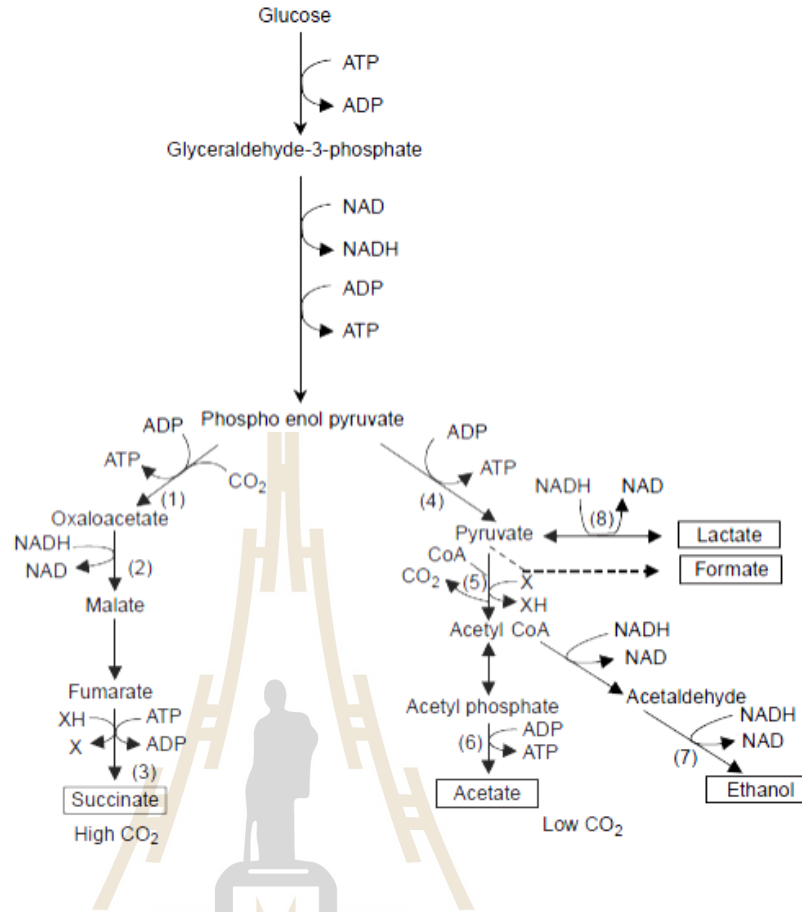
รูปภาพ 2 วิธีปฏิกิริยาของ n - butane กลายเป็น Maleic anhydride (Hapbern, 2011)

ปฏิกิริยาจาก Maleic anhydride มาเป็นกรดซัคซินิก เริ่มจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส การแตกของ พันธะเดี่ยวหนึ่งพันธะระหว่างคาร์บอนและออกซิเจน และเกิดกลายเป็นกรดมาเลอิก (Maleic acid) การเติมไฮโดรเจนทำให้การแตกพันธะคู่ของคาร์บอนกับคาร์บอน ถือว่าเสร็จสิ้นปฏิกิริยากลายเป็นกรดซัคซินิก อย่างไรก็ตาม กรดซัคซินิกที่ผลิตจากเชื้อเพลิงฟอสซิลเป็นสิ่งที่ทำให้ผลิตภัณฑ์นั้นเป็นผลิตภัณฑ์ที่ไม่ ได้มาจากธรรมชาติ (Song and Lee, 2006). ในขณะที่วิธีการของการผลิตนี้มีต้นทุนการผลิตที่ถูกกว่า การแปรรูปโดยการหมัก แต่ก็มีข้อบกพร่องที่เป็นปัญหาใหญ่อยู่เหมือนกัน ในขณะที่มีการแปรรูปโดยผ่าน กระบวนการทางปิโตรเคมีนั้นจะแสดงให้เห็นว่ากรดซัคซินิกที่ทำได้นั้นมาจากทรัพยากรที่ไม่หมุนเวียน เช่น ก๊าซธรรมชาติ ซึ่งจะกลายเป็นเรื่องที่ยากเมื่อเวลาผ่านไป เนื่องจากวัตถุดิบจะกลายเป็นเรื่องยากที่หา วัตถุดิบ สารตั้งต้นและความต้องการอย่างไม่สิ้นสุดที่เพิ่มขึ้นนั้น ก็จะกลายเป็นว่ามีค่าใช้จ่ายที่เพิ่มขึ้นด้วย กระบวนการนี้จึงถือได้ว่าไม่เป็นกระบวนการที่มีความอย่างยั่งยืนและไม่สามารถแก้ปัญหาในด้านความ ต้องการ หากมีความต้องการอย่างต่อเนื่องและเพิ่มมากขึ้นในด้านอุตสาหกรรมการผลิตกรดซัคซินิก

2.3 กระบวนการหมักกรดซัคซินิก

กระบวนการหมักกรดซัคซินิก ได้มีการศึกษากันอย่างจริงจัง เมื่อปี ค.ศ. 1980 (Zeikus *et al.*, 1999) อย่างไรก็ตามในปัจจุบันนี้ได้มีการสนใจการผลิตกรดซัคซินิกดังกล่าวโดยใช้สารตั้งต้นที่มีการนำ กลับมาใช้ใหม่ได้ (renewable resource) หรือวัตถุดิบทางการเกษตร จำพวก ข้าวโพด มันสำปะหลัง น้ำตาลอ้อย ฯลฯ กรดซัคซินิกสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์หลากหลายชนิด ยกตัวอย่างเช่น *Actinobacillus succinogenes* *Anaerobiospirillum succiniciproducens* และ *Mannheimia succiniciproducens* (Song *et al.*, 2007) จุลินทรีย์กลุ่มที่กล่าวมานี้มีคุณสมบัติพิเศษคือ มีความสามารถทนต่อความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสได้สูงโดยที่ไม่เกิดแรงดันออสโมติส และมีความสามารถในการ ผลิตกรดซัคซินิกสูง (Huh *et al.*, 2006) สำหรับกรดซัคซินิกนี้ยังเป็นสารตัวกลาง หรือ intermediate ในวัฏจักร TCA (tricarboxylic acid) และเป็นผลผลิตสุดท้ายในกระบวนการหมักที่ ไม่มีออกซิเจน ในกระบวนการหมัก นอกเหนือจากกรดซัคซินิกแล้ว อาจมีผลพลอยได้ที่เป็กรดอะซิติก

กรดฟอร์มิก กรดแล็กติก และเอทานอลเกิดขึ้น การผลิตกรดซัคซินิก ยกตัวอย่างเช่น เชื้อ *A. succiniciproducens* สามารถผลิตกรดซัคซินิกได้ความเข้มข้น 83 กรัมต่อลิตร *M. succiniciproducer* ผลิตได้มากกว่า 50 กรัมต่อลิตร และ *A. succinogenes* ผลิตได้มากกว่า 100 กรัมต่อลิตร (Qiang et al., 2010) เป็นต้น สำหรับวิธีการผลิตกรดซัคซินิกแสดงดังรูปภาพ 3 โดยที่เข้าสู่วิถี PEP (phosphoenol pyruvate) carboxykinase สำหรับเชื้อ *A. succiniciproducens* และ *A. succinogenes* โดยจากแผนภาพจะเห็นได้ว่าปฏิกิริยาผลิตกรดซัคซินิกจะมีประสิทธิภาพดีในสภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์อยู่ในปริมาณที่สูง (High CO₂) โดยน้ำตาลกลูโคสสามารถที่จะเปลี่ยนเป็นกรดซัคซินิกได้เกือบทั้งหมด ในขณะที่สภาวะ คาร์บอนไดออกไซด์ต่ำ (Low CO₂) ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นหลายปฏิกิริยา ส่งผลให้เกิดผลพลอยได้ที่หลากหลาย (by product) เช่น กรดอะซีติก กรดฟอร์มิก กรดแล็กติก และเอทานอล เป็นต้น ดังนั้นจะเห็นว่าการบังคับให้เชื้อสามารถผลิตกรดซัคซินิกได้ในปริมาณที่สูงนั้น จำเป็นที่จะต้องทำให้ปริมาณของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในระบบสูงอีกด้วย การผลิตกรดซัคซินิกจากกากน้ำตาลอ้อย (molasses) ที่เป็นผลพลอยได้จากโรงงานน้ำตาล ซึ่งวัตถุดิบนี้ประกอบด้วย น้ำตาลชนิดต่างๆ (น้ำตาลซูโครส กลูโคส ฟรุคโตส) ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนัก สารคอลลอยด์ โลหะหนักต่างๆ วิตามิน และสารประกอบไนโตรเจน เป็นต้น ซึ่งถือเป็น วัตถุดิบที่มีประโยชน์และมีราคาถูก นิยมใช้ในการผลิตเอทานอล กรดแล็กติก และน้ำตาลซอร์บิทอล (Liu et al., 2008) สำหรับการผลิตกรดซัคซินิกโดยกระบวนการหมักแบบกะ จะสามารถผลิตได้ประมาณ 46.4 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อ *A. succinogenes* นอกจากนี้ยังได้มีการนำน้ำย่อยฟางข้าวที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลไซโลสมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตกรดซัคซินิก โดยเชื้อ *A. succinogenes* ในกระบวนการหมักแบบกะ ที่สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน พบว่าสามารถผลิตกรดซัคซินิกได้มากกว่า 45.5 กรัมต่อลิตร และในกระบวนการหมักแบบกึ่งกะสามารถผลิตได้มากกว่า 53.2 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิต 1.21 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ที่ระยะการหมัก 44 ชั่วโมง (Zhenga et al., 2009) หลังจากที่ทำกรย่อยฟางข้าว จะได้เป็นน้ำตาลออกมา ทำให้ง่ายต่อการที่เชื้อแบคทีเรียจะไปใช้ เป็นสารตั้งต้นได้ แต่อย่างไรก็ตามวัตถุดิบจำพวกแป้งนั้น จะมีความน่าสนใจมากที่สุด เนื่องจากมีปริมาณธาตุอาหารสูงและสามารถหาซื้อได้ง่าย ดังนั้นในประเทศไทยและจังหวัดนครราชสีมาเป็นพื้นที่ที่มีการผลิตมันสำปะหลัง ทั้งที่เป็นสด แป้งมันสำปะหลัง และแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ ที่มีคุณภาพออกมา จำพวกกลูโคสไซรัปหรือกลูโคสเหลว ซึ่งล้วนแต่มีราคาถูก มีโรงงานหลายแห่งที่ตั้งอยู่ภายในจังหวัด ทำให้ได้รับความสนใจที่จะนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตกรดซัคซินิกเป็นอย่างมาก ทั้งยังสร้างมูลค่าให้กับวัตถุดิบมวลชีวภาพควบคู่กับการพัฒนาด้านเทคโนโลยีชีวภาพ ก่อให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่เป็นประโยชน์ต่อไป กระบวนการผลิตทางชีวภาพหรือกระบวนการหมักที่มีการใช้เชื้อจุลินทรีย์ร่วมด้วย ถือเป็นวิธีการที่ดีต่อสิ่งแวดล้อม และเป็นเทคโนโลยีสะอาด ที่ได้รับความสนใจศึกษาวิจัยกันอย่างกว้างขวาง นอกจากนี้ในการผลิตกรดซัคซินิกด้วยวิธีการหมัก ยังมีมีการตรึงก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เข้าสู่เซลล์เพื่อใช้ในกระบวนการหมักกรดซัคซินิกซึ่งถือเป็น CO₂-fixation fermentation เป็นประโยชน์เป็นอย่างมากกับการลดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์



รูปภาพ 3 แสดง Catabolic pathway ในกระบวนการผลิตกรดซัคซินิกด้วยน้ำตาล (Song et al., 2006)

2.4 จลศาสตร์ของการหมักกรดซัคซินิก

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

2.5 การแยกผลิตภัณฑ์ควบคู่กับกระบวนการหมัก (Extractive fermentation)

การแยกผลิตภัณฑ์ควบคู่กับกระบวนการหมัก (extractive fermentation หรือ *in situ* product removal) เป็นแนวคิดในการทำปฏิบัติการสองอย่างภายในขั้นตอนเดียว โดยเป็นการพัฒนากระบวนการหมักไปพร้อม ๆ กับการแยกผลิตภัณฑ์ ซึ่งจะมีผลดีในด้านต่าง ๆ ดังนี้ 1.) ลดความเป็นพิษของกรดอินทรีย์ที่มีต่อเชื้อแบคทีเรียลง จะทำให้เชื้อแบคทีเรียสามารถผลิตกรดได้มากขึ้น 2.) สมดุลของสมการจะไปข้างหน้าเนื่องจากการแยกผลิตภัณฑ์ออกจากระบบอยู่ตลอดเวลา 3.) การสูญเสียผลิตภัณฑ์จะมีค่าลดลง และ 4.) เป็นการลดขั้นตอนของการผลิตลง (Lye and Woodley, 1999) ข้อได้เปรียบต่าง ๆ เหล่านี้จะนำไปสู่การลดขนาดของถังหมักลง (เมื่อเปรียบเทียบกับผลิตผลของกรดที่เท่ากัน) ทำให้สามารถลดต้นทุนทั้งต้นทุนคงที่และต้นทุนผันแปรต่าง ๆ ลงได้ จากการศึกษางานวิจัยที่น่าสนใจ พบว่ามีการประยุกต์ใช้เทคนิคต่าง ๆ ควบคู่กับกระบวนการหมักกรดอินทรีย์ดังนี้

2.6 การทำบริสุทธิ์กรดซัคซินิก

สำหรับกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ของกรดซัคซินิกนั้น ต้นทุนในการทำบริสุทธิ์กรดซัคซินิกมีมากกว่า 60% ของต้นทุนการผลิตทั้งหมด ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาและพิจารณาเลือกวิธีที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพสูงในการแยกกรดซัคซินิกออกจากกรดอินทรีย์อื่นๆ และเข้าสู่กระบวนการทำให้บริสุทธิ์ต่อไป ด้วยคุณลักษณะเฉพาะของผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพ จึงเป็นข้อจำกัดสำหรับกระบวนการแยกโดยทั่วไป ในบางครั้งอาจจะต้องพัฒนาวิธีใหม่ที่เหมาะสมขึ้นมาใช้ในการแยก สำหรับการออกแบบกระบวนการหรือการเกี่ยวข้องกับผลิตภัณฑ์ นอกจากต้องคำนึงถึงชนิดและคุณภาพของผลิตภัณฑ์แล้ว ยังต้องพิจารณาปัจจัยอื่นๆ ร่วมด้วย เช่น ตำแหน่งของผลิตภัณฑ์และสารเจือปนในกระบวนการผลิต ประโยชน์ของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการรวมทั้งความคุ้มค่าของกระบวนการแยกที่นำมาใช้อีกด้วย การทำให้บริสุทธิ์ของกรดซัคซินิกจึงมีอยู่หลายวิธี เช่น *electrodialysis acidification* และ *extraction* เป็นต้น

2.6.1 การดูดซับ

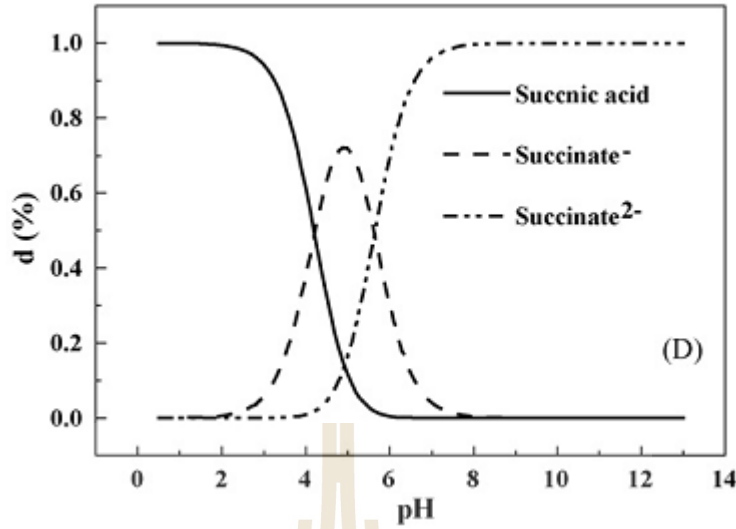
การดูดซับเป็นเทคนิคที่มีศักยภาพในการแยกกรดซัคซินิกออกจากน้ำหมัก โดยเฉพาะการใช้ตัวดูดซับที่มีสมบัติเป็นตัวแลกเปลี่ยนประจุชนิดด่างอ่อน (weak alkaline anion exchange adsorbents) ซึ่งจะทำให้สามารถจับกับสารที่มีประจุเป็นลบได้เป็นอย่างดี โดยเมื่อตัวดูดซับเกิดการอิ่มตัว ก็สามารถที่จะทำการคายซับ (desorption) เอากรดซัคซินิกออกจากตัวดูดซับด้วยวิธีการล้างด้วยสารละลายที่มีค่า ionic strength สูง ซึ่งจะทำให้กรดซัคซินิกหลุดออกจากตัวดูดซับนั้น ซึ่งข้อดีของเทคนิคนี้คือมีการลงทุนที่ไม่สูงมากนัก และมีความสามารถในการจับกรดซัคซินิกได้ดี แต่อย่างไรก็ตามเทคนิคนี้ไม่สามารถแยกกรดอินทรีย์ชนิดอื่นที่ปนเปื้อนมาจากน้ำหมักได้ ทั้งนี้เนื่องจากกรดอินทรีย์เหล่านี้ จะมีสมบัติทางกายภาพและทางเคมีที่คล้ายกันกับกรดซัคซินิก กล่าวคือมีค่าคงที่ของการแตกตัว (pK_a) ที่ใกล้เคียงกันและยังมีหมู่ฟังก์ชันคาร์บอกซิลิกเช่นเดียวกันอีกด้วย ดังนั้นกระบวนการดูดซับ จึงถือเป็นการทำบริสุทธิ์ขั้นต้นเท่านั้น และจะต้องใช้เทคนิคอื่น ๆ ร่วมในกระบวนการเพื่อที่จะผลิตกรดซัคซินิกบริสุทธิ์สูงต่อไป

2.6.2 Electrodialysis

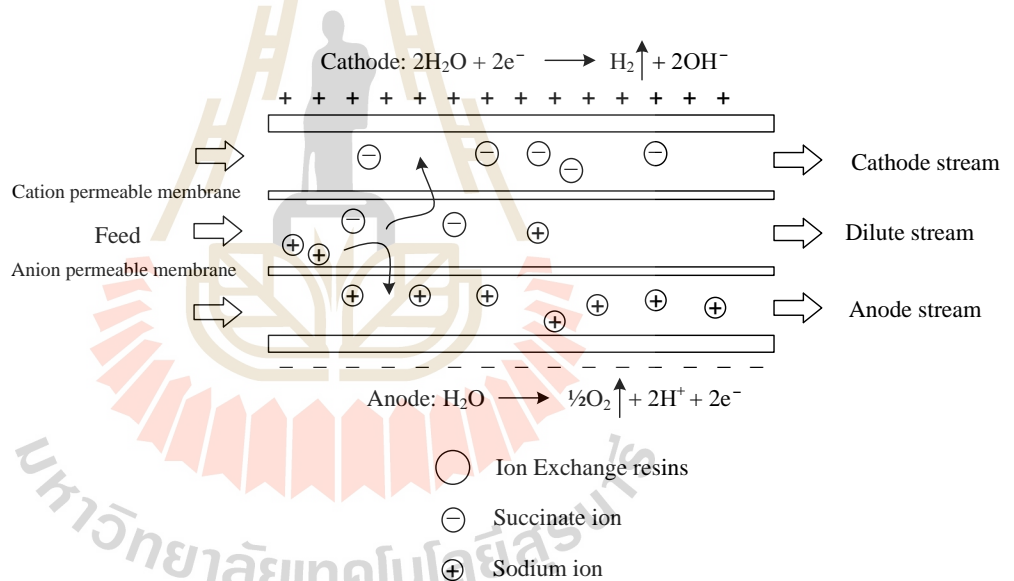
สำหรับ electrodialysis เป็นกระบวนการแยกผลิตภัณฑ์ที่มีการใช้การแลกเปลี่ยนประจุในโมเลกุลของสารนั้นๆ โดยใช้เยื่อแผ่นร่วมกับใช้ไฟฟ้ากระแสตรงเป็นตัวช่วยในการแตกตัวของประจุ ให้เกิดการแยกผลิตภัณฑ์ที่สมบูรณ์ (Boontawan และคณะ, 2011) แต่อย่างไรก็ตามเทคโนโลยีดังกล่าวนี้ มีการลงทุนที่ค่อนข้างสูง ทั้งในด้านการจัดระบบการแยกและอุปกรณ์จัดสร้างระบบต่างๆ (Zeikus *et al.*, 1999) นอกจากนี้ เทคนิคดังกล่าวไม่สามารถแยกกรดอินทรีย์หลายชนิดที่ได้จากกระบวนการหมัก เนื่องจากกรดอินทรีย์เหล่านี้สามารถแตกตัวเป็นไอออนได้เช่นกัน

2.7 การแยกกรดอินทรีย์ควบคู่กับกระบวนการหมักด้วยระบบอิเล็กโตรไดโออนไนเซชัน/อิเล็กโตรไดโอะไลซิส (Electrodeionization/electrodialysis)

Meynial-Salles *et al.*, 2007 ได้ทำการศึกษาการผลิตกรดซัคซินิกแบบต่อเนื่องควบคู่กับกระบวนการหมักด้วยเทคนิคอิเล็กโตรไดโอะไลซิสโดยใช้เชื้อ *A. succiniproducens* ซึ่งระบบอิเล็กโตรไดโอะไลซิสนั้น เป็นปฏิกิริยาทางไฟฟ้า-เคมีที่ใช้เยื่อแผ่นที่มีประจุ (charged membranes) สองชนิดคือ anion และ cation-exchange membrane โดยที่แต่ละชนิดจะยอมให้อิออนประจุลบและประจุบวกผ่านได้ตามลำดับ นอกจากนี้แล้ว ยังจะมีการใช้ไฟฟ้ากระแสตรง เป็นตัวทำให้เกิดความต่างศักย์ของไฟฟ้าระหว่างเยื่อแผ่นทั้งสอง ในระหว่างการแยกนั้น จะมีการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้อยู่ในสถานะที่เหมาะสม โดยกรดซัคซินิกมีค่าคงที่ของการแตกตัวอยู่ 2 ค่าคือที่ pH 4.2 และ 5.6 ตามลำดับ (รูปภาพ 4) ซึ่งจะทำให้กรดซัคซินิกแตกตัวเป็นไอออนของซัคซิเนตซึ่งมีประจุเป็นลบ และสามารถแพร่ออกจาก Cation-exchange membrane ได้ในขณะที่ โซเดียมหรือแคลเซียมซึ่งมีประจุบวกจะแพร่ออกจาก anion-exchange membrane (รูปภาพ 5) ซึ่งผลการทดลองระบุว่า ความเข้มข้นของเซลล์แบคทีเรียและผลิตผลของกรดซัคซินิกอยู่ที่ 42 กรัมต่อลิตรและ 14.8 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งสูงมากกว่าการหมักในแบบกะถึง 28 และ 20 เท่าตามลำดับ



รูปภาพ 4 อิทธิพลของค่าความเป็นกรด-ด่างที่มีต่อการแตกตัวของกรดซัคซินิก (Li *et al*, 2010)



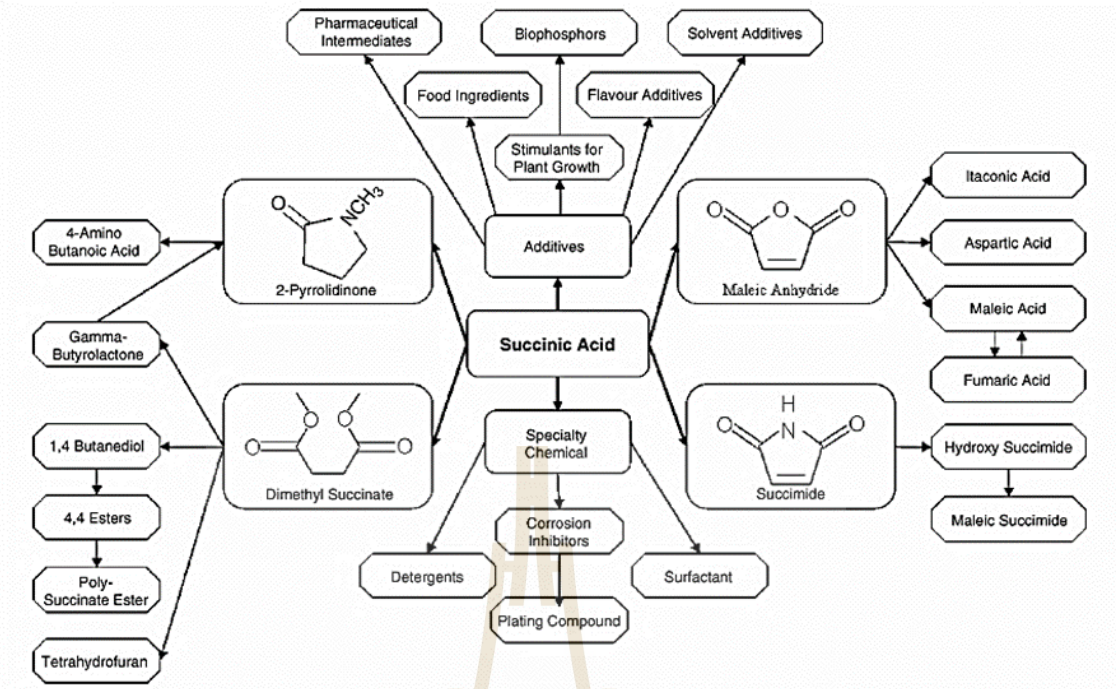
รูปภาพ 5 หลักการทำงานของระบบ Electrodialysis (ED)

Boontawan *et al.*, 2011 ได้ทำการศึกษาการแยกกรดแล็กติกควบคู่กับกระบวนการหมักด้วยระบบอิเล็กโตรไดไอออนไนเซชัน หรือ electrodeionization (EDI) ซึ่งกระบวนการนี้เป็นการประยุกต์ใช้ระบบแลกเปลี่ยนประจุ (Ion Exchange) กับ Electrodialysis ซึ่งการแลกเปลี่ยนประจุจะใช้เรซินชนิดที่มีความสามารถในการจับแล็กติกได้ดี แม้จะอยู่ในรูปของสารละลายที่มีความเข้มข้นต่ำก็ตาม โดยที่กรดแล็กติกมีค่าคงที่ของการแตกตัว (K_a) อยู่ที่ 1.37×10^{-4} แล็กเตอิดไอออนจะถูกเรซินจับไว้จากสารป้อนก่อนที่จะแพร่ผ่านเยื่อแผ่นออกไปที่ Cation permeable membrane ต่อไป ภายในของเครื่องมือ EDI นี้จะ

ประกอบไปด้วยส่วนต่าง ๆ ที่สำคัญดังนี้คือ ส่วนเจือจาง (dilute stream) ส่วนเข้มข้น (concentrate stream) และ ส่วนที่เป็นขั้วไฟฟ้า (electrode compartment) ในช่องของส่วนเจือจางจะถูกเติมด้วยเรซินสองชนิดที่สามารถจับไอออนที่มีประจุบวกและประจุลบได้ดี ซึ่งเรซินทั้งสองชนิดนี้จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการถ่ายเทมวลของประจุจากในส่วนของสารป้อน (feed solution) ไปยังเยื่อแผ่นภายใต้แรงขับเคลื่อนซึ่งเป็นไฟฟ้ากระแสตรง เนื่องจากความเข้มข้นของไอออนจะเข้มข้นและเจือจางในช่องการไหลที่ต่างกัน ดังนั้นกระบวนการ EDI นี้จึงสามารถประยุกต์ใช้ได้ทั้งในการทำให้เจือจางหรือทำให้เข้มข้น ยกตัวอย่างเช่นในการผลิตน้ำปราศจากไอออน (deionized water) โดยน้ำจะเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้ในด้านของส่วนเจือจาง (diluted stream) ส่วนการผลิตกรดแล็กติกนั้น สารละลายกรดแล็กติกเข้มข้นจะถูกผลิตขึ้นในด้านของส่วนเข้มข้น

2.8 การประยุกต์ใช้กรดซัคซินิกในอุตสาหกรรมพลาสติกชีวภาพ

กรดซัคซินิกสามารถใช้เป็นสารตั้งต้นในสารเคมีสำคัญในหลายอุตสาหกรรมรวมถึงอนุพันธ์ของกรดซัคซินิก อาทิ เช่น adipic acid, 1,4-butanediol, tetrahydrofuran, N-methyl pyrrolidinone, 2-pyrrolidinone, succinate salts และ gamma-butyrolactone (รูปภาพ 6). และที่สำคัญกรดซัคซินิกถูกใช้ในการสังเคราะห์พอลิเมอร์ที่สามารถย่อยสลายได้ เช่น polybutyrate succinate (PBS) and polyamide (Nylon®x,4) ในการผลิตพลาสติกชีวภาพ (McKinley และคณะ., 2007) อย่างไรก็ตามโดยทั่วไปการตลาดของกรดซัคซินิกที่ผลิตจากกระบวนการหมักนั้นมีการผลิตน้อยมาก เมื่อเปรียบเทียบกับสารเคมีที่เป็นคู่แข่งกันอย่างเช่นกรดมาเลอิกแอนไฮไดรด์ (Maleic anhydride) ซึ่งผลิตได้จากกระบวนการปิโตรเลียม (กระบวนการทางเคมี) ซึ่งกล่าวมาเป็นเพียงส่วนหนึ่งของข้อเสียเปรียบของกระบวนการหมักกรดซัคซินิก แต่เนื่องจากต้นทุนกระบวนการทางเคมีในการเปลี่ยนแปลงกรดมาเลอิกแอนไฮไดรด์ให้กลายเป็นกรดซัคซินิก โดยผ่านกระบวนการทางเคมีนั้นมีต้นทุนที่สูง ซึ่งทำให้มีข้อจำกัดในการใช้กรดซัคซินิกไม่มีความหลากหลาย และในขณะเดียวกันการวิจัยและการศึกษาที่ผ่านมาเร็ว ๆ นี้ก็แสดงให้เห็นว่าการผลิตกรดซัคซินิกจากกระบวนการหมักโดยการใช้ทรัพยากรทดแทนสามารถทำให้กระบวนการผลิตกรดซัคซินิกมีประสิทธิภาพเพิ่มมากขึ้นเมื่อเทียบกับกระบวนการปิโตรเลียมซึ่งเป็นกระบวนการทางเคมี (Song and Lee, 2006)



รูปภาพ 6 เคมีภัณฑ์ที่สามารถสังเคราะห์จากกรดซัคซินิก (Song and Lee, 2006)

2.9 การตลาดของกรดซัคซินิก

ในปัจจุบัน กรดซัคซินิกที่ผลิตจัดจำหน่ายในเชิงพาณิชย์จากกระบวนการเคมี โดยการออกซิเดชันลำดับส่วนของ n -butane ตามด้วย ขั้นตอนของปฏิกิริยา Hydrogenation ของ Maleic anhydride โดยต้นทุนของ n -Butane อยู่ที่ 850 - 950 เหรียญสหรัฐ ฯต่อตัน (McKinley และคณะ., 2007) ราคาของกรดซัคซินิกมีการรายงานอยู่ในช่วง 5.9 - 9.0 เหรียญสหรัฐ ฯต่อกิโลกรัมขึ้นอยู่กับความบริสุทธิ์ของกรดซัคซินิก ต้นทุนการผลิตของกรดซัคซินิกนั้นจะมีผลกระทบมาจากปัจจัยหลายประการด้วยกันซึ่งรวมไปถึงขั้นตอนการผลิตกรดซัคซินิกและผลผลิตของกรดซัคซินิกที่ได้จากกระบวนการหนึ่งๆ ค่าใช้จ่ายของวัตถุดิบและค่าใช้จ่ายในการเก็บเกี่ยวผลผลิต โดยเฉพาะอย่างยิ่งต้นทุนด้านวัตถุดิบของ Maleic anhydride ที่เป็นที่น่าทึ่งกันดีว่าเป็นส่วนสำคัญทำให้เกิดผลด้านต้นทุนโดยรวมของการผลิตกรดซัคซินิกที่เพิ่มมากขึ้น (Song และ Lee, 2006) และ กระบวนการ Hydrogenation มีการผลิตสารพิษในปริมาณมาก ซึ่งทำให้ขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ของผลิตภัณฑ์กรดซัคซินิกนั้นมีค่าใช้จ่ายที่สูงขึ้น กระบวนการหมักซัคซิเนตที่มีกำลังผลิตขนาดใหญ่ขึ้นได้มีการเริ่มการผลิตขึ้นในช่วงต้นปี ค.ศ. 1980 และในปัจจุบันการผลิตซัคซิเนตจากกระบวนการหมักมีประมาณ 5,000 ตันต่อปี และขายในราคา 2.20 เหรียญสหรัฐ ฯต่อกิโลกรัมในตลาดเชิงอุตสาหกรรมอาหาร ตามที่คาดการณ์ไว้ราคาของกรดซัคซินิกชีวภาพจะลดลงประมาณ 0.55 เหรียญสหรัฐ ฯต่อกิโลกรัม ถ้าขนาดการผลิตมีกำลังสูงกว่า 75,000 ตัน เนื่องจากสามารถใช้ประโยชน์จากสารตั้งต้นคาร์บอนที่มีราคาถูก เช่น ข้าวโพด แป้ง กากน้ำตาล และน้ำตาล (Zeikus และ คณะ.,1999) ทางเลือกหนึ่งของกระบวนการหมักกรดซัคซินิกนั้นสามารถผลิตได้จากน้ำตาลกลูโคส โดยปัจจุบันมีกระบวนการหมักกรดซัคซินิกจากน้ำตาลกลูโคสมากกว่า 30,000,000 ตันต่อปีของ

การผลิตทั่วโลก ราคาน้ำตาลกลูโคสจะอยู่ที่ประมาณ 220-250 เหรียญสหรัฐ ๕ ต่อตัน โดยหากสมมติฐาน ได้ผลผลิตของกรดซัคซินิก 91% (w/w) ของน้ำตาลกลูโคส เห็นได้ว่าการผลิตกรดซัคซินิกจากทรัพยากรทดแทนโดยกระบวนการหมักนั้นสามารถแข่งขันกับกระบวนการผลิตทางเคมีได้ และที่สำคัญชี้ถึงความจำกัดของพลังงานฟอสซิลและปัญหาสิ่งแวดล้อมที่เพิ่มมากขึ้นนั้นทำให้เกิดการกระตุ้นให้นักวิจัยมีความต้องการในการเปลี่ยนแปลงการผลิตจากกระบวนการปิโตรเคมีมาเป็นกระบวนการทางชีวภาพ และด้วยเหตุนี้จึงได้มีงานวิจัยทางวิชาการและภาคส่วนอุตสาหกรรมจำนวนมากให้ความสนใจในส่วนของงานวิจัยจำนวนมาก การผลิตกรดซัคซินิกชีวภาพกำลังจะมาแทนที่การผลิตปิโตรเลียมเคมีของ Maleic anhydride (2.2 ล้านตันต่อปี) (กระทรวงพลังงานสหรัฐอเมริกา, 2004) และมีการจัดหาตลาดที่เกิดขึ้นใหม่สำหรับกรดซัคซินิกและอนุพันธ์กรดซัคซินิก (30 ล้านตันต่อปี) BioAmber, Reverdia, Myriant Technologies และ DSM-Purac เป็นบริษัทระดับแถวหน้าของอุตสาหกรรมการผลิตกรดซัคซินิก ทั้งสองบริษัทสามารถผลิตรวมกันซึ่งคาดว่าจะถึง 70,000 ตันต่อปี ในปี 2013 การผลิตที่คาดการณ์เอาไว้สามารถผลิตเพียงได้เพียง 0.2% ของตลาดความต้องการกรดซัคซินิกทั้งหมด (McKinley *et al*, 2007) แม้ว่าเศรษฐกิจโดยรวมยังคงมีข้อจำกัดในการผลิตกรดซัคซินิกทางชีวภาพ แต่การประเมินค่าใช้จ่าย ต้นทุนวัตถุดิบและการประมาณขนาดของตลาดที่มีศักยภาพรองรับการผลิตกรดซัคซินิกทางชีวภาพนั้นแสดงให้เห็นว่าปัจจุบันกระบวนการของกรดซัคซินิกโดยปิโตรเลียมจะสามารถถูกแทนที่ด้วยกระบวนการผลิตกรดซัคซินิกโดยการหมักได้ภายในอนาคตอันใกล้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 สถานที่ทำการทดลอง

ณ ห้องปฏิบัติการหมัก อาคารปฏิบัติการ 10 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.2 อุปกรณ์และสารเคมี

สำหรับอุปกรณ์เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัยนี้ จะเป็นเครื่องมือที่มีอยู่แล้วบางส่วน ยกตัวอย่างเครื่องมือที่ใช้เช่น

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)

3.3 เชื้อจุลินทรีย์และการหมัก

เชื้อแบคทีเรีย *A. succinogenes* จะถูกซื้อมาจาก American Type Culture Collection (ATCC 55618, USA) จากนั้นนักวิจัยได้ทำการเพาะเชื้อด้วยอาหารเหลวชนิด AS medium ซึ่งมีส่วนประกอบดังแสดงในตาราง 2 และทำการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างใน (pH) ของอาหารเลี้ยงเชื้อให้ได้ 6.5 โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ จากนั้นนำมานิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ตาราง 2 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
Cassava starch	100.0
Yeast extract หรือ N source อื่น ๆ	5.0
MgCO ₃	80

ในขั้นแรกจะทำการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ Termamyl® และ Spirizyme® เพื่อทำการเปลี่ยนแปลงเป็นน้ำตาล จากนั้นจะทำการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อให้กับ pH 6.5 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ จากนั้นนำมานึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เชื้อแบคทีเรีย *A. succinogenes* จะถูกถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อเตรียมเป็นหัวเชื้อในกระบวนการหมัก โดยมีการหมักในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน โดยในขั้นแรกจะทำการเติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เพื่อไล่ออกซิเจนออก หลังจากนั้นทำการบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เพื่อเตรียมความเข้มข้นของเซลล์ให้ได้ 5-10 เปอร์เซ็นต์ เพื่อเตรียมไว้สำหรับถ่ายลงสำหรับกระบวนการหมักต่อไป ส่วนการหาแหล่งไนโตรเจนที่มีราคาถูกนั้น จะเน้นสารที่หาได้ในท้องถิ่น เช่น กากยีสต์จากโรงเบียร์ น้ำที่เหลือจากการผลิตเต้าหู้ เป็นต้น

3.4 การเตรียมกล้าเชื้อ

เชื้อ *A. succinogenes* จะถูกถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อเตรียมเป็นหัวเชื้อในกระบวนการหมัก โดยมีการหมักในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน โดยทำการเติมก๊าซไนโตรเจนเพื่อไล่ออกซิเจนออก หลังจากนั้นทำการบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เพื่อเตรียมความเข้มข้นของเซลล์ให้ได้ 5-10 เปอร์เซ็นต์ เพื่อเตรียมไว้สำหรับถ่ายลงสำหรับกระบวนการหมักต่อไป

3.5 กระบวนการหมักกรดซัคซินิก

3.5.1 กระบวนการหมักแบบกะ

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 3.5 ลิตร ลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ขนาดปริมาตร 5 ลิตร (Sartorius, Germany) เมื่อกำลังเชื้อที่เตรียมไว้โดยบ่ม ถ่ายลงไปถังหมัก ในกระบวนการหมักโดยใช้ถังหมักแบบนี้ต้องมีการควบคุมด้วยเครื่องควบคุมเฉพาะ มีการควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ตามที่ต้องการ การแสดงค่า pH ที่มีการเปลี่ยนแปลงในระบบ อีกทั้งเครื่องควบคุมจะมีการเชื่อมต่อกับปั๊มที่ทำหน้าที่ปั๊ม $MgCO_3$ (40% โดยน้ำหนัก) ลงในถังหมักเพื่อควบคุมค่า pH ให้คงที่ โดยที่ไม่เปลี่ยนปริมาตรในถังหมักมากนัก เนื่องจากค่าที่ใช้มีความเข้มข้นสูง เพื่อที่จะควบคุมปริมาตรในการหมัก ทั้งนี้ควบคุมอุณหภูมิให้ได้ 37 องศาเซลเซียส อีกทั้งดำเนินการภายใต้สภาวะไม่มี อากาศ เพื่อให้เซลล์สามารถเจริญและสร้างผลผลิตเกิดขึ้นได้ จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 3-4 ชั่วโมงเป็นระยะเวลาประมาณ 40-60 ชั่วโมง จนกว่าการสร้างกรดซัคซินิกจะหยุดลง หลังจากนั้นนำมาวิเคราะห์สารต่างๆต่อไป

3.5.2 กระบวนการหมักแบบกึ่งกะ

ในการหมักแบบกึ่งกะจะสามารถแบ่งออกเป็นสองส่วนคือ ส่วนแรกเป็นการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาตร 1.2 ลิตร พร้อมกันกับการเตรียมอาหารสำหรับการป้อนในขั้นตอนกึ่งกะ โดยมีการใช้แป้งมันสำปะหลังที่มีความเข้มข้น 5 เท่า จากนั้นเติมกล้าเชื้อเช่นเดียวกับแบบกะ และควบคุมระบบการหมักคล้ายกับแบบกะ ที่มีการควบคุมค่า pH เท่ากับ 6.5 และหลังจากที่กระบวนการหมักแบบกะดำเนินไปจนปริมาณของน้ำตาลกลูโคสเริ่มหมดลง จึงเริ่มป้อนอาหารที่เตรียมไว้แล้วลงไป โดยจะทำการเติมน้ำเชื่อมเข้มข้นเป็นครั้ง ๆ (intermittent feeding) เพื่อทำการหมักแบบกึ่งกะต่อไป นอกจากนี้ จะทำการศึกษากระบวนการหมักพร้อมทั้งจลนศาสตร์การหมัก รวมทั้งหาค่าตัวแปรต่าง ๆ เช่น ค่าการเจริญจำเพาะ, ผลผลิตและผลผลิตผลของกรดซัคซินิก เป็นต้น

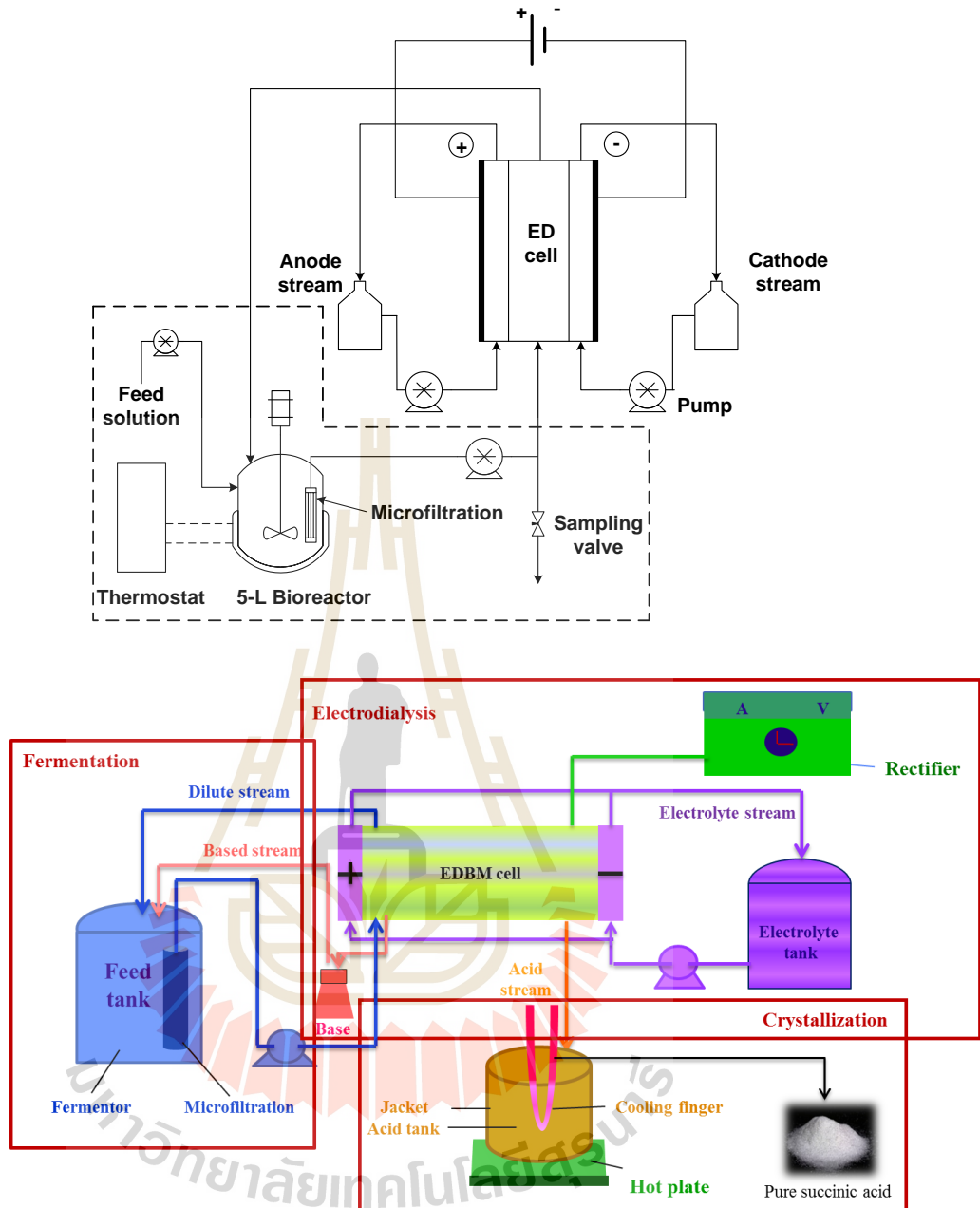
3.6 การแยกกรดซัคซินิกควบคู่กับกระบวนการหมักด้วยเทคนิคอิเล็กโตรไดอะไลซิส

การจัดชุดการทดลองการแยกกรดซัคซินิกควบคู่กับกระบวนการหมักด้วยระบบ ED (Electrodialysis bipolar membrane (EDBM) โดยที่ชุดการทดลองสั่งซื้อมาจาก DW-Lab unit (Japan) เพื่อใช้ทำการแยกกรดซัคซินิกออกจากน้ำหมัก สำหรับพื้นที่ผิวที่มีประสิทธิภาพของแต่ละเมมเบรนคือ 30 ตารางเซนติเมตร ใช้ทองคำขาวและสแตนเลสสำหรับขั้วบวกและแคโทดตามลำดับ (รูปภาพ 7)



รูปภาพ 7 Electro-dialyzer (Selemion™ DW-Lab Specification)

ส่วนระบบการแยกกรดซัลฟูริกควบคู่กับกระบวนการหมักนั้น จะใช้ถังหมักเช่นเดียวกับระบบการหมักแบบกะและกึ่งกะ แต่จะมีการติดตั้งระบบการกรองแบบ microfiltration ภายในถังหมัก น้ำหมักที่ถูกทำให้บริสุทธิ์ปั๊มออกจากปฏิกรณ์ชีวภาพโดยใช้หน่วยเยื่อกรอง (microfiltration) แบบจุ่มแช่เพื่อแยกหรือกั้นเซลล์แบคทีเรียให้อยู่ภายในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ จากนั้นจะทำการดึงเอาน้ำหมักส่วนใสออกมาทำการแยกกรดซัลฟูริกก่อนที่จะไหลเวียนน้ำหมักดังกล่าวกลับเข้าสู่ถังหมักต่อไป น้ำหมักที่ผ่านกระบวนการหมักนี้ได้ถูกนำเข้าไปในหน่วย EDBM และหมุนเวียนไปในช่องเจือจาง (dilution stream) ภายในเซลล์ EDBM โดยใช้เครื่องปั๊มแบบ peristaltic โดยมีสารละลาย Na_2SO_4 ความเข้มข้น 2 โมลาร์ (2M) ถูกใช้เป็นสารละลายอิเล็กโทรไลต์ซึ่งไหลเวียนไปตามช่องขั้วบวกและขั้วลบในระหว่างกระบวนการทำงาน เครื่องแปลงกระแสไฟฟ้าถูกสร้างขึ้นภายในเพื่อผลิตกระแสไฟฟ้าตรง โดยแรงดันไฟฟ้าและความหนาแน่นกระแสอยู่ในช่วง 0-100 โวลต์ (V) และ 0-1.2 แอมแปร์ต่อตารางเมตร (A/cm^2) ตามลำดับ และอัตราการไหลของของเหลวในแต่ละ stream อยู่ที่ 1.6 ลิตรต่อนาที โดยกรดซัลฟูริก (ซัลฟูเนท) จะถูกแยกออกภายในเซลล์ของระบบ ED และเกิดการถ่ายเทมวลไปที่ขั้วลบเก็บสารละลายในด้านของ cathode (รูปภาพ 8)



รูปภาพ 8 Experimental setup สำหรับกระบวนการแยกกรดซัคซินิกควบคู่กับกระบวนการหมักด้วยเทคนิคอิเล็กโตรไดอะไลซิส



รูปภาพ 9 อุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์ที่ใช้ทดลองในงานนี้





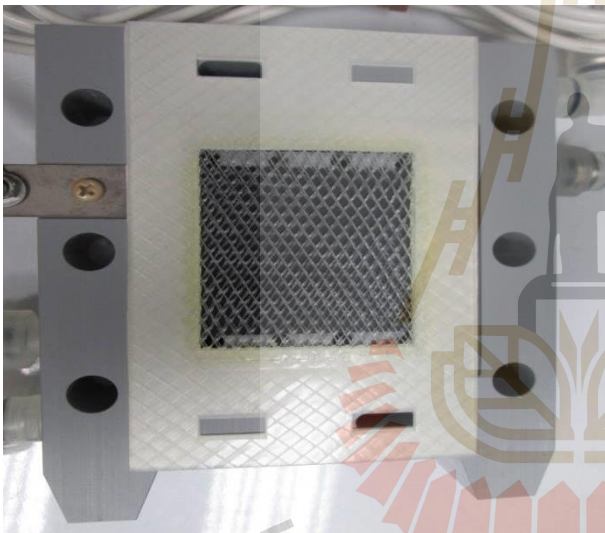
	Constitute	Amount
-	Cathode	1
+	Anode	
K	Cation membrane	5+3
A	Anion membrane	5
EA,EK	Electrolyte frame	2+2
D	Dilute frame	5+2
C	Concentrate Frame	5
Pt	Pt wire	2
S	Softlon	2

รูปภาพ 10 ลักษณะและส่วนประกอบของระบบ ED ในส่วน cathode

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



	Constitute	Amount
-	Cathode	1
+	Anode	1
K	Cation membrane	5+3
A	Anion membrane	5
EA,EK	Electrolyte frame	2+2
D	Dilute frame	5+2
C	Concentrate Frame	5
Pt	Pt wire	2
S	Softlon	2



รูปภาพ 11 ลักษณะและส่วนประกอบของระบบ ED ในส่วน anode



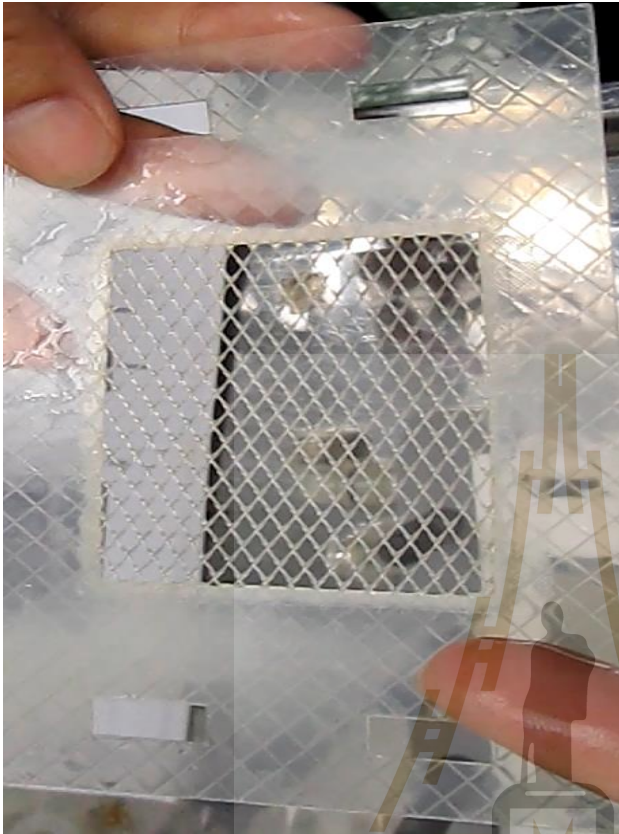
	Constitute	Amount
-	Cathode	1
+	Anode	1
K	Cation membrane	5+3
A	Anion membrane	5
EA,EK	Electrolyte frame	2+2
D	Dilute frame	5+2
C	Concentrate Frame	5
Pt	Pt wire	2
S	Softlon	2

รูปภาพ 12 ลักษณะและส่วนประกอบของระบบ ED ในส่วน cation membrane



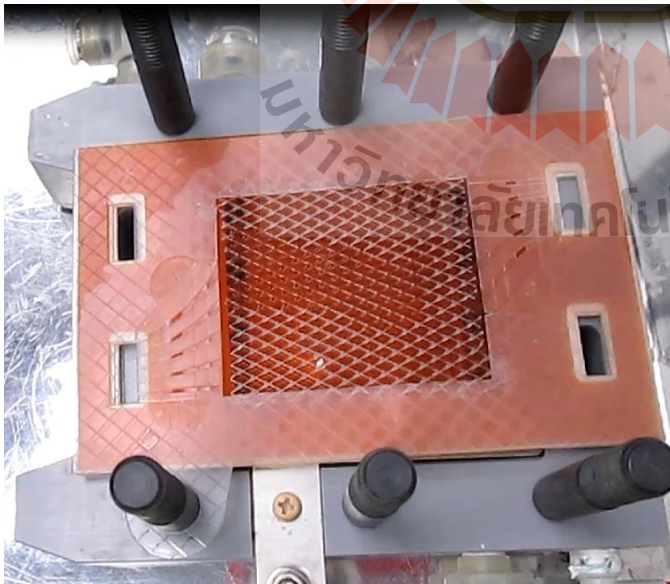
	Constitute	Amount
-	Cathode	1
+	Anode	1
K	Cation membrane	5+3
A	Anion membrane	5
EA,EK	Electrolyte frame	2+2
D	Dilute frame	5+2
C	Concentrate Frame	5
Pt	Pt wire	2
S	Softlon	2

รูปภาพ 13 ลักษณะและส่วนประกอบของระบบ ED ในส่วน anion membrane



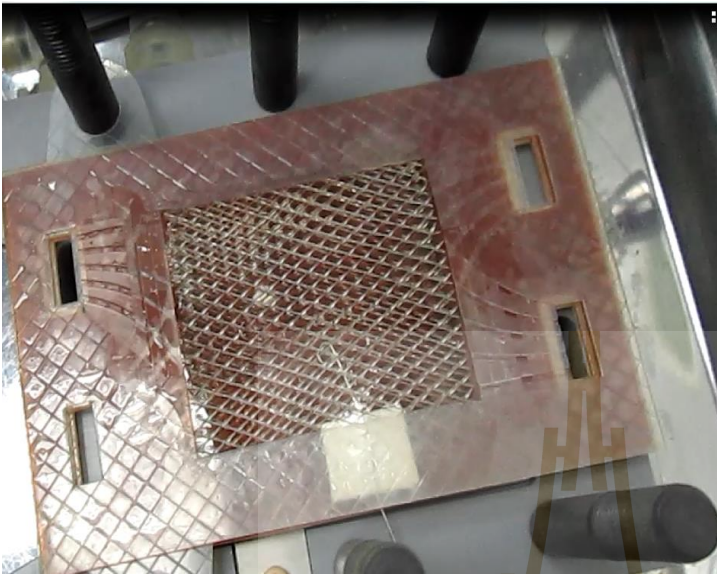
	Constitute	Amount
-	Cathode	1
+	Anode	1
K	Cation membrane	5+3
A	Anion membrane	5
EA,EK	Electrolyte frame	2+2
D	Dilute frame	5+2
C	Concentrate Frame	5
Pt	Pt wire	2
S	Softlon	2

รูปภาพ 14 ลักษณะและส่วนประกอบของระบบ ED ในส่วน electrolyte frame



	Constitute	Amount
-	Cathode	1
+	Anode	1
K	Cation membrane	5+3
A	Anion membrane	5
EA,EK	Electrolyte frame	2+2
D	Dilute frame	5+2
C	Concentrate Frame	5
Pt	Pt wire	2
S	Softlon	2

รูปภาพ 15 ลักษณะและส่วนประกอบของระบบ ED ในส่วน dilute frame



	Constitute	Amount
-	Cathode	1
+	Anode	1
K	Cation membrane	5+3
A	Anion membrane	5
EA,EK	Electrolyte frame	2+2
D	Dilute frame	5+2
C	Concentrate Frame	5
Pt	Pt wire	2
S	Softlon	2

รูปภาพ 16 ลักษณะและส่วนประกอบของระบบ ED ในส่วน concentrate frame



	Constitute	Amount
-	Cathode	1
+	Anode	1
K	Cation membrane	5+3
A	Anion membrane	5
EA,EK	Electrolyte frame	2+2
D	Dilute frame	5+2
C	Concentrate Frame	5
Pt	Pt wire	2
S	Softlon	2

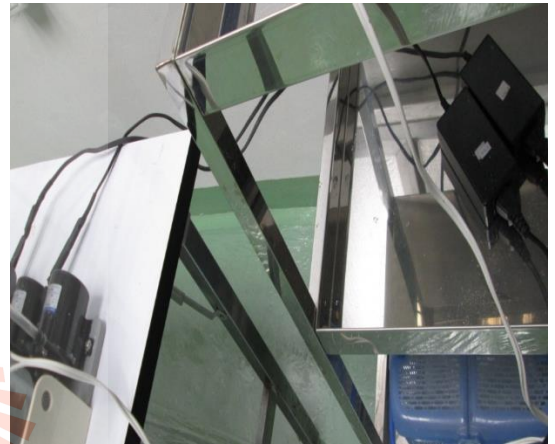
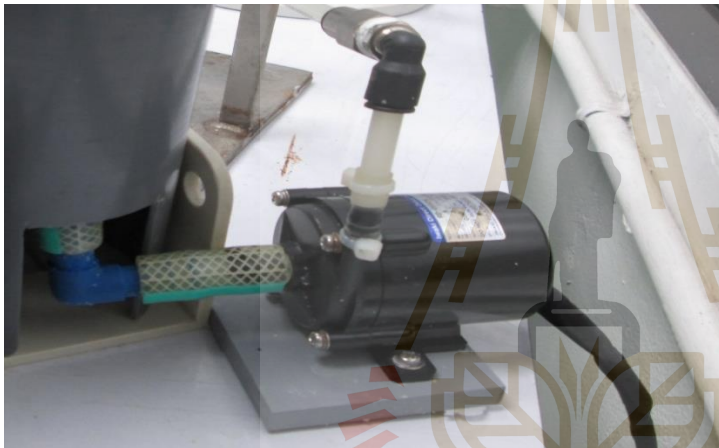
รูปภาพ 17 ลักษณะและส่วนประกอบของระบบ ED ในส่วน Pt wire



	Constitute	Amount
-	Cathode	1
+	Anode	1
K	Cation membrane	5+3
A	Anion membrane	5
EA,EK	Electrolyte frame	2+2
D	Dilute frame	5+2
C	Concentrate Frame	5
Pt	Pt wire	2
S	Softlon	2

รูปภาพ 18 ลักษณะและส่วนประกอบของระบบ ED ในส่วน softlon

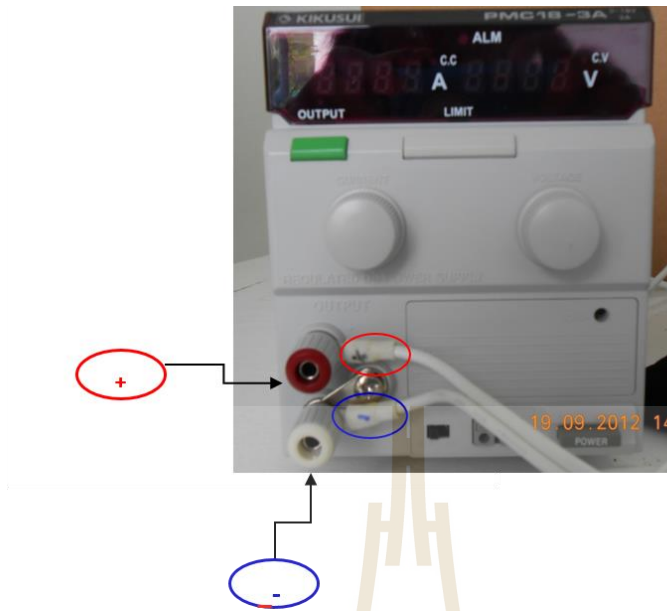
Set of pump IWAKI RD-05



รูปภาพ 19 ปัมที่ใช้ในระบบ ED



รูปภาพ 20 ถังหรือตัวรองรับของเหลว 3 ถัง ในระบบ ED



Rectifier of output: DC 18V/3A and input: AC100V 1φ50/60Hz

รูปภาพ 21 การต่อไฟฟ้าในระบบ ED

ในการที่จะให้มีความเข้มข้นของไอออนเพียงพอ นั้น ขึ้นอยู่กับความสัมพันธ์ระหว่างแรงดันไฟฟ้าของกระแสและเมมเบรนด้วย ซึ่งเป็นไปตามกฎของโอห์ม (Ohm's law) ที่กล่าวไว้ว่าแรงดันไฟฟ้าที่ปลายทั้งสองของตัวนำอยู่ที่สัดส่วนกับค่าแอมป์



รูปภาพ 22 อุปกรณ์สำหรับการตรวจวิเคราะห์ค่า LCD point

3.7 การวิเคราะห์

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

(1) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี Dinitrosalicylic (DNS) method ตามวิธีของ Miller (Miller, 1959) โดยที่จะนำเอาน้ำหมักที่ปั่นเหวี่ยงกรองเอาส่วนใสมา 0.5 มิลลิลิตร และเติม 3, 5-dinitrosalicylic acid reagent 0.5 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองแก้ว จากนั้นนำไปต้มให้ความร้อนเพื่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสี เป็นการเกิดปฏิกิริยาของน้ำตาลกับสารละลายที่เติมลงไปตั้งกล้าวเป็นเวลา 5 นาที และนำไปวิเคราะห์ผลหาค่าความขุ่นของตัวอย่างโดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร พร้อมกับทำการหาความสัมพันธ์ของน้ำตาลโดยแปรผันความเข้มข้นระหว่าง 0.2-1.0 ไมโครโมลต่อ มิลลิลิตร ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดจะถูกนำมาเปรียบเทียบกับกราฟความเข้มข้นน้ำตาล มาตรฐาน (ในที่นี้ใช้น้ำตาลกลูโคส) ที่ทราบความเข้มข้นแล้ว เพื่อให้ได้กราฟมาตรฐานและเทียบกับค่าที่ได้จากตัวอย่างที่ต้องการ

(2) ความเข้มข้นของเซลล์ในน้ำหมักได้ถูกวัดโดยใช้เครื่องวัดความเข้มข้นของการดูดกลืนแสง หรือ spectrophotometer (UV-vis Spectrometer) ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร โดยตัวอย่างน้ำหมัก จะ ถูกนำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 12000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำส่วนที่เป็นอาหารเหลว (Supernatant) ที่ทิ้งไป ก่อนที่จะเติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ให้มีปริมาตรเท่าเดิม และ ทำการเจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม และ เปลี่ยนเป็นความเข้มข้นของเซลล์ (Dry Cell Weight, DCW) กราฟมาตรฐาน (standard calibration curve) สามารถสร้างได้โดยทำการกรองแบคทีเรียที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผ่านกระดาษกรองขนาดรูพรุน 13 มิลลิเมตร, 0.2 ไมโครเมตร (Whatman, England) ร่วมกับการใช้สุญญากาศดูดออก และนำกระดาษกรองที่มีเซลล์ติดอยู่ไปอบเพื่อระเหยน้ำออกที่อุณหภูมิ ที่ผ่านการอบให้แห้ง และ ชั่งน้ำหนักมาแล้ว จากนั้นนำกระดาษกรองดังกล่าวไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานของการวัดความเข้มข้นของเซลล์อยู่ที่ \pm ร้อยละ 5 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

(3) การวิเคราะห์กรดอินทรีย์ชนิดต่างๆที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักกรดซัคซินิกและผลพลอยได้ ที่เป็นกรดอินทรีย์ชนิดอื่นๆ โดยที่ตัวอย่างน้ำหมักจะถูกกรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.2 ไมครอนเพื่อกำจัด เซลล์แบคทีเรีย ก่อนที่จะทำการวิเคราะห์ ส่วนตัวอย่างในด้านตัวทำละลายอินทรีย์จะถูกฉีดเข้าเครื่อง วิเคราะห์โดยตรง ซึ่งการวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารตัวอย่าง ได้ด้วยเครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC) ที่ใช้ detector เป็น UV และ RI-detectors คอลัมน์ที่ใช้แยกสารจะเป็น ประเภท ion exchange column (Aminex HPX-87H, Biorad, Hercules, CA) และถูกวิเคราะห์ด้วย UV ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร จากนั้นทำ การคำนวณปริมาณของกรดซัคซินิกเปรียบเทียบกับพื้นที่ ได้กราฟของสารละลายตัวอย่างมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ใช้อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และมี 0.005 N H₂SO₄ เป็นเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) เพื่อเป็นตัวนำพาตัวอย่างเข้าสู่คอลัมน์เกิดการแยก สาร ที่อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที ที่อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นเวลา 40 นาที

ซึ่งผลได้ สามารถนำมาใช้หาค่าผลผลิต (yield) และผลิตผลของกรดซัคซินิก (productivity) ต่อไป

3.8 Electrodialysis analysis

Removal ratio ของกลูโคส glucose (DG) และ soluble proteins (DP) หาได้จากสูตร:

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

โดยที่ M_T และ M_W คือ มวลของกลูโคสหรือโปรตีนในส่วนบนหรือ top phase ซึ่งหมายถึงส่วนที่ยังคงเป็นผลึก (กรัม) และมวลของกลูโคสหรือโปรตีนทั้งหมด ตามลำดับ

Recovery rate ของกรดซัคซินิกสามารถหาได้จากสมการ:

$$R (\%) = \frac{W_F - W_I}{W_{I, \text{feed}}} \times 100\%$$

โดยที่ R คือ Recovery rate ของกรดซัคซินิก, W_F และ W_I คือจำนวนสุดท้ายและเริ่มต้น (หน่วยเป็นกรัม)

ค่าการนำไฟฟ้า (Conductivity): การนำไฟฟ้าของสิ่งที่ได้รับก่อนและหลังผ่านระบบ ED วัดได้โดยใช้อุปกรณ์พิเศษเฉพาะ

บทที่ 4 ผลการทดลอง

4.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจากหัวมันสำปะหลังสดและการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในถังหมักขนาด 40 ลิตร

เชื้อแบคทีเรีย *Actinobacillus succinogenes* โดยได้ทำการซื้อมาจากศูนย์เก็บรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์แห่งชาติ สหรัฐอเมริกา หรือ American Type Culture Collection (ATCC, USA) โดยมีรหัสกำกับคือ 55618 จากนั้นนักวิจัยได้ทำการเพาะเชื้อด้วยอาหารเหลวที่ใช้หัวมันสำปะหลังสดเป็นแหล่งคาร์บอนหลัก โดยมีจุดประสงค์หลักเพื่อที่จะลดต้นทุนลงให้มากที่สุด เนื่องจากขณะนี้ราคาของหัวมันสำปะหลังสดมีราคาถูก ประมาณ 2.0 บาทต่อกิโลกรัม โดยขั้นตอนต่าง ๆ แสดงในรูปภาพ 23



รูปภาพ 23 แสดงการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจากหัวมันสำปะหลังสด

รูปภาพ 23 แสดงขั้นตอนต่าง ๆ ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจากหัวมันสำปะหลังสด โดยในขั้นตอนแรกนั้น จะนำหัวมันสำปะหลังสดมาทำการล้างจนสะอาด ทำการปอกเปลือก และฝานเป็นชิ้นเล็ก ๆ หนาประมาณ 1-2 เซนติเมตร จากนั้นทำการบดด้วยเครื่องบดเนื้อทั่ว ๆ ไป ซึ่งเครื่องบดเนื้อนี้มีราคาถูก

(ประมาณ 5 พันบาท) ในระหว่างที่บดนั้นจะทำการเติมน้ำลงไปเล็กน้อยเพื่อไม่ทำให้มันสำปะหลังบดนั้นมีลักษณะที่แห้งเกินไป โดยทั่ว ๆ ไปแล้ว จะค่อย ๆ ทำการเติมน้ำในอัตราส่วนร้อยละ 50 โดยน้ำหนักของหัวมันสด ซึ่งข้อได้เปรียบของการใช้หัวมันสำปะหลังสดในการเตรียมน้ำเชื่อมก็คือการใช้น้ำในปริมาณน้อย ทั้งนี้เนื่องจากหัวมันสำปะหลังสดจะมีน้ำอยู่เป็นปริมาณมากอยู่แล้ว หลังจากที่ทำกรบดเสร็จเรียบร้อยแล้ว จะได้หัวมันสำปะหลังบดที่มีลักษณะเป็นของเหลวข้น มีกากใยของไฟเบอร์ปนอยู่จำนวนมาก (รูปบนขวา) ซึ่งโดยทั่วไปแล้ว หัวมันสดอายุ 8 เดือนจำนวน 1 กิโลกรัม จะมีปริมาณแป้งประมาณร้อยละ 30 (300 กรัม)

เนื่องจากหัวมันบดที่ได้นั้น จะมีปริมาณของแป้งและกากใยค่อนข้างสูง ดังนั้นหากทำการให้ความร้อนสูงโดยตรง จะทำให้มีลักษณะเป็นแป้งสุกและจะมีความเหนียวมาก (คล้าย ๆ ขนมันสำปะหลัง) ทำให้ไม่สามารถย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลได้ ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องมีการมีขั้นตอนอีกขั้นตอนหนึ่งเข้ามาคือ การแยกกาก ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้ใช้เครื่องมืออย่างง่ายในการสกัดแป้งคือ เครื่องแยกกาก (รูปล่างซ้าย) โดยมีหลักการทำงานคล้ายกับเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบความเร็วสูง ซึ่งน้ำแป้งจะผ่านรูกกรองขนาด 100 mesh ที่ติดตั้งอยู่ภายในเครื่อง ส่วนกากมันซึ่งมีขนาดใหญ่จะไม่สามารถผ่านรูกกรองนี้ได้ และจะถูกสกัดให้ออกจากเครื่อง โดยมีการทำงานเป็นแบบต่อเนื่อง สามารถกรองน้ำแป้งได้ในอัตราประมาณ 100 กิโลกรัมต่อชั่วโมง ลำดับถัดไปคือการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลกลูโคส (glucose) โดยจะมีการทำงานสองขั้นตอนคือการย่อยครั้งที่ 1 และการย่อยครั้งที่ 2 ซึ่งการย่อยครั้งที่ 1 นั้น จะทำการเพิ่มอุณหภูมิของหม้อต้มให้เป็น 90 องศาเซลเซียสและทำการเติมน้ำย่อยชนิดอัลฟาอะไมเลส (α -amylase) ลงไป เพื่อทำหน้าที่ในการย่อยโมเลกุลของแป้งให้มีขนาดเล็กลง ซึ่งในขั้นตอนนี้จะใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมง โดยจะสังเกตเห็นว่ามีลักษณะเป็นของเหลวที่ใสมากขึ้น และความหนืดจะลดลงเป็นอย่างมาก จากนั้นจะทำการย่อยครั้งที่ 2 โดยทำการลดอุณหภูมิของระบบลงจนเหลือ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมงและทำการเติมน้ำย่อยชนิดกลูโคอะไมเลส (gluco-amylase) ลงไปเพื่อทำการปลดปล่อยน้ำตาลกลูโคสออกมา และได้น้ำเชื่อมจากหัวมันสำปะหลังสด (รูปภาพ 23 ขวาล่าง) มีลักษณะเป็นสีขุ่นขาว ๆ มีค่าของแข็งที่ละลายได้ประมาณ 25 บริกซ์ โดยสามารถวัดได้โดยเครื่อง refractometer ส่วนกากที่แยกได้นี้ สามารถนำไปรวมกับเปลือกของหัวมันสำปะหลังเพื่อใช้ประโยชน์ได้อีกเช่นใช้เป็นสารบ่อนในถังบำบัดระบบไร้อากาศเพื่อผลิตเป็นก๊าซชีวภาพ (ไบโอแก๊ส) สำหรับปั่นกระแสไฟฟ้า ในขั้นสุดท้ายทำการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของอาหารเลี้ยงเชื้อให้ได้ 6.5 โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และเติม Diammonium phosphate (DAP) เพื่อเพิ่มไนโตรเจนในความเข้มข้นประมาณร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก จากนั้นนำมาใส่ในถังหมักขนาด 40 ลิตร ก่อนที่จะทำการนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที



รูปภาพ 24 การเตรียมกล้าเชื้อในถังหมักขนาด 5 ลิตรและกระบวนการหมักกรดซัคซินิกแบบกะในถังหมักขนาด 40 ลิตร

4.2 กระบวนการหมักกรดซัคซินิก (Succinic acid fermentation processes) โดยใช้แบคทีเรียสายพันธุ์ *Actinobacillus succinogenes* ATCC 55618

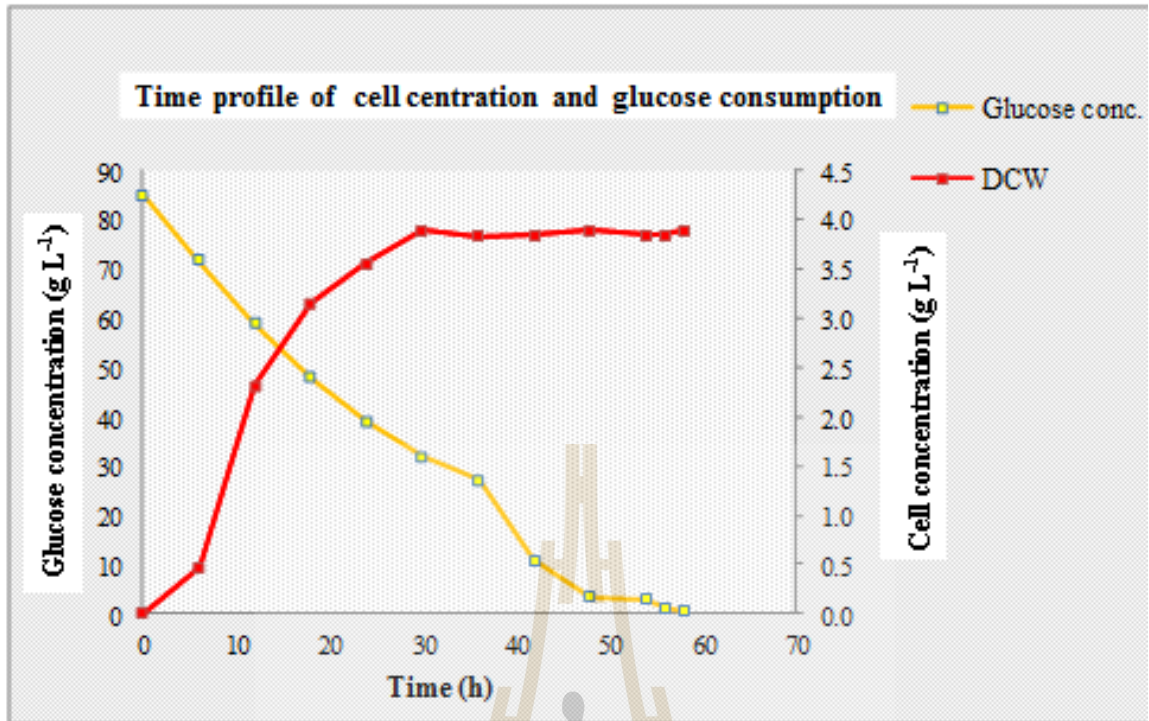
ดังที่กล่าวก่อนข้างต้น *Actinobacillus succinogenes* ATCC 55618 เป็นจุลินทรีย์ที่มักถูกเลือกใช้สำหรับกระบวนการหมักกรดซัคซินิกซึ่งสามารถทนความเป็นกรดซัคซินิกได้สูง ซึ่ง *A. succinogenes* ATCC 556188 คัด แยกมาจากกระเพาะของวัวโดยสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพมิชิแกน อินเตอร์เนชั่นแนล (MBI) ในแลนซิง, มิชิแกน, ประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งสามารถผลิตกรดซัคซินิกให้ค่าความเข้มข้นที่สูงและให้กรดซัคซินิกเป็นผลิตภัณฑ์หลักมากกว่าแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น ๆ ที่ปราศจากการปรับแต่งยีนหรือปรับแต่งสายพันธุ์ สายพันธุ์ดังกล่าวนี้มีลักษณะที่ตามต้องการทั้งหมดและถูกนำมาใช้ในกระบวนการหมักในการศึกษาครั้งนี้

4.2.1 กระบวนการหมักแบบกะ

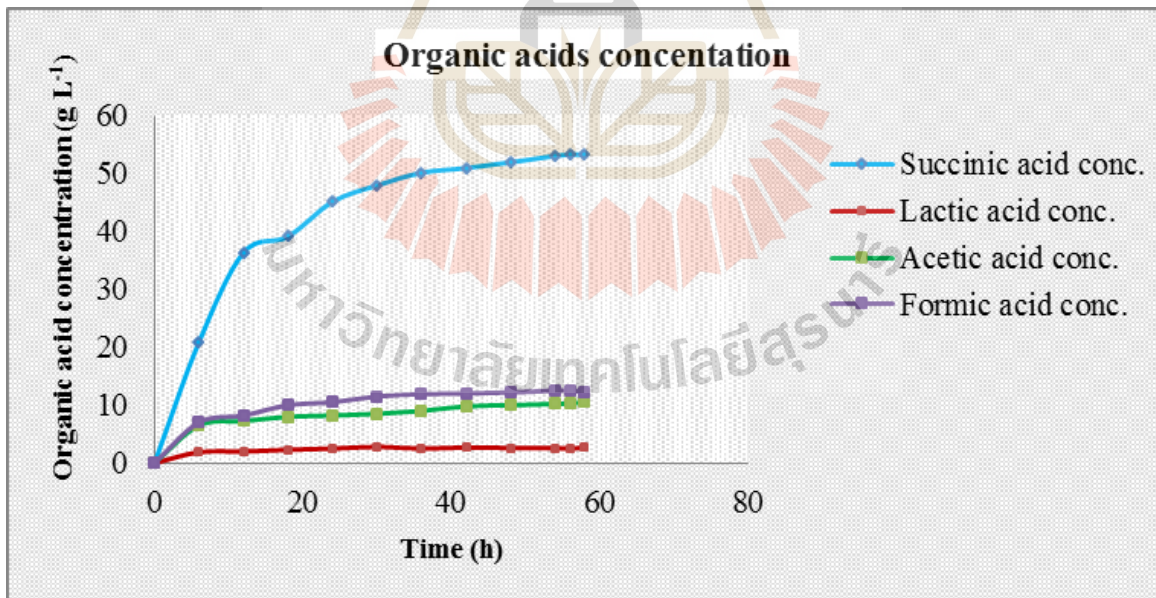
สำหรับกระบวนการหมักกรดซัคซินิกแบบกะในกระบวนการผลิตนั้นมีการใช้หัวเชื้อ 10% โดยปริมาตร โดยทำบ่มเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soya เป็นเวลา 24 ชั่วโมงและถ่ายเชื้อด้วยเทคนิคปลอดเชื้อลงถังปฏิกรณ์ชีวภาพ 2.0 L สำหรับการเจริญของ *A. succinogenes* ATCC 55618 โดยใช้น้ำตาลกลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอนหลัก สำหรับการเพาะเลี้ยงจะเพาะในระบบไร้อากาศ ที่อุณหภูมิ 37 °C ทั้งนี้มีการควบคุมความเร็วในการกวนด้วยความเร็ว 200 rpm และมีการให้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ให้กับน้ำหมักในถังปฏิกรณ์ ด้วยอัตรา 0.5 vvm ค่า pH ในน้ำหมัก มีการควบคุมโดยอัตโนมัติที่ 6.8-7.0 ควบคุมด้วยการเติมสารละลายแคลเซียมคาร์บอเนต CaCO_3 40 wt.% ใน

ระหว่างการหมักแบบกะโดย *A.succinogenes* ATCC 55618 แสดงในรูปภาพ 25 ความเข้มข้นของน้ำตาลลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 40 ชั่วโมงแรกของกระบวนการหมัก ต่อจากนั้นอัตราการบริโภคน้ำตาลจะค่อยๆลดลงและน้ำตาลกลูโคสถูกบริโภคจนหมดโดยเซลล์แบคทีเรียที่ 58 ชั่วโมง การศึกษาครั้งนี้ได้มีการตั้งข้อสังเกตว่า *A.succinogenes* ATCC 55618 มีระยะพักของเซลล์ที่ค่อนข้างสั้นอยู่ที่ชั่วโมงที่ 8 ของกระบวนการหมัก และหากสังเกตจากกราฟจะเห็นได้ว่า ความเข้มข้นเซลล์มีค่าความเข้มข้น ช่วง plateau ของกราฟ ประมาณ 3.8 กรัมต่อลิตร และยังคงเป็นค่าความเข้มข้นดังกล่าวนี้จนถึงสิ้นกระบวนการหมัก ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเหลืออยู่ประมาณ 0.6 กรัมต่อลิตร ภายหลังจาก 58 ชั่วโมง และค่าความเข้มข้นของเซลล์สูงสุดที่ 3.89 กรัมต่อลิตร ในระหว่างการเจริญของเซลล์ ความเข้มข้นของกรดซัคซินิกเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 30 ชั่วโมงแรกและจากนั้นความเข้มข้นก็คงที่ตามแนวโน้มการเจริญของเซลล์

กรดซัคซินิกเป็นผลิตภัณฑ์กรดที่ได้จากกระบวนการหมักเมื่อเกิดการผลิตกรด น้ำหมักในถังปฏิกรณ์จะมีค่า pH ที่ลดลง ซึ่งจำเป็นต้องมีการใช้ตัวปรับค่า (Alkaline neutralize) เพื่อควบคุมค่า pH ของน้ำหมัก ในกรณีนี้ค่า pH จะถูกควบคุมที่ 6.8 ± 0.2 โดยเป็นการควบคุมค่า pH แบบอัตโนมัติ ส่วนใหญ่ของการศึกษาเกี่ยวกับการผลิตกรดซัคซินิกจะมีการใช้ $MgCO_3$ เป็นตัว Alkaline neutralize และเพื่อให้ได้มาซึ่งความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ที่สูงในกระบวนการหมัก แต่ในทางปฏิบัติสำหรับอุตสาหกรรมการหมักกรดซัคซินิกแล้วนั้น ค่าใช้จ่ายของการใช้ $MgCO_3$ นั้นไม่มีความเหมาะสมเท่าที่ควร ในศึกษานี้จึงได้มีการปรับเปลี่ยน ตัว Alkaline neutralize จาก $MgCO_3$ มาเป็น $Ca(OH)_2$ การทดลองจะเห็นได้ว่า ผลของความเข้มข้นของกรดซัคซินิกเมื่อใช้ $Ca(OH)_2$ เป็นตัว Alkaline neutralize ให้ผลการทดลองที่ใกล้เคียงกับการใช้ $MgCO_3$ โดยที่ความเข้มข้นสุดท้ายกรดซัคซินิกในถังปฏิกรณ์ชีวภาพมีความเข้มข้นที่ 53.25 กรัมต่อลิตร ส่งผลให้ได้ผลผลิตที่ 0.62 กรัมต่อกรัมของสารตั้งต้น โดยที่ค่าผลผลิตนี้ถือเป็นค่าผลผลิตที่ดีมีการยอมรับในงานเอกสารที่ใช้สายพันธุ์เดียวกัน (Li และคณะ, 2011) แม้ว่ากรดซัคซินิกจะเป็นผลิตภัณฑ์หลักแต่ก็ยังมีกรดอะซิติก, กรดฟอร์มิก, และกรดแลคติก เป็นกรดผลพลอยได้ โดยที่ความเข้มข้นสุดท้ายของกรดฟอร์มิก, กรดแลคติก, และกรดอะซิติกเป็น 12.3, 2.7 และ 10.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และความเข้มข้นของกรดซัคซินิกและความเข้มข้นกรดอินทรีย์ผลพลอยได้ ในระหว่างกระบวนการหมักแบบกะนั้นแสดงในรูปภาพ 26



รูปภาพ 25 แผนภาพแสดงการใช้น้ำตาลกลูโคสของเซลล์และความเข้มข้นของเซลล์ในระหว่างกระบวนการหมักแบบกะเทียบกับเวลาโดย *A. succinogenes*. ATCC 55618



รูปภาพ 26 แผนภาพแสดงความเข้มข้นกรดซักซินิกและกรดอินทรีย์ผลพลอยได้ในระหว่างกระบวนการหมักแบบกะเทียบกับเวลาโดย *A. succinogenes*. ATCC 55618

อย่างไรก็ตามการเจริญโตของเซลล์ขึ้นอยู่กับปริมาณสารอาหารและสารอาหารที่จำกัดอยู่ในกระบวนการหมักแบบกะ สำหรับกระบวนการหมักขั้นแรก (Upstream process) นั้นสามารถปรับให้มีการเพิ่มผลผลิตทั้งตัวผลิตภัณฑ์ และการผลิตเชิงปริมาตรของกระบวนการหมักได้ ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจที่จะศึกษากระบวนการหมักซ้ำแบบกะ (Repeat-batch mode) ที่ซึ่งสามารถแก้ปัญหาด้านความเข้มข้นของสารตั้งต้นให้สามารถเพิ่มสารตั้งต้นได้อย่างต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

4.2.2 กระบวนการหมักแบบกึ่งกะ (Fed-batch fermentation)

เนื่องจากกรดซัคซินิกและกรดอินทรีย์ที่เป็นผลพลอยได้อื่น ๆ มีลักษณะที่เป็นพิษต่อเซลล์แบคทีเรียสูงทำให้เกิดปรากฏการณ์ที่เรียกว่าการยับยั้งจากผลิตภัณฑ์ (product inhibition effect) อีกทั้งความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นก็มีอิทธิพลต่อประสิทธิภาพของการหมักเช่นกัน ดังนั้นกลศาสตร์ของการหมักจึงแตกต่างจากกระบวนการหมักแบบทั่ว ๆ ไป โดยสมการของโมนอดในรูปแบบของการยับยั้งจากสารอาหารสามารถแสดงได้ดังนี้

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

โดยสมการข้างบนพบว่า สามารถที่จะลดรูปลงเมื่อค่าความเข้มข้นของสารตั้งต้นเพิ่มขึ้นได้ดังนี้

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

ในขณะเดียวกันค่าการยับยั้งจากผลิตภัณฑ์ที่ส่งผลกระทบต่ออัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อสามารถแสดงโดยสมการ

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

และแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของการเจริญเมื่อทำการรวมกันของการยับยั้งทั้งจากสารตั้งต้นและผลิตภัณฑ์แล้วจะได้สมการ

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

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 ($g L^{-1}$), C_s^* = ความเข้มข้นวิกฤตของน้ำตาลที่แบคทีเรียทนได้สูงสุด Critical substrate concentration ($g L^{-1}$), C_p = ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์หรือผลพลอยได้ product or by-product concentration ($g L^{-1}$), C_p^* = ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์หรือผลพลอยได้สูงสุดที่เกิดการยับยั้งต่อแบคทีเรีย Critical product concentration ($g L^{-1}$), เลขยกกำลัง n และ a_i เป็นค่าค่าที่สำหรับสารตั้งต้นและผลิตภัณฑ์ ตามลำดับ

นอกจากนี้ ช่วงเวลาของ lag phase ยังพบว่ามีความสัมพันธ์อย่างยิ่งกับค่าความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลกลูโคส โดยพบว่าช่วงเวลา lag phase (T_L) จะยาวนานขึ้นเมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลมีมากขึ้น โดยมีความสัมพันธ์ตามสมการของ Belehradec 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

$$\frac{dX}{dt} = \mu X$$

โดยที่ X คือความเข้มข้นของเซลล์ ($g L^{-1}$)

ส่วนสมการของ Leudeking–Piret ได้ถูกออกแบบสำหรับค่าผลิตผล (productivity) ของผลิตภัณฑ์ดังสมการ

$$\frac{dC_P}{dt} = (\alpha_p \mu + \beta_p) X$$

โดยที่ α_p และ β_p คือ ค่าที่เกี่ยวข้องกับการเจริญ growth associate และค่าที่ไม่เกี่ยวข้องกับการเจริญ non-growth associate ตามลำดับ

ส่วนอัตราการใช้น้ำตาลของเชื้อจะขึ้นอยู่กับความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของเชื้อ การเกิดผลิตภัณฑ์ และการรักษาสภาวะของเซลล์ดังสมการ

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

โดยที่

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

โดยที่ m คือ ค่าการรักษาสภาวะของเซลล์นั่นเอง

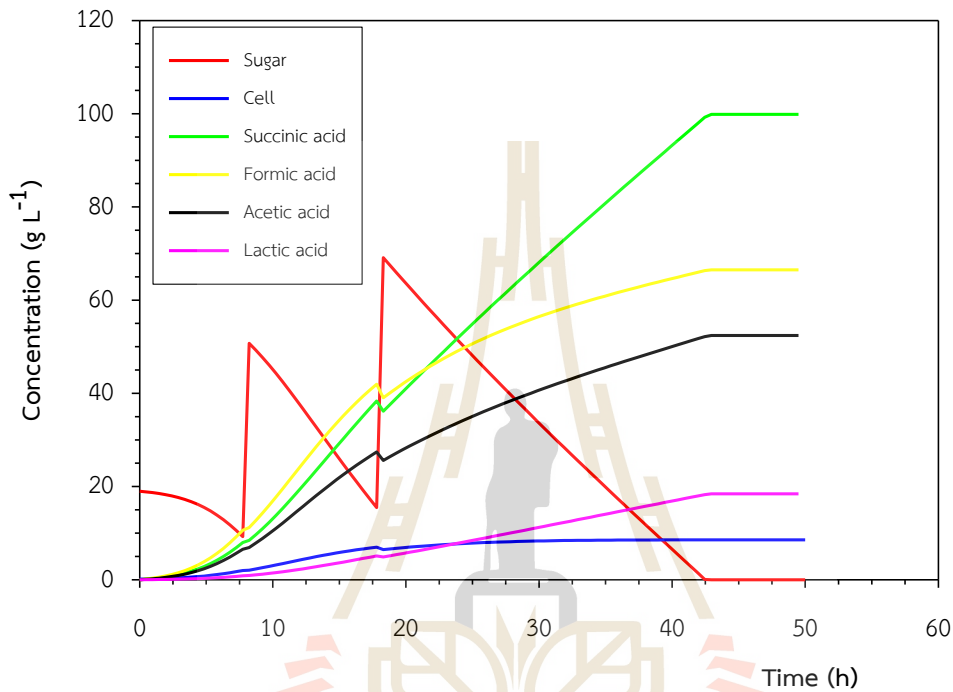
เนื่องจากค่าคงที่ทางจลศาสตร์ต่าง ๆ ของการหมักกรดซัคซินิกมีจำนวนมาก ดังนั้นนักวิจัยจึงได้หาค่าเหล่านี้จากการทบทวนวรรณกรรม โดยตาราง 3 ได้สรุปค่าต่าง ๆ ดังนี้

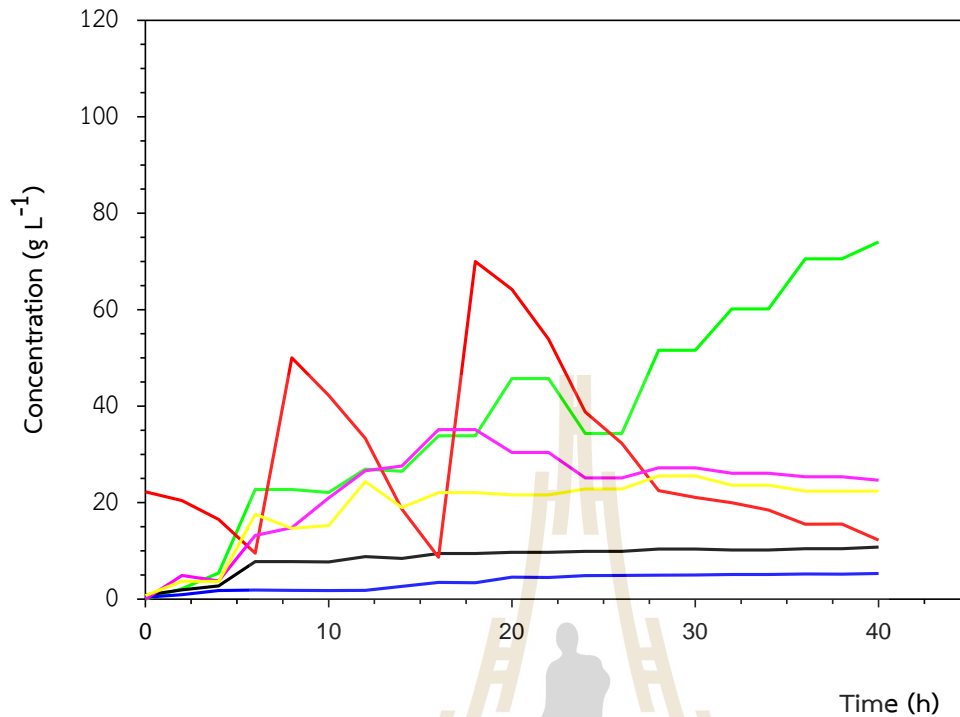
ตาราง 3 การสรุปค่าคงที่ต่าง ๆ สำหรับจลศาสตร์การหมักกรดซัคซินิกจากน้ำตาลกลูโคส (Lin *et al.*, 2008)

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	$g L^{-1}$
ฟอร์มेट	16	$g L^{-1}$
อะซีเตต	44.2	$g L^{-1}$
แล็กเตต	100	$g L^{-1}$
κ	-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 มีจุดประสงค์หลักในการเพิ่มประสิทธิภาพของการหมักโดยทำการเติมอาหารเหลวเข้มข้นเป็นครั้ง ๆ เพื่อหลีกเลี่ยงการเกิดการยับยั้งเนื่องจากสารตั้งต้น ในที่นี้ได้ใช้โปรแกรม Visual Basic for Applications (VBA) มาช่วยในการคำนวณออกแบบ โดยทำการแบ่งการหมักเป็น 3 ช่วง และใช้วิธีการ Runge-Kutta 4 มาใช้ในการทำแบบจำลองทางคณิตศาสตร์

สำหรับอัตราการเจริญ การใช้กลูโคสและการเกิดผลิตภัณฑ์ โดยเฉพาะกรดซักซินิก ซึ่งรูปภาพ 27 แสดงการทำแบบจำลองทางคณิตศาสตร์และการเปรียบเทียบผลการทดลอง ซึ่งพบว่าได้ผลิตภัณฑ์ต่ำกว่าความคาดหมายจากการทำแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ค่อนข้างมาก โดยผลการทดลองพบว่าสามารถทำการหมักกรดซักซินิกได้ประมาณ 74 กรัมต่อลิตรซึ่งไม่เป็นตามที่ได้คาดคะเนไว้ ซึ่งสาเหตุนี้ อาจจะเกิดเนื่องมาจากการกำหนดค่าตัวแปรต่าง ๆ ที่ไม่ถูกต้อง ซึ่งจะได้ทำการปรับปรุงในลำดับถัดไป

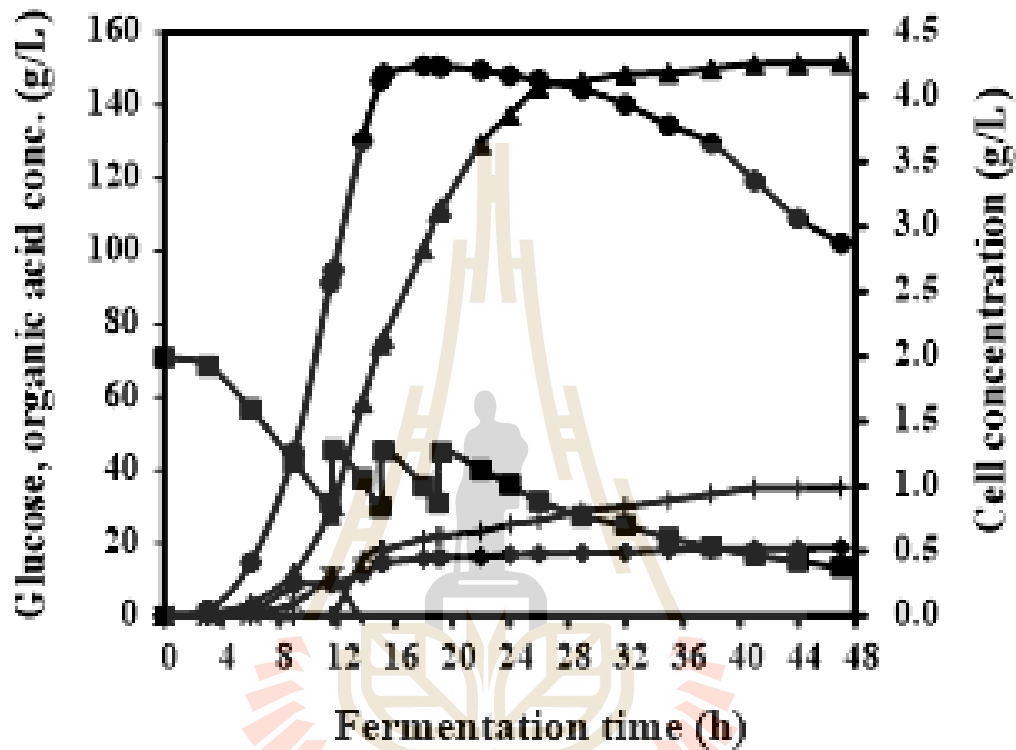




รูปภาพ 27 แสดงการการเจริญของเซลล์ การใช้กลูโคส และการเกิดผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ โดยทำการเปรียบเทียบระหว่างการทำแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ (บน) และผลที่ได้จากการทดลอง (ล่าง)

รูปภาพ 28 แสดงระยะเวลาในการเจริญของเซลล์ ปริมาณการใช้กลูโคสและความเข้มข้นของกรดอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ในระหว่างการหมักจริงของ *A. succinogenes* ATCC 55618 แบบกึ่งกะในถังหมัก ซึ่งจากการวิเคราะห์ตัวอย่างด้วย HPLC นั้นจะพบว่า ถึงแม้ว่ากรดซัคซินิกจะเป็นผลผลิตหลักแต่เขื่อดังกล่าวก็ยังผลิตกรดอะซิติก กรดฟอร์มิก และกรดแลคติก เป็นผลพลอยได้ของกระบวนการหมัก การหมักแบบกะ แสดงให้เห็นข้อจำกัดของการหมักที่สามารถผลิตกรดซัคซินิกสูงสุดได้ไม่เกิน 95 กรัมต่อลิตร เมื่อพิจารณาจากการหมักกรด polysaccharide and ganoderic โดยใช้ *Ganoderma lucidum* (Liu et al., 2008a) ในทางตรงกันข้ามการหมักแบบกึ่งกะจะมีการเติมแหล่งคาร์บอน ซึ่งช่วยป้องกันการยับยั้งการเจริญ (cell growth limitation) และการถูกยับยั้งโดยกลูโคสที่เป็นสารตั้งต้น (substrate inhibition) ดังนั้นในงานวิจัยนี้ สารตั้งต้นจะถูกป้อนลงไป โดยใช้กระบวนการหมักแบบกึ่งกะ เพื่อวัดปริมาณการผลิตกรดซัคซินิก ในงานวิจัยนี้จะเปรียบเทียบและประเมินประสิทธิภาพการผลิตกรดซัคซินิก ในรูปภาพ 28 แสดงให้เห็นว่าในช่วง 12 ชั่วโมงแรกปริมาณกลูโคสถูกนำมาใช้อย่างรวดเร็ว โดยที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 70 กรัมต่อลิตรไปจนถึงถึงประมาณ 30 กรัมต่อลิตร และสอดคล้องกับการหมักแบบกะ ที่ทำให้มีการเจริญเติบโตของเซลล์สูง สารละลายกลูโคสที่มีความเข้มข้นสูงถูกป้อนเข้าไปในถังหมักโดยการปั๊มลูกกลิ้ง ในช่วง 12-24 ชั่วโมงเพื่อให้ระดับกลูโคสอยู่ในช่วง 30-40 กรัมต่อลิตร หลังจากการหมัก 6 ชั่วโมงความเข้มข้นของเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างมากมีค่าสูงสุด 3.99 และ 4.24 กรัมต่อลิตร โดยใช้กลูโคสและ

แป้งมันสำปะหลัง ตามลำดับ นอกจากนี้ความเข้มข้นของกรดซัคซินิกมีค่าสูงสุดเท่ากับ 151.44 และ 100.54 กรัมต่อลิตร โดยสารตั้งต้นคือ มันสำปะหลังและกลูโคสตามลำดับ ในทางตรงกันกรดอินทรีย์ที่เป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้ เพิ่มขึ้นเล็กน้อยโดยเฉพาะอย่างยิ่งกรดแลคติกและกรดฟอร์มิกซึ่งเกือบจะหายไปหลังจากป้อนกลูโคสในครั้งแรก อย่างไรก็ตามมีการสร้างกรดไพรูวิกที่มีความเข้มข้นไม่เกิน 1.0 กรัมต่อลิตรในทั้งสองกรณี ผลผลิตที่ได้จากการหมักแบบกึ่งกะ คือ 3.22 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

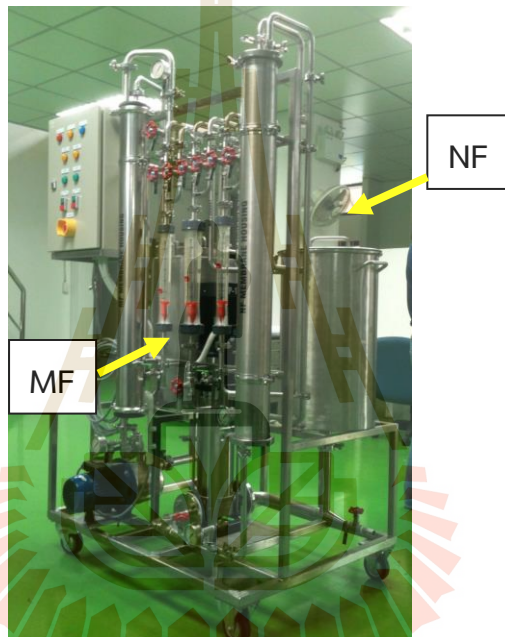


รูปภาพ 28 แสดงการการเจริญของเซลล์ การใช้กลูโคส และการเกิดผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ในระหว่างการหมักจริงแบบกึ่งกะ

4.3 การทำบริสุทธิ์เบื้องต้น

ภายหลังจากที่กระบวนการหมักเสร็จสิ้นลง พบว่าน้ำตาลในระบบได้ถูกใช้ไปจนหมดแล้ว และเกิดเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ เช่นกรดอินทรีย์และจำนวนของเซลล์ที่เพิ่มมากขึ้น ในโครงการวิจัยนี้ได้ทำการทำบริสุทธิ์น้ำหมักเบื้องต้นโดยใช้ระบบการกรอง 2 ระบบคือ 1 ไมโครฟิวเตรชัน (microfiltration, MF) และ 2 นาโนฟิวเตรชัน (nanofiltration, NF) ซึ่งระบบแรกนั้น จะเป็นการใช้เยื่อแผ่นบางที่มีขนาดของรูกรอง 0.1 ไมครอน เพื่อทำหน้าที่ในการแยกเซลล์ของแบคทีเรียออกจากน้ำหมักก่อนเป็นอันดับแรก (รูปภาพ 29) ซึ่งการแยกเซลล์ออกก่อนนี้ มีความสำคัญต่อขั้นตอนการทำบริสุทธิ์กรดซัคซินิกเป็นอย่างมาก ทั้งนี้เนื่องจากภายในเซลล์นั้นประกอบไปด้วยสารชีวเคมีต่าง ๆ มากมาย ซึ่งหากเซลล์ของแบคทีเรียแตก จะทำให้สารต่าง ๆ เหล่านั้นไหลออกมาปนเปื้อนในน้ำหมักมากขึ้น ทำให้เพิ่มความยุ่งยากต่อ

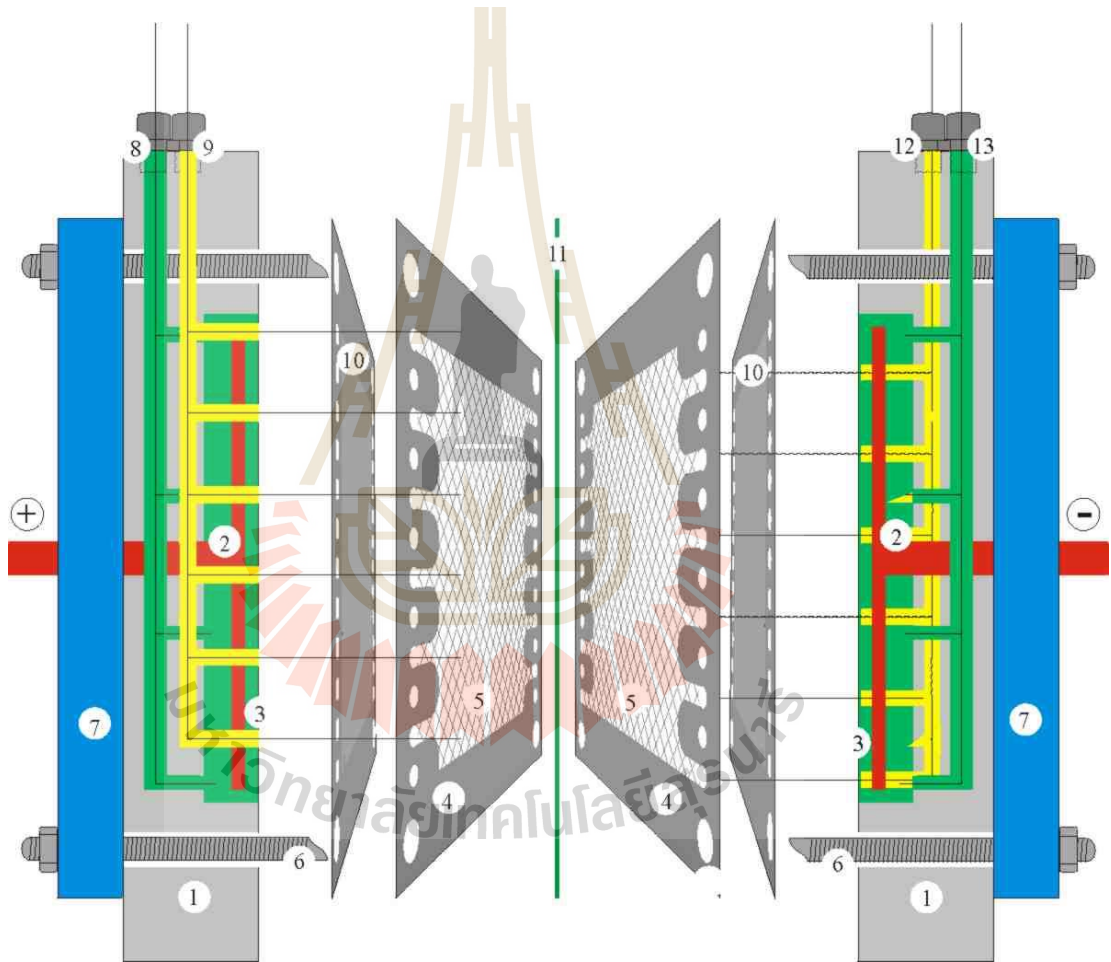
กระบวนการทำบริสุทธิ์มากขึ้นไปอีก กระบวนการไมโครฟิวเตรชั่นจะใช้สำหรับการแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักเท่านั้น ซึ่งส่วนที่กรองได้ (filtrate) จะมีลักษณะที่ใสแต่จะยังมีสีเหลืองอยู่ ซึ่งเป็นส่วนประกอบของโปรตีนและสารโมเลกุลใหญ่อื่น ๆ อยู่ในขั้นตอนถัดมาจะเป็นการใช้ระบบนาโนฟิวเตรชั่นในการกำจัดสารดังกล่าวออกไป ซึ่งสารเหล่านี้อาจจะตกค้างอยู่บนผิวหน้าของเมมเบรนในระบบอิลคโตรไดอะไลซิส ทำให้ประสิทธิภาพการทำงานลดลงได้ ระบบนาโนฟิวเตรชั่นที่ใช้ในโครงการวิจัยนี้เป็นแบบท่อม้วน (spiral wound) มี molecular weight cut off ที่ 100 ดาลตัน โดยมีการใช้ปั๊มแรงดันสูงประมาณ 10 บาร์ในการเพิ่มความดันในด้านของสารป้อน ซึ่งโปรตีนและสารโมเลกุลใหญ่อื่น ๆ จะมีขนาดใหญ่กว่ารูพรุนของเยื่อแผ่น ทำให้ไม่สามารถผ่านเยื่อแผ่นได้ ในขณะที่กรดอินทรีย์ต่าง ๆ จะมีขนาดเล็กกว่าและจะแพร่ผ่านเยื่อแผ่นไปเป็นส่วนกรอง (permeate หรือ filtrate) ซึ่งส่วนที่กรองได้นี้จะได้นำไปศึกษาถึงระบบอิลคโตรไดอะไลซิสต่อไป



รูปภาพ 29 ระบบการกรองแบบไมโครฟิวเตรชั่นและนาโนฟิวเตรชั่น (บน) และตัวอย่างของน้ำหมักส่วนต่าง ๆ ที่ผ่านขั้นตอนการกรองแล้ว

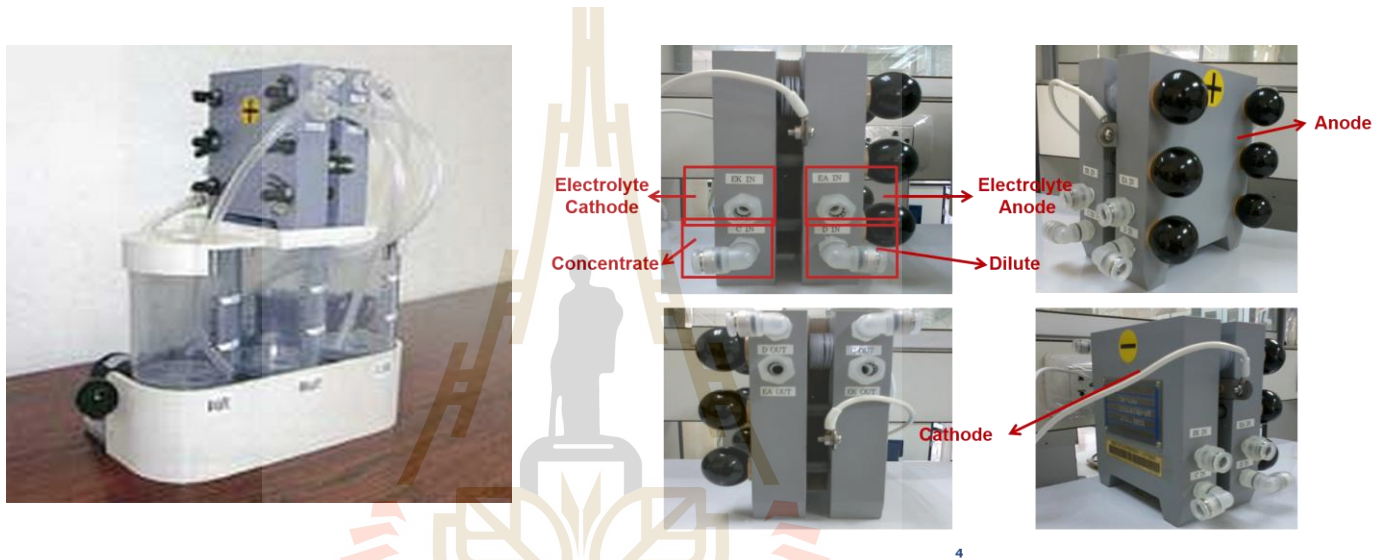
4.4 การศึกษาระบบบิโเลคโตรไดอะไลซิส (Electrodialysis)

เมมเบรนจะถูกคั่นด้วย spacers (หมายเลข 5) ซึ่งจะถูกรวบรวมด้วยแป้นเมมเบรนเมพื้นที่ผิวร่วมกับบิโเลคโตรไลต์ร่วมกับซีลรอบ ๆ แผ่นรองพื้นป้องกันไม่ให้แผ่นปิดสัมผัสกัน รูปแบบ Spacer ซ้อนกันขึ้นรูปด้วยรูของท่อ ซึ่งจัดหรือแบ่งเป็นทางโดยจะอยู่ในทางที่แยกออกจากกันแบ่งออกเป็น สองระบบ หรือสองช่องทางที่แตกต่างกัน ด้วยวิธีนี้จะมีการสร้างวงจรของสารละลายเจือจาง (dilute) ส่วนตัวเซลล์มีความแตกต่างกันในขนาดของแผ่นเยื่อที่ใช้รูปร่างและความหนาโดยที่มีพื้นฐานเป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาด 11×11 ซม. มี active membrane window ประมาณ 8×8 ซม. (ส่วนที่เหลือปกคลุมด้วยซีล (หมายเลข 4) และพื้นที่ด้านเข้า / ทางออก (inlet/outlet areas) (รูปภาพ 30)

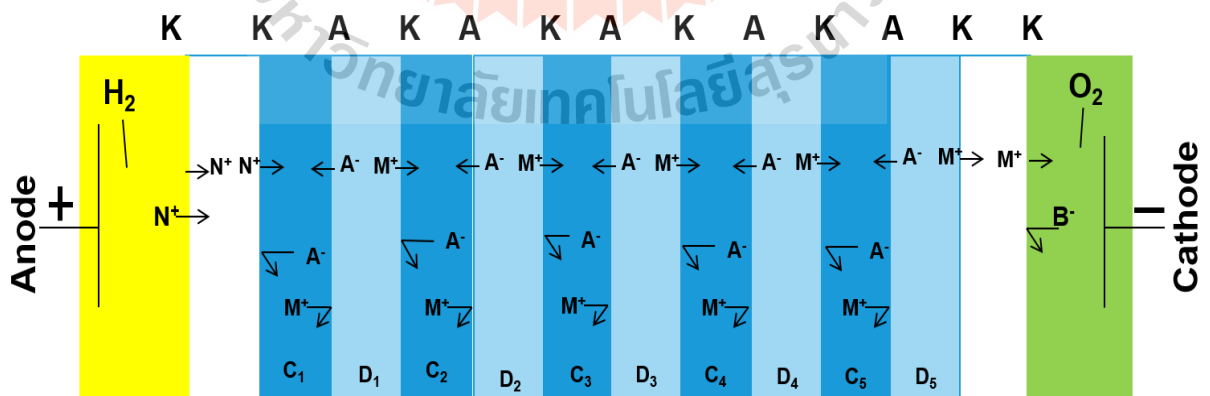


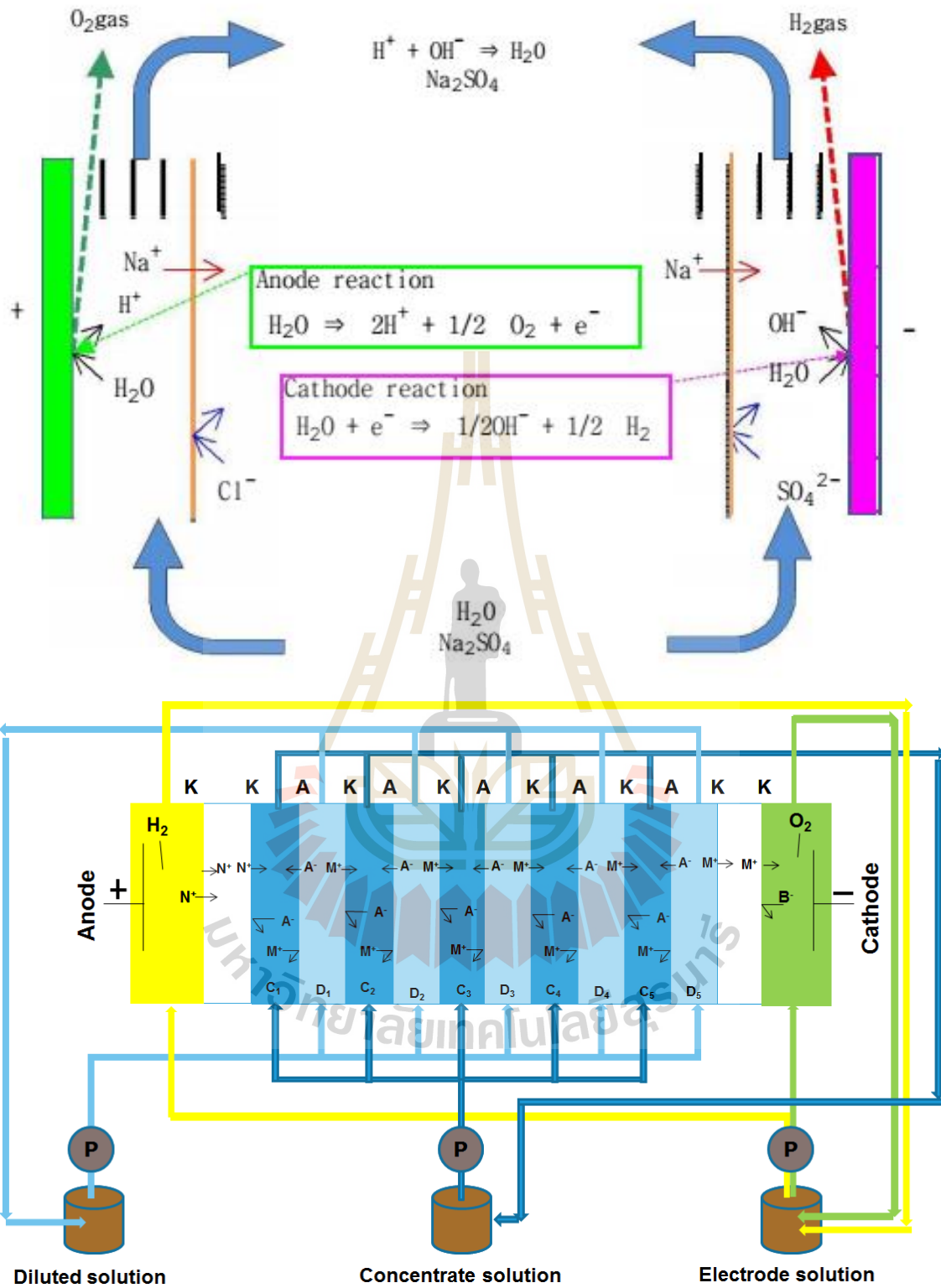
- 1: Polypropylene end plate
- 2: Electrode
- 3: Electrode chamber
- 4: spacer-sealing PVC
- 5: Spacer fabric
- 6: Screws
- 7: Steel frame
- 8: Inlet anode cell
- 9: Inlet concentrate cell
- 10: cation exchange membrane
- 11: AAM
- 12: Inlet diluate cell
- 13: Inlet cathode chamber

รูปภาพ 30 หลักการทั่วไปของเซลล์ Electrodialysis ที่ใช้ในการศึกษานี้



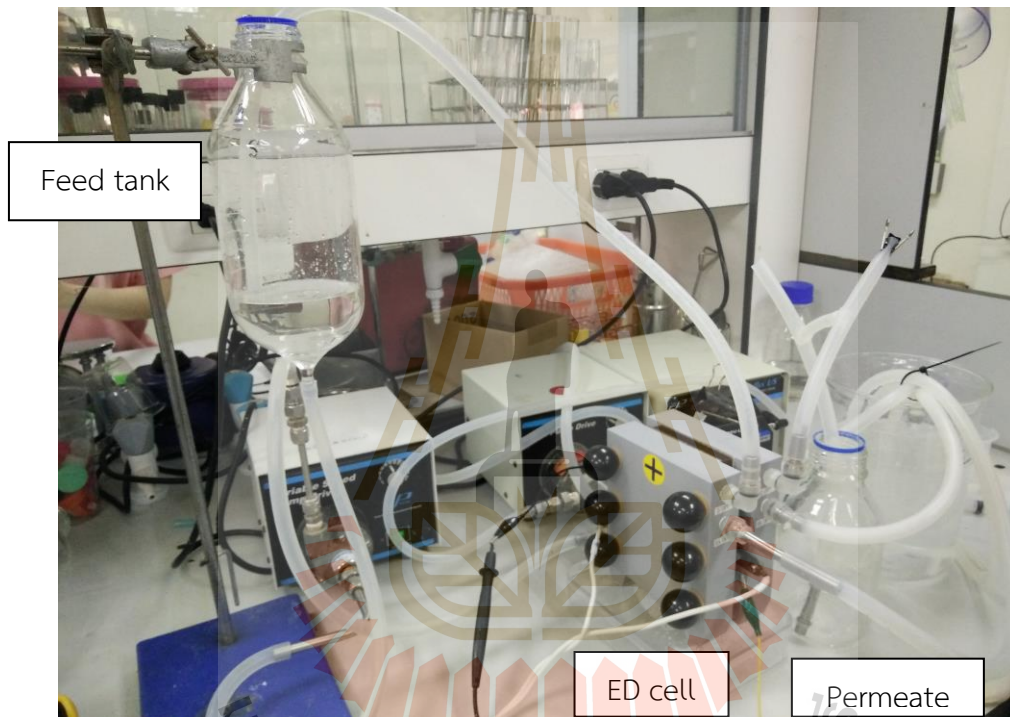
การออกแบบการดำเนินการในระบบ ED แสดงดังรูปภาพ 31





รูปภาพ 31 อุปกรณ์ ED ในภาพรวมที่ใช้ในการศึกษา

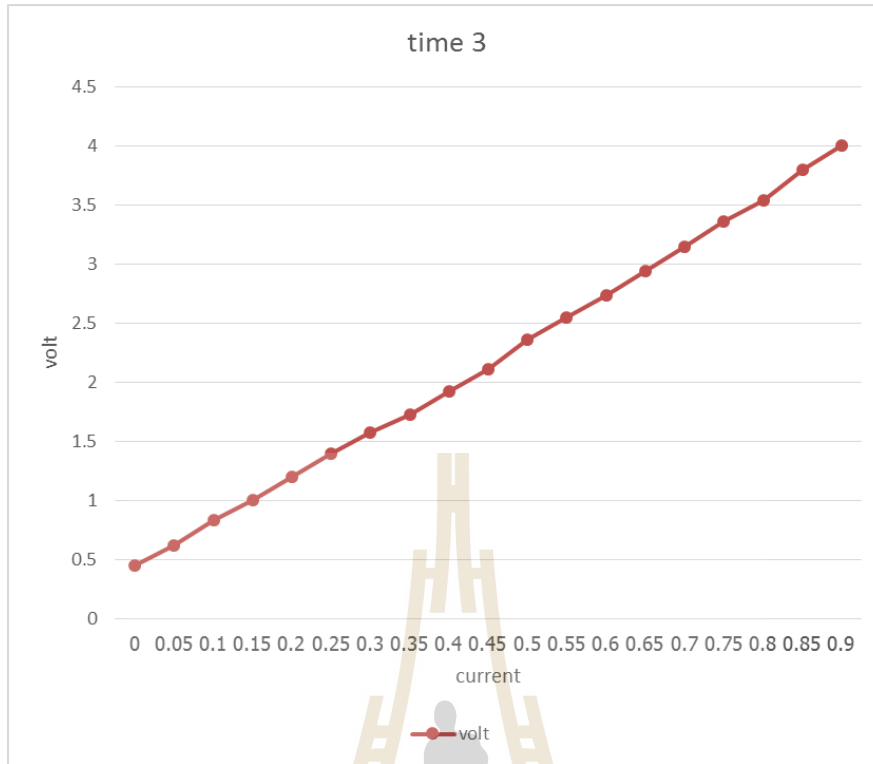
อิเล็กโทรไดอะไลซิส เป็นเซลล์อิเล็กโทรไลต์ที่ใช้แยกไอออนจากสารละลายโดยให้ไอออนเคลื่อนที่ผ่านเยื่อแลกเปลี่ยนไอออน ซึ่งเป็นเยื่อบางๆ ไปยังขั้วไฟฟ้าที่มีขั้วตรงกันข้าม สารละลายจึงมีความเข้มข้นลดลง ดังนั้นจึงใช้หลักการนี้ในอุตสาหกรรมหลาย ๆ อย่าง เช่นการทำน้ำจืดจากน้ำทะเล และการทำความสะอาดเข้มข้นไอออนต่าง ๆ เป็นต้น ในโครงการ วิจัยนี้ได้มีการประยุกต์ใช้ระบบดังกล่าวในการแยกไอออนของกรดอินทรีย์เช่นซักซิเนต แล็กเตท อะซิเตท ออกจากระบบโดยใช้น้ำหมักที่ได้ผ่านกระบวนการไมโครฟิวเตรชันและนาโนฟิวเตรชันมาแล้วเป็นสารป้อน ซึ่งการต่อระบบอิเล็กโทรไดอะไลซิสนั้นแสดงในรูปภาพ 32



รูปภาพ 32 การจัดชุดการทดลองอุปกรณ์อิเล็กโทรไดอะไลซิสเพื่อทดลองสารสังเคราะห์

4.4.1 การหาค่า Limit current density (LCD) และ constant voltage operation

LCD เป็นสิ่งที่สำคัญสำหรับการดำเนินงานในระบบ ED โดยที่เราต้องใช้ ED ภายใต้ LCD เพื่อหลีกเลี่ยงการแยกน้ำ หากเราใช้ระบบ ED เกินกว่าค่า LCD เป็นสาเหตุทำให้การแยกน้ำจะเกิดขึ้น ตามด้วยทำให้เกิดการเปลี่ยนค่า pH และการแยกน้ำทำให้เกิดการสร้างระดับและความเสียหายของเมมเบรน ดังนั้นเราต้องตรวจสอบ LCD ในตอนแรกของการดำเนินการทดลอง



รูปภาพ 33 การหาค่า LCD ระหว่างกระแสที่ให้กับความต่างศักย์ที่ได้รับ

ในขั้นแรกนั้นจะเป็นการหา limiting current density (LCD) ซึ่งเป็นค่าที่มีความสำคัญกับระบบมาก เนื่องจากการหาค่าความสัมพันธ์ระหว่างแรงต้านทานทางไฟฟ้าและค่าของกระแสที่ถูกใช้ในระบบ ซึ่งค่า LCD นี้จะเป็นค่าเฉพาะของระบบ ขึ้นอยู่กับชนิดของเมมเบรน ชนิดของสารละลายที่ใช้ในการทดลอง การจัดเรียงเมมเบรนระหว่าง cation และ anion exchange membrane และสภาวะของการทดลองต่าง ๆ โดยจะทำการติดตั้งอุปกรณ์วัดความต่างศักย์ (volt meter) จากนั้นทำการปรับค่ากระแสตรง (direct current) จาก 0-0.9 แอมแปร์ ในขณะเดียวกันก็จะทำการบันทึกค่าโวลต์ที่อ่านได้และจะได้กราฟดังรูปภาพ 33

4.5 การทดสอบระบบ electro dialysis bipolar membrane (EDBM) technique

อิเล็กโทรไดโอะลิซิส เป็นเซลล์อิเล็กโทรไลต์ที่ใช้แยกไอออนจากสารละลายโดยให้ไอออนเคลื่อนที่ผ่านเยื่อแลกเปลี่ยนไอออน ซึ่งเป็นเยื่อบาง ๆ ไปยังขั้วไฟฟ้าที่มีขั้วตรงกันข้าม สารละลายจึงมีความเข้มข้นลดลง โดยที่ ED แตกต่างจาก RO และ UF ตรงที่ไอออนจะถูกแยกออกจากน้ำโดยเคลื่อนที่ผ่านเยื่อเมมเบรน ในขณะที่ RO และ UF น้ำจะเป็นตัวที่เคลื่อนที่ผ่านเยื่อเมมเบรน แยกออกจากสิ่งเจือปนที่ละลาย

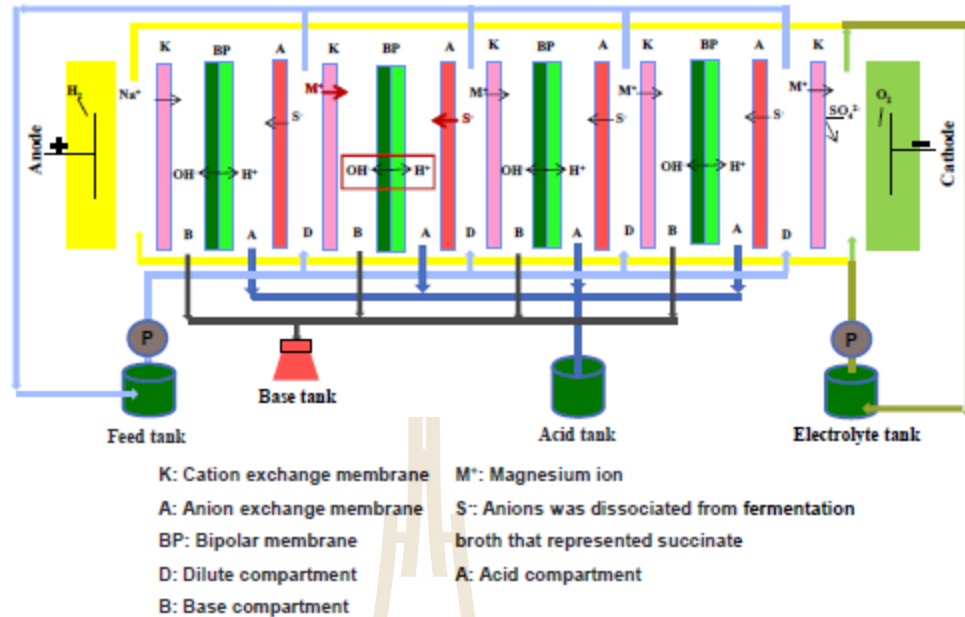
อยู่ในโมดูลของ ED ประกอบด้วยขั้วไฟฟ้าอิเล็กโทรด 2 ขั้ว คือ แอโนด (ขั้วบวก) และแคโทด (ขั้วลบ) และชั้นเยื่อเมมเบรนแบบพิเศษ คือ เมมเบรนชนิดที่ยอมให้ออนบวกลอดผ่านไปได้แต่ไม่ยอมให้ออนลบผ่าน เรียกว่า Cation transfer membrane และเมมเบรนชนิดที่ยอมให้ออนลบลอดผ่านไปได้แต่ไม่ยอมให้ออนบวกผ่าน เรียกว่า Anion transfer membrane โดยเมมเบรนทั้งสองชนิดนี้จะถูกเรียงสลับกันมากกว่า 100 แผ่น อยู่ระหว่างขั้วอิเล็กโทรดสองขั้ว น้ำดิบที่ต้องการกำจัดออนจะถูกสูบเข้าในช่องว่างระหว่างเมมเบรน น้ำไหลออกช่องหนึ่งจะเป็นน้ำบริสุทธิ์ และอีกช่องหนึ่งจะเป็นน้ำที่มีเกลือ (อออน) เข้มข้น เมื่อปล่อยกระแสไฟฟ้าผ่านอิเล็กโทรด อออนบวก (Na^+ , Ca^{2+} ...) จะเคลื่อนที่ไปขั้วลบ (แคโทด) แต่จะถูกกักไว้ด้วยเมมเบรนชนิด Anion transfer membrane และอออนลบ (Cl^- , SO_4^{2-} ...) จะเคลื่อนที่เข้าหาประจุบวก (แอโนด) แต่จะถูกกักไว้ด้วยเมมเบรนชนิด Cation transfer membrane ผลจากการเคลื่อนที่ของอออนต่างๆ จะทำให้ช่องกลางไม่มีอออนเหลืออยู่ ในขณะที่ช่องข้างๆ จะมีอออนไปสะสมเพิ่มขึ้น ศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ประมาณ 1000 โวลต์

ในการศึกษาการแยกกรดซัคซินิกได้ทำการศึกษาดทดลองระบบอิเล็กโทรไดอะไลซิส ด้วย Electrodialyzer รุ่น SelemionTM DW-Lab Specification (แสดงดังรูปภาพ 34) สำหรับการจัดตั้งประกอบอุปกรณ์ในการดำเนินงานแสดงดังรูปภาพ 31 ทั้งยังมีการจ่ายกระแสไฟตรงภายใต้วงจรเรียงกระแสหรือแหล่งจ่ายกระแสไฟแบบตั้งโต๊ะแบบ DC ที่ส่งผลกระตุ้นสารอิเล็กโทรไลต์ในเวลาเดียวกัน นอกจากนี้กระแสไฟตรงจะถูกสร้างขึ้นในระบบเมมเบรน กระแสไฟฟ้าตรงนี้สร้างแรงผลักดันของเกลือแมกนีเซียมของกรดอินทรีย์ เช่นแมกนีเซียมซัคซิเนต, แมกนีเซียมแลคเตตและแมกนีเซียมอะซิเตตผ่านสารป้อนหรือ feed และส่วนของด้านเพอร์มิเอต (permeate) ของเมมเบรน จากนั้น anion และ cation จะแพร่ข้ามไปยัง anion-exchange membrane และ cation-exchange membrane และเกิดการรวมตัวกันกับไฮดรเจนอออนที่ปล่อยออกจากเมมเบรนแบบสองขั้วที่อยู่ในชั้นกลาง เกิดฟอร์ตัวขึ้นได้กรดอินทรีย์และแมกนีเซียมไฮดรอกไซด์ ($\text{Mg}(\text{OH})_2$) ใน ช่องกรดและช่องเบสตามลำดับ จากนั้นนำมาเก็บที่ถังกรดและถังเบสตามลำดับ ในขณะที่เดียวกันสารประกอบที่ไม่ใช่ไอออนิกเช่นโปรตีน ฯลฯ ถูกนำกลับมาย้อนกลับเข้าไปในถังหมักโดยได้แสดงไว้ดังรูปภาพ 3๓ สำหรับการศึกษาดทดสอบใช้น้ำหมักหลังจากผ่านกระบวนการหมัก วิธีการศึกษาระบบจะมีการตั้งค่าความหนาแน่นกระแสไฟฟ้าคงที่ 0.9 แอมแปร์ (A) จากน้ำหมักที่ได้จากกระบวนการหมักในขั้นตอนก่อนหน้า พบว่า succinate แยกตัวเป็นไอออนิก ขณะที่ส่วนประกอบอื่น ๆ เช่นโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต มีไอออนไม่ไอออนิกหรือไม่ใช่ไอออนิก (Lee et al., 2008) สำหรับระบบ electrodialysis ทำการศึกษาในขณะที่การหมักเกิดขึ้น ส่วนของของเหลวจากถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (fermentor) สามารถดำเนินการผ่านระบบ Electrodialysis และเมื่อไอออนของ succinate ถูกกำจัดหรือแยกออกไป ของเหลวส่วนที่เหลือรวมทั้งเซลล์แบคทีเรียและไอออนิกที่ไม่ไอออนิกจะย้อนกลับเข้าไปในถังหมักอีกครั้ง ในขณะเดียวกันแมกนีเซียมซัคซิเนตจะแยกออกจากกันและแยกออกเป็นไอออนแมกนีเซียมและแยกไอออนออกเป็นส่วน ๆ ทั้งนี้แมกนีเซียมอออนบวกจะทำปฏิกิริยากับเยื่อแลกเปลี่ยนไอออนบวกที่มีกลุ่มไฮดรอกซิล (OH^-) ซึ่งแยกออกจากน้ำเกิดเป็นแมกนีเซียมไฮดรอกไซด์ ($\text{Mg}(\text{OH})_2$) ในทำนองเดียวกัน anion succinate จะถูกย้ายข้าม anion exchange เมมเบรนและพร้อมกันทำปฏิกิริยากับโปรตอน H^+ ที่แยกออกจากกันได้เป็นกรดซัคซินิก ข้อดีอย่างหนึ่งคือไม่เพียงแต่สามารถแยกกรดซัคซินิกออกจากสารปนเปื้อนอื่นๆได้แล้ว ยังมีแมกนีเซียมไฮดร

อกไซด์ซึ่งจะถูกส่งกลับสู่ถังหมักเพื่อรักษา pH ที่เหมาะสม ส่วนสารอาหารเช่นกลูโคสและโปรตีน จะไม่ถูกขนส่งผ่านเมมเบรน แต่ยังคงย้อนกลับเข้าไปยังถังหมักเพื่อดำเนินการกระบวนการหมักต่อไป และระบบ ED ถูกหยุดหรือสิ้นสุดลงเมื่อกระแสไฟฟ้าลดลง อย่างไรก็ตามที่ไม่เป็นไปตามที่คาดไว้เนื่องจากมีแมกนีเซียมไอออนจำนวนมากซึ่งทำให้เกิดการฟาวลิง (fouling) ของเมมเบรน หลังการใช้งานในระยะเวลาสั้น ๆ



รูปภาพ 34 แสดงการจัดชุดการทดลองระบบ electro dialysis bipolar membrane (EDBPM)



รูปภาพ 35 แสดงแผนผังการประกอบจัดชุดการทดลองระบบ electrodesalination bipolar membrane (EDBPM)

ในรูปภาพ 35 พบว่าประสิทธิภาพของการแยกกรดซัคซินิคจากน้ำหมักโดยใช้ระบบ ED โดยเกิดปรากฏการณ์ที่ไอออนแบบชั่วคราวเสถียรเมื่อสารป้อนที่มีไอออนโลหะเช่น Ca^{2+} และ Mg^{2+} (Lee *et al.*, 1998) การเกิดไอออนโลหะในน้ำหมัก ทำให้เกิดการตกตะกอนของไอออนโลหะบนผิวเมมเบรนในระบบ ED ได้ นอกจากนี้ยังมีรายงานอีกว่าระยะเวลาในการดำเนินงานที่ยาวขึ้นมีประสิทธิภาพการใช้พลังงานและ recovery ratio ที่สูงขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้แอมโมเนียมแลคเตตในน้ำหมักกับสารละลายมาตรฐานแอมโมเนียมแลคเตต (abiotic solution) (Timbuntam *et al.*, 2008) ทั้งนี้สามารถอธิบายได้จากการที่มีสิ่งสกปรกหรือสิ่งเจือปน (impurities) มาในน้ำหมักเช่น โปรตีนและไอออนโลหะที่เกิดเป็นฟิล์มติดบนพื้นผิวเมมเบรน ส่งผลให้ผลการทดลองไม่ดี และส่งผลต่อการกระบวนการเก็บเกี่ยวผลผลิตจากน้ำหมักในขั้นตอนสุดท้าย ซึ่งแก้ปัญหาคาบการ fouling นี้ได้ด้วยการใช้กระบวนการทำให้บริสุทธิ์ของ microfiltration (MF) และ nanofiltration (NF) ในการ pre-treatment น้ำหมักเบื้องต้นก่อนเข้าระบบ ED จะทำให้กระบวนการทำให้บริสุทธิ์กรดซัคซินิคมีประสิทธิภาพมากขึ้น



รูปภาพ 36 การเกิด membrane fouling จากไอออนของแมกนีเซียม

Electrodialysis เป็นกระบวนการแยกไอออนที่รวมเอาเยื่อแลกเปลี่ยนไอออนและความแตกต่างศักย์ไฟฟ้าเพื่อแยกไอออนไนซ์หรือโมเลกุลที่เป็นไอออนไม่อิมตัวออกไปในสารละลายในน้ำโดยการขนส่งผ่านเยื่อแลกเปลี่ยนไอออนภายใต้ผลของสนามไฟฟ้าโดยตรง ในงานวิจัยนี้จึงนำมาใช้ในการเก็บเกี่ยวผลผลิตที่เป็นกรดอินทรีย์จากน้ำหมัก เช่นเดียวกับงานอื่นๆที่ใช้ในการแยกผลิตภัณฑ์ Citric, acetic, fumaric และ propionic acid (Anthony *et al.*, 1992, Lixin *et al.*, 2000, Pinacci, 2002; Prochaska *et al.*, 2014) นอกจากนี้สำหรับการแยกน้ำหมักด้วย Electrodialysis ผลที่ได้คือได้ กรดแลคติกความเข้มข้น 92.4 กรัมต่อลิตร ซึ่งถือได้ว่าเป็นเทคนิคการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้ (Wee *et al.*, 2005)

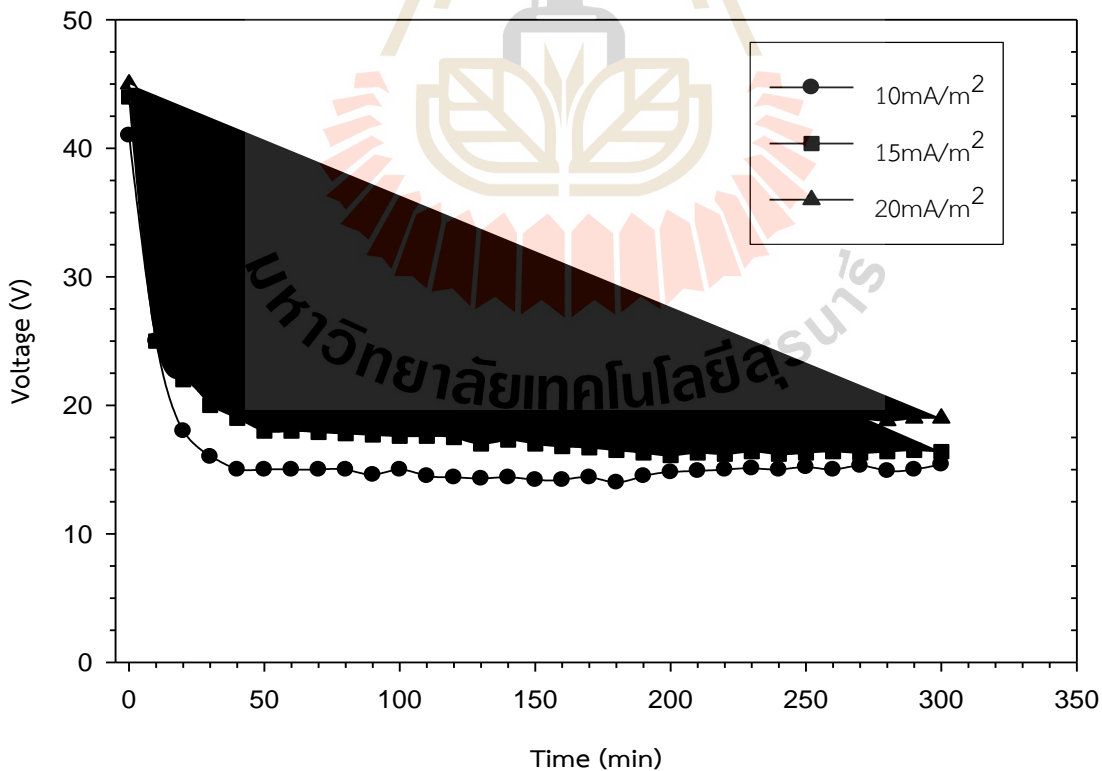
ในน้ำหมักจะเกิดการแยกตัว succinate เป็นไอออนิกขณะที่ส่วนประกอบของน้ำหมักตัวอื่นๆ เช่นโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตมีไอออนไม่อิมตัวมากหรือไม่ใช่ไอออนิก ดังนั้นหากมีการใช้กระบวนการ Electrodialysis ในขณะที่การหมักเกิดขึ้นระบบของเหลวจากถังปฏิกรณ์ชีวภาพหรือ fermentor สามารถทำงานได้ผ่านระบบ Electrodialysis และเมื่อไอออนของ succinate ถูกกำจัดออกไป ตัวอย่างน้ำหมักส่วนที่เหลือรวมถึงเซลล์และไอออนิกที่ไม่อิมตัวหรือไอออนไม่อิมตัวจะย้อนกลับเข้าสู่ระบบการหมักได้ ซึ่งถือเป็นการทำงานแบบต่อเนื่อง (Lee *et al.*, 2008) ในขณะเดียวกันในการปรับค่า pH ในระหว่างการหมัก มีการใช้ด่างที่เป็นแมกนีเซียมคาร์บอเนต ทำให้เกิดเป็น magnesium succinate และแยกแตกตัวออกเป็นไอออนแมกนีเซียมและ succinate ion แยกออกจากกัน โดยที่แมกนีเซียมไอออนบวกจะอยู่ในเยื่อแผ่นแลกเปลี่ยนไอออนบวกพร้อมกับกลุ่มไฮดรอกซิล (OH^-) ซึ่งถูกแยกออกจากน้ำทำให้เกิดแมกนีเซียมไฮดรอกไซด์ ($\text{Mg}(\text{OH})_2$) ในทำนองเดียวกัน anion succinate จะถูกย้ายข้ามอนุภาคแลกเปลี่ยน anion และพร้อมกันทำปฏิกิริยากับโปรตอน H^+ ซึ่งแตกตัวออกจากน้ำ รวมกันแล้วเกิดเป็น

กรดซัคซินิกซึ่งเป็นผลผลิตที่เราต้องการ ดังนั้นจึงถือได้ว่าเป็นข้อได้เปรียบอย่างหนึ่งคือไม่เพียงแต่แยกใน ส่วนของผลิตภัณฑ์ที่เป็นกรดซัคซินิกได้เท่านั้น แต่ยังมีเมกนีเซียมไฮดรอกไซด์ซึ่งจะถูกย้อนกลับเข้าสู่ถัง หมักเพื่อรักษา pH ให้คงที่ตามที่ต้องการ

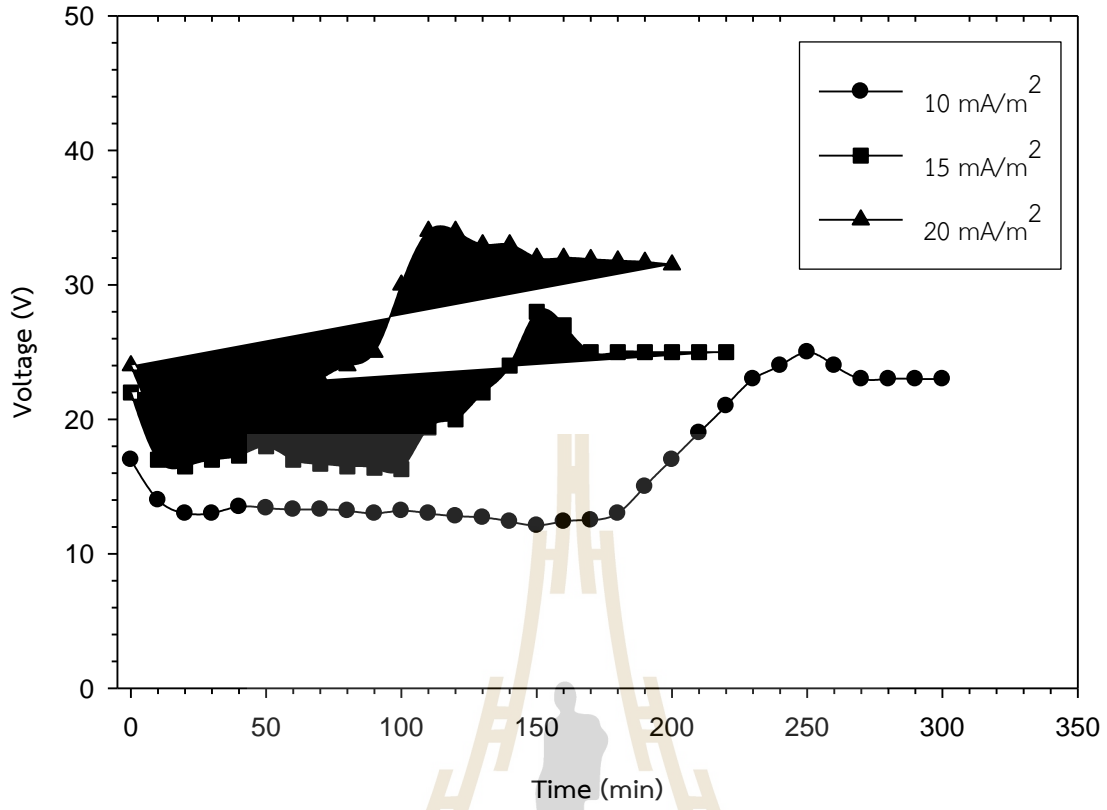
สิ่งสำคัญที่ต้องคำนึงในกระบวนการทำบริสุทธิ์กรดซัคซินิกคือสารอาหารต่างๆในอาหารหมัก เช่น กลูโคสและโปรตีนที่ไม่สามารถผ่านเมมเบรนไปได้ โดยจะย้อนกลับเข้าสู่ถังหมักตามเดิมเพื่อให้ กระบวนการหมักต่อไป ดังนั้นระบบ Electrodialysis นี้จึงถือได้ว่าเป็นการใช้เพื่อแยกกรดซัคซินิกออก จากระบบในระหว่างดำเนินการหมักไปได้ นอกจากนี้กระบวนการ extractive fermentation ที่กล่าวถึง นี้แสดงให้เห็นว่าสามารถที่จะเพิ่มผลผลิตและเพิ่ม volumetric productivity เพื่อป้องกันการยับยั้ง ผลิตภัณฑ์ระหว่างกระบวนการหมักที่เกิดจากกรดซัคซินิกเอง (product inhibition) ส่งผลให้การผลิตมี ประสิทธิภาพสูงในแง่ของการลดต้นทุนการดำเนินงานและผลผลิตการผลิตที่สูงขึ้น เช่นเดียวกับในปี 2007 ที่มีนักวิจัยจัดสร้างระบบ integrated membrane-bioreactor-electrodialysis system เพื่อให้ สามารถเก็บเกี่ยวกรดซัคซินิกที่ให้ผลผลิตสูงและมีประสิทธิภาพสูง (Meynial Salles et al., 2008) ซึ่งถือ เป็นต้นแบบในการดำเนินโครงการนี้เช่นกัน อีกทั้งเทคนิคนี้ยังสามารถใช้ประยุกต์เพื่อแยกกรดซัคซินิกออก จากน้ำหมักระหว่างกระบวนการหมัก(simultaneously fermentation) ที่ถือเป็นกระบวนการที่ เรียกว่า extractive fermentation มีผลทำให้สามารถเพิ่มผลผลิตการผลิตและค่า volumetric productivity โดยไม่มีปรากฏการณ์ยับยั้งของผลิตภัณฑ์ (product inhibition) จากกระบวนการตั้ง ข้างต้นทำให้การผลิตมีประสิทธิภาพสูง สามารถลดต้นทุนการดำเนินงานและการผลิต เช่นเดียวกับ การที่ Meynial-Salles และคณะได้ทำการศึกษาการแยกกรดซัคซินิกด้วยการใช้เยื่อแผ่นโดยจัดสร้างระบบ ที่เรียกว่า integrated membrane-bioreactor-electrodialysis system ที่ทำให้กระบวนการผลิตกรด ซัคซินิกที่มีผลผลิตสูงและมีประสิทธิภาพ (Meynial-Salles et al., 2008) โดยงานวิจัยของ Meynial-Salles พบว่าในส่วนของ succinate ion นั้นจะมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นใน concentrate stream ขณะที่ diluted stream จะถูกไหลเวียนกลับเข้าสู่ในถังหมักอีกครั้งทำให้ในกระบวนการหมักจะมี การผลิตที่สูงขึ้น ทำให้ความเข้มข้นของกรดซัคซินิกและความเข้มข้นของเซลล์ สูงขึ้น สรุปได้ว่า monopolar แบบ bioreactor ร่วมกับกระบวนการ electrodialysis ที่พัฒนาขึ้นในการศึกษาดังกล่าว ทำให้ระดับกรดอินทรีย์ลดลง ผลผลิตถูกย้ายออกไปอยู่ในส่วน concentrate stream ในหน่วยปฏิบัติการ downstream processes เป็นผลให้ลดการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ ผลของระบบนี้ สามารถผลิตกรดซัคซินิกที่ให้ผลผลิตสูง (1.35 โมล / โมล) หรือ (83 กรัมต่อลิตร) และมีปริมาตรการผลิต สูง (10.4 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง) ตามลำดับ นอกจากนี้ bipolar membrane eletrodialysis bipolar membrane eletrodialysis ดังกล่าวมีการใช้ low current efficiency และพลังงานที่ต่ำมากเพื่อ เปลี่ยนกรดซัคซินิกจากสารละลายโซเดียมซัคซิเนต (Fu et al., 2014) ด้วยเหตุนี้ในโครงการนี้จึงทำการ ทดสอบระบบการแยกกรดซัคซินิกต่อยอดและพัฒนาประยุกต์การทำงานจากงานวิจัยที่ทำการทบทวน บรรณกรรมเพื่อให้ได้ผลการทดลองตามที่ตั้งเป้าหมายเอาไว้

4.5.1 การศึกษาปริมาณกระแสที่ใช้ในระบบ electro dialysis bipolar membrane (EDBM) technique

สำหรับระบบ electro dialysis bipolar membrane (EDBM) technique ระหว่างการทำงานจะเกี่ยวข้องกับแรงดันไฟฟ้าของภายในเซลล์เมมเบรน ซึ่งเป็นไปตามทฤษฎีของ Donnan potential ทั้งนี้ปรากฏการณ์ดังกล่าวเกิดขึ้นจากการที่มีการเชื่อมต่อเมมเบรนและการแพร่กระจายภายในเมมเบรนแลกเปลี่ยนและในสารละลายรวมทั้งแรงดันไฟฟ้าทั่วแผ่นเยื่อ bipolar membrane (Zhang et al., 2009) ดังนั้นจึงมีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับจำนวนช่องการไหลของสาร (compartment), ความเข้มข้นของสารละลายและชนิดของเมมเบรน เพื่อให้ตรงตามเอกสารที่กล่าวไว้ จึงทำให้ทดลองโดยลดแรงดันไฟฟ้าพร้อมกับทำการบันทึกเวลาและการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในระบบ electro dialysis ซึ่งผลการศึกษาแสดงออกดังรูปภาพ 38 จากรูปกราฟเห็นได้ชัดว่าความหนาแน่นกระแสใดๆสักมีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงที่คล้ายคลึงกันในขณะเดียวกันก็มีความแตกต่างกันไป การกำหนดค่า แรงดันไฟฟ้าของแผ่นเมมเบรนแต่ละชนิดมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อความหนาแน่นกระแสเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ผลการศึกษาของโครงการในหัวข้อนี้ได้ข้อมูลเป็นไปในแนวทางเดียวกันกับงานของ Fu และคณะ, 2014 อีกด้วย



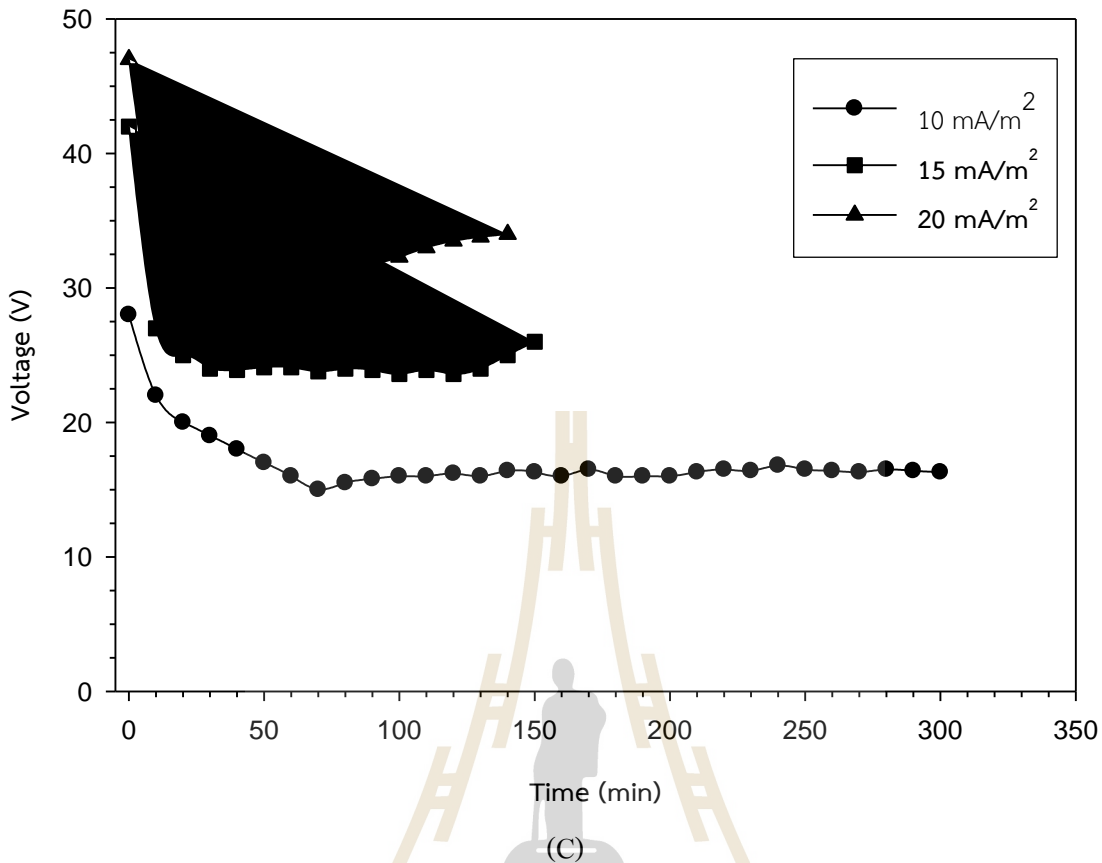
(A)



Time (min)

(B)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รูปภาพ 37 ผลของปริมาณกระแส (voltage) ในเมมเบรนแต่ละส่วนเทียบกับเวลา โดยที่ (A) คือ Bipolar-Anion-bipolar, (B) คือ bipolar-Cation-bipolar, และ (C) คือ bipolar-Anion-Cation-bipolar ตามลำดับ

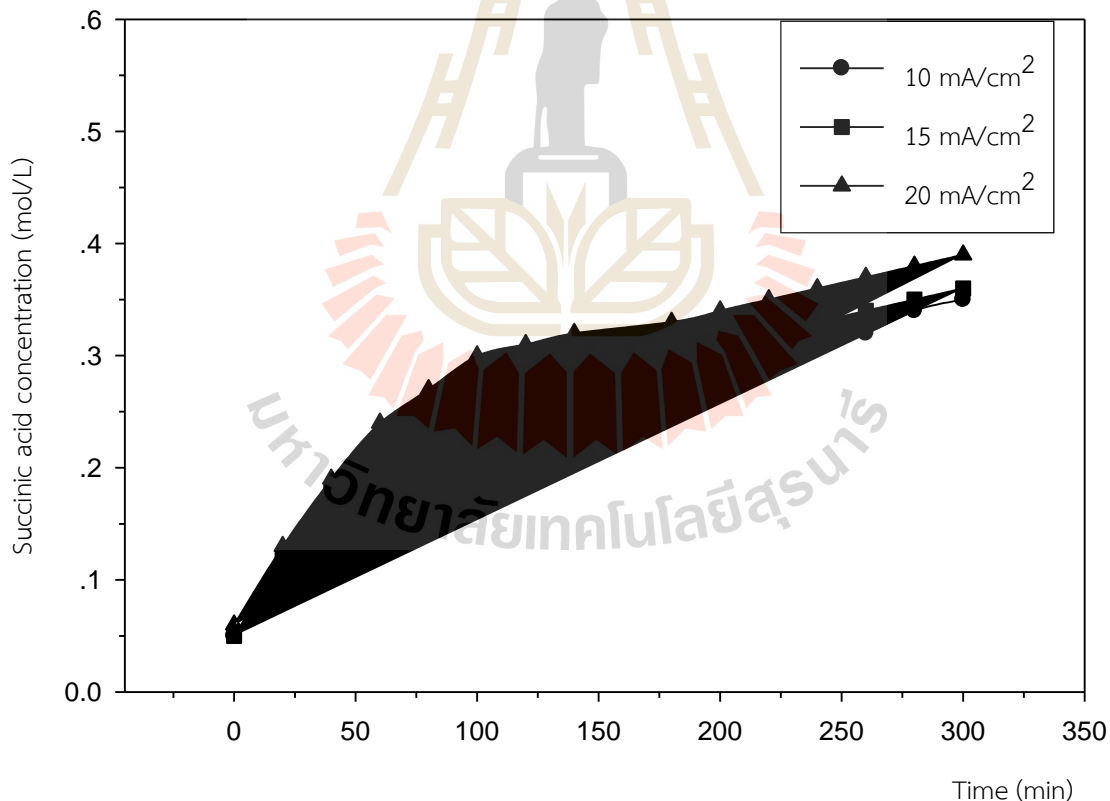
สำหรับการศึกษาระยะสั้น ในหัวข้อนี้จะทำการศึกษาค่าความต้านทานต่อกระแสไฟฟ้าของรูปแบบที่เป็น Bipolar-Anion-Bipolar และ Bipolar-Anion+Cation-Bipolar มีความสัมพันธ์กับค่าความอึดตัวของสารละลายส่วนของ acid compartments ที่มีความเข้มข้นต่ำเกินไป ทำให้แรงดันไฟฟ้าของระบบลดลง เป็นผลต่อเนื่องที่ส่งผลกระทบต่อในกรณีที่ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดและเบสความต้านทานไฟฟ้าของแผ่น หรือ stack ลดลง และหากพิจารณาถึงความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ (สารละลายในการปรับค่า pH ระหว่างกระบวนการหมัก) ในส่วน Bipolar-cation-Bipolar พบว่ามีการเพิ่มขึ้นตามการแบ่งตัวของเยื่อกรอง bipolar และการส่งผ่านไอออนของโซเดียม เมื่อเวลาผ่านไปไอออนของโซเดียมเพิ่มเติมไม่สามารถเติมเต็มได้โดยการกระจายตัวแบบ diffusive โดยแรงดึงดูดความเข้มข้นที่ตั้งอยู่ในชั้นขอบเขต เหตุผลก็คือจำนวนโซเดียมไอออนที่เคลื่อนย้ายในสารละลายสู่พื้นผิวของเมมเบรนแลกเปลี่ยนไอออนบวกมีขนาดเล็กกว่าไอออนของโซเดียมที่ขนส่งผ่านเยื่อแลกเปลี่ยนไอออนบวก เนื่องจากความแตกต่างของอัตราการขนส่ง ความเข้มข้นของกรดซัลฟูริกที่ผลิตได้สูงมากเพื่อทำการปรับประจุให้เกิดการแทนที่โซเดียมไอออนในเวลาเดียวกัน (Raissouni et al., 2007)

การเพิ่มขึ้นของประจุอีกครั้งในบางส่วนของการทำงานในระบบ electrodialysis bipolar membrane (EDBM) technique ที่ศึกษาปริมาณกระแสที่ใช้ พบว่าเกิดการลดแรงดันของเมมเบรนแลกเปลี่ยนไอออนไนซ์สูงกว่าเมมเบรนแลกเปลี่ยนไอออนบวก นอกจากนี้การโยกย้ายของ anion succinate ผ่านเยื่อแลกเปลี่ยนประจุ anion มีความต้านทานสูงกว่าไอออนโซเดียมผ่านเยื่อแลกเปลี่ยน cation เนื่องจากรัศมีมีขนาดใหญ่ (Wang et al., 2011) และค่าความดัน Bipolar-Cation-Bipolar ลดลง ดังนั้นผลการทดลองในการศึกษานี้จึงตรงกับหลักการของอิเล็กโตรไดอะลิซิส (ED) ที่เป็นเทคนิคเกี่ยวข้องเป็นเซลล์อิเล็กโตรไลต์ชนิดหนึ่งที่ใช้แยกไอออนออกจากสารละลาย โดยให้ไอออนผ่านแผ่นเยื่อบาง ๆ (Semipermeable membrane) ไปยังขั้วไฟฟ้าที่มีประจุตรงข้าม ทำให้สารละลายที่อยู่ระหว่างขั้วไฟฟ้าจะมีความเข้มข้นของไอออนลดลง โดยหลักการนี้ทำให้พัฒนาใช้กับการทำเก็บเกี่ยวกรดซัคซินิค ดังเช่นในโครงการนี้

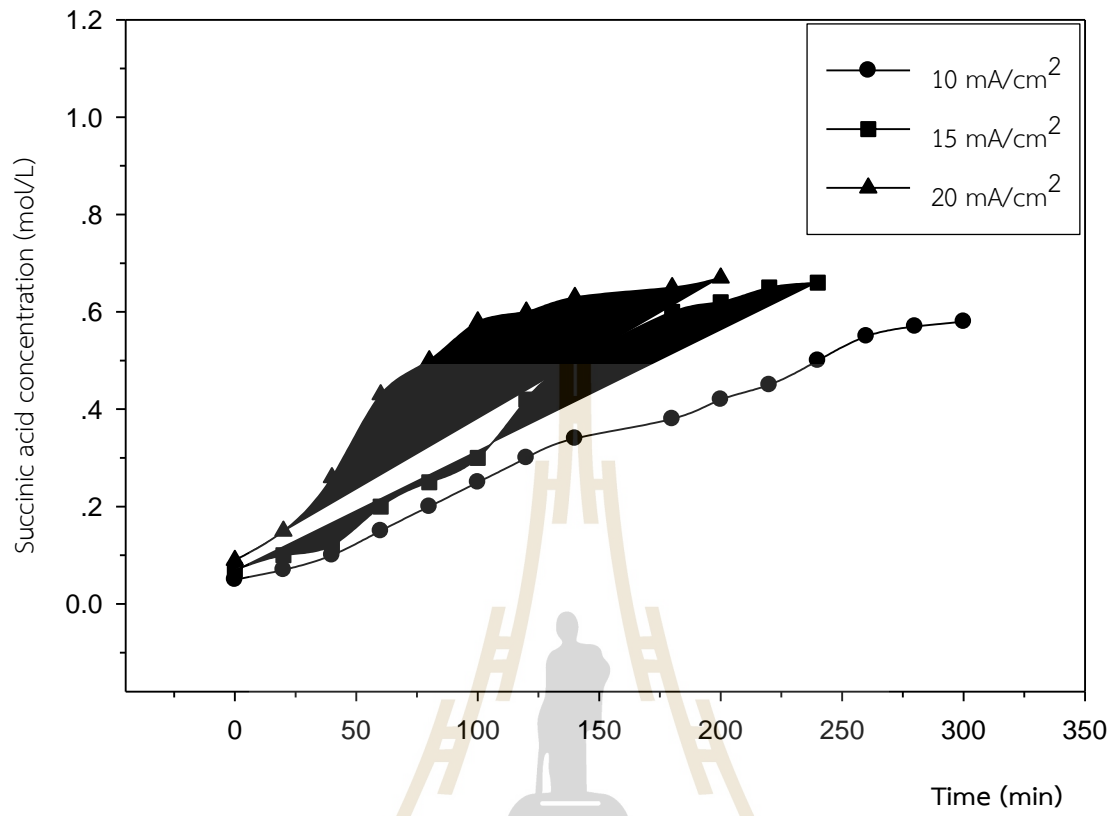
4.5.2 ความเข้มข้นของกรดซัคซินิกในระบบ electrodialysis bipolar membrane (EDBM) technique สำหรับการทดลองต่างๆ

รูปภาพ 38 แสดงความเข้มข้นของกรดซัคซินิกโดยเรียงลำดับจากมากไปหาน้อยดังนี้ Bipolar-Cation-Bipolar > Bipolar-Anion-Cation-Bipolar > Bipolar-Anion-Bipolar ใน configuration ต่างๆ ผลการทดลองสามารถใช้ความรู้ทางทฤษฎีในการวิเคราะห์ผลได้ ซึ่งสามารถอธิบายได้ด้วยการที่เกิดจากการแพร่กระจายของกรดซัคซินิคโมเลกุลผ่านเยื่อแผ่น bipolar membrane และเยื่อแลกเปลี่ยนประจุลบ การเคลื่อนที่เข้าไปของไอออนไฮดรอกไซด์ผ่านเยื่อแลกเปลี่ยนไอออนบวก ทั้งยังเกิดจากการแข่งขันระหว่างไอออนและ electro-osmosis ทำให้ผลการศึกษาเป็นไปตามรูปภาพ 38 อีกทั้งแสดงให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงของความเข้มข้นของกรดซัคซินิกกับเวลาในการดำเนินระบบ โดยจะเห็นว่าความเข้มข้นของกรดซัคซินิกของ Bipolar-Anion-Bipolar มีค่าต่ำกว่าเนื่องจากการโยกย้ายถ่ายเทของไฮดรอกไซด์ไอออนในส่วน base compartment สามารถเกิดปฏิกิริยากับกรดซัคซินิกที่เกิดขึ้นเพื่อให้เกิดการสูญเสียกรด อย่างไรก็ตามส่วนของ salt compartment เป็นพื้นที่ buffer ใน Bipolar-Anion-Cation-Bipolar configuration ซึ่งช่วยลดและกำจัดสถานะที่ไม่เหมาะสมให้กลับสู่สถานะสมดุลในระบบ จากลักษณะของกราฟจะเห็นได้ว่า เกิดเนื่องมาจากการเคลื่อนที่ของ hydroxide ions โดยที่จะเพิ่มขึ้นเมื่อความหนาแน่นกระแสเพิ่มขึ้น (Shen et al., 2013) ซึ่งมีความเป็นไปได้ที่จะเกิดการแข่งขันกันของ hydroxide ions และ succinate ions ใน salt compartment ดังนั้นจึงไม่มีความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของกรดซัคซินิกกับเวลาที่ 15 mA / cm² และ 20 mA / cm² นอกจากนี้สำหรับการกำหนดค่า Bipolar-Cation-Bipolar พบว่าการรั่วซึมของ hydroxide ions จาก base compartment ทำให้กรดซัคซินิกอยู่ในสถานะเป็นกลาง ซึ่งส่วนหนึ่งเป็นผลให้เกิดประสิทธิภาพในการกำจัดไฟฟ้าสถิต current efficiency ในระบบ electrodialysis ในขณะเดียวกันมีการแข่งขันกันระหว่าง sodium ions และ hydrogen ions ในเยื่อแลกเปลี่ยนไอออนบวก (cation exchange membrane) ด้วยแรงดันไฟฟ้า นอกจากนี้ยังมีการเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณ sodium ions ใน acid

compartment มีการลดลง อย่างไรก็ตามสำหรับเหตุผลหลักที่ Bipolar-Anion-Cation-Bipolar มากกว่า Bipolar-Anion-Bipolar นั้นเนื่องมาจากปริมาณ acid compartment ของ Bipolar-Cation-Bipolar มีการลดลง ในขณะที่ Bipolar-Anion-Cation-Bipolar และ Bipolar-Anion-Bipolar ลดลง นั้นเป็นเพราะสาเหตุมาจากการโยกย้ายไอออนเนื่องจาก electro-osmosis (Groot et al., 2011) นอกจากนี้ยังสามารถสังเกตได้ว่ามีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของกรดซัคซินิกกับเวลา ในการทำงานระหว่างดำเนินระบบ อีกทั้งความเข้มข้นของกรดซัคซินิกเพิ่มขึ้นเมื่อความหนาแน่นกระแส (current density) เพิ่มขึ้น สันนิษฐานว่าอาจเนื่องมาจากเพราะโมเลกุลของน้ำจะแยกตัวระหว่างอยู่ใน ชั้นกลาง (the intermediate layer) ของ bipolar membrane ณ ความหนาแน่นกระแสที่สูง ในขณะที่ เวลาในการดำเนินงานลดลงและเกิดผลกระทบที่เกี่ยวข้องกับการแพร่กระจาย (diffusion) มีการลดลง เมื่อความหนาแน่นกระแสสูงขึ้นซึ่งก็คือเป็นกระบวนการหลักของการแยกสารด้วยเทคนิคนี้ โดยสารจะ ผ่านไฟฟ้ากระแสตรงลงไปในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ แล้วทำให้เกิดปฏิกิริยาเคมีเกิดขึ้นที่ขั้วบวก และ ขั้วลบของเซลล์อิเล็กโทรไลต์นั่นเอง

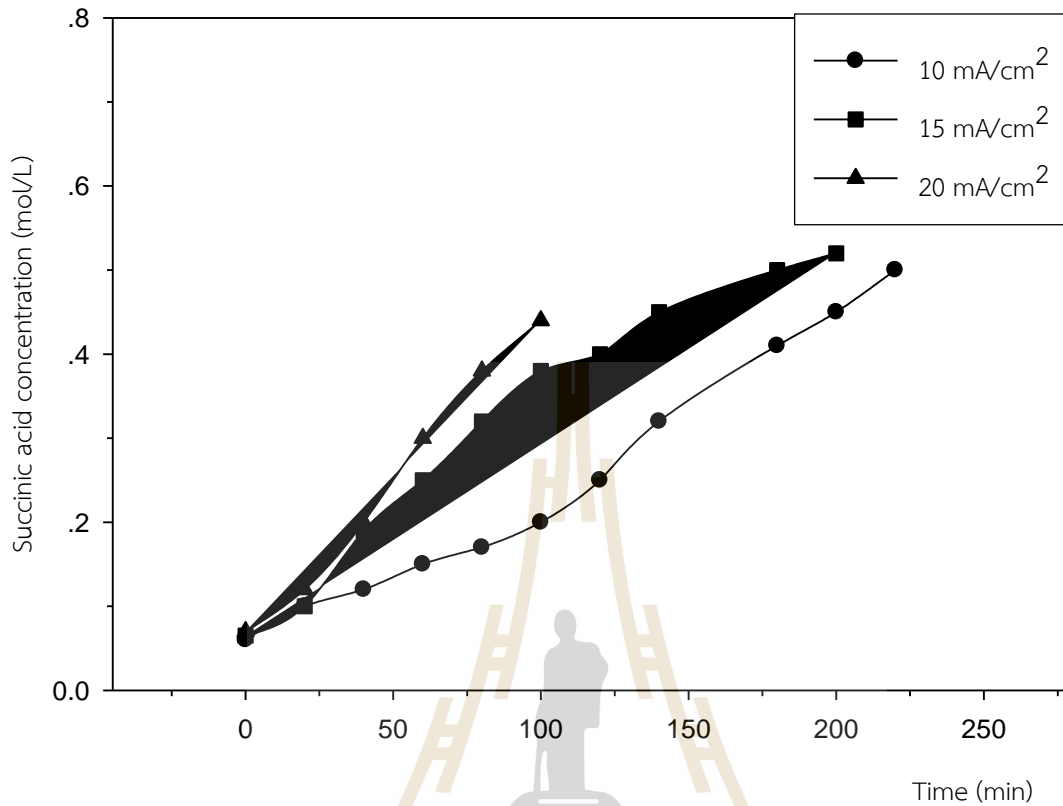


(A)



(B)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

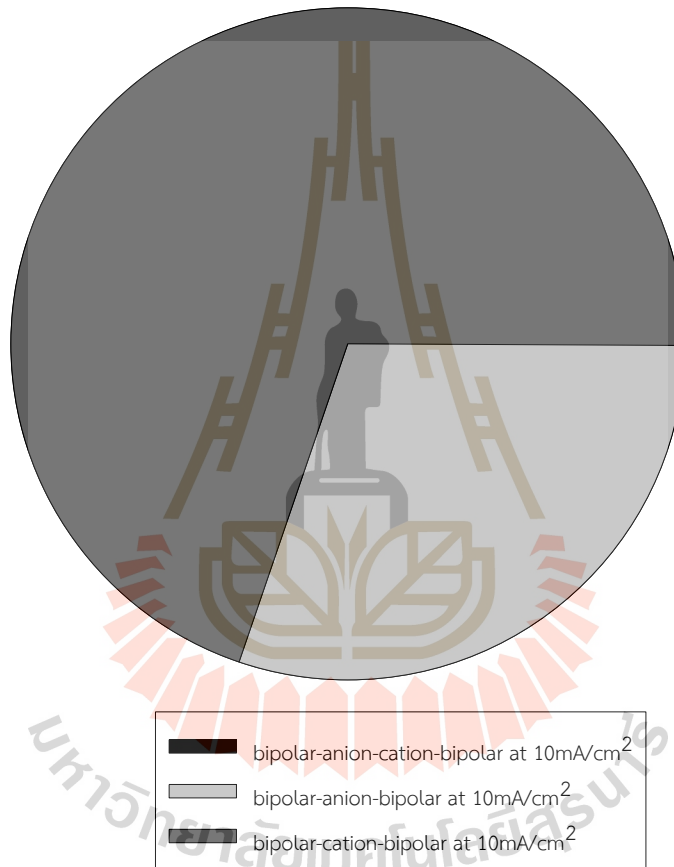


รูปภาพ 38 ความเข้มข้นของกรดซัคซินิกที่ configuration ต่างๆ โดยที่ (A) คือ Bipolar-Anion-bipolar, (B) คือ bipolar-Cation-bipolar, และ (C) คือ bipolar-Anion-Cation-bipolar ตามลำดับ

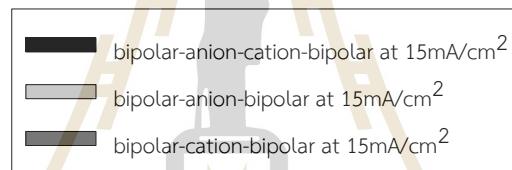
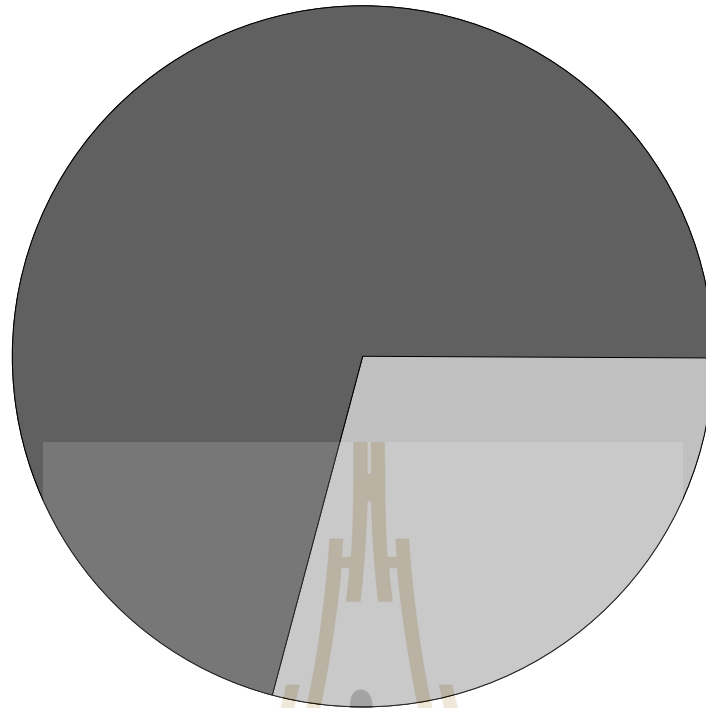
4.5.3 การใช้พลังงาน (energy consumption) ในระบบ electro dialysis bipolar membrane (EDBM) technique สำหรับการทดลองต่างๆ

ประสิทธิภาพของกระบวนการ BMED สามารถวัดได้จากปริมาณของการใช้ เนื่องจากเป็นตัวแปรสำคัญในการประเมินการทำงานงานในแง่เชิงเศรษฐศาสตร์ เนื่องจากระบบ EDBM เกี่ยวข้องโดยตรงกับการใช้ไฟฟ้าด้วยหลักการ electro-membrane ในการดำเนินงาน ซึ่งต้องมีการตรวจสอบค่าปริมาณไฟฟ้าที่ใช้งานจริง โดยทั่วไปส่วนใหญ่แล้วพบว่ามีความเกี่ยวข้องกับการแยกตัวของน้ำและการถ่ายเทแลกเปลี่ยนไอออนผ่านเมมเบรนและสารละลายในระบบ

รูปภาพ 39 แสดงการใช้พลังงานที่ความหนาแน่นกระแส (current density) ที่แตกต่างกัน ในระยะเวลาที่เท่ากันที่ 180 นาที เห็นได้ชัดว่าการใช้พลังงานตามลำดับดังนี้ bipolar-anion-bipolar > bipolar-anion-cation-bipolar > bipolar-cation-bipolar จากผลดังกล่าวสามารถสรุปได้ว่าการใช้พลังงานของ bipolar-anion-cation-bipolar สูงกว่าของ bipolar-cation-bipolar ส่วนการใช้พลังงานสูงสุดคือ bipolar-anion-bipolar เพราะค่าการนำไฟฟ้าต่ำในสารละลายที่มีสถานะเป็นกรด เนื่องจาก low conductivities ต่ำในสารละลายที่มีสถานะเป็นกรดนั่นเอง ทั้งยังเป็นไปได้ว่าส่วนหนึ่งของไฟฟ้าที่ใช้ อาจถูกนำมาใช้ในการแยกน้ำมากกว่าการแลกเปลี่ยนของไอออนในระบบ

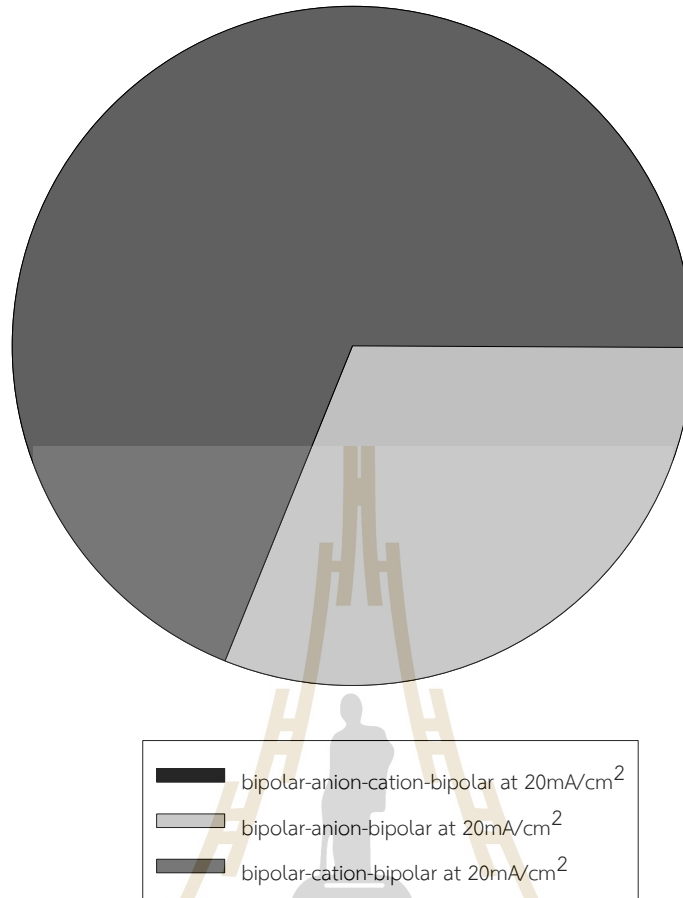


(A)



(B)





(C)

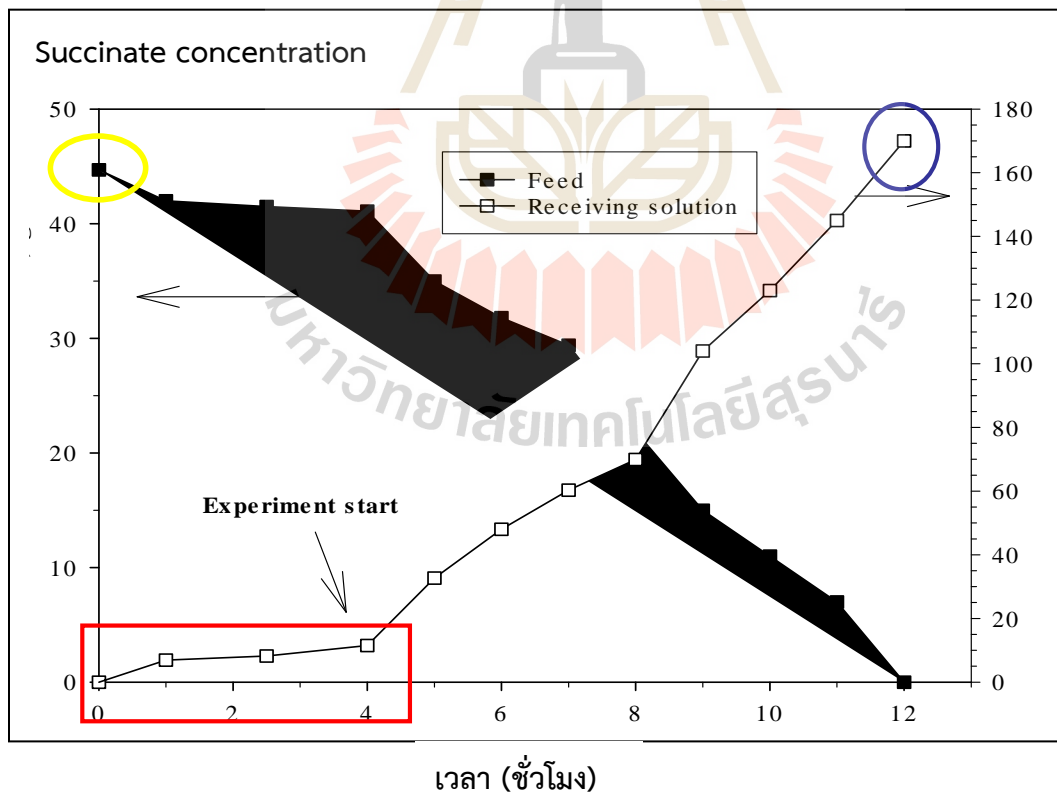
รูปภาพ 39 การใช้พลังงาน (energy consumption) ที่ configuration ต่างๆกัน โดยที่ A คือ 10 mA/cm², B คือ 15 mA/cm² และ C คือ 20 mA/cm²

จากผลการทดลองในหัวข้อนี้สามารถสรุปได้ว่าหาก current density พบว่าจะมีการใช้พลังงานเพิ่มขึ้นด้วย ผลที่เกิดขึ้นนี้สามารถอธิบายได้โดยเกิดจากการขนส่งไอออนิกหรือไอออน ผลลัพธ์ข้างต้นเป็นพื้นฐานสำหรับการทดลองที่ใช้กับน้ำหมักโดยตรงในการศึกษาระดับขนาดใหญ่ (large scale) ต่อไป

4.6 การแยกและทำบริสุทธิ์กรดซัคซินิกออกจากถังหมักโดยตรงด้วยระบบ electro dialysis bipolar membrane (EDBM) technique

รูปภาพ 40 เป็นการทดลองการแยกกรดซัคซินิก (ซัคซิเนต) ออกจากน้ำหมักหลังสิ้นสุดกระบวนการหมักแบบกึ่งกะ โดยจะมีการ recovery น้ำหมักกลับจากการ eject แล้วย้อนกลับมาเข้าสู่ feed solution อีกครั้ง ในการจัดการศึกษามีการปั๊มตัวอย่างด้วยปั๊ม peristaltic pump ในอัตรา 10 มิลลิลิตร ต่อนาที ซึ่งใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของซัคซิเนตอยู่ที่ 50 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นที่ 10 กรัมต่อลิตร โดยมีปริมาตรเริ่มต้นที่ 2 ลิตร ในขณะที่ปริมาตรเริ่มต้นในด้านของสารละลายตัวรับนั้นอยู่ที่ 0.3 ลิตร โดยในการทดลองนี้ได้ทำการกำหนดค่ากระแสไฟฟ้าอยู่ที่ 4 โวลต์ 0.9 แอมแปร์ เนื่องจากผลจาก

กราฟก่อนหน้านี้นี้ระบุว่าเป็นสถานะในการทดลองที่ดีที่สุด แต่เนื่องจากเครื่องกำเนิดกระแสไฟฟ้ามีความจำกัดทำให้ค่าสูงสุดที่สามารถจะรันการทดสอบได้อยู่ที่สถานะดังกล่าว ซึ่งถือว่ามีความเหมาะสมกับการแยกกรดซัคซินิกอินทรีย์ 25 องศาเซลเซียส ผลการทดลองพบว่าในช่วงชั่วโมงเริ่มต้น ที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 4 นั้นเป็นช่วงเริ่มต้นของระบบการแยกซัคซิเนต ยังไม่มีการปล่อยกระแสไฟฟ้า ซึ่งจะเห็นได้ว่าความเข้มข้นของซัคซิเนตในด้านของสารป้อนและสารละลายตัวรับ มีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย แต่หลังจากที่มีการปล่อยกระแสไฟฟ้าเข้าไปในระบบ พบว่าความเข้มข้นของซัคซิเนตในด้านของสารป้อนนั้นจะลดลงอย่างรวดเร็ว ทั้งนี้เนื่องมาจากการที่กรดซัคซินิกสามารถเคลื่อนที่ได้ภายใต้สนามไฟฟ้า เมื่อให้กระแสไฟฟ้าทำให้เกิดประจุ ซึ่ง cation จะถูกดึงไปที่ขั้ว negative electrode และ anion ถูกดึงไปยัง positive electrode สำหรับกรดซัคซินิกมีคุณสมบัติเป็นประจุลบ จะถูกดึงผ่าน ion exchange membrane เกิดการถ่ายเทและเก็บไว้ในด้านของ receiving solution ซึ่งพบว่าความเข้มข้นในด้านของสารละลายตัวรับก็เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเช่นกันและมีค่าความเข้มข้นของเส้นกราฟอยู่ที่ 20 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง จากการทดลองพบว่าความปริมาณของซัคซิเนตในด้านของสารป้อนนั้น จะหมดลงเมื่อเวลาผ่านไป 12 ชั่วโมง ส่วนความเข้มข้นในด้านของสารละลายตัวรับนั้น จะอยู่ที่ประมาณ 170 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งผลแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นในส่วน receiving solution มีค่าสูงเนื่องจากมีปริมาตรของสารละลายที่น้อย (0.3 ลิตร) ซึ่งจากการทดสอบในเบื้องต้นจะเห็นได้ว่าระบบอิเล็กโตรไดอะไลซิสเป็นระบบที่มีประสิทธิภาพสูงในการแยกซัคซิเนตออกจากน้ำหมัก ซึ่งในลำดับถัดไปจะได้ทำการทดสอบการแยกกรดซัคซินิกออกจากน้ำหมักโดยตรงต่อไป



รูปภาพ 40 แสดงความเข้มข้นของกรดซัคซินิกทั้งสองด้านของสารละลายในระบบอิเล็กโตรไดอะไลซิส

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

เทคนิค electrodialysis เป็นระบบการใช้ ion exchange membrane มีคุณสมบัติในการแยกสารเฉพาะอย่าง เนื่องจากมีความเฉพาะเจาะจงโดยใช้ ion exchange membrane โดยที่ Ion exchange membrane ประกอบด้วย 2 ชนิด คือ Cation exchange membranes ซึ่งเลือกเฉพาะสารที่มีคุณสมบัติเป็น cation ผ่านได้ และชนิด anion exchange membranes ซึ่งเลือกเฉพาะสารที่มีคุณสมบัติเป็น anion ผ่านได้ ภายในเครื่อง electrodialyzer มี membranes เหล่านี้ อยู่ระหว่างขั้ว electrode ทั้ง 2 ขั้ว และใช้กระแสไฟฟ้าช่วยในการแยก ion ของสารละลาย ร่วมกับการใช้พลังงานไฟฟ้าในการแยกการประกอบประเภท ionic ในสารละลาย ทำให้สารตัวอย่างเข้มข้นขึ้น ทำให้กรดซัลฟิวริกที่นำมาใช้ในการศึกษานี้มีความบริสุทธิ์ ถือเป็นเทคนิคการแยกสารหรือ recovery ที่มีประสิทธิภาพอีกเทคนิคหนึ่ง



เอกสารอ้างอิง

- Anthony J. W., Bonita A. G., Charles E. G. (1992). Recovery of propionic and acetic acids from fermentation broth by electrodialysis. *Biotechnol*, 4: 479-485.
- 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.
- Fu, L., Gao, X., Yang, Y., Aiyong, F., Hao, H., Gao, C. (2014). Preparation of succinic acid using bipolar membrane electrodialysis. *Separation and Purification Technology*. 127, 212–218.
- de Groot, M.T., de Rooij, R.M., Bos, A.A., and Bargeman, G. (2011). Bipolar membrane electrodialysis for the alkalization of ethanolamine salts, *J. Membr. Sci.* 378, 415–424.
- Hábová, V., Melzoch, K., Rychtera, M., and Sekavová, B. (2004) Electrodialysis as a useful technique for lactic acid separation from a model solution and a fermentation broth, *Desalination*. 162:361-372.
- Huh, Y. S., Jun, Y. S., Hong, Y. K., Song, H., Lee, S. Y., and Hong, W. H. (2006). Effective purification of succinic acid from fermentation broth produced by *Mannheimia succiniciproducens*. *Process Biochem* 41: 1461-1465.
- Lee, E.G., Moon, S. H., Chang, Y. K., Chang, H. N., 1998. Lactic acid recovery using two-stage electrodialysis and its modeling, *Journal of Membrane Science*. 145(1):53-66.
- Lee, S., Kim, J., Song, H., Lee, J., Kim, T., Jang, Y. S. (2008). From genome sequence to integrated bioprocess for succinic acid production by *Mannheimia succiniciproducens*. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 79: 11-22.
- 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.
- Lin, S. K. C., Du, C., Koutinas, A., Wang, R., and Webb, C. (2008). Substrate and product inhibition kinetics in succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes*. *Biochem Eng J*. 41: 128-135.
- Lixin, X., Qingfeng, G., Jihua, H., Weijun, J., (2000). Recovery of acetic acid from dilute wastewater by means of bipolar membrane electrodialysis. *Desalin*, 129: 283-288.
- Lye, G. J., and Woodley, J. M. (1999). Application of in situ product-removal techniques to biocatalytic process. *Trends Biotechnol*. 17: 395-402

- Meynial-Salles, I., Dorotyn, S., and Soucaille, P. (2007). A new process for the continuous production of succinic acid from glucose at high yield, titer and productivity. *Biotechnol Bioeng.* 99:129-135.
- Meynial-Salles, I., Dorotyn, S., Soucaille, P. (2008). A new process for the continuous production of succinic acid from glucose at high yield, titer, and productivity. *Biotechnol Bioeng.*, 99(1):129-35.
- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry.* 31: 426-428.
- Qiang, L., Dan, W., Yong, W., Wangliang, L., Yunjian, Z., Jianmin, X., and Zhiguo, S. (2010). One step recovery of succinic acid from fermentation broths by crystallization. *Sep Purif Technol.* 72:294-300.
- Pinacci, R. (2002). Recovery of citric acid from fermentation broths by electrodialysis with bipolar membranes. *Desalin.* 148: 177-179.
- Prochaska, K., Staszak, K., Wozniak-Budych, M. J., Regel-Rosocka, M., Adamczak, M., Wisniewski, M., Staniewski, J. (2014). Nanofiltration, bipolar electrodialysis and reactive extraction hybrid system for separation of fumaric acid from fermentation broth. *Bioresour. Technol.* 167: 219-225.
- Raissouni, I., Marraha, M., Azmani, A. (2007). Effect of some parameters on the improvement of the bipolar membrane electrodialysis process, *Desalination*, 208. 62-72.
- Shen, J.-N., Yu, J., J. Huang, and Van der Bruggen, B. (2013). Preparation of highly pure tetrapropyl ammonium hydroxide using continuous bipolar membrane electrodialysis, *Chem. Eng. J.* 220. 311-319.
- Song, H., and Lee, S. Y. (2006). Production of succinic acid by bacterial fermentation. *Enzyme Microb Technol* 39: 352-361.
- Song, H., Huh, Y. S., Lee, S. Y., Hong, W. H., and Hong, Y. K. (2007). Recovery of succinic acid produced by fermentation of a metabolically engineered *Mannheimia succiniciproducens* strain. *J Biotechnol* 132: 445-452.
- Timbuntam, W., Sriroth, K., Piyachomkwan, K., and Tokiwa, Y. 2008, Application of bipolar electrodialysis on recovery of free lactic acid after simultaneous saccharification and fermentation of cassava starch. *Biotechnol. Lett.* v.30, p.1747-1752, 2008.
- Wang, Q., Cheng, G., Sun, X., and Jin, B. (2006) Recovery of lactic acid from kitchen garbage fermentation broth by four-compartment configuration electrodialyzer. *Proc. Biochem.* 41: 152-158.
- Wang, Y., Zhang, N., Huang, C., and Xu, T. (2011). Production of monoprotic, diprotic, and

- triprotic organic acids by using electrodialysis with bipolar membranes: effect of cell configurations, *J. Membr. Sci.* 385–386, 226–233.
- Zeikus, J. G., Jain, M. K., and Elankovan, P. (1999). Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products. *Appl Microbiol Biotechnol* 51: 545-552.
- Zhang, K., Wang, M., Wang, D., and Gao, C. (2009). The energy-saving production of tartaric acid using ion exchange resin-filling bipolar membrane electrodialysis, *J. Membr. Sci.* 34, 246–251.
- Zhenga, P., Donga, J. J., Sun, Z. H., Nia, Y., and Fanga, L. (2009). Fermentative production of succinic acid from straw hydrolysate by *Actinobacillus succinogenes* *Bioresource Technol.* 100.



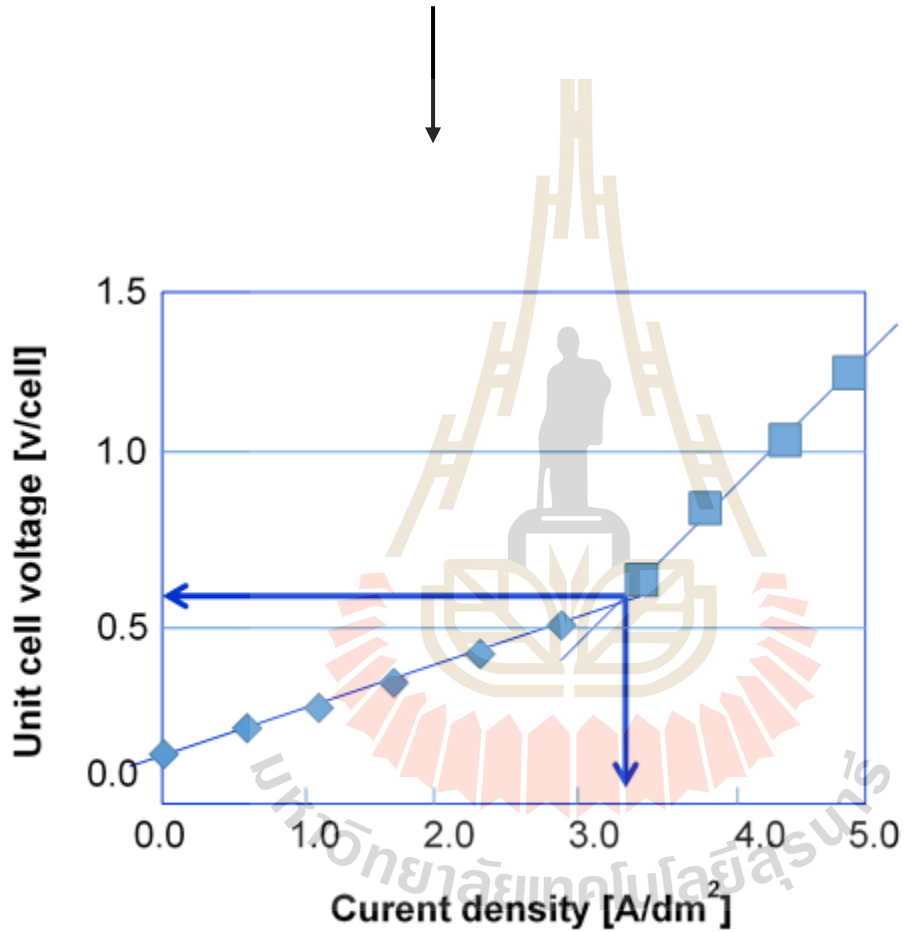
ภาคผนวก ก

Standard specification of Electrodialyzer

Type	Unit	DW-Lab
membrane size	mm	80×130
membrane area	dm ² /piece	1.04
effective area size	mm	50×60
effective area	dm ² /piece	0.3
total effective area in standard 5 pairs	dm ²	1.5
standard number of pairs	pair	5 (D: 5 room, C: 7 room)
thickness of gasket frame	mm	0.75
material of gasket frame		PP
material of ED body		PVC
material of anode		Ti/Ir
material of cathode		SUS

ภาคผนวก ข

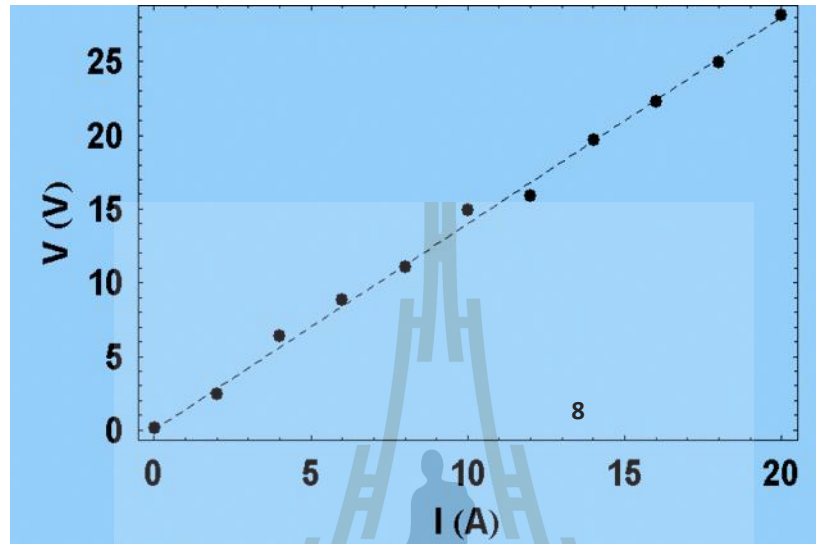
Current (A)	1	2	3	4	5
Voltage of membrane (v)	a	b	c	d	e



รูปภาพ 41 กราฟวิธีการเช็ค LCD point

- $CD < 0.8 * LCD$
- $0.9 \text{ A (} 3 \text{ A/dm}^2 \text{)}$

$$\text{Current (I)} = \frac{\text{Voltage (V)}}{\text{Resistor (R)}}$$



รูปภาพ 42 กราฟสำหรับการหาค่า I (current)

The monitoring parameters																							
Time	operating condition				Dilute								Concentrate								Electrode		
	Volt	Amp.	temp.	Quan.	Flow rate	Cond.	pH	SA, LA, AA,...	Glu.	pro	Prod.	Yield	Color	Quan.	Flow rate	Cond.	pH	SA, LA, AA,...	Glu	Pro		Prod.	Yield
	V	A	°C	ml	ml/h	ms/cm	g/l	g/l	g/l	g/l.h	g		ml	ml/h	ms/cm	g/l	g/l	g/l	g/l.h	g		ml	
										$\text{Yield (g/g)} = \frac{\text{Amount of succinate produced (g)}}{(\text{Initial total amount of glucose (g)} + \text{amount replenished of glucose (g)})}$													

รูปภาพ 43 การจัดชุดการทดลองโดยใช้ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ

Type	Unit	DW-Lab
membrane size	mm	80×130
membrane area	dm ² /piece	1.04
effective area size	mm	50×60
effective area	dm ² /piece	0.3
total effective area in standard 5 pairs	dm ²	1.5
standard number of pairs	pair	5 (D: 5 room, C: 7 room)
thickness of gasket frame	mm	0.75
material of gasket frame		PP
material of ED body		PVC
material of anode		Ti/Ir
material of cathode		SUS

รูปภาพ 44 ค่าจำเพาะของ electro dialyzer ที่ใช้ในการศึกษา



ภาคผนวก ค

Selemion™ DW-Lab Specification

AGC Engineering Company
Membrane System Div.

1. Standard specification of Electro Dialyzer

Type		DW-Lab	CH-0 (reference)
membrane size	mm	80 × 130	160 × 280
membrane area	dm ² /piece	1.04	4.5
effective area size	mm	50 × 60	120 × 175
effective area	dm ² /piece	0.3	2.1
standard number of pairs	pair	5 (D: 5 room, C: 7 room)	10 (D: 10 room, C: 12 room)
total effective area in standard 5 pairs	dm ²	1.5	21
thickness of gasket frame	mm		0.75
material of gasket frame			PP
material of ED body			PVC
material of anode			Ti/Ir
material of cathode			SUS

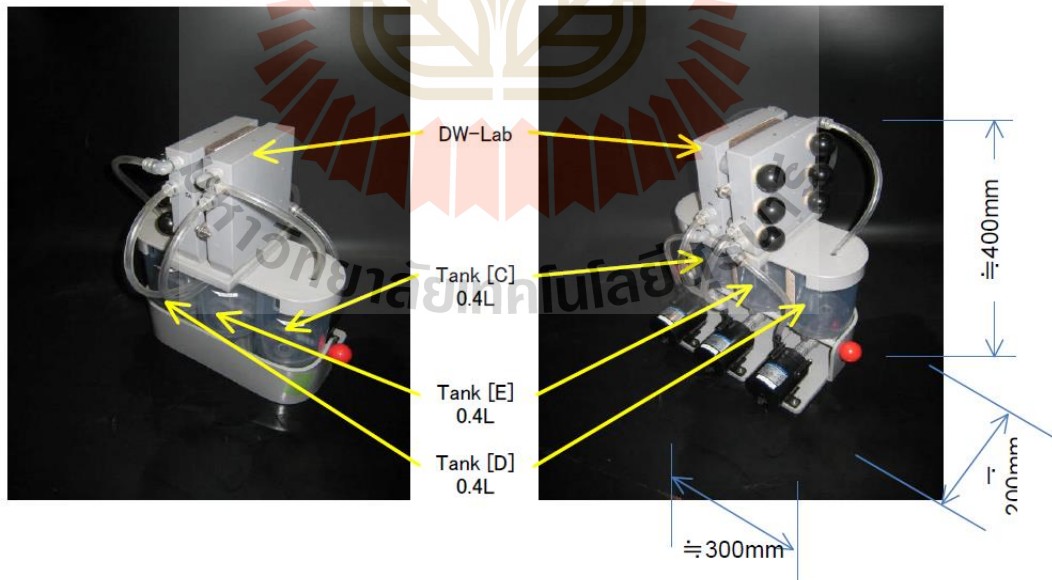
2. Specification of other equipment

pump	Magnetic Drive Pump		
	type		
type	IWAKI RD-05	IWAKI MD-30	
input	AC100V 1 φ 50/60Hz*	AC100V 1 φ 50/60Hz	
rectifier output	DC 18V/3A	DC 35V/10A	
input	AC100V 1 φ 50/60Hz		
flow meter	none	0-600L/hr	
volume of concentrate	L	0.4	3
volume of dilute	L	0.4	3
volume of electrolyte	L	0.4	3

* AC adaptor

【Front view】

【Back view】



** The specification and outlook published in this sheet are subject to change without notification.

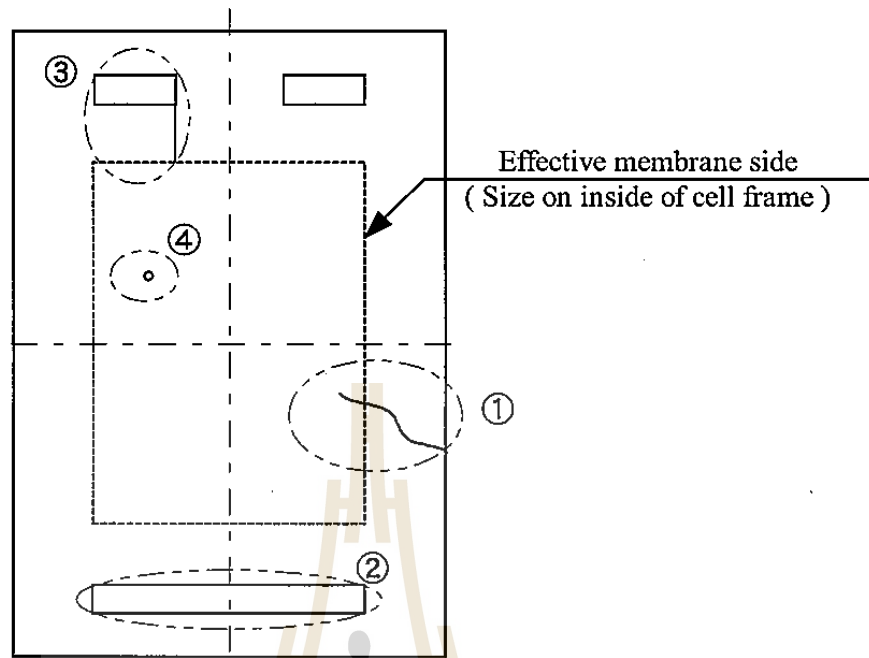


Fig. 11

13-2. Inspection process of pinhole

- 1) Flannel (10 cm 15 cm) in pure water.
- 2) Spread it on the table.
- 3) Put a piece of membrane on it.
- 4) Wipe out moisture with cloth (30 cm 30 cm).
- 5) Put filter paper on the membrane.
- 6) Push lightly the filter paper.
- 7) Confirm that there is no pinhole.
 Note) When there is a pinhole in the membrane, moisture of flannel underside come through the pinhole to the filter paper.
- 8) Inspect all range of the membranes according to the above 4) ~ 7).

13-3. Standard of success or failure of the membrane

13-3-1. Preface

1) Judge the break of the surface of the membrane, scratch, pinhole are usable or not according to the following standard of judgment.

13-3-2. Standard

- 1) Sometimes there is a chance of setting leaving wrinkle at the time of assembling, then the wrinkle develops to the break by tightening. (Figure 11)
 - A case of break to the effective surface not usable
 - A case of wrinkle only usable
- 2) Between ducts break may occur by washing. (Figure 11 ②)
 - In the case of lack not usable
- 3) In the case of the break exists vertically. (Figure 11 ③)
 - In the case the break reach to the effective surface not usable
 - In the case the break does not reach to the effective surface usable
- 4) In the case of existing of break on the effective surface. (Figure 11 ④)
 - In the case membrane is broken not usable
 - The break exists on the surface only and not penetrate usable
- 5) Pinhole
 - In the case only a small part of inspection paper becomes wet not usable

(Condition of contamination, condition of adhesion of foreign matters, condition of wound and wrinkle of membrane, abnormality of cell frame, especially net.)

- 3) Record of tightening dimension before disassemble and after assemble.

12. Replacement of electrode plate

12-1. Preface

- 1) Surface of the anode plate is coated. Be careful not to injure.
- 2) The content of this clause is described on the assumption that procedure 5) of [4-2. procedure] of [4. disassembling of the electro dialyzer] is finished.

12-2. Procedure

- 1) Turn over the electro dialyzer so that the electrode plate that becomes a target of exchange comes upper side object.
- 2) Loosen the tightening of the electro dialyzer, and remove the tightening frame.
Note) Refer to 6)~11) of [4-2. Procedure] of [4. Disassembling of the electro dialyzer].
Originally remove from the anode side, remove as the above in the case of remove from the cathode plate.
- 3) After the bolt that is the fixation of the electrode plate and tightening frame is detached, the electrode plate is detached from tightening frame.
- 4) Wash the tightening frame with a sponge and water.
- 5) Set the electrode packing to the tightening frame.
- 6) Set the new electrode plate on the tightening frame.
Note1) Be careful that electrode plate does not run around the ditch of tightening frame.
Note2) fix the electrode plate and tightening frame with the bolt.
- 7) Correct distortion of the stacks.
Note) Assembling must not be distorted or slant and not blockade the duct.
- 8) Set the tightening frame and tightening.
Note 1) Refer to 13)-16) of [6-2. Procedure] of [6. Washing and assembling of the electro dialyzer]
Note 2) Note the top and bottom of the electrode and tightening frame.

13. Inspection standard of the ion exchange membrane

13-1. Preface

- 1) When there are doubts of the pinhole, the tear, and wrinkle in the membrane, judge usable or not.
- 2) Be careful not to injure newly in the case of inspection.

8-2. procedure

- 1) Tighten diagonally from the center of the electro dialyzer repeatedly. (Refer to Figure 10)
 Note) Tighten partially if necessary, while measuring the dimension so that the difference from each measuring point becomes not more than 1 mm.
- 2) Measure the tightening size at the end and record.

9. Storage of electro dialyzer

- 1) Keep the membranes always wet.
- 2) Keep the electro dialyzer indoor.
- 3) As the electro dialyzer are made of many amount of resin, avoid keeping in the place of straight sunlight or rainy place, and keep indoor. And avoid dusty place.
- 4) When it is kept temporally outdoors, cover all with sheets.
- 5) Do not injure the electro dialyzer.
- 6) In case of store for a long time, to prevent drying of the membranes, fill and draw water once at the half month after removing cover of each nozzle. After that pour 50 ml of pure water in dilute room and concentration room.
- 7) When the water in electro dialyzer has frozen, move it in a warm room and defreeze naturally.

10. Movement and installation of the electro dialyzer

10-1. Preface

- 1) Move the electro dialyzer with great care.
- 2) Taking care of surrounding equipment to do not injure the electro dialyzer itself or the other equipment.

10-2. Procedure

- 1) Move the electro dialyzer on the unit.
 Note) When the unit is moved, a fixed rod is correctly set. And after it is confirmed that each tank is integration with the unit, the unit is moved.

10-3. Connection of tube

- 1) As the nozzle of the electro dialyzer is made of resin, pay full attention when tube is connected. Excessive force may break.
- 2) Scramble tube needs flexibility in the allowing range of tightening, and connect so that no load is burdened on the resin nozzle.
- 3) Wipe the dirt of the surface of the tube when you connect the tube.
- 4) Don't use the one that there are a dent and a wound on the surface of outer at the tube. Insert it straightly after squarely chopping off the damage part.

11. Work of persons for disassembling, assembling, recording and inspection workers

- 1) Check of quantity of cell frame and membrane and check of its inside out and arrangement.
- 2) Observation and record of inside condition at the time of disassembling.

7-2. Procedure

- 1) Tighten diagonally from the center of the electro dialyzer repeatedly. (Refer to Figure 10)

Note) Tighten partially if necessary, while measuring the dimension so that the difference from each measuring point becomes not more than 1 mm.

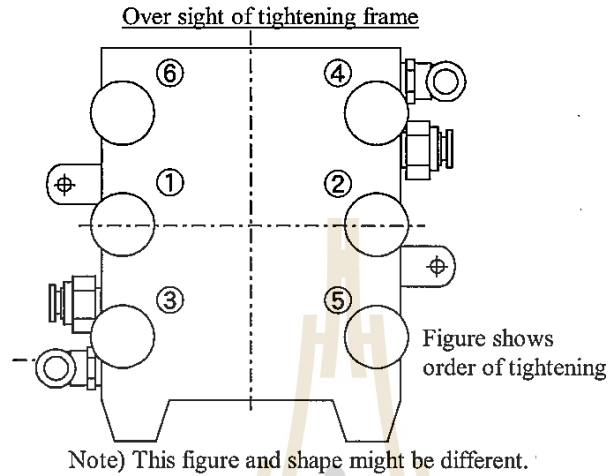


Fig. 10

- 2) Confirm the size has not changed, and measure the tightening size at the end and record.

8. The increase tightening of the electro dialyzer

8-1. Preface

- 1) Tighten of increase according to [8-2. Procedure] incase of confirming a lot of outside leakages when water is poured in the electro dialyzer.
- 2) Strength of tightening is enough to the allowable minimum to outside leak. In case the strength is too much, cell frames or membranes or rods may be broken, adjust the strength checking the leak to outside, while feeding the liquid.
- 3) Tighten all the ball knobs by the hand evenly.

Note) Because of made resin, the rod and tightening frame are broken when too strongly tightening with the tool etc. (Reference allowable tightening torque: $3\text{N}\cdot\text{m}$)
- 4) Tighten while measuring the tightening dimension. Tighten so that the difference at each measuring point must be not more than 1 mm.
- 5) Execute the increase tightening with driving stopped without fail.

- 9) Confirm that no membranes and cell frames are not left behind.
- 10) Correct distortion of the stacks.
 - Note) Assembling must not be distorted or slanted.
- 11) Wash anode tightening frame and the surface of the anode plate with flowing water and a sponge.
 - Note) Be careful to do not injure the coating on the surface of the anode plate.
- 12) After confirmation of up and down, the anode tightening frame is set along the rods.
 - Note) Confirm that the rods can be installed. If the anode tightening frame is difficult to be installed, pull up the tightening frame and correct the distortion of the stacks and set again.
- 13) Install the washers and boll knobs.
 - Note 1) Foreign matters stick to the screw parts of the rods must be removed by a brush.
 - Note 2) Concerning each parts, refer to Figure 7.
- 14) Tighten all the ball knobs by the hand evenly.
 - Note) Refer to [7. Tightening of the electro dialyzer].
- 15) Move the electro dialyzer, and correct the shaking of it.
- 16) Connect the tube and the cable.
 - Note 1) Wipe the dirt of the surface of the tube when you connect the tube.
 - Note 2) Don't use the one that there are a dent and a wound on the surface of outer at the tube.
 - Insert it straightly after squarely chopping off the damage part.
 - Note 3) Especially, turn the tube from the tank wall to the lower side when you return the tank the electrolyte exit tube (Refer to the Figure 8). It blows the liquid from the tank when the exit tube remains turning upper side. And it is dangerous.

7. Tightening of the electro dialyzer

7-1. Preface

- 1) In this clause, description is executed on the assumption that either [5. Newly assembling of the electro dialyzer] , [6. Washing and assembling of the electro dialyzer] or [12. Replacement of electrode plate] are finished.
- 2) Tighten all the ball knobs by the hand evenly.
 - Note) The rod and tightening frame are broken when too strongly tightening with the tool etc.
(Reference allowance tightening torque: $3\text{N}\cdot\text{m}$)
- 3) Strength of tightening is enough allowable to outside leakage of the liquid. If the strength of tightening is too strong, the cell frames, the membranes and rods may be broken. While the liquid is flowing, inspect the outside leakage and adjust the tightening strength.
- 4) Tighten while measuring dimension of tightening. Tighten so that the difference at each measuring point becomes not more than 1mm.

- 2-2-5) Wash only one direction only and do not wash reciprocally.
- 3) This clause is described concerning the work on the assumption that [4. Disassembling of the electrolyzer] is finished.
 - 4) When softlon packing are set on both ends of the stack or electrode packing are set to the back of the electrode plate, be careful to do not clog the duct holes ($\phi 5$) (Refer to the attached part drawing Figure No.7,8).
 - 5) Softlon packing is not reused. Replace every time.
 - 6) Softlon packing is rarely set to before and behind of cell frame (D,C cell frame), in this case, cut the softlon packing according to the example, to prevent clog of the distributors of the cell frame. (Refer to Figure 5)
 - 7) The tip of platinum wire for measuring voltage is rounded and is set at the designated position. (Refer to Fig.-6, attached assembly drawing.)

6-2. Procedure

- 1) Wash cathode tightening frame and cathode plate with water and a sponge.
Note) Contamination stick to inside the nozzles must be washed cleanly with water.
- 2) Remove the softlon packing (0.1 t white) located on the top of the stack on the table.
Note) Softlon packing is not reused. Replace every time.
- 3) Set a new softlon packing on the cathode tightening frame.
Note) be careful to do not clog the duct holes ($\phi 5$) of tightening frame.
- 4) Move one piece of electrode cell frame on the table without changing of inside and outside and top and bottom. (Refer to Figure 9)
Note) Replace an inferior frame with a new one.

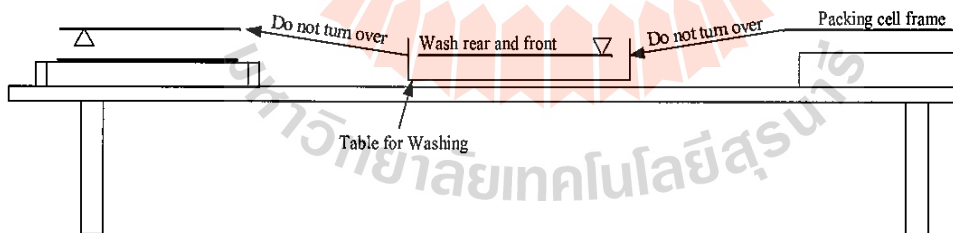


Fig. 9

- 5) Wash the upper surface the electrode cell frame with water and a sponge.
- 6) Turn over the electrode cell frame of which upper surface is washed, and wash the lower side.
- 7) Set the packing cell frame without changing both sides on the tightening frame of cathode side.
Note) Remove water completely when piling the frames.
- 8) Wash the other cell frame and membranes same as before.

Note 3) Especially, turn the tube from the tank wall to the lower side when you return the tank the electrolyte exit tube (Refer to the Figure 8). It blows the liquid from the tank when the exit tube remains turning upper side. And it is dangerous.

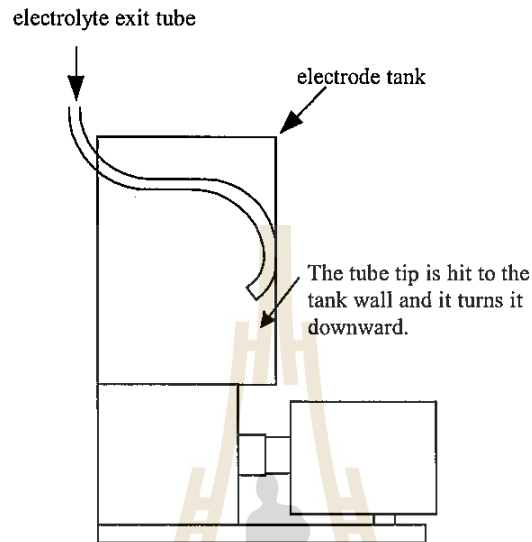


Fig. 8

6. Washing and assembling of the electro dialyzer

6-1. Preface

- 1) Refer to the stack construction drawing.
- 2) Wash every piece of membrane using water and a piece of sponge.

2-1) Washing of the cell frame

- 2-1-1) Wash the both faces of the cell frames. Wash the distributors of the cell frames using a toothbrush.
- 2-1-2) In case of washing of the cell frames, be sure to watch the breaks of the spacer nets and condition of ditches of distributors and correct breaks and projections by fingers.

2-2) Washing of the membrane

- 2-2-1) In case of handling of the membranes, pull the membrane faces. Handle with care so that wrinkles, bending or the other injury do not happen.
- 2-2-2) Press down the membrane lightly with one hand, and washing the membrane with sponge and water while observing the membrane so as not to generate wrinkle by slipping.
- 2-2-3) Wash both faces of the membranes. When washing one side ends, it reverses and the back is washed.
- 2-2-4) Do not rub the duct part strongly, because connection of the duct may fall down.

- 3) Pile up softion packing, membranes and cell frames according to the stack construction drawing.
 Note 1) Be careful that electrode plate does not run around the ditch of tightening frame.
 Note 2) When the cell frames are piled up after the rods are set in cathode tightening frame, positioning is easy.
 Note 3) One with short screw of the rod is installed in the cathode side.
- 4) Confirm there is not a leaving of the membranes and cell frame.
- 5) Correct distortion of the stacks.
 Note) Assembling must not be distorted or slant and not blockade the duct.
- 6) Wash anode tightening frame and anode plate with water and a sponge.
 Note 1) Contamination stick to inside the nozzles must be washed cleanly with water.
 Note 2) Be careful to do not injure the coating on the surface of the anode plate.
- 7) After confirmation of up and down, the anode tightening frame is set along the rods.
 Note) Confirm that the rods can be installed. If the anode tightening frame is difficult to be installed, pull up the tightening frame and correct the distortion of the stacks and set again.
- 8) Install the washers and ball knobs.
 Note 1) Foreign matters stick to the screw parts of the rods must be removed by a brush.
 Note 2) Concerning each parts, refer to Figure 7.

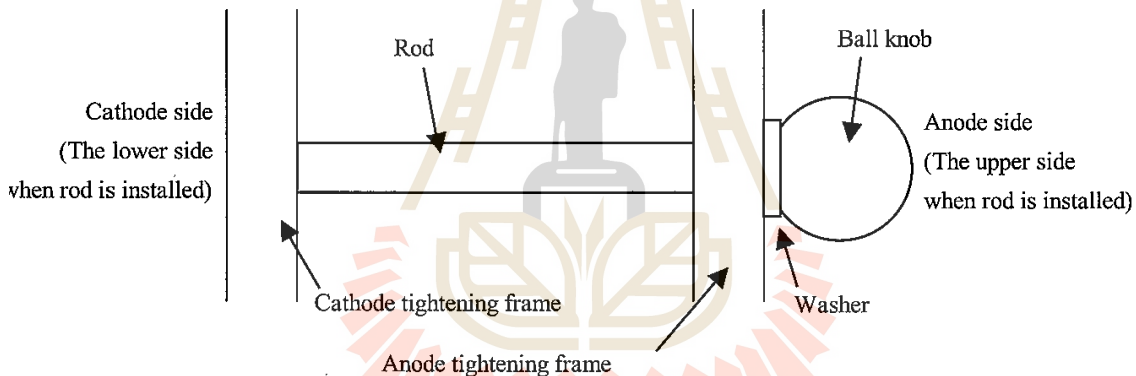


Fig. 7

- 9) Tighten all the ball knobs by the hand evenly.
 Note) Refer to [7. Tightening of the electro dialyzer].
- 10) Move the electro dialyzer, and correct the shaking of it.
- 11) Connect the tube and the cable.
 Note 1) Wipe the dirt of the surface of the tube when you connect the tube.
 Note 2) Don't use the one that there are a dent and a wound on the surface of outer at the tube.
 Insert it straightly after squarely chopping off the damage part.

- 12) Softlon packing is rarely set to before and behind of cell frame (D,C cell frame), in this case, cut the softlon packing according to the example, to prevent clog of the distributors of the cell frame.
(Refer to Figure 5)

Example) When softlon packing is set before and behind of C cell frame on which the rib surface looks downward.

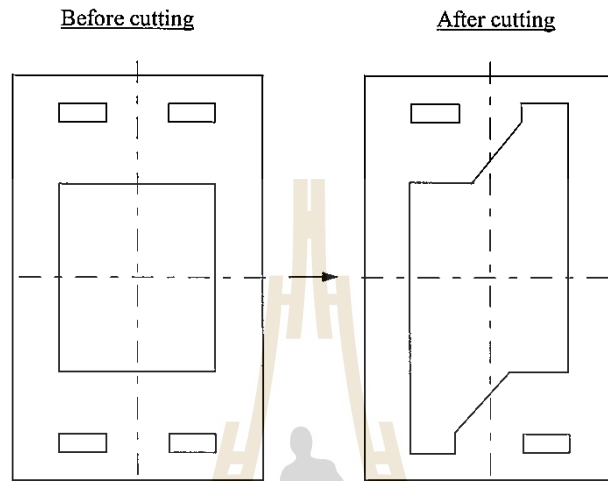


Fig 5

Note) In the case of setting at D cell frame, cut distributor part same as the above.

- 13) The tip of platinum wire for measuring voltage is rounded and is set at the designated position.
(Refer to Fig.-6, attached assembly drawing.)

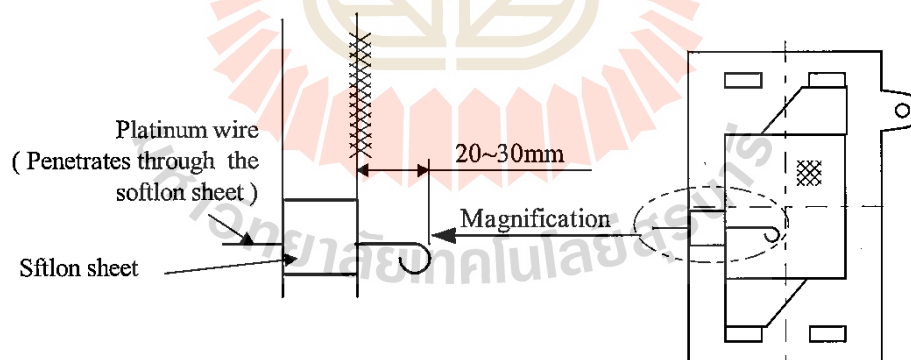


Fig. 6

5-2. Procedure

- 1) Put each cell frames and ion exchange membranes on the table.

Note) Check each quantity, inside and outside, and the top and bottom before assembling.

- 2) Wash cathode tightening frame and cathode with water and a sponge.

Note) Contamination stick to inside the nozzles must be washed cleanly with water.

Note 3) Note damage because the rods is made of the resin.

11) At last the cathode tightening frame is left over.

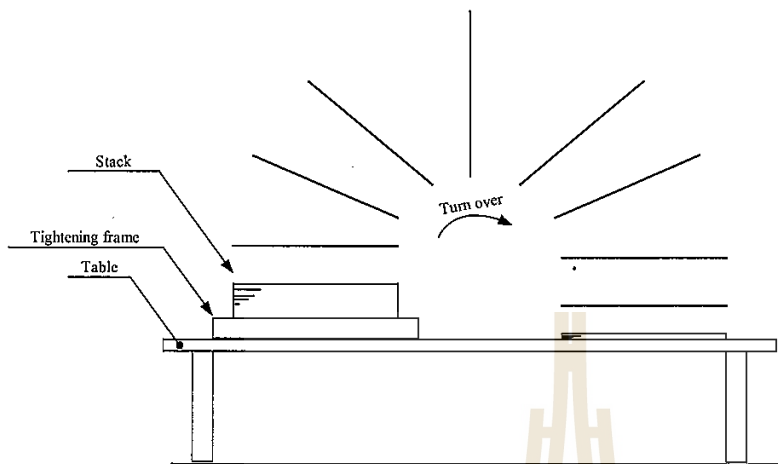


Fig. 4

5. Newly assembling of electro-dialyzer

5-1. Preface

- 1) Refer to the stack construction drawing.
- 2) One person executes assembling, and one inspector is necessary.
- 3) This clause is described on the assumption that [4. Disassembling of electro-dialyzer] is finished.
- 4) In the case of assembling of electro-dialyzer, be careful that no foreign matters invade in between membranes and cell frames.
- 5) When membranes and cell frame are assembled, be careful that no wrinkles or crimps occur. Especially when membranes are assembled, do it while pulling. And in the case of setting be careful not to injure the surface of the membranes or net of cell frames.
- 6) To prevent mistake of assembling, be sure to confirm quantity of the membranes and quantity of cell frames before assembling work.
- 7) On one side of the cell frame, there are crossing type ribs. Make the directions of these ribs unity according to the stack construction drawing, in case of assembling.
- 8) As nozzles are fragile, do not give a shock.
- 9) After completion of assembling of membranes and cell frames, be sure to correct the distortion of stacks.
- 10) In the case of interruption on the way of assembling, cove the nozzles and stacks with vinyl sheet, to prevent drying and invasion of foreign matters.
- 11) When softlon packing are set on both ends of the stack or electrode packing are set to the back of the electrode plate, be careful to do not clog the duct holes ($\phi 5$) (Refer to the attached part drawing Figure No.7,8).

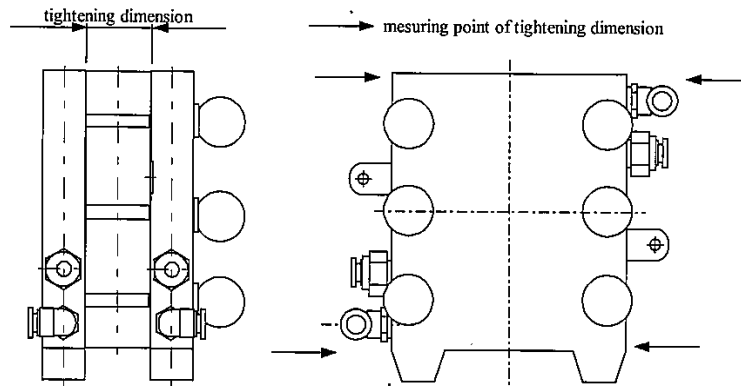
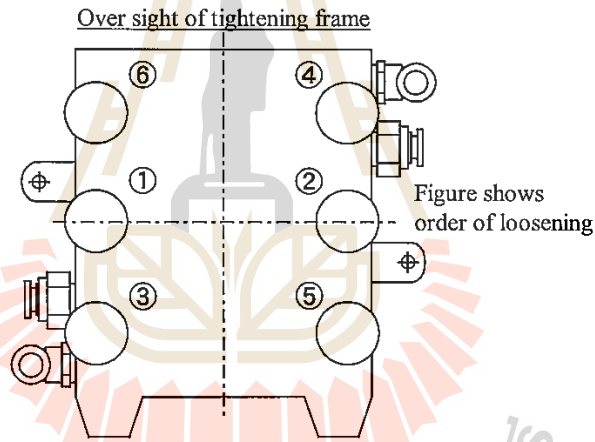


Fig. 2 Note : This figure and shape might be different.

6) Loosen all ball knobs according to the order shown in Figure 3 evenly.

Note 1) If ball knobs are loosened unevenly, the tightening frame or the rods will be broken.

Note 2) Repeat the work several times until all ball knobs are loosened.



Note) This figure and shape might be different.

Fig 3

7) After confirmation that all ball knobs are loosened, remove the ball knobs and washers.

Note) Be careful not to lose.

8) Hang up the anode tightening frame, and peel the cell frame, membrane and softlon packing attached to the anode tightening frame off politely, then turn on the stack.

9) Move the anode tightening frame reversing.

Note) Be careful not to break the nozzles. And adjust the direction of the nozzle and reverse.

10) Turn stacks on the table. (Refer to the Figure 4)

Note 1) In the case of turning over, be careful that the cell frames and the membranes do not dislocate.

Note 2) It is possible to work smoothly by detaching the rods.

12) brush	1 piece	
13) cloth	several pieces	30cm×30cm
14) Filter paper	10 pieces	10cm×10cm
15) Flannel	1 piece	10cm×15cm
16) Towel	10 pieces	30cm×30cm

4. Disassembling of the electro dialyzer

4-1. Preface

- 1) In this clause, we will describe to work after the electro dialyzer is moved to the maintenance yard.
- 2) Start to work after confirmation that electric power to the electro dialyzer is cut off.

4-2. Procedure

- 1) Draw out liquid in the electro dialyzer completely.
- 2) Secure enough space for the work completely.
- 3) Remove the tube and the cable, which connect with the electro dialyzer.

Note 1) Be careful not to lose parts. Close all nozzles to prevent drying of the membranes.

Note 2) Push the tube once lightly, and pull out the tube slowly while pushing the pool of the nozzle next (Refer to Figure 1). Elbow nozzle is also similar.

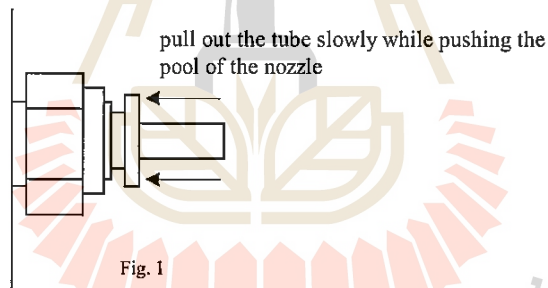


Fig. 1

- 4) turn over the electro dialyzer so that the cathode side to downward.

Note 1) Be careful not to break the nozzles. And adjust the direction of the nozzle and reverse.

Note 2) Avoid work in the delicate state.

- 5) Record the dimension of tightening. (Refer to Figure 2)

3-7. About tightening

- 1) Strength of tightening is enough to be the minimum strength that allows leakage of the liquid. If the tightening strength is too strong, break of cell frames or membranes may be caused, so adjust the tightening strength while observing leakage to outside during feed of the liquid. And be careful not to be uneven tightening.
- 2) In the case of reassembling, tighten until the tightening dimension before disassembling.
- 3) Concerning tightening dimension in the case of newly assembling according to the attached assembly drawing.
- 4) Tighten the rod evenly. Tighten so that the difference at each measuring point must be not more than 1 mm.

3-8. About the increase tightening

- 1) Strength of tightening is enough to the allowable minimum to outside leak. In case the strength is too much, cell frames or membranes may be broken, adjust the strength checking the leak to outside, while feeding the liquid.
- 2) Tighten the rod evenly. (Reference allowable tightening torque: $3\text{N}\cdot\text{m}$)
- 3) Tighten while measuring the tightening dimension. Tighten so that the difference at each measuring point must be not more than 1 mm.

3-9. About drain

- 1) Each tank that exists in the unit can be individually detached.
- 2) Detach the fixed rod that is the fixation of the base unit and the tank in order to detach.
- 3) The tube is fixed to the cutting lack of the tank.
- 4) Treat handling politely because the tank is made of the resin.

3-10. Tools to be used

Article name	Quantity	Note
1) Convex	1 piece	
2) Spanner	2 pieces	size 14mm, 17mm
3) Table	1 piece	
4) PE or PVC sheet (0.1t×1m×1m)	1 piece	
5) Rubber tape	1 piece	
6) Bucket	1 piece	
7) Sponge	1 piece	
8) Rubber glove	2 sets	for worker and inspector, each one
9) goggle	2 sets	for worker and inspector, each one
10) apron	2 sets	for worker and inspector, each one
11) boot	2 sets	for worker and inspector, each one

- 5) Do not give nozzles as they are fragile.
- 6) Install it after wrapping the seal tape around the threaded portion of the nozzle when you install the nozzle on tightening frame.
- 7) Be careful that electrode does not run around the ditch of tightening frame. And fix tightening frame and the electrode plate with the bolt.
- 8) In the case of assembling, refer to the attached drawing of stack construction.
- 9) If you want to interrupt the work on the way, cover the stacks with vinyl sheets, to prevent drying and invasion of foreign matters.
- 10) Be sure to adjust distortion after completion of assembling of membranes and cell frames.
- 11) Refer to the drawing of the parts. Cell frames and the like are shown so that rib faces looks down.

3-6. About washing of stacks

3-6-1. Membrane

- 1) Wash every piece of membrane using water and a piece of sponge. Wash only one direction only and do not wash reciprocally.
- 2) Press down the membrane lightly with one hand, to prevent collecting wrinkle by slip of the membrane.
- 3) Do not rub the duct part strongly, because connection of the duct may fall down.
- 4) Wash both faces of the membranes.

3-6-2. Cell frame

- 1) Wash the distributors of the cell frames using a toothbrush.
- 2) Wash the cell frames piece by piece with water and a piece of sponge.
- 3) In case of washing of the cell frames, be sure to watch the breaks of the spacer nets and condition of ditches of distributors and correct breaks and projections by fingers.
- 4) Wash the both faces of the cell frames.

3-6-3. The others

- 1) Softlon packing is not reused. Replace at every time of maintenance.
- 2) Replace inferior frame and inferior membrane with new one.
- 3) When you pile membranes with cell frames, remove water completely.
- 4) Surface of electrode (anode plate) is covered with coating. Be careful handling so as not to damage it. Avoid the adhesion of the stain of the surface of the electrode.
- 5) If you want to interrupt the work on the way, cover the stacks with vinyl sheets, to prevent drying and invasion of foreign matters.

3. Precautions for handling the electro dialyzer

3-1. Preface

The electro dialyzer has sheet type ion exchange films (SELEMION) and a fastening machine fastens plastic cell frames that are piled alternately and them. As thickness of an ion exchange membrane are generally so thin such as 100~ 200 μ m, please handle with care according to the precaution. A cell frame provides with distributors (liquid is fed through the ditch) and spacer net on the plastic that has ribs of grating type, to bring its ability into full play. Therefore, in case of maintenance work, be careful same as the case of ion exchange membrane after understanding its construction, paying attention to order of assembling and right side and back side.

3-2. Handling of the membranes

- 1) In case of handling of the membranes, pull the membrane faces. Handle with care so that wrinkles, bending or the other injury do not happen.
- 2) Wrap the wet membranes up in plastic bag to prevent drying. Be careful that assembled membranes keep always wet condition and spray pure water after disassembled and cover with sheets.
- 3) There are both sides in the following membrane, and it is necessary to note it for handling. Be careful when it assemble it in the electro dialyzer. (Kind of the membrane : APS, HSF, CSO).

3-3. About tightening open

- 1) Please loosen the rod and the ball knob evenly.
- 2) It is slippery when the ball knob includes moisture etc. Please loosen it after it wipes off.

3-4. In the case of disassembling

- 1) Be sure to record the fastening dimension before disassembling. (Refer to Figure-2)
- 2) If you want to interrupt the work on the way, cover the stacks with vinyl sheets, to prevent drying and invasion of foreign matters.
- 3) Start working after confirmation of breaking of the electric power to the electro dialyzer.

3-5. In the case of newly assembling

- 1) In the case of assembling of the electro dialyzer, be careful that no foreign matters invade between membranes and cell frames.
- 2) When assemble membranes and cell frames, be careful that no wrinkles nor breakage will occur. Especially in the case of setting of membranes, do the work pulling them to prevent wrinkles.
- 3) Be sure to confirm number of membrane and cell frame beforehand, to prevent mistake of assembling.
- 4) Ribs are provided at one side of the cell frames. In the case of assembling, standardize the direction of these ribs according to the stack construction drawing.

1. Preface

This instruction manual includes maintenance of disassembling, assembling and basic cautions concerning maintenance. Please confirm miscellaneous conditions that are applied to the operation of electro dialyzer (for example of solution, temperature, kind of process and relating pretreatment and the like) by the separate specifications. And start operation after read this instruction completely.

2. Specifications of the electro dialyzer

Type	DW-Lab
Dimensions of a membrane	80mm×130mm
Space between membranes	0.75mm
Effective dimension of a membrane	50mm×60mm
Effective area of a membrane	0.003 m ² /sheet
Number of membrane	refer to the attached stack construction drawing
Ion exchange membrane	refer to the attached stack construction drawing
Dimension of the unit	refer to the attached assembly drawing

ประวัติผู้วิจัย

1. ชื่อ : นาย อภิชาติ บุญทาวัน
2. ตำแหน่งปัจจุบัน : รองศาสตราจารย์ประจำสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ
3. ที่อยู่
 สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ 111 ถนนมหาวิทยาลัย ตำบลสุรนารี
 สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา 30000
 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี 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	วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร (เกียรตินิยม)	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	ไทย

5. ประสบการณ์การทำงาน

- งานวิจัยหลังปริญญาเอก ASEA-UNINET Post-doc, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีเวียนนา, ประเทศออสเตรีย (พ.ค. 2550- เม.ย. 2551).
- อาจารย์ประจำสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (ม.ค. 2548 – เม.ย. 2550)
- ผู้ช่วยศาสตราจารย์ประจำสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (เม.ย. 50 – ก.พ. 2557)
- รองศาสตราจารย์ประจำสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (ก.พ. 2557 – ปัจจุบัน)

6. สาขาความเชี่ยวชาญ

Bioseparation engineering, Membrane separation processes, Fermentation technology

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. IF = 1.986
- 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. IF = 3.420
- 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. IF = 2.892
- 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. IF = 2.497
- 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 Khunnonkwao, P., Ariyawong, C., Lertsiriyothin, W., and **Boontawan, A.** (2012). Purification of D-(-)-lactic acid from fermentation broth using nanofiltration, esterification, distillation, and hydrolysis technique. *Advanced Materials Research*, 550-553: 2945-2952
- 9 Champreda, V., Stuckey, D., and **Boontawan, A.** (2012). Separation of methanol/water mixtures from dilute aqueous solutions using pervaporation technique. *Advanced Materials Research*, 550-553: 3004-3007.

- 10 **Boontawan, A.** (2013). Purification of succinic acid from synthetic solution using vapor permeation-assisted esterification coupled with reactive distillation. *Advanced Materials Research*, 550-553: 3008-3011
- 11 Pimkaew, S., Kanchanatawee, S., and **Boontawan, A.** (2011). Process optimization of anhydrous ethanol production using vapor Permeation (VP) and pressure swing adsorption (PSA) techniques. *Thai Journal of Agricultural Science*, 44 (5): 137-143
- 12 Dung, N.T.T., Ketudat-Cairns, M., and **Boontawan, A.** (2011). Simple fed-batch technique for the production of recombinant enterokinase light chain by *Pichia pastoris*. *Thai Journal of Agricultural Science*, 44 (5): 526-533
- 13 Inthavee, W., Kanchanatawee, S., and **Boontawan, A.** (2011). Development of a composite tubular membrane for separation of acetone-butanol-ethanol (ABE) from fermentation broth by using pervaporation technique. *Thai Journal of Agricultural Science*, 44 (5): 400-407.
- 14 Lubsungneon, J., Srisuno, S., Rodtong, S., and **Boontawan, A.** (2014) Nanofiltration coupled with Vapor Permeation-Assisted Esterification as an Effective Purification Step for Fermentation-Derived Succinic Acid, *Journal of Membrane Science*, 459: 132-142 IF = 6.035
- 15 Thuy, N.T.H., and **Boontawan, A.** (2017). Production of very-high purity succinic acid from fermentation broth using microfiltration and nanofiltration-assisted crystallization. *Journal of Membrane Science*, 524:470-481. IF = 6.035
- 16 Thuy, N.T.H., Kongkaew, A., Flood, A., and **Boontawan, A.** (2017). Fermentation and Crystallization of Succinic Acid from *Actinobacillus succinogenes* ATCC55618 using Fresh Cassava Root as the Main Substrate. *Bioresource Technology*, 233:342-352. IF = 5.651.
- 17 Truong, N.T.T, and **Boontawan, A.**, Development of Bio-Jet Fuel Production Using Palm Kernel Oil and Ethanol,
- 18 Samnuknit, W., Boontawan, P., and **Boontawan, A.**, Efficient Process Development for Cellulosic Ethanol Fermentation from Cassava Pulp,
- 19 Mai, K.T., Rodtong, S., Baimak, Y., Rarey, J., and Boontawan A. (2018), Membrane-based Purification of Optically Pure D-Lactic acid from

Fermentation Broth to Poly(D-lactide) Polymer. *Journal of Membrane Science*. 551:180-190. IF = 6.035

- 20 Kongkaew, A., Tönjes, J., Siemer, M., P. Boontawan, Rarey, J., and Boontawan, A. (2018), Extractive Fermentation of Ethanol from Sweet Sorghum using Vacuum Fractionation Technique: Optimization and Techno-Economic Assessment. *Journal of Chemical Reactor Engineering*. *In Press*. IF = 0.623

Submitted

1. Truong, T.T.N., Suttichaiya, A., Hiamhoen, W., Thinnongwaeng, P., Rarey, J., Ariyawong, C., Boontawan, P., Rarey, J., Koonsrisuk, A., and **Boontawan, A.**, Production of Medium Chain Fatty Acid Ethyl Ester, Combustion, and Its Gas Emission using a Small Scale Gas Turbine Jet Engine. *Fuel*.
2. Boontawan, P., Baimark, Y., and Boontawan, A. Fermentation and Purification of L-Lactic Acid from Cassava Pulp using *Pediococcus pentosaceus* PB1 to Poly(L-lactide) Polymer. *Journal of Cleaner Production*.

In Preparation

1. Witchayapong, C., Tittabutr, P., and **Boontawan, A.** Increasing of methane content in **biogas** produced from cassava pulp supplemented with spent brewer yeast.
2. Laipraditkorn W., Kongmanklang, C., Amnuaypanich, S., and **Boontawan, A.** Development of ZIF-8 with Polysulfone mixed matrix membrane for improving the quality of **biogas** derived from tapioca starch factory.
3. Ariyawongse, C., **Boontawan, A.**, and Ajharn, W., Response surface methodology for cellulosic ethanol production using mulberry stalk as the main substrate.
4. Pakdeedeckakiet, W., and **Boontawan A.** One-pot ionic liquid pretreatment and saccharification of mulberry stalk for cellulosic L-lactic acid fermentation.

5. Poopisut, P., Gosarawit, C., Truong, N.T.T., Ketudat-Cairns, M., Pattiya, A., and **Boontawan, A.**, Production and Characterization of Synthetic Paraffinic Kerosene from *Rhodospiridium paludigenum* using Fast Pyrolysis and Vacuum Fractionation Technique.

8. **งานนำเสนอในงานประชุมทางวิชาการระดับนานาชาติ:**

1. **Boontawan, A.**, Schausberger, P., Bösch, P., Brinkmann, T., and Friedl, A. Dehydration of Ethanol/Water Mixture using Pervaporation and Vapor Permeation Technique. *The 6th Regional Symposium on Membrane Science and Technology 2008*, 13rd-15th August 2008, Phuket, Thailand (นำเสนอด้วยวาจา)
2. **Boontawan, A.**, Schausberger, P., Bösch P., Brinkmann, T., and Friedl, A. Dehydration of Ethanol/Water Mixture using Vapor Permeation Technique. *2008 International Congress on Membranes and Membrane Processes*, 12nd-18th July 2008, Hawaii, United State of America. (นำเสนอแบบโปสเตอร์)
3. Bösch, P., Schausberger, P., **Boontawan, A.**, and Friedl, A. Modelling and Process Integration of Membranes for Ethanol Dehydration. *2008 International Congress on Membranes and Membrane Processes*, 12nd-18th July 2008, Hawaii, United State of America. (นำเสนอด้วยวาจา)
4. Panvichit, P., **Boontawan, A.**, and Kanchanatawee, S. Selection of Lactic Acid Bacteria for L-Lactic Acid Fermentation from Cassava Starch. *The 3rd International Conference on Renewable Resources and Biorefineries 2007*, 4th-6th June 2007, Ghent University, Belgium. (นำเสนอแบบโปสเตอร์)
5. Panvichit, P., Kanchanatawee, S. and **Boontawan, A.** Mass transfer characteristic of ethanol from diluted aqueous solution through silicone membranes in a liquid-liquid contacting system. *Membrane Science & Technology 2006*, 26th-29th April 2006, Nanyang Technological University, Singapore. (นำเสนอแบบโปสเตอร์)
6. **Boontawan, A.** and Stuckey, D.C. A Membrane Bioreactor for Biotransformation of Monoterpene. *3rd Regional Symposium on Membrane Science & Technology 2005*, 27th-28th April 2005, Institut Teknologi Bandung, Indonesia. (นำเสนอด้วยวาจา)
7. **Boontawan, A.** Molecular Diffusion in PVA Membrane for Separation Dehydration of EtOH/H₂O Mixtures using Vapor Permeation Technique.

Nanotech Insight Conference 2009, 29th March-2nd April 2009, Barcelona, Spain. (นำเสนอแบบโปสเตอร์)

8. **Boontawan, A.** and Pimkaew, S. Anhydrous ethanol production from fermentation broth using distillation, vapor permeation, and pressure swing adsorption technique. *The 8th International Conference on Membrane Science and Technology 2010*, 29th November-2nd December 2010, Institute Teknologi Bandung, Indonesia. (นำเสนอด้วยวาจา)
9. Molina, S., Lertsiriyothin, W., and **Boontawan, A.** Production and Purification of D-(-)-Lactic Acid from Concentrated Fermentation Broth using Esterification, Distillation and Hydrolysis Technique. *The 4th International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products (FerVAAP) Conference*, 29th -31st August 2011, Khon Kaen, Thailand. (นำเสนอด้วยวาจา)
10. Samnukit, 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 (นำเสนอด้วยวาจา)
11. Samnukit, W., Boontawan, P., and **Boontawan, A.**, Efficient Process Development for Cellulosic Ethanol Fermentation from Cassava Pulp, *The 4th International Conference on Chemical and Food Engineering*, 27th -30th March 2017, Osaka, Japan.
12. Truong, N.T.T., and **Boontawan, A.**, Development of Bio-Jet Fuel Production Using Palm Kernel Oil and Ethanol, *The 4th International Conference on Chemical and Food Engineering*, 27th -30th March 2017, Osaka, Japan.