



รายงานการวิจัย

**การเก็บเกี่ยวกรด L-แล็กติกจากน้ำหมักด้วยระบบ
อิเล็กโตรดีไอออนไนเซชัน**

**(Recovery of L-lactic acid from fermentation broth using
electrodeionization technique)**

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

**ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)**

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT 3-304-51-12-09



รายงานการวิจัย

การเก็บเกี่ยวกรด L-แล็กติกจากน้ำหมักด้วยระบบ
อิเล็กโตรดีไอออไนเซชัน

(Recovery of L-lactic acid from fermentation broth using
electrodeionization technique)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อภิชาติ บุญทวัน

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ปีงบประมาณ พ.ศ. 2551

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

ตุลาคม 2552

กิตติกรรมประกาศ

การเก็บเกี่ยว กรด L-เล็กติกจากน้ำหมักด้วยระบบอิเล็กโตรดิไอออนไนเซชัน ในการศึกษานี้ได้
ทำการวิจัยที่ห้องปฏิบัติการวิศวกรรมกระบวนการทางชีวภาพ อาคารปฏิบัติการ 3 มหาวิทยาลัย
เทคโนโลยีสุรนารี ซึ่งสามารถสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีและสำนักงาน
คณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ปีงบประมาณ 2551



ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อภิชาติ บุญทาวน
หน่วยวิจัยการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพจากชีวมวล
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อภาษาไทย

ในปัจจุบันกรดแล็กติกถือว่ามีค่าสำคัญต่ออุตสาหกรรมหลากหลาย โดยเฉพาะอย่างยิ่ง อุตสาหกรรมพอลิเมอร์ ดังนั้นจึงมีความต้องการเป็นอย่างมาก ซึ่งสามารถผลิตได้โดยเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกนั่นเอง ซึ่งจะเปลี่ยนสารตั้งต้นไปเป็นกรดแล็กติก เพื่อที่จะลดต้นทุนการผลิตกรดแล็กติกในกระบวนการหมักจึงมีการใช้กลูโคสไซรัปที่เป็นผลิตภัณฑ์จากแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนและใช้ brewer's yeast extract ที่เป็นของเหลือทิ้งจากโรงงานเบียร์เป็นแหล่งไนโตรเจน เพื่อเปลี่ยนสารอาหารเหล่านี้เป็นกรดแล็กติกที่เป็นผลผลิตหลักโดยเชื้อสายพันธุ์ *Pediococcus pentosaceus* ในกระบวนการหมักแบบกึ่งกะ อย่างไรก็ตามยังมีปัญหาจากการยับยั้งโดยกรดแล็กติกที่เป็นผลผลิตที่เกิดขึ้นในน้ำหมัก ทั้งนี้ในงานวิจัยนี้จึงได้มุ่งเน้นในการศึกษาถึงระบบการแยกกรดแล็กติกออกจากระบบ คือระบบ EDI อย่างต่อเนื่อง (Continuous electrodeionization, CEDI) เพื่อให้สามารถยืดเวลาในกระบวนการหมัก ให้เกิดการผลิตกรดแล็กติกอย่างต่อเนื่อง และถือเป็นขั้นตอนที่สำคัญมากในการที่จะนำกรดแล็กติกไปใช้ได้ โดยที่หลักการของระบบ EDI ประกอบด้วย ตัวให้กระแสไฟฟ้า เรซิน ion exchange membranes (anion - cation exchange membranes) ที่เลือกผ่านกรดแล็กติกที่มีการไหลเวียนน้ำหมักผ่านระบบ EDI เพื่อเยื่อแผ่นจะสามารถแยกกรดแล็กติกออกจากน้ำหมักไปเก็บไว้ในอีกด้าน concentration side ดังนั้นจึงมีการใช้เทคนิคการแยกผลิตภัณฑ์ขณะกระบวนการกำลังดำเนินการ (*in situ* product removal technique) นั้นถูกนำมาศึกษาเนื่องจากสามารถควบคุมระบบได้ง่ายและผลผลิตจะไม่ยับยั้งกระบวนการหรือปฏิกิริยา จากการการประยุกต์ใช้ระบบ EDI ร่วมกับการหมักนี้ พบว่าสามารถลดค่าความเป็นพิษของกรดแล็กติกที่มีต่อเซลล์แบคทีเรียและอัตราการผลิตกรดแล็กติก ซึ่งจะเห็นได้จากการที่ระบบสามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพและเวลาที่ยาวนาน ในขณะที่ปฏิกิริยาการหมักในแบบกึ่งกะจะหยุดอยู่ที่ประมาณ 96 ชั่วโมงเท่านั้น ถ้า volumetric productivity ในระบบ EDI และการหมักแบบกึ่งกะ อยู่ที่ 3.39 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง การแยกเอากรดแล็กติกออกจากน้ำหมักในระหว่างที่ปฏิกิริยากำลังดำเนินไปอยู่นั้นจะส่งผลในการลดการสะสมของกรดแล็กติกในน้ำหมัก ทำให้เชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกไม่ถูกยับยั้ง และสามารถผลิตกรดแล็กติกได้เพิ่มมากขึ้น ทั้งยังสามารถแยกเพียงกรดแล็กติกออกจากน้ำหมักเท่านั้น โดยที่น้ำตาลหรือสารอื่นๆ ไม่ออกจากระบบ อีกทั้งตลอดการทดลองเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดได้ถูกกักกันไว้ภายในถังหมักจากการกรองน้ำหมักก่อนที่จะปั๊มของเหลวเข้าสู่ระบบ EDI เกิดการแยกกรดแล็กติกออกมาให้บริสุทธิ์ เพื่อให้ได้กรดแล็กติกสำหรับนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นหรือวัตถุดิบในงานต่อๆ ไป ทั้งยังพัฒนากระบวนการที่แยกให้ได้สารที่มีบริสุทธิ์สูงอีกด้วย เพื่อที่จะพัฒนากระบวนการผลิตกรดแล็กติกทั้งระบบต่อไป

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Nowadays, Lactic acid plays important roles in various industries especially bio-polymer industry. Poly-lactic acid has been attracting much attention because it is producible from renewable resources, e.g. starch, and has very low or non-toxicity and high mechanical performance comparable to those of non-degradable polymers. In order to reduce production cost, this work used hydrolyzed starch as starting substrate supplemented with brewer's yeast extract as nitrogen source. The strain employed in this work was *Pediococcus pentosaceus* because of its high productivity. However, lactic acid productions in both batch and fed-batch mode suffer from end-product inhibition, and traditional product recovery processes require high energy input. In order to alleviate product inhibitory effect during fermentation and to facilitate subsequent downstream processes, the product must be selectively removed *in situ* from the fermentation broth. Continuous electrodeionization (CEDI) is the most advance membrane process for separation of charged molecules. It captures charged materials with ion-exchange resins before continuously removed by ion-permeable membrane under direct electrical current. As a result, separation performance is significantly improved especially in the real fermentation system where product inhibition affects the volumetric productivity. A commercial CEDI spiral-wound module (IonPure[®]) was purchased from Siemens, USA whilst an adjustable power supply was domestically manufactured. The experiment used synthetic feeds with initial lactic acid concentrations in the range between 10-50 g/L. The direct electric currents were adjusted in the range of 0-20 volts. The mass transfer rate has been found to be a function of feed concentration, feed flow rate, and most importantly current density. In fermentation system, the biochemical reaction, in fed-batch process, stopped at only 96 hours whereas fed-batch mode coupling with EDI system seemed to work more efficiently and for a longer time. The volumetric productivity of this system was 3.39 g.L⁻¹.hr⁻¹ with the highest concentration of 160 g.L⁻¹ in the receiving solution. In conclusion, continuous EDI technique is successfully applied for *in situ* lactic acid recovery from fermentation broths in both batch and fed-batch mode. The technique is strongly encouraged in scaling up the production system for pilot plant scale.

สารบัญเรื่อง

กิตติกรรมประกาศ.....	3
บทคัดย่อภาษาไทย.....	4
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	5
สารบัญเรื่อง.....	6
สารบัญตาราง.....	9
สารบัญภาพ.....	10
สารบัญภาพ.....	10
บทที่ 1 บทนำ.....	12
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหางานวิจัย.....	12
1.2 กรดแล็กติก.....	12
1.3 กระบวนการผลิตกรดแล็กติก.....	14
1.3.1 การผลิตโดยวิธีทางเคมี.....	14
1.3.2 การผลิตโดยกระบวนการทางชีวภาพ (Fermentation processes).....	15
1.4 แบคทีเรียกรดแล็กติก.....	16
1.4 การผลิตโดยกระบวนการทางชีวภาพของกรดแล็กติก (Fermentation processes).....	17
1.4.1 กระบวนการหมักแบบกะ.....	17
1.4.2 กระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง (Continuous fermentation).....	17
1.4.3 กระบวนการหมักแบบกึ่งกะ (Fed-batch fermentation).....	18
1.5 Downstream processes.....	19
1.6 กระบวนการแยกผลิตภัณฑ์.....	21
1.6.1 การเลือกใช้วิธีการแยก.....	21
1.7 การพิจารณาการเลือกใช้ระบบ (system consideration).....	23
1.8 กระบวนการแยกโดยใช้เยื่อแผ่นสังเคราะห์.....	23
1.8.1 การจำแนกชนิดของเยื่อแผ่น.....	24
1.8.2 จำแนกตามแรงขับเคลื่อน (driving forces).....	25
1.9 การแยกกรดแล็กติกจากน้ำหมักด้วยระบบอิเล็กโตรไดโอนไนเซชัน (Electrodeionization, EDI).....	26
1.10 การแยกผลิตภัณฑ์ในระหว่างที่การหมักกำลังดำเนินอยู่ (Extractive fermentation).....	28

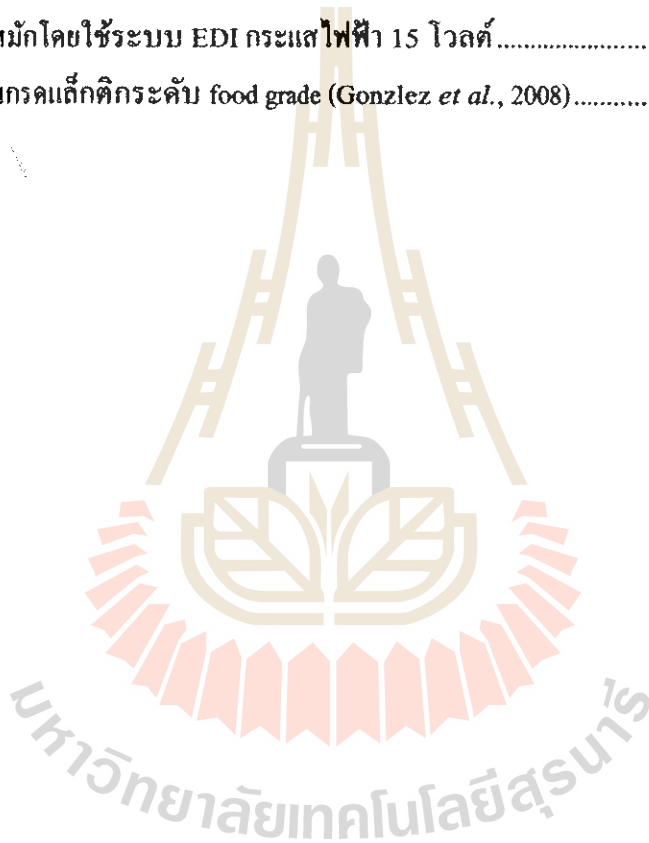
1.10	ดังปฏิกรณ์ชีวภาพเมมเบรนด้วยระบบอิเล็กโตรไดโอดอินไลน์แซชั่น (EDI)	29
1.10	จุดประสงค์ของ โครงการวิจัย.....	31
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย		32
2.1	อุปกรณ์และสารเคมี	32
2.2	เชื้อจุลินทรีย์.....	32
2.2.1	อาหารเลี้ยงเชื้อ	33
2.2.2	การเตรียมกล้าเชื้อ.....	33
2.3	การศึกษากระบวนการหมักกรดแลกติกในดังปฏิกรณ์ชีวภาพ	33
2.3.1	กระบวนการหมักแบบกะ.....	33
2.4.2	กระบวนการหมักแบบกึ่งกะ.....	34
2.5	EDI experimental setup	35
2.6	การศึกษาการหมักกรดแลกติกในดังปฏิกรณ์ชีวภาพด้วยระบบ EDI.....	36
2.7	การวิเคราะห์.....	36
2.7.1	การวิเคราะห์เชิงปริมาณของกรดแลกติก.....	36
2.7.2	การวัดความเข้มข้นของเซลล์.....	37
2.7.3	การวิเคราะห์น้ำตาล.....	37
บทที่ 3 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....		38
3.1	การศึกษาการแยกผลิตภัณฑ์กรดแลกติกด้วยระบบ EDI	38
3.2	การศึกษาพฤติกรรมการถ่ายเทมวลของกรดแลกติกในระบบ EDI	39
	การศึกษาการดูดซับ (Adsorption).....	39
3.3	การศึกษาปัจจัยต่างๆที่มีอิทธิพลต่อการแยกกรดแลกติกด้วยระบบ EDI โดยสารละลายป้อน ตั้งเคราะห์ (Abiotic experiment).....	42
3.3.1	การศึกษาถึงผลของกระแสไฟฟ้าที่ใช้	43
3.3.2	การศึกษาถึงผลของความเข้มข้นกรดแลกติกเริ่มต้น.....	47
3.4	ศึกษาจลนศาสตร์กระบวนการผลิตกรดแลกติกโดยวิธีการหมัก (Fermentation processes).....	51
3.5	กระบวนการหมักกรดแลกติกโดยดังปฏิกรณ์ชีวภาพ.....	57
3.6	การหมักกรดแลกติกแบบกึ่งกะ (Fed-batch fermentation process).....	58
3.7	การหมักกรดแลกติกควบคู่ระบบ EDI ในดังหมักปฏิกรณ์ชีวภาพเมมเบรน	60
บทที่ 4 บทสรุป.....		66

4.1 สรุปผลการทดลอง.....	66
4.2 ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต.....	67
ภาคผนวก ก.....	69
ภาคผนวก ข.....	70
ภาคผนวก ค.....	71
ประวัติผู้วิจัย.....	75
บรรณานุกรม.....	78



สารบัญตาราง

ตาราง 1 โครงสร้างทางเคมีและสมบัติของกรด L-แล็กติก (ศิริตันสนิขกุล, 2547).....	13
ตาราง 2 ตัวอย่างวิธีการแยกผลิตภัณฑ์โดยอาศัยสมบัติทางกายภาพและเคมีที่แตกต่างกัน (Lye <i>et al.</i> , 1999).....	22
ตาราง 3 การจำแนกเชื้อแผ่นโดยอาศัยแรงขับเคลื่อนเป็นตัวกำหนด (Huang, 1991).	26
ตาราง 4 เปรียบเทียบความเข้มข้นของกรดแล็กติกโดยกระบวนการหมักและการแยกกรดแล็กติกออกจากน้ำหมักโดยใช้ระบบ EDI กระแสไฟฟ้า 15 โวลต์.....	63
ตาราง 5 มาตรฐานกรดแล็กติกระดับ food grade (Gonzlez <i>et al.</i> , 2008).....	67



สารบัญภาพ

รูปภาพ 1 ลักษณะโครงสร้างทางเคมีของกรดเล็กติก (Nelson <i>et al.</i> , 2000).....	13
รูปภาพ 2 แผนผังการผลิตกรดเล็กติกโดยวิธีทางเคมี (Narayanan <i>et al.</i> , 2004b).....	15
รูปภาพ 3 การผลิตกรดเล็กติกภายใต้สภาวะไร้อากาศจากกลูโคส	16
รูปภาพ 4 สรุปกระบวนการผลิตกรดเล็กติกในอุตสาหกรรมที่ใช้ในปัจจุบัน (ศิริคันสนียกุล, 2547)...	20
รูปภาพ 5 กระบวนการแยกโดยใช้เยื่อแผ่นซึ่งใช้ขนาดของโมเลกุลเป็นตัวกำหนด (Mulder, 1991).....	24
รูปภาพ 6 การแตกตัวของกรดเล็กติกในสารละลายค่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ (Belter <i>et al.</i> , 1988).....	27
รูปภาพ 7 หลักการทำงานของเครื่อง Electrodeionization (EDI) (Matsuura, 1994).....	28
รูปภาพ 8 แผนภาพจำลองการทำงานทดลองการผลิตกรดเล็กติกโดยใช้ระบบอิเล็กโทรไลต์ไอออนใน เซชัน	29
รูปภาพ 9 การจัดการทดลองสำหรับเครื่อง electrodeionization (EDI) (Widiasa <i>et al.</i> , 2004).....	30
รูปภาพ 10 อุปกรณ์ในการทดลองกระบวนการหมัก (Fermentation processes)	34
รูปภาพ 11 Experimental setup สำหรับกระบวนการแยกกรดเล็กติกด้วย EDI technique.	35
รูปภาพ 12 ความสามารถในการดูดซับกรดเล็กติกในระบบการดูดซับ.....	40
รูปภาพ 13 การประกอบและติดตั้งระบบ EDI	43
รูปภาพ 14 กราฟระหว่างค่าความเข้มข้นกรดเล็กติกกับเวลาของทางด้านสารป้อนและด้านสารละลาย ตัวรับในกระบวนการแยก ที่มีค่ากระแสไฟฟ้า 10 โวลต์ และความเข้มข้นกรดเล็กติกเริ่มต้น 15 กรัมต่อลิตร อัตราการป้อนเท่ากับ 20 มิลลิลิตรต่อนาที.....	44
รูปภาพ 15 กราฟระหว่างค่าความเข้มข้นกรดเล็กติกกับเวลาของทางด้านสารป้อนและด้านสารละลาย ตัวรับในกระบวนการแยก ที่มีค่ากระแสไฟฟ้า 5 โวลต์ และความเข้มข้นกรดเล็กติกเริ่มต้น 15 กรัมต่อลิตร อัตราการป้อนเท่ากับ 20 มิลลิลิตรต่อนาที.....	45
รูปภาพ 16 กราฟระหว่างค่าความเข้มข้นกรดเล็กติกกับเวลาของทางด้านสารป้อนและด้านสารละลาย ตัวรับในกระบวนการแยก ที่มีค่ากระแสไฟฟ้า 15 โวลต์ และความเข้มข้นกรดเล็กติกเริ่มต้น 15 กรัมต่อลิตร อัตราการป้อน 20 มิลลิลิตรต่อนาที	46
รูปภาพ 17 กราฟระหว่างค่าความเข้มข้นกรดเล็กติกกับเวลาของทางด้านสารป้อนและด้านสารละลาย ตัวรับในกระบวนการแยก ที่มีค่ากระแสไฟฟ้า 15 โวลต์ และความเข้มข้นกรดเล็กติกเริ่มต้น 5 กรัมต่อลิตร อัตราการป้อน 20 มิลลิลิตรต่อนาที	48

รูปภาพ 18 กราฟระหว่างค่าความเข้มข้นกรดแล็กติกกับเวลาของทางด้านสารป้อนและด้านสารละลายตัวรับในกระบวนการแยก ที่มีค่ากระแสไฟฟ้า 15 โวลต์ และความเข้มข้นกรดแล็กติกเริ่มต้น 10 กรัมต่อลิตร อัตราการป้อน 20 มิลลิลิตรต่อนาที	48
รูปภาพ 19 กราฟระหว่างค่าความเข้มข้นกรดแล็กติกกับเวลาของทางด้านสารป้อนและด้านสารละลายตัวรับในกระบวนการแยก ที่มีค่ากระแสไฟฟ้า 15 โวลต์ และความเข้มข้นกรดแล็กติกเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร	49
รูปภาพ 20 กระบวนการผลิตกรดแล็กติกโดยกระบวนการหมักจากเชื้อ <i>P. pentosaceus</i> ด้วย สูตรอาหาร MRS	54
รูปภาพ 21 กระบวนการผลิตกรดแล็กติกจากน้ำตาลกลูโคสเสริมด้วย brewer's yeast extract โดยเชื้อ <i>Lactococcus lactis</i> ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที.....	55
รูปภาพ 22 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของแหล่งไนโตรเจนที่เป็น commercial yeast extract และ brewer's yeast extract ที่มีกลูโคสไซรัปเป็นแหล่งคาร์บอน ในกระบวนการผลิตกรดแล็กติกด้วยเชื้อ <i>P. pentosaceus</i>	56
รูปภาพ 23 กราฟการเปรียบเทียบอัตราการป้อนของสารอาหาร ในกระบวนการผลิตกรดแล็กติกโดยเชื้อ <i>P. pentosaceus</i>	59
รูปภาพ 24 กระบวนการหมักแบบกึ่งกะควบคุมไปกับระบบการแยก EDI	62
รูปภาพ 25 แสดงความเข้มข้นของกรดแล็กติกของทั้งสองด้านของสารละลายในระบบ EDI	63
รูปภาพ 26 การแยกกรดแล็กติกออกจากน้ำหมักแบบต่อเนื่องด้วยระบบ EDI (Continuous lactic acid removal from fermentation broth using EDI technique)	64
รูปภาพ 27 การแยกกรดแล็กติกออกจากน้ำหมักโดยที่ไม่มีน้ำตาลออกมาจากระบบเปรียบเทียบกับสิ่งซึ่งไม่เข้มข้นเมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายตัวอย่าง blank	64
รูปภาพ 28 โครมาโตแกรมของกรดแล็กติกจากน้ำหมักหลังจากทำการวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง HPLC .	70
รูปภาพ 29 กราฟมาตรฐานของ Dry cell weight กรดแล็กติกที่เรียกแล็กติก โดยวัดค่าความขุ่นที่ 600 นาโนเมตร	72
รูปภาพ 30 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกรดแล็กติกที่ทำการวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง HPLC	73
รูปภาพ 31 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลรีดิวซ์ในกระบวนการหมักโดยวิธี DNS method.....	74

บทที่ 1 บทนำ

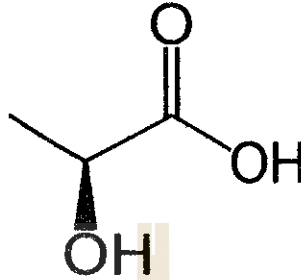
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหางานวิจัย

การผลิตกรดแล็กติกเพื่อใช้เป็นพลาสติกชีวภาพ (bioplastic) กำลังเป็นที่สนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากสามารถใช้ทดแทนพลาสติกที่ได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมีเป็นอย่างดีและสามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม และมีการใช้เชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกที่สามารถสร้างกรดแล็กติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักในระบบในการพัฒนาการผลิตกรด L-แล็กติกในระดับอุตสาหกรรมต่อไป ในปัจจุบันการผลิตกรดแล็กติกในระดับอุตสาหกรรมนั้นจะใช้กรดซัลฟูริกเข้มข้น เพื่อแยกเอากลีโคแลคซีมออกจากสารละลายกรดแล็กติก ก่อนที่จะผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ ซึ่งจะเกิดปัญหาในการกำจัดกากของแข็งที่เกิดขึ้นเป็นปริมาณมากจากการบวนการผลิตเอกลีโคแลคซีมแตกเศษด้วย ในงานวิจัยนี้จะมีการประยุกต์ใช้ระบบ electrodeionization (EDI) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ดัดแปลงมาจากการแยกกรดซัลฟูริกจากน้ำหมัก (Widiasa *et al.*, 2004) โดยเป็นระบบผสม (Hybrid system) ระหว่างการแลกเปลี่ยนประจุ (ion Exchange) กับ ระบบอิเล็กโทรไดอะลิซิส (electrodialysis) ซึ่งจะเป็นการใช้เยื่อแผ่นชนิดที่ยอมให้สารที่มีประจุผ่านได้ โดยจะใช้สนามไฟฟ้าเป็นตัวขับเคลื่อนให้กรดแล็กติกที่อยู่ในรูปของเอกลีโคแลคซีมแตกตัวออกจากสารป้อน (Feeding solution) ภายในขั้นตอนเดียว ซึ่งจะเป็นการลดขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ลงเมื่อเปรียบเทียบกับการทำให้บริสุทธิ์แบบทั่ว ๆ ไป อีกทั้งลดต้นทุนในด้านของสารเคมีที่จะใช้ด้วย

1.2 กรดแล็กติก

กรดแล็กติก (รูปภาพ 1) เป็นกรดอินทรีย์ที่มีความสำคัญเป็นอย่างมาก เนื่องจากสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้กับหลายอุตสาหกรรม กรดแล็กติกพบเป็นครั้งแรกในนมเปรี้ยวโดยนักเคมีชาวสวีเดนเมื่อปี ค.ศ. 1780 ซึ่งภายหลังได้มีการศึกษาอย่างกว้างขวางและพบว่าสามารถผลิตได้สองแนวทาง โดยปริมาณสองในสามส่วนผลิตได้มาจากกระบวนการหมัก ส่วนที่เหลือผลิตจากกระบวนการทางเคมี กรดแล็กติกที่ผลิตได้มานั้นประมาณ 85 % ใช้กันอยู่ในอุตสาหกรรมอาหาร โดยใช้กรดแล็กติกทำหน้าที่เป็นตัวปรับสภาพกรดในอาหาร เพื่อให้เกิดรสชาติของความเปรี้ยวที่พึงประสงค์ของอาหารและเครื่องดื่ม ตลอดจนการใช้ในอาหารแปรรูป อีกทั้งยังถูกใช้เป็นสารกันบูดเพื่อป้องกันการเสียของผลิตภัณฑ์อาหารได้ นอกจากนี้ยังมีการประยุกต์ใช้กรดแล็กติกในเวชภัณฑ์ อุตสาหกรรมเท็กซ์ไทล์ และใช้เป็นส่วนผสมของแลกเกอร์และสารพอลิเมอร์ได้อีกด้วย (สารโรจน์, 2547) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ในปัจจุบันมีการศึกษา

ค้นคว้าเป็นอย่างมาก นั่นคือ นำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตพลาสติกที่สามารถย่อยได้โดยธรรมชาติ ที่เรียกว่า พอลิแลกเตต (polylactate) เพื่อใช้ทดแทนพลาสติกที่ผลิตได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี



รูปภาพ 1 ลักษณะ โครงสร้างทางเคมีของกรดแล็กติก (Nelson *et al.*, 2000)

ตาราง 1 โครงสร้างทางเคมีและสมบัติของกรด L-แล็กติก (ศิริกันสนีย์กุล, 2547)

คุณสมบัติ	ค่า
สูตรเคมี	$\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}$
น้ำหนักโมเลกุล	90.08
จุดหลอมเหลว	$53\text{ }^\circ\text{C}$
จุดเดือด	$122\text{ }^\circ\text{C}$
$[\alpha]_D^{20}$	$+3.3^\circ$ (5%, H_2O)
ความหนาแน่น	1.294 กรัมต่อมิลลิลิตร ($20\text{ }^\circ\text{C}$)

เนื่องจากการผลิตกรดแล็กติกในประเทศไทยนั้น เป็นการดำเนินการจากบริษัทต่างประเทศ ทำให้มีความจำเป็นต้องพัฒนางานวิจัยภายในประเทศขึ้น โดยกระบวนการหมักจากเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติก (Lactic acid bacteria) ที่สามารถผลิตกรดแล็กติกได้สูง และสามารถใช้วัตถุดิบที่มีราคาถูก และหาได้ง่าย มีตลอดทั้งปีได้ เช่น แป้งมันสำปะหลัง เป็นต้น ซึ่งถือได้ว่าเป็นการช่วยเพิ่มมูลค่าผลิตภัณฑ์ และส่งเสริมทางการเกษตรได้อีกทางหนึ่ง อีกทั้งในปัจจุบันมีการคำนึงถึงสิ่งแวดล้อมมากขึ้น และมีการสร้างสิ่งทดแทนพลาสติกที่มีอยู่มากที่ใช้กันอยู่ทั่วไปในชีวิตประจำวัน โดยที่ส่วนใหญ่ได้มาจากการสังเคราะห์ทางเคมีจากสารตั้งต้นที่มาจากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี ปริมาณการใช้งานพอลิเมอร์ชนิดต่าง ๆ เพิ่มปริมาณขึ้นอย่างต่อเนื่อง และได้ก่อให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อมหลายอย่างตามมา โดยเฉพาะ

อย่างไร้ปัญหาในการกำจัดหลังการใช้งาน ถุงพลาสติกและกล่องโฟมที่เราใช้ใส่อาหารต้องใช้เวลาในการย่อยสลายตามธรรมชาติถึงกว่า 400 ปี ทางหนึ่งของการแก้ปัญหาคือการใช้พอลิเมอร์ที่สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ หรือ biodegradable polymer หรือ biopolymer ซึ่งมีอยู่หลายชนิด ทั้งที่ได้จากธรรมชาติ เช่น แป้ง หรือจากการสังเคราะห์ทางเคมี อย่างไรก็ตามในปัจจุบันนี้มีการผลิตพอลิเมอร์ที่เรียกว่า พอลิแล็กติกแอซิด (polylactic acid) หรือ PLA ซึ่งสามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ ซึ่งมีกรดแล็กติกเป็นสารตั้งต้น ก่อนจะนำกรดแล็กติกที่ได้มาต่อกันเป็นสายโซ่ยาวให้เป็น PLA โดยกระบวนการพอลิเมอไรเซชัน (polymerization) ทั้งยัง สามารถขึ้นรูปด้วยกระบวนการผลิตที่ใช้ทั่วไปให้เป็นผลิตภัณฑ์ชนิดต่างๆ โดยมีสมบัติเทียบเคียงได้กับผลิตภัณฑ์ในท้องตลาด มีราคาไม่แพงนัก และที่สำคัญผลิตได้จากพืชผลทางการเกษตรต่างๆ

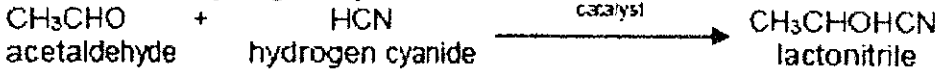
1.3 กระบวนการผลิตกรดแล็กติก

การศึกษากการผลิตกรดแล็กติกขึ้นเป็นครั้งแรกในประเทศสหรัฐอเมริกา โดยมีการผลิตเกลือแคลเซียมแล็กเตตมาใช้ทดแทนการนำเข้าแร่ธาตุที่เป็นส่วนผสมของผงฟูในขณะนั้น ต่อมาได้มีการพัฒนากระบวนการผลิตกรดแล็กติกในระบบอุตสาหกรรม เพื่อหาสภาวะและวัตถุดิบที่เหมาะสม อีกทั้งศึกษาวิธีการผลิตให้ได้ผลผลิตสูงสุด โดยปัจจุบันได้พบว่าสามารถมีการผลิตกรดแล็กติกได้เป็น 2 แนวทาง คือ การผลิตทางเคมีและการผลิตทางชีวภาพ

1.3.1 การผลิตโดยวิธีทางเคมี

กระบวนการผลิตกรดแล็กติกโดยวิธีทางเคมีนั้น เกิดขึ้นจากอาศัยปฏิกิริยาออกซิเดชันของพอรินด้วยกรดไนตริก และใช้ไนโตรเจนเปอร์ออกไซด์ในสภาวะที่มีแก๊สออกซิเจนร่วมด้วย ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เรียกว่า กรดแอลฟา-ไนตราโตพโรปิโอนิก ซึ่งจะสามารถถูกไฮโดรไลซ์ต่อไปได้เป็นกรดแล็กติกและกรดไนตริก และอีกวิธีหนึ่งคือเริ่มจากแลคโตรไนโทดไฮโดรเจนไซยาไนด์จะถูกเติมลงในอะเซทิลดีไฮด์ โดยปฏิกิริยาจะเกิดในสภาวะที่เป็นของเหลวและที่ความดันสูง ส่วนแลคโตรไนโทดที่เหลือจะถูกทำให้บริสุทธิ์และนำกลับมาใช้ใหม่ จากนั้นปฏิกิริยาจะเกิดการไฮโดรไลซ์ไปเป็นกรดแล็กติก โดยกรดไฮโดรคลอริกหรือกรดซัลฟูริก ส่งผลให้ได้เกลือแอมโมเนียมกับกรดแล็กติกขึ้น ดังแสดงผังรูปภาพ 2 จากปฏิกิริยากระบวนการทางเคมีจะได้กรดแล็กติกชนิด racemic mixture ซึ่งตรงกันข้ามกับการผลิตโดยกระบวนการทางชีวภาพ (Narayanan *et al.*, 2004a)

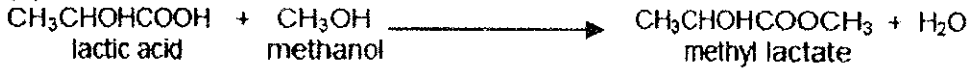
(a) Addition of Hydrogen Cyanide



(b) Hydrolysis by H_2SO_4



(d) Esterification



(e) Hydrolysis by H_2O



รูปภาพ 2 แผนผังการผลิตกรดแล็กติกโดยวิธีทางเคมี (Narayanan *et al.*, 2004b)

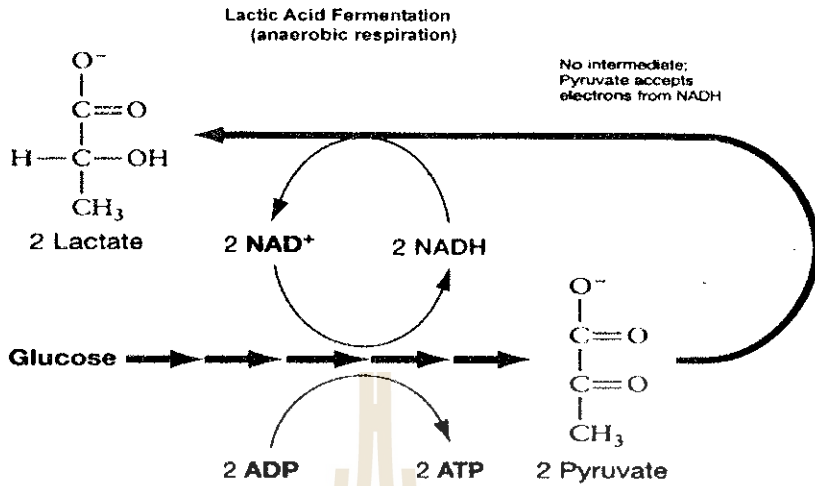
1.3.2 การผลิตโดยกระบวนการทางชีวภาพ (Fermentation processes)

แบคทีเรียกรดแล็กติกแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ ตามผลิตภัณฑ์ที่ได้ จากกระบวนการหมักกลูโคส และ path way ที่ใช้ ได้แก่

1. Homolactic เป็นแบคทีเรียกรดแล็กติกที่หมักกลูโคสโดยใช้ glycolysis pathway ไปเป็นกรดแล็กติกเป็นส่วนใหญ่

2. Heterolactic เป็นกลุ่มที่หมักกลูโคสโดยใช้ 6-phosphogluconate/ phosphoketolase pathway ไปเป็นสารหลายชนิดได้แก่ กรดแล็กติก, เอทานอล, คาร์บอนไดออกไซด์ ในสัดส่วน 1:1:1 และยังมีกรดอื่น ๆ เช่น กรดอะซิติก, กรดฟอร์มิก และพบว่า *L. casei* เป็นแบคทีเรียกรดแล็กติกในกลุ่มนี้ (วิสุทธิแพทย์, 2542)

น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเป็นสารตั้งต้นสำหรับเอนไซม์จากเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกโดยน้ำตาลดังกล่าวจะถูกเปลี่ยนให้เป็นกรดแล็กติก (วิถี Embden-Meyerhof-Parnas, EMP pathway) สำหรับปฏิกิริยาทางชีวเคมีในการเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นกรดแล็กติกนั้นจะอยู่ภายใต้สภาวะไร้อากาศซึ่งน้ำตาลถูกเปลี่ยนให้เป็นกรดไพรูวิกโดยผ่านทางวิถีไกลโคไลซิส ซึ่งจะมีการเติมฟอสเฟต 2 โมเลกุลเข้าไปในน้ำตาลก่อนที่จะแตกตัวกลายเป็น glyceraldehyde-3-phosphate ซึ่งเป็นสารที่มีคาร์บอน 3 อะตอม จำนวน 2 โมเลกุลก่อนที่จะถูกออกซิไดซ์เป็นไพรูเวทและรีดิวซ์เป็นกรดแล็กติกต่อไปดังแสดงในรูปภาพ 3 โดยที่จะมีการผลิต ATP สุทธิ 2 โมเลกุลจากน้ำตาล 1 โมเลกุล (Hofmeyr, 1997)



รูปภาพ 3 การผลิตกรดแล็กติกภายใต้สภาวะไร้อากาศจากกลูโคส

1.4 แบคทีเรียกรดแล็กติก

จุลินทรีย์สามารถใช้ผลิตสารต่างที่ก่อให้เกิดประโยชน์ได้มากมายหลายชนิด ดังนั้นจากการที่แป้งมันสำปะหลังมีปริมาณมากในประเทศไทย จึงได้มีการนำเอาจุลินทรีย์มาใช้เพื่อให้เกิดประโยชน์ โดยจะมีการผลิตกรดแล็กติกจากแบคทีเรียกรดแล็กติก (Lactic acid bacteria) โดยจุลินทรีย์กลุ่มนี้จะใช้วัตถุดิบพวกแป้งและแป้งจะถูกย่อยสลายเป็นกลูโคส (วิจิตรศิริ, 2004) เพื่อให้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตกรดแล็กติกต่อไป

แบคทีเรียแล็กติก หรือ แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย เป็น แบคทีเรียที่พบมากในอาหารประเภทอาหารหมัก เช่น แหนม ผักดอง ผลไม้ดอง ไข่กรอกเปรี้ยว ผลิตภัณฑ์นม เช่น เนยแข็ง นมเปรี้ยวหรือโยเกิร์ต และยังพบได้ในร่างกายคน และสัตว์ เช่นระบบทางเดินหายใจ และระบบทางเดินอาหาร อวัยวะสืบพันธุ์ ในระดับอุตสาหกรรมมีการใช้แบคทีเรียแล็กติกเป็นหัวเชื้อตั้งต้นเพื่อเติมลงไป ในอาหาร มีผลต่อกลิ่น รส และเนื้อสัมผัส ของอาหาร แบคทีเรียแล็กติกเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม ท่อนสั้น หรือยาว ไม่สร้างสปอร์ ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase) ต้องการอากาศเล็กน้อยในการเจริญ (microaerophile) บางชนิดสามารถเจริญได้ในที่ๆ ไม่มีอากาศ (strictly anaerobe) ให้ผลผลิตหลักจากการหมักย่อน้ำตาล คือ กรดแล็กติก พลังงานจากกระบวนการหมักโมโนเซตคาร์ไรด์ ไคแซคคาร์ไรด์ พอลิแอลกอฮอล์ และแป้ง สามารถผลิตกรดแล็กติกจากน้ำตาล hexose ผ่านวิถี Embden-Meyerhof Parnas (EMP) และจาก น้ำตาล pentose โดยวิถี 6-phosphogluconate/phosphoketolase (Salminen *et al.*, 1998) ไม่สร้างเอนไซม์ catalase แต่ สามารถเจริญบนผิวหน้าอาหารที่สัมผัสกับ

อากาศได้ เนื่องจากมีเอนไซม์ peroxidase ซึ่งใช้ในการกำจัด H_2O_2 อีกทั้งสามารถเจริญได้ในอาหารประเภทซับซ้อน มีความต้องการออกซิเจนหลายระดับ (ต้องการหรือไม่ต้องการ) (Stiles *et al.*, 1997)

1.4 การผลิตโดยกระบวนการทางชีวภาพของกรดแล็กติก (Fermentation processes)

การหมักจากชีวโมเลกุล ในปัจจุบันนั้นสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กระบวนการใหญ่ ๆ คือการหมักแบบกะ (batch fermentation) การหมักแบบกึ่งกะ (fed-batch fermentation) และการหมักแบบต่อเนื่อง (continuous fermentation)

1.4.1 กระบวนการหมักแบบกะ

การหมักแบบกะนั้น สารอาหารทั้งหมดจะถูกเตรียมไว้ก่อนที่จะมีการเติมแบคทีเรียกรดแล็กติกลงไปและจะไม่มีสารอาหารอื่น ๆ ลงไปในระหว่างที่การหมักดำเนินไป โดยที่การหมักแบบกะเป็นที่นิยมในการผลิตเนื่องจากเป็นระบบที่ควบคุมและสามารถจัดการระบบได้ง่าย (Bai *et al.*, 2004) ได้มีการศึกษาในกระบวนการหมักแบบกะ โดยเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกที่ใช้ น้ำตาลกลูโคสเป็นสารตั้งต้น พบว่าสามารถผลิตกรดแล็กติกได้ 15.20 กรัมต่อลิตร และมีค่า productivity 1.34 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (Yun *et al.*, 2001) โดยสายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์ส่วนมากที่ใช้คือ *Lactobacillus* sp. ดังเช่นสายพันธุ์ *L. delbruecki* มีความสามารถในการใช้น้ำตาลในข้าวโพด ซึ่งสามารถเจริญและสร้างผลิตภัณฑ์ขึ้น และสำหรับการศึกษาการหมักจากหางนมโดยเชื้อ *L. bulgaricus* นั้นก็สามารถผลิตกรดแล็กติกโดยกระบวนการหมักแบบกะเช่นกัน (Madigan *et al.*, 2000) อีกทั้งโดยทั่วไป อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของเชื้อ จะอยู่ระหว่าง 30-37 องศาเซลเซียส ซึ่งโดยที่กระบวนการหมักแบบนี้จะมีการศึกษาอย่างกว้างขวางโดยมีการใช้สารตั้งต้นที่แตกต่างกัน ทั้งสามารถใช้ของเหลือทิ้งทางการเกษตร ของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม แต่อย่างไรก็ตาม ในกระบวนการหมักแบบกะนี้ ก็มีปัญหาเกิดขึ้นได้ อันเนื่องมาจาก ไม่มีการเติมและถ่ายออกของน้ำหมัก หลังจากที่เชื้อมีการเจริญและสร้างกรดแล็กติกขึ้น ทำให้ในน้ำหมักมีการสะสมกรดแล็กติกที่มีความเข้มข้นสูงขึ้นเรื่อยๆ มีผลต่อการเจริญเติบโตและเกี่ยวข้องกับทางด้านสรีรวิทยาของแบคทีเรียกรดแล็กติก อาจเกิดการยับยั้งโดยผลิตภัณฑ์ หรือที่เรียกว่า Product inhibition ได้ ดังนั้น จึงจะต้องมีการพัฒนาและปรับปรุงในกระบวนการหมัก เพื่อให้สร้างกรดแล็กติกได้ยาวนานและเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต เพื่อส่งผลถึงการผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

1.4.2 กระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง (Continuous fermentation)

กระบวนการหมักแบบต่อเนื่องจะมีการเติมอาหารลงไปในระบบและจะมีการนำเอาน้ำหมักบางส่วนออกโดยที่อัตราการป้อนอาหารเข้าถึงหมักต่อปริมาตรของน้ำหมักในถังหมักเรียกว่าอัตราการ

เจือจาง (Dilution rate, D) ซึ่งจะมีหน่วยเป็น ชม^{-1} มีงานวิจัยที่ได้ศึกษาเกี่ยวกับการหมักแบบต่อเนื่อง เช่น ได้มีการศึกษาการผลิตกรดแล็กติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *casei* DSM 20011 และ *Lactobacillus coryniformis* subsp. *Torquens* DSM 20004 ด้วย chemostat ที่มีการแปรผันค่า dilution rates ซึ่งผลพบว่า dilution rate มีผลต่อรูปแบบกระบวนการหมัก แต่สำหรับอัตราการผลิต (productivity) และอัตราการใช้สารตั้งต้น (substrate utilization rate) ไม่มีการเปลี่ยนแปลง (Gonzalez-Vara, A., 1996) และเมื่อได้มีการเติมวัตถุดิบครั้งที่สองลงในถังหมักพบว่า อัตราการผลิตกรดแล็กติกยาวนานขึ้น และมีค่า Productivity สูงขึ้น ส่งผลให้ ความเข้มข้นสุดท้ายของการหมักของกรดแล็กติกสูงขึ้นเช่นกัน

อย่างไรก็ตามการหมักกรดแล็กติกแบบต่อเนื่องนี้อาจจะก่อให้เกิดการสูญเสียทั้งกรดแล็กติกและแบคทีเรียกรดแล็กติกออกจากระบบไป ในระหว่างที่มีการถ่ายน้ำหมักออกจากระบบด้วยเช่นกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อจุลินทรีย์มีอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ค่าและมีการป้อนอาหารที่อัตราการเจือจางที่สูง นอกเหนือจากปัญหาดังกล่าวแล้วการควบคุมปัจจัยต่าง ๆ ที่ทำให้เกิดสภาวะคงตัว (steady state) ของทั้ง chemostat และ turbidostat ระหว่างกระบวนการหมักพบว่ามีความยุ่งยากมาก โดยที่ chemostat เป็นการควบคุมระบบให้เกิดสภาวะคงตัว (steady state) ของปริมาณน้ำหมักโดยการควบคุมอัตราการป้อนของสารอาหารและอัตราการถ่ายน้ำหมักออกจากระบบให้เท่ากัน ส่วน turbidostat เป็นการควบคุมความเข้มข้นของเซลล์ในน้ำหมักให้คงที่ โดยการควบคุมอัตราการป้อนสารอาหารและอัตราการถ่ายน้ำหมักออก ซึ่งจะต้องอาศัยระบบการควบคุมที่ซับซ้อนและไม่เป็นที่นิยมในการกระบวนการผลิตกรดแล็กติกในระดับอุตสาหกรรมปัจจุบัน (Doran, 1995)

1.4.3 กระบวนการหมักแบบกึ่งกะ (Fed-batch fermentation)

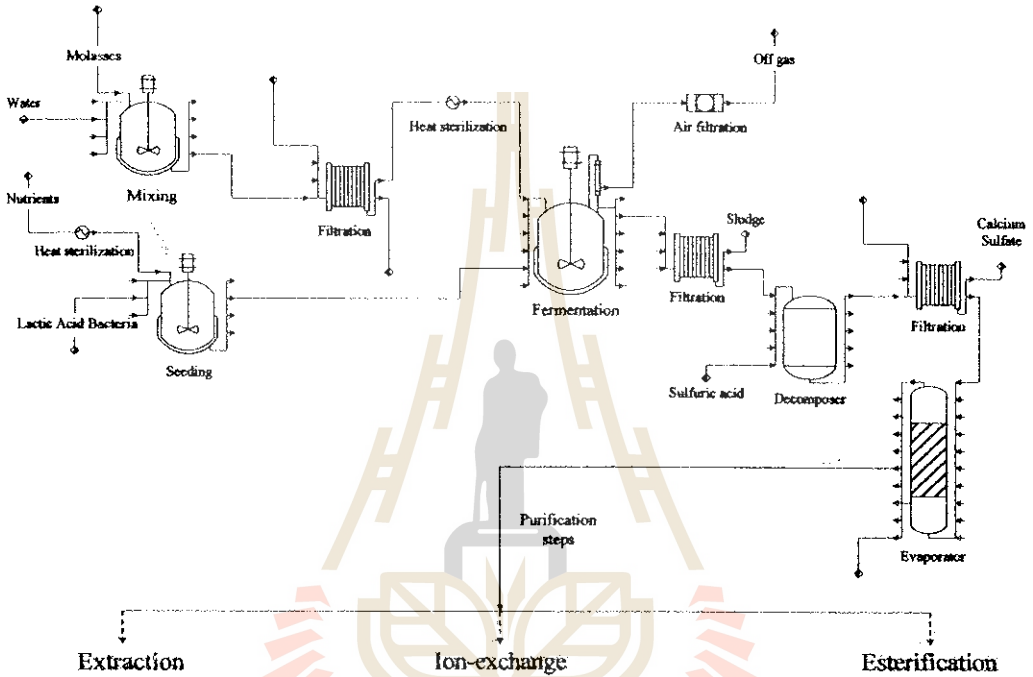
ในกระบวนการหมักแบบกึ่งกะนั้น สารอาหารจะถูกป้อนเข้าสู่ระบบเป็นครั้งคราวหรือต่อเนื่องก็ได้ แต่จะไม่มีการถ่ายเอาน้ำหมักออกจากระบบในระหว่างการหมัก ซึ่งจะเป็นการผสมผสานระหว่างการหมักแบบกะและแบบต่อเนื่อง สำหรับกระบวนการหมักนี้ พบว่ามีหลายงานวิจัยมีการศึกษา ทั้งนี้เนื่องจากสามารถผลิตกรดแล็กติกได้ปริมาณสูง เมื่อเทียบกับกระบวนการหมักแบบกะ และการจัดการระบบไม่ยุ่งยากซับซ้อนมากนัก อีกทั้งสามารถลดความเป็นกรดของกรดแล็กติกที่สะสมอยู่ในถังหมักต่อแบคทีเรียกรดแล็กติกได้อีกด้วย สำหรับกระบวนการผลิตกรดแล็กติกโดยวิธีนี้ได้มีการศึกษาหลากหลาย เช่น ในงานที่มีการใช้เชื้อ *Lactobacillus casei* และมีการแปรผันอัตราการป้อนเข้าของสารอาหารสู่ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ผลการทดลองพบว่า ค่าความเข้มข้นกรดแล็กติกสูงสุด เท่ากับ 210 กรัมต่อลิตร โดยที่สารตั้งต้นคือน้ำตาลกลูโคส พร้อมกับเติมสารสกัดจากยีสต์ 1 เปอร์เซ็นต์ในระหว่างการหมัก ทั้งยังพบว่า ความเข้มข้นของเซลล์สูงสุด 4.3 กรัมต่อลิตรและค่า productivity 2.14 กรัมต่อลิตรต่อ

ชั่วโมง ซึ่งได้เปรียบเทียบกับกระบวนการหมักแบบกะพอบว่าความเข้มข้นของเซลล์เพิ่มขึ้นเป็น 7.25 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ค่า productivity เพิ่มขึ้นร้อยละ 59.7 เป็น 3.42 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (Shaofeng, D., 2006) จากการศึกษากระบวนการผลิตกรดแล็กติกจากหลายงานวิจัยนั้น ได้มีการค้นคว้าวิจัยที่มีการใช้กระบวนการหมักแบบกะ, กึ่งกะ, ต่อเนื่อง อย่างไรก็ตาม พบว่ากระบวนการหมักแบบกะ และแบบกึ่งกะสามารถควบคุมกระบวนการผลิตกรดแล็กติกได้ง่ายกว่ากระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้มีการทดลองศึกษากระบวนการหมักแบบกึ่งกะพร้อมทั้งแบบกะ เพื่อเปรียบเทียบอัตราการผลิต และผลิตกรดแล็กติกให้ได้ผลผลิตสูง และเกิดประโยชน์สูงสุด

1.5 Downstream processes

ขั้นตอนที่สำคัญอีกขั้นหนึ่งของกระบวนการผลิตกรดแล็กติกคือการสกัดและการทำให้บริสุทธิ์ (downstream processing) ซึ่งจะมีหลายทางเลือกโดยขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการทำงานเป็นสำคัญ เช่นการใช้กรดแล็กติกในอุตสาหกรรมอาหาร (food grade) จะผลิตให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ร้อยละ 50 ถึง 80 โดยจะต้องเป็นกรดแล็กติกที่ไม่มีสีและเกือบจะไม่มีกลิ่น สำหรับงานวิจัยนี้ได้ให้ความสำคัญถึงการ ใช้กรดแล็กติกสำหรับการผลิตพลาสติกชีวภาพ ซึ่งจะต้องใช้กรดแล็กติกที่มีเกณฑ์ของความบริสุทธิ์สูงมากและสามารถทนต่ออุณหภูมิสูงได้ กล่าวคือสารละลายกรดแล็กติกที่มีความบริสุทธิ์สูงที่มีความเข้มข้นร้อยละ 88 อีกทั้งจะต้องไม่เกิดสีที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียสอีกด้วย ทำให้การทำกรดแล็กติกให้บริสุทธิ์จะต้องใช้กระบวนการที่มีต้นทุนสูง ในกรณีของการหมักกรดแล็กติกแบบดั้งเดิมนั้น โดยทั่ว ๆ ไปจะประกอบด้วยกระบวนการ ใช้เกลือแคลเซียมคาร์บอเนตในการทำให้กรดแล็กติกจับตัวกับแคลเซียมกลายเป็นเกลือแคลเซียมแลกเทต ภายหลังจากที่กระบวนการหมักสิ้นสุดลงแล้วจะต้องใช้ความร้อนในการสลายเกลือ จากนั้นทำการกรองเอาภาคเซลล์แบคทีเรียทิ้งไปก่อนที่จะทำการเติมกรดซัลฟูริกความเข้มข้นร้อยละ 78 เพื่อแยกเอาเกลือแคลเซียมออกจากสารละลายกรดแล็กติก โดยที่เกลือแคลเซียมแลกเทตจะถูกสลายให้เป็นกรดแล็กติกอิสระและเกิดเป็นตะกอนของเกลือแคลเซียมซัลเฟต (Ca-sulfate) จากนั้นทำการกรองเอาเกลือแคลเซียมออกไป ขั้นตอนต่อไปจะเป็นการระเหยน้ำออกไปจากสารละลายกรดแล็กติกเจือจางดังกล่าวโดยใช้เครื่องระเหย จากนั้นกำจัดสารสีออกโดยใช้ถ่านกัมมันต์ (Activated carbon) ผ่านคอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุ (Ion Exchange) ก่อนที่จะระเหยน้ำออกไปในขั้นตอนสุดท้ายซึ่งรูปภาพ 4 นอกจากกระบวนการแยกและทำกรดแล็กติกให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีแลกเปลี่ยนประจุ ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว (ศิริกันสนียกุล, 2547)ยังมีการพัฒนากระบวนการทางเลือกที่ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในการสกัดกรดแล็กติก (extraction) ซึ่งตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้สกัดส่วนใหญ่จะเป็นไตรอัลคิลเทอร์ติอารีอามีนในแอลกอฮอล์ (tri-alkyl tertiary amine in alcohol) (Juang *et al.*, 1997) นอกจากนี้ยังมีกระบวนการทางเลือกอีกอย่างหนึ่งก็คือการใช้

เทคนิค เอสเทอร์ฟิเคชัน (esterification) โดยการใช้เมทานอลเป็นตัวทำปฏิกิริยา และผ่านขั้นตอนการกลั่นแยกเมทานอลเพื่อให้ได้เฉพาะเมทิลแลกเตต แล้วจึงผ่านขั้นตอนของการ ดีเอสเทอร์ฟิเคชัน (de-esterification) เพื่อให้ได้กรดแล็กติกอิสระในที่สุด และจะมีการแยกหมุนเวียนเอทานอลกลับเข้ามาใช้ในกระบวนการใหม่อีกครั้ง (Sun *et al.*, 2006) แต่ข้อเสียของกระบวนการนี้คือ อุปกรณ์มีราคาแพง และต้องอาศัยเทคนิคขั้นสูงในการปฏิบัติ



รูปภาพ 4 สรุปกระบวนการผลิตกรดแล็กติกในอุตสาหกรรมที่ใช้ในปัจจุบัน (ศิริพันธ์มณีชกุล, 2547)

จะเห็นได้ว่ากระบวนการทำให้บริสุทธิ์นั้นมีอยู่หลายขั้นตอน จึงมีความเป็นไปได้สูงที่ในระหว่าง ขั้นตอนต่าง ๆ เหล่านี้จะมีการสูญเสียผลิตภัณฑ์ไปเป็นจำนวนมาก อีกทั้งยังเกิดปัญหาในการกำจัดกากของแข็งที่เป็นชิ้นเป็นปริมาณมากจากการบวนการผลิตเกลือแคลเซียมแลกเตตด้วย เพื่อเป็นการลดปริมาณกากทิ้งของเกลือแคลเซียมและลดต้นทุนในการใช้สารเคมีลง ในปัจจุบันได้มีความสนใจในการแยกโดยใช้เยื่อแผ่น (membrane separation process) เข้ามาพัฒนาในการลดขั้นตอนต่าง ๆ ของการทำให้บริสุทธิ์ให้มีขั้นตอนน้อยที่สุด โดยขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์สามารถลดลงให้เหลือภายในขั้นตอนเดียวเป็นการลดต้นทุนในการผลิต นอกจากนี้ ยังทำให้สามารถลดการสูญเสียผลิตภัณฑ์ในระหว่างกระบวนการผลิตอีกด้วย (Lye *et al.*, 1999)

1.6 กระบวนการแยกผลิตภัณฑ์

1.6.1 การเลือกใช้วิธีการแยก

ได้มีการพัฒนาเทคนิคต่าง ๆ สำหรับการแยกผลิตภัณฑ์ออกจากน้ำหมักในระหว่างที่การหมักกำลังดำเนิน ไปอยู่นี้หลายเทคนิคโดยอาศัยสมบัติทางกายภาพและเคมีของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการจะแยกเป็นพื้นฐานในการพิจารณาเช่น ขนาด รูปร่าง จุดหลอมเหลว จุดเดือด ค่าความดันไอ ความสามารถในการละลาย ความชอบหรือไม่ชอบน้ำ (hydrophilic/hydrophobic property) และความเป็นประจุ เป็นต้น ตัวอย่างเทคนิคต่าง ๆ สามารถดูได้จากตาราง 2 นอกจากนี้การเลือกใช้วิธีการแยกให้เหมาะสมยังต้องพิจารณาถึงศักย์ทางเคมี (chemical potential, χ_i) อีกด้วย โดยที่ศักย์ทางเคมีนี้จะเป็ปัจจัยสำคัญในการกำหนดฟลักซ์หรืออัตราการถ่ายเทมวลสารต่อหนึ่งหน่วยพื้นที่ (mass flux, J_i) ซึ่งขึ้นอยู่กับสัมประสิทธิ์การแพร่ (D_i) และแรงขับ (driving force, dx_i/dy) โดยเป็นไปตามกฎข้อแรกของ Fick ดังสมการ

$$J_i = -D_i \frac{dx_i}{dy} \quad (1)$$

ภายหลังจากเสร็จสิ้นกระบวนการหมักหรือเมื่อปฏิกิริยาของเอนไซม์สิ้นสุดลงแล้ว ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักหรือจากปฏิกิริยาของเอนไซม์จะถูกนำมาแยกและทำให้มีความบริสุทธิ์ กระบวนการแยกดังกล่าวนี้เรียกว่า กระบวนการหลังการหมัก (downstream processing) หรือกระบวนการแยกทางชีวภาพ (bioreparation) ผลิตภัณฑ์จากการหมักอาจหมายถึงตัวเซลล์เอง หรือเป็นองค์ประกอบที่อยู่ภายในน้ำหมักซึ่งเป็นองค์ประกอบที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นมาและถูกขับออกมานอกเซลล์ (extracellular) เมื่อเซลล์มีการเจริญเติบโตและสร้างผลิตภัณฑ์ หรืออาจจะเป็นองค์ประกอบที่อยู่ภายในเซลล์ (intracellular) ก็ได้ ถ้าผลิตภัณฑ์ที่ต้องการเป็นตัวเซลล์ต้องทำการแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักก่อนแล้วจึงล้างเซลล์และทำให้เซลล์แห้ง ในกรณีที่ผลิตภัณฑ์เป็นองค์ประกอบที่อยู่ภายในน้ำหมัก ภายหลังแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักแล้ว จะได้ผลิตภัณฑ์ที่เจือจางในของเหลวหมัก ค่อยจากนั้น จึงนำผลิตภัณฑ์ของเหลวที่ได้ไปทำการแยกและทำให้บริสุทธิ์ และหลังจากนั้นจึงนำส่วนของเหลวที่ได้ไปทำการแยกผลิตภัณฑ์และทำให้ผลิตภัณฑ์มีความบริสุทธิ์ต่อไป

การแยกทางชีวภาพจะมีลักษณะที่แตกต่างจากการแยกทางเคมีต่างๆ ไป เนื่องจากคุณลักษณะเฉพาะตัวของบางประการของผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพ ดังต่อไปนี้คือ 1) ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการทางชีวภาพ มักจะมีความเข้มข้นที่เจือจาง 2) ผลิตภัณฑ์บางชนิดมีความไวต่ออุณหภูมิ 3) มีความหลากหลายของผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้จากกระบวนการทางชีวภาพ 4) ผลิตภัณฑ์ภายในเซลล์ มักจะมีองค์ประกอบของสารเจือปนที่ไม่ละลายรวมอยู่ด้วย 5) คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของผลิตภัณฑ์มักมีความคล้ายคลึง

กับสารเจือปน 6) ผลผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพที่ได้จากการแยกต้องมีความบริสุทธิ์สูง เพื่อความปลอดภัยของผู้ใช้

ด้วยคุณลักษณะเฉพาะของผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพ จึงเป็นข้อจำกัดสำหรับกระบวนการแยก โดยทั่วไป บางวิธีที่ไม่อาจใช้ในกรณีนี้ และในบางครั้งอาจจะจำเป็นต้องพัฒนาวิธีใหม่ที่เหมาะสม ขึ้นมาใช้ในการแยก สำหรับการออกแบบกระบวนการหรือการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ นอกจากต้องคำนึงถึงชนิดและคุณภาพของผลิตภัณฑ์แล้ว ยังต้องพิจารณาปัจจัยอื่นๆร่วมด้วย เช่น ตำแหน่งของผลิตภัณฑ์และสารเจือปนในกระบวนการผลิต ประโยชน์ของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการรวมทั้งความคุ้มค่าของกระบวนการแยกที่นำมาใช้อีกด้วย ดังแสดงใน ตาราง 2

ตาราง 2 ตัวอย่างวิธีการแยกผลิตภัณฑ์โดยอาศัยสมบัติทางกายภาพและเคมีที่แตกต่างกัน (Lye *et al.*, 1999).

สมบัติทางกายภาพและเคมี (driving force)	ข้อสังเกต	ตัวอย่างระบบของการแยก
สมบัติทางกายภาพ		
ความสามารถในกลายเป็นไอ		การกลั่น การพาโดยก๊าซ (stripping)
ขนาดและรูปร่าง		การใช้เยื่อแผ่น การปั่นแยก เพอร์เมอพรอนซ์ เพอร์สแทรกซ์ การกรอง
ความสามารถในการละลาย	มีการคัดเลือกต่ำ (low selectivity) แต่มีความจุสูง (high capacity)	การตกตะกอน aqueous-organic two phase system, AOTP การตกผลึก
สมบัติทางเคมี		
การแสดงประจุ		การแลกเปลี่ยนประจุ Electrodialysis
ความชอบน้ำ/ไม่ชอบน้ำ	มีการคัดเลือกสูง (High selectivity) แต่ความจุต่ำ (low capacity)	โครมาโตกราฟี การดูดซับ
อื่น ๆ		Affinity methods

1.7 การพิจารณาการเลือกใช้ระบบ (system consideration)

ดังที่ได้กล่าวมาแล้วว่าจุดประสงค์หลักของการแยกกรดแล็กติกในระหว่างการหมัก คือการเพิ่มผลิตผลของกรดแล็กติกให้มากขึ้น ซึ่งจะเป็นการนำไปสู่การลดขนาดของถังหมักลง การหมักกรดแล็กติกควบคู่ไปกับกระบวนการแยก (product recovery) เพื่อจุดประสงค์หลักคือ ข้อแรก ทำการแยกกรดแล็กติกที่เกิดจากกระบวนการหมักออกจากกระบวนการ โดยใช้เทคนิคการแยกต่างๆ ทำให้สามารถลดความเป็นพิษของกรดแล็กติกที่มีต่อเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกลง ซึ่งคาดว่าจะได้ผลิตผลที่เพิ่มมากขึ้น อย่างไรก็ตามการระบบการแยกด้วยเทคนิคที่เหมาะสมจะมีความสำคัญต่อการพัฒนาระบบมาก จึงต้องมีการศึกษาและทบทวนวรรณกรรมเป็นอย่างดี เพื่อที่จะได้ผลที่มีประสิทธิภาพต่อระบบอย่างสูงสุด

การใช้เยื่อแผ่นสังเคราะห์ในการแยกผลิตภัณฑ์ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในปัจจุบันเพื่อจุดประสงค์ในการเพิ่มประสิทธิภาพของกระบวนการหมัก (Doig *et al.*, 1998) ด้วยเหตุนี้งานวิจัยนี้จึงได้เลือกการแยกกรดแล็กติกด้วยเยื่อแผ่นในการศึกษาวิจัยต่างๆ เนื่องจากเยื่อแผ่นสามารถเลือกผ่านเฉพาะกรดแล็กติกออกจากน้ำหมัก โดยที่เซลล์แบคทีเรียกรดแล็กติกในถังหมักไม่สามารถออกมาได้ ทำให้สามารถเจริญและสร้างผลผลิตต่อไปได้อีก และกรดแล็กติกมีคุณสมบัติที่เป็นประจุ ซึ่งจะสามารถใช้กระบวนการแยกอื่นๆที่มีการแยกตามประจุมาร่วมกับการแยกด้วยเยื่อแผ่นอีกทางหนึ่ง เพื่อพัฒนากระบวนการหรือเทคนิคให้มีประสิทธิภาพที่สุด ทั้งนี้ต้องมีการรวบรวมข้อมูลและทบทวนวรรณกรรมจากวารสารวิชาการอื่นๆที่มีการศึกษาเทคนิคที่ใกล้เคียง เพื่อที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในระบบนี้และเกิดความเป็นไปได้อย่างสูงที่สุด

1.8 กระบวนการแยกโดยใช้เยื่อแผ่นสังเคราะห์

เยื่อแผ่นสังเคราะห์มีลักษณะเป็นแผ่นบาง ๆ ที่กั้นระหว่างของไหลสองชนิดโดยอาจจะเป็นของเหลวหรือแก๊สก็ได้และมีความสามารถในการคัดเลือกผ่านของสารเข้า-ออกหรือที่เรียกว่า semi-permeable property (Baker, 2004) การศึกษากระบวนการแยกโดยใช้เยื่อแผ่นนั้น ได้มีการศึกษาครั้งแรกใน ค.ศ. 1748 (พ.ศ. 2291) โดยนักวิทยาศาสตร์ชาวฝรั่งเศสชื่อ Abbé Nolet จากการสังเกตปรากฏการณ์ออสโมซิสของน้ำจากน้ำเกลือผ่านผนังเนื้อเยื่อของกระเพาะหมู จากนั้นมากระบวนการแยกโดยเยื่อแผ่นได้พัฒนามาเรื่อย ๆ ตามลำดับแต่ทำในห้องปฏิบัติการเท่านั้นเช่นกระบวนการ dialysis โดย Thomas Graham ในปี ค.ศ. 1861 กระบวนการเพอร์แวนเพอเรชันโดย Kober ในปี ค.ศ. 1917 เป็นต้น ส่วนกระบวนการแยกโดยเยื่อแผ่นสังเคราะห์ในระดับอุตสาหกรรมนั้น ได้มีการพัฒนาเมื่อประมาณ 40 กว่าปีที่ผ่านมานี้เองโดย Loeb และ Sourirajan ซึ่งเป็นผู้ผลิตเยื่อแผ่นออสโมซิสแบบผ้นกลับจากเซลลูโลสอะซิเตทสำหรับการผลิตน้ำดื่มจากน้ำทะเลและเยื่อแผ่นอัลตราฟิลเตรชันสำหรับการบำบัดน้ำเสีย ปัจจุบัน ได้มีการประยุกต์ใช้เยื่อแผ่นสังเคราะห์กันอย่างกว้างขวางในหลายอุตสาหกรรมเช่น อาหาร ยา

ปีโตรเลียม การบำบัดน้ำเสีย และเทคโนโลยีชีวภาพเป็นต้น การแยกโดยใช้เยื่อแผ่นสังเคราะห์ในทางเทคโนโลยีชีวภาพนั้นได้มีการใช้แยกสารทุกประเภทตั้งแต่การแยกเซลล์ของจุลินทรีย์ด้วยการกรองไปจนถึงการผลิตแก๊สมีเทนให้บริสุทธิ์สูงเพื่อเพิ่มค่าความร้อนของการสันดาป การเลือกชนิดของเยื่อแผ่นให้เหมาะสมนั้นจะต้องพิจารณาถึงสมบัติทางกายภาพและเคมีของสารที่ต้องการแยกเป็นสำคัญ

รูปภาพ 5 แสดงการจำแนกกระบวนการแยกตามขนาดของโมเลกุลหรืออนุภาค โดยโมเลกุลขนาดเล็กหรือไอออนที่มีขนาดเล็กกว่า 0.001 μm อาจจะแยกออกจากสารละลายได้โดยใช้ระบบออสโมซิสผันกลับ (reverse osmosis) นาโนฟิลเตรชัน (nanofiltration) หรือกระบวนการแยกอื่น ๆ ที่ใช้เยื่อแผ่นแบบแน่น ส่วนโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ขึ้นเช่น โปรตีน เอ็นไซม์ และอิมัลชัน (emulsion) สามารถแยกออกจากสารละลายได้โดยใช้กระบวนการอัลตราฟิลเตรชัน (ultrafiltration) ส่วนไมโครฟิลเตรชัน (microfiltration) จะมีการประยุกต์ใช้ในการแยกสารที่มีขนาดใหญ่เช่นการแยกเซลล์จุลินทรีย์ออกจากน้ำ หมักหรือกำจัดตะกอนออกจากระบบการบำบัดน้ำเสีย เป็นต้น

	Scanning Electron Microscope			Optical Microscope		Naked Eye	
	Ionic range	Molecular range	Macro molecular range	Micro particles range	Macro particles range		
Micron (μ)	0.001	0.01	0.1	1.0	10.0	100.0	1000.0
Relative size of common materials	Aqueous Salts	Albumin Protein	Carbon Black	Paint Pigment	Yeast Cells		
		Endotoxin / Pyrogen		BACTERIA		Beach Sand	
	Sugar	VIRUS					Granular Activated Carbon
	Metal Ion	Synthetic Dye	Tobacco Smoke	Milled Flour			
			Latex / Emulsion				
	Pesticide	Colloidal Silica	Blue Indigo Dye	Red Blood Cells	Pollen		
	Herbicide		Gelatin	Human Hair			
				Coal Dust			
					Mist		
	Membrane Selection	REVERSE OSMOSIS	ULTRAFILTRATION			PARTICLE FILTRATION	
		NANOFILTRATION	MICROFILTRATION				

รูปภาพ 5 กระบวนการแยกโดยใช้เยื่อแผ่นซึ่งใช้ขนาดของโมเลกุลเป็นตัวกำหนด (Mulder, 1991)

1.8.1 การจำแนกชนิดของเยื่อแผ่น

เยื่อแผ่นสามารถจำแนกได้โดยอาศัยสมบัติทางกายภาพและเคมีเช่น ลักษณะตัวฐาน ความชอบน้ำ/ไม่ชอบน้ำ และแรงขับเคลื่อน (driving forces) เป็นต้น ซึ่งในที่นี่จะยกตัวอย่างถึงการจำแนกตามแรงขับเคลื่อน

1.8.2 จำนวนตามแรงขับเคลื่อน (driving forces)

การจำแนกเยื่อแผ่นแบบสาคสุดท้ายจะเป็นการจำแนกโดยใช้แรงขับเคลื่อน (driving force) ที่ใช้ในการทำให้เกิด permeate ผ่านชั้นของเยื่อแผ่น แรงขับเคลื่อนนี้เกิดขึ้นมาจากผลต่างของค่าศักย์ทางเคมีของสารในด้านของ permeate กับในด้านของสารป้อน (feed) ซึ่งค่าศักย์ทางเคมีนั้นจะบ่งบอกถึงพลังงานภายในของสารเคมีนั้นเนื่องมาจากความต่างกันของความดัน อุณหภูมิ ศักย์ทางไฟฟ้าหรือความเข้มข้นที่อยู่ระหว่างด้านทั้งสองของเยื่อแผ่น ค่าอัตราการถ่ายเทมวลจำเพาะหรือฟลักซ์ของสาร i (J_i) จะเป็นไปตามกฎข้อแรกของฟิค ซึ่งว่าด้วยการแพร่คั่งสมการ

$$J_i = -D_i \frac{dx_i}{dy} \quad (2)$$

ซึ่งค่า dx_i/dy หมายถึงค่าศักย์ทางเคมีของสารที่เปลี่ยนแปลงไปต่อเยื่อแผ่นที่มีความหนาเท่ากับ y ส่วน D_i นั้นจะหมายถึงค่าสัมประสิทธิ์การแพร่ของสาร i เครื่องหมายลบแสดงถึงทิศทางของการถ่ายเทมวลที่จะเคลื่อนที่จากด้านที่มีศักย์สูง ไปยังด้านที่มีศักย์ต่ำกว่าเสมอ

ตาราง 3 แสดงถึงการจำแนกชนิดของเยื่อแผ่นออกเป็นกระบวนการต่าง ๆ โดยใช้แรงขับเคลื่อนเป็นตัวกำหนด นอกจากนี้แล้ว ผลต่างของความเข้มข้นก็เป็นแรงขับเคลื่อนอีกชนิดหนึ่งที่ใช้ในการจำแนกชนิดของเยื่อแผ่น โดยอาศัยหลักทฤษฎีของการแพร่ของสารซึ่งจะเคลื่อนที่จากแหล่งที่มีความเข้มข้นสูงไปสู่แหล่งที่มีความเข้มข้นต่ำกว่าเสมอ และ การถ่ายเทมวลจะหยุดลงเมื่อความเข้มข้นของสารในสองแหล่งนี้เท่ากัน การแพร่นี้เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นได้เอง ทำให้ไม่ต้องการพลังงานจากภายนอกมาขับเคลื่อน การประยุกต์ใช้เยื่อแผ่น โดยใช้ผลต่างของความเข้มข้นเป็นแรงขับเคลื่อนนั้นมีอยู่หลายอย่างด้วยกัน ตัวอย่างแรกที่จะขอกล่าวในที่นี้คือ ไคเทียม ซึ่งมีการใช้เยื่อแผ่น ไคอะไลซิสทำการแยกยูเรีย กรดบูริก และ ครีเอทีนีน (creatinine) ซึ่งเป็นของเสียจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของโปรตีน ในร่างกายคนปกติ นั้น สารเหล่านี้จะถูกกำจัดออกทางปัสสาวะโดยหน่วยกรองเล็ก ๆ ที่มีอยู่ภายในไต ถ้าหากไตไม่ทำงานแล้วจะเกิดภาวะเลือดเป็นพิษซึ่งจะเป็นอันตรายต่อผู้ป่วยได้ ในขั้นตอนการฟอกเลือดนั้น เยื่อแผ่นเซลโลเฟนจะถูกใช้ในการสัมผัสกับเลือดผู้ป่วย ส่วนอีกด้านหนึ่งของเยื่อแผ่นจะมีการมีการใช้สารละลายไฮเดรตโครไมท์ ซึ่งได้มีการปรับแรงดันออสโมติกให้เท่ากับในเลือด ทำการสกัดเอาของเสียคั่งที่ได้กล่าวมาแล้วออกจากเลือด ส่วนฮีออนต่าง ๆ โดยเฉพาะ โซเดียมและโปแตสเซียมจะไม่ผ่านเยื่อแผ่น เพราะว่าความเข้มข้นของสารดังกล่าวมีค่าเท่ากันทั้งสองด้านของเยื่อแผ่นเป็นผลมาการใช้สารละลายไฮเดรตโครไมท์นั่นเอง (Cussler, 1997)

ตาราง 3 การจำแนกเยื่อแผ่นโดยอาศัยแรงขับเคลื่อนเป็นตัวกำหนด (Huang, 1991).

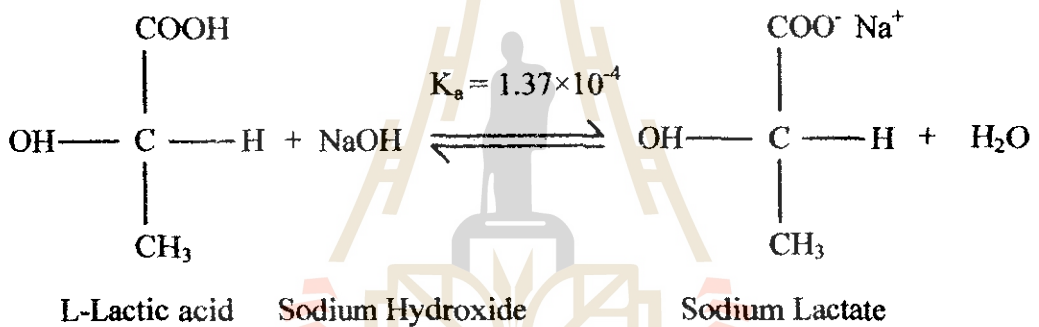
กระบวนการแยกด้วยเยื่อแผ่น	แรงขับเคลื่อน (Driving force)
เพอร์เวปเพอร์เรชั่น (Pervaporation)	ผลต่างความดันไอ (Gradient of vapor pressure)
อัลตราฟิลเตรชั่น (Ultrafiltration)	ผลต่างความดัน (Pressure gradient)
การแยกก๊าซ (Gas permeation)	ผลต่างความดัน (Pressure gradient)
ออสโมซิสแบบผกผัน (Reverse osmosis)	ผลต่างความดัน (Pressure gradient)
ไดอะไลซิส (Dialysis)	ผลต่างความเข้มข้น (Concentration gradient)
เพอร์สเตรกชั่น (Perstraction)	ผลต่างความเข้มข้น (Concentration gradient)
อิเล็กโทรไดอะไลซิส (Electrodialysis)	ผลต่างศักย์ไฟฟ้า (Gradient in electrical potential)

1.9 การแยกกรดเกลือคิกจากน้ำหมักด้วยระบบอิเล็กโทรดีไอออนไนเซชัน (Electrodeionization, EDI)

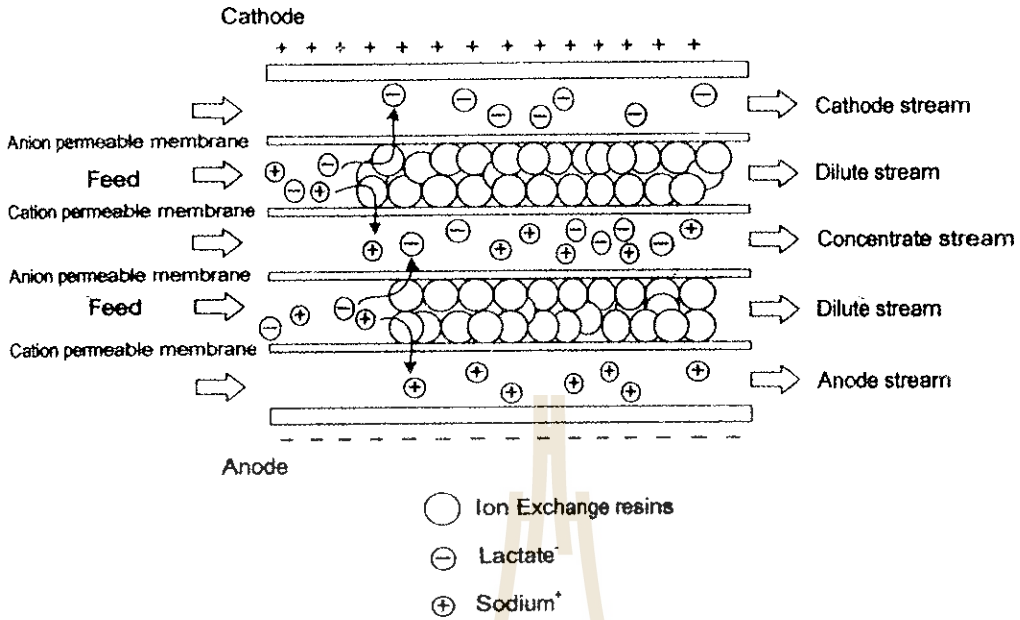
ในปัจจุบันได้มีการประยุกต์ใช้เยื่อแผ่นในการแยกกรดเกลือคิกออกจากน้ำหมักหลายวิธีด้วยกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง กระบวนการอิเล็กโทรไดอะไลซิส หรือ Electrodialysis (ED) ซึ่งมีการใช้เยื่อแผ่นที่มีประจุ (charged membranes) สองชนิดคือ anion และ cation-exchange membrane โดยที่แต่ละชนิดจะยอมให้อيونประจุลบและประจุบวกผ่านได้ตามลำดับ และจะมีการใช้ไฟฟ้ากระแสตรง เป็นตัวทำให้เกิดความต่างศักย์ของไฟฟ้าระหว่างเยื่อแผ่นทั้งสอง ทำให้แยกเขตซึ่งมีประจุเป็นลบสามารถแพร่ออกจาก anion-exchange membrane ได้ในขณะที่ โซเดียมหรือแคลเซียมซึ่งมีประจุบวกจะแพร่ออกจาก cation-exchange membrane (Gyo Lee et al., 1998; Habova et al., 2004; Madzingaidzo et al., 2002a)

นอกจากนี้ ยังมีการปรับปรุงกระบวนการอิเล็กโทรไดอะไลซิสให้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้นโดยเรียกกระบวนการนี้ว่า อิเล็กโทรดีไอออนไนเซชัน หรือ electrodeionization (EDI) ซึ่งกระบวนการนี้เป็นนวัตกรรมสำหรับการประยุกต์ใช้การแลกเปลี่ยนประจุ (Ion Exchange) กับ Electrodialysis ซึ่งเป็นเยื่อแผ่นชนิดที่มีประจุ ซึ่งจะมีความสามารถยอมให้สารที่มีประจุผ่าน ในขณะที่สารอื่น ๆ จะไม่สามารถผ่านเยื่อแผ่นชนิดนี้ได้ (Baker, 2004) ส่วนการแลกเปลี่ยนประจุจะใช้เรซินชนิดที่มีความสามารถในการจับกรดเกลือคิกได้ดี แม้จะอยู่ในรูปของสารละลายที่มีความเข้มข้นต่ำก็ตาม โดยที่กรดเกลือคิกสามารถแตกตัวเป็นแยกเขตได้ในสภาวะที่เป็นด่างดังรูปภาพ 6 โดยมีค่าคงที่ของการแตกตัว (K_a) อยู่ที่ 1.37×10^{-4} แยกเขตจะถูกกระตุ้นจับไว้จากสารป้อนก่อนที่จะแพร่ผ่านเยื่อแผ่นออกไปที่ Anion permeable membrane และ concentrate stream ต่อไป (รูปภาพ 7) แสดงหลักการการทำงานของกระบวนการ Electrodialysis ซึ่งเริ่มแรกได้มีการพัฒนาสำหรับการแยกเกลือ NaCl จากน้ำทะเลในการ

ผลิตน้ำจืดบริสุทธิ์ซึ่งพบว่าได้ผลการทดลองเป็นอย่างดี (Mulder, 1991) ภายในของเครื่องมือ EDI นี้จะประกอบไปด้วยส่วนต่าง ๆ ที่สำคัญดังนี้คือ ส่วนเจือจาง (dilute stream) ส่วนเข้มข้น (concentrate stream) และ ส่วนที่เป็นขั้วไฟฟ้า (electrode compartment) ในช่องของส่วนเจือจางจะถูกเติมด้วยเรซินสองชนิดที่สามารถจับอออนที่มีประจุบวกและประจุลบได้คือ ซึ่งเรซินทั้งสองชนิดนี้จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการถ่ายเทมวลของประจุจากในส่วนของสารป้อน (feed solution) ไปยังเยื่อแผ่นภายใต้แรงขับเคลื่อนซึ่งเป็นไฟฟ้ากระแสตรง เนื่องจากความเข้มข้นของอออนจะเข้มข้นและเจือจางในช่องการไหลที่ต่างกัน ดังนั้นกระบวนการ EDI นี้จึงสามารถประยุกต์ใช้ได้ทั้งในการทำให้เจือจางหรือทำให้เข้มข้น ยกตัวอย่างเช่นในการผลิตน้ำปราศจากอออน (deionized water) เราสามารถที่จะเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ได้ในด้านของส่วนเจือจาง สำหรับการผลิตกรดแล็กติกนั้น สารละลายกรดแล็กติกเข้มข้นจะถูกผลิตขึ้นในด้านของส่วนเข้มข้น



รูปภาพ 6 การแตกตัวของกรดแล็กติกในสารละลายค่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ (Belter *et al.*, 1988)



รูปภาพ 7 หลักการทำงานของเครื่อง Electrodeionization (EDI) (Matsuura, 1994)

ปริมาณการถ่ายเทมวลของไอออนที่ผ่านเยื่อแผ่นจะแปรค่าตามปริมาณของกระแสไฟฟ้าที่ใช้ โดยค่ากระแสไฟฟ้า (I) ที่ใช้ในการแยกไอออนจำนวนหนึ่งจะมีค่าเท่ากับ

$$I = \frac{zFQ\Delta C}{\eta}$$

โดยที่ค่า z หมายถึง ค่า valence ของประจุ F คือค่าคงที่ของฟาราเดย์ (1 Faraday = 96,500 A s/equiv.) Q คืออัตราการไหลของสารป้อน ΔC หมายถึงความต่างของความเข้มข้นระหว่างเยื่อแผ่น และ η คือค่าประสิทธิภาพโดยรวมของกระแส (overall current efficiency) ตามลำดับ (Widiassa *et al.*, 2004)

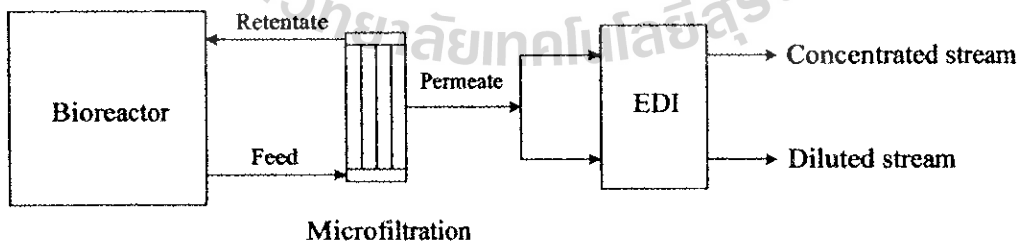
1.10 การแยกผลิตภัณฑ์ในระหว่างที่การหมักกำลังดำเนินอยู่ (Extractive fermentation)

การสะสมของกรดเล็กน้อยในน้ำหมักในปริมาณที่สูง ส่งผลให้มีค่า pH เป็นกรดที่สูง ซึ่งถึงแม้ว่าแบคทีเรียกรดเล็กน้อยจะมีความสามารถในการทนในสภาวะเป็นกรดได้ (acid tolerant) ก็ตาม แต่ถ้าความเข้มข้นกรดสูงก็ไม่สามารถมีชีวิตอยู่ได้เช่นกัน ได้ก่อให้เกิดปัญหาหลักคือการยับยั้งปฏิกิริยาของ

เชื้อแบคทีเรีย ดังนั้นจึงมีการพัฒนาแนวความคิดที่จะทำการแยกกรดแล็กติกออกจากระบบในขณะที่กระบวนการหมักกำลังดำเนินไป (extractive fermentation หรือ *in situ* product removal) ซึ่งจะเป็นการพัฒนากระบวนการหมักไปพร้อม ๆ กับการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ ซึ่งจะมีผลดีในด้านต่าง ๆ ดังนี้ 1.) ลดความเป็นพิษของกรดแล็กติกที่มีต่อเชื้อแบคทีเรียลง จะทำให้เชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกสามารถผลิตกรดแล็กติกได้มากขึ้น 2.) สมดุลของสภาวะจะไปข้างหน้าเนื่องจากการแยกกรดแล็กติกออกจากระบบอยู่ตลอดเวลา 3.) การสูญเสียผลิตภัณฑ์จะมีค่าลดลง และ 4.) เป็นการลดขั้นตอนของการผลิตลง (Mattiasson *et al.*, 1991) ข้อได้เปรียบต่าง ๆ เหล่านี้จะนำไปสู่การลดขนาดของถังหมักลง (เมื่อเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ของกรดแล็กติกที่เท่ากัน) ทำให้สามารถลดต้นทุนทั้งต้นทุนคงที่และต้นทุนผันแปรต่าง ๆ ลงได้

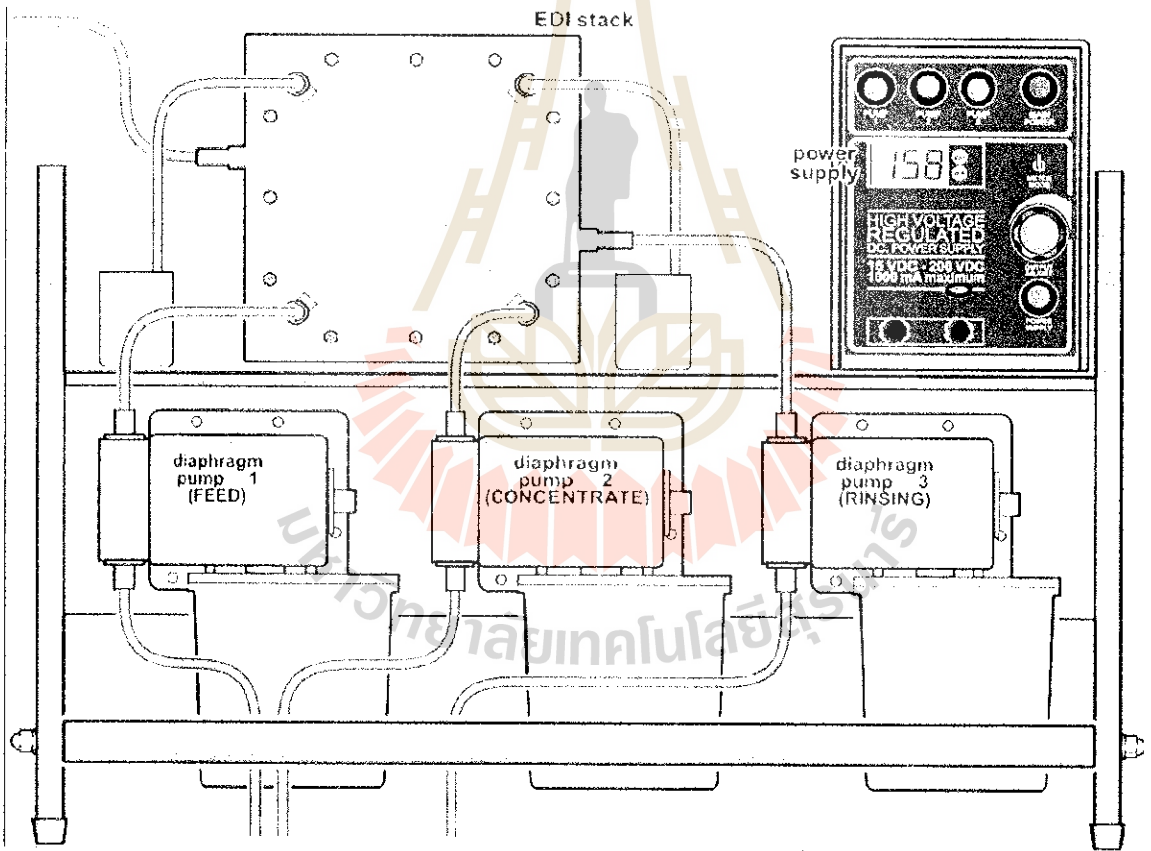
1.10 ดึงปฏิกรณ์ชีวภาพเมมเบรนด้วยระบบอิเล็กโทรลิซิสไอออนไนเซชัน (EDI)

การใช้ระบบ EDI ในการแยกผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพออกจากกระบวนการหมัก ได้มีการนำมาประยุกต์ร่วมกับการหมักในถังหมักเพื่อจุดประสงค์หลักในการเพิ่มผลผลิตให้กับการหมักแบบกะหรือกึ่งกะที่ทำกันอยู่โดยทั่วไป โดยการใช้ดึงปฏิกรณ์ชีวภาพเมมเบรนนี้จะเป็นการประสานระหว่างการคัดแยกสารผลิตภัณฑ์ออกจากระบบและเพิ่มปฏิกิริยาทางชีวเคมีที่เกิดขึ้น (Giomo *et al.*, 2000) การแยกผลิตภัณฑ์ออกตลอดเวลาจะทำให้ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ในน้ำหมักต่ำอยู่เสมอ ซึ่งจะมีประโยชน์มาก ในกรณีที่ผลิตภัณฑ์มีผลในการก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวเคมี (biocatalyst) เช่น กรดแล็กติก เป็นต้น นอกจากนี้แล้ว ผลิตภัณฑ์ที่ถูกแยกจะมีความบริสุทธิ์สูง ทำให้สามารถนำไปเข้ากระบวนการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นต่อไปได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Lye *et al.*, 1999)



รูปภาพ 8 แผนภาพจำลองการทำงานของการผลิตกรดแล็กติกโดยใช้ระบบอิเล็กโทรลิซิสไอออนไนเซชัน

ภาพวาดของเครื่อง EDI สามารถแสดงได้ รูปภาพ 9 ซึ่งตัวเครื่องจะประกอบไปด้วยโมดูลของเยื่อแผ่นซึ่งจะทำให้อยู่ในรูปของเยื่อแผ่นเป็นคู่ (EDI stack) โดยที่ภายในจะประกอบไปด้วยเรซินสองชนิดผสมกัน (ion-exchange resins) คือ cation-exchange resin และ anion-exchange resin เพื่อทำการจับไอออนบวกและไอออนลบ (แลกเปลี่ยน) โดยมีแพลตตินัม และ สมตงเลส สตีล ทำหน้าที่เป็นขั้วลบ (anode) และขั้วบวก (cathode) ตามลำดับ ส่วนเยื่อแผ่นแลกเปลี่ยนประจุบวกและลบ (cation-exchange and anion-exchange membrane) จะถูกใช้สำหรับแยกประจุบวก และ แลกเขต ออกจากน้ำหมัก ความแรงของกระแสไฟฟ้าระหว่างทั้งสองด้านของเยื่อแผ่นจะถูกควบคุมโดยตัวจ่ายไฟกระแสตรงที่สามารถปรับระดับความแรงได้ (adjustable power supply) น้ำหมักจะถูกปั๊มโดยปั๊มชนิด diaphragm ขณะที่ในด้านของของเหลวเข้มข้นจะถูกปั๊มแยกเป็นสองส่วนสำหรับด้านของ concentrate และ anode-cathode stream ตามลำดับ (ดูรูปภาพ 7 ประกอบ)



รูปภาพ 9 การจัดการทดลองสำหรับเครื่อง electrodeionization (EDI) (Widiasa *et al.*, 2004)

1.10 จุดประสงค์ของโครงการวิจัย

1. ศึกษาถึงศักยภาพในการทำกรดแล็กติกให้บริสุทธิ์จากกระบวนการหมักกรด L-แล็กติกโดยใช้เชื้อแบคทีเรีย *Pediococcus pentosaceus* (ที่คัดแยกได้เอง) ด้วยเทคนิคอิเล็กโทรลิโอออนไนเซชัน
2. ศึกษาค่าตัวแปรต่าง ๆ ที่มีผลต่อการถ่ายเทมวลของกรดแล็กติกผ่าน ion-exchange membrane เช่นอัตราการป้อน ปริมาณของกระแสที่ใช้ และ ความเข้มข้นกรดแล็กติกเริ่มต้น เป็นต้น
3. พัฒนาและประยุกต์ใช้ระบบ อิเล็กโทรลิโอออนไนเซชัน ดังกล่าวควบคู่กับการหมักกรดแล็กติกในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเพื่อเปรียบเทียบกับค่าผลิตผล (production yield) กับกระบวนการหมักกรดแล็กติกแบบกะและแบบกึ่งกะ

บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 อุปกรณ์และสารเคมี

สำหรับอุปกรณ์เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัยนี้ จะเป็นเครื่องมือที่มีอยู่แล้วบางส่วน ณ ห้องปฏิบัติการกระบวนการทางชีวภาพ อาคารปฏิบัติการ 3 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ยกตัวอย่าง เครื่องมือที่ใช้เช่น

1. Laminar flow
2. Spectrophotometer
3. pH meter
4. Hot plate stirrer
5. Autoclave
6. High performance liquid chromatography
7. Incubator shaker
8. Fermenter 2 ลิตร
9. Microcentrifuge
10. เครื่องชั่ง

ทำการกรองเอาเซลล์แบคทีเรียออกโดยใช้ระบบไมโครฟิลเตรชัน ซึ่งจะทำการไหลเวียนของ สารป้อน (Feed) ผ่านเครื่องกรองไมโครฟิลเตรชัน ดังรูปภาพ 8

2.2 เชื้อจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้ คือ *Pediococcus pentosaceus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียกรดแล็กติกที่สามารถกักแยกได้เอง โดยการเก็บตัวอย่างมาจากอาหารหมักคอง โดยเชื้อสายพันธุ์นี้จะสามารถผลิตกรดแล็กติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักในกระบวนการหมัก ซึ่งจะทำการเชื้อเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) ที่มีส่วนประกอบคือน้ำตาลกลูโคส (20 กรัมต่อลิตร) เป็นแหล่งคาร์บอนหลักและมี yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน พร้อมกับสารอาหาร วิตามินและแร่ธาตุต่าง ๆ เชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกดังกล่าวจะเก็บไว้เป็นกล้าเชื้อสำหรับกระบวนการหมักในงานศึกษาต่อไป

2.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

สูตรอาหาร DE MAN ROGOSA AND SHARPE (MRS medium) และอาหารที่มีการดัดแปลงอื่นๆ และหลังจากเตรียมเสร็จ จะนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ ในธรรมชาติ

2.2.2 การเตรียมกล้าเชื้อ

นำเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* ที่เจริญบนอาหารรุ้น MRS medium ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกให้ได้โคโลนีเดี่ยว โดยเชื้อจากอาหาร MRS จากนั้นทำการ spread plate อีกครั้ง และทำการบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการเชื้อเชื้อจากอาหารเหลวจากข้างต้น มาเลี้ยงบนจานอาหารรุ้น MRS โดยการขีดเชื้อ (streak plate) ก่อนที่จะนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อทดสอบว่าเป็นเชื้อบริสุทธิ์หรือไม่ โดยทำการขีดเชื้อลงบนอาหาร MRS จนได้เป็นโคโลนีเดี่ยวและทำการทดสอบสายพันธุ์ของเชื้อด้วยความสามารถในการใช้น้ำตาล 49 ชนิด (Biochemical test) ด้วย API 50 CHL kit จากนั้นทำการขีดเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้จากจานอาหารรุ้นดังกล่าวมาใส่ในหลอดอาหารรุ้น และ บ่มที่สภาวะเดียวกัน จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อเก็บไว้ใช้งานต่อไป เมื่อต้องการใช้งาน จะทำการขีดเชื้อลงในอาหาร MRS ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เพื่อเตรียมความเข้มข้นของเซลล์ให้ได้ 10 เปอร์เซ็นต์ เพื่อเตรียมไว้สำหรับถ่ายลงอาหารหมักต่อไป

2.3 การศึกษากระบวนการหมักกรดแล็กติกในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

การศึกษการหมักกรดแล็กติกในงานวิจัยนี้ จะใช้การหมักแบบกะและกึ่งกะ เพื่อหาสภาวะและปริมาณสารตั้งต้นที่เหมาะสมในการหมักต่อไป จุดประสงค์หลักในการศึกษาการหมักนั้น เพื่อเป็นการวางพื้นฐานสำหรับการพัฒนากระบวนการผลิตในระดับที่ใหญ่ขึ้นต่อไป

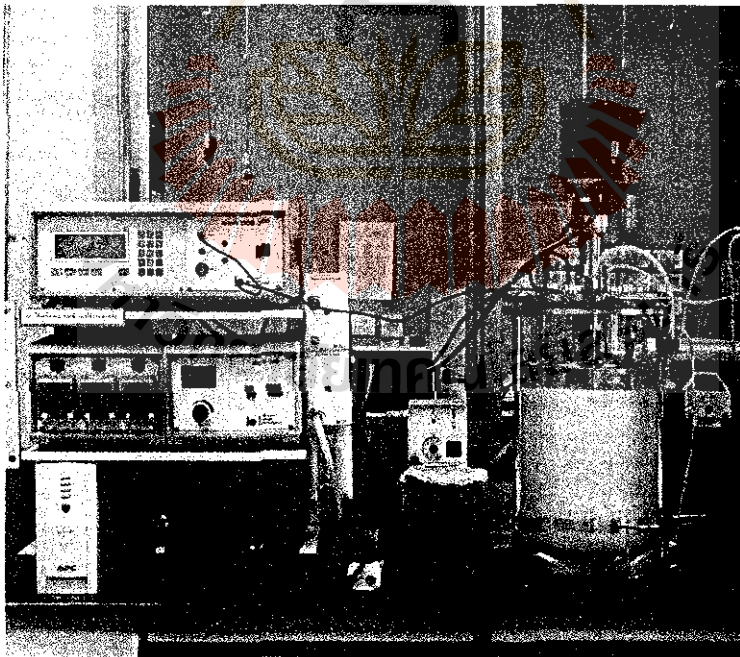
2.3.1 กระบวนการหมักแบบกะ

ทำการหมักแบบกะเพื่อผลิตกรดแล็กติกด้วย Erlenmeyer flask ขนาด 1000 มิลลิลิตร และในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (Fermenter) ดังแสดงในรูปภาพ 10 โดยเตรียมอาหารเหลว YM ที่ปรับเปลี่ยนสูตรอาหารแล้ว จำนวน 900 มิลลิลิตร ในถังหมักขนาด 10 ลิตร (B. Bruan, Germany) และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทำการถ่ายเชื้อลงไป โดยทำการควบคุมอุณหภูมิที่

30 องศาเซลเซียส และความเร็วรอบของใบกวนที่ 200 รอบต่อนาที เครื่องควบคุมการทำงานอัตโนมัติ จะทำการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้คงที่เท่ากับ 6.0 โดยการเติมกรดซัลฟูริก หรือ สารละลาย โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 3.0 โมลาร์ จากนั้นเริ่มกระบวนการหมัก โดยควบคุมอุณหภูมิ ระหว่างการหมักให้ได้ 30 องศาเซลเซียส โดยทำการทดลองในสูตรอาหารหมัก MRS และ MRS ดัดแปลงที่เติมแหล่งคาร์บอนต่างๆกันในปริมาณ 10 กรัมต่อลิตร เป็นสารตั้งต้นแทนการใช้น้ำตาล กลูโคส โดยทำการหมักสูตรละ 2 ข้ำ จากนั้นทำการเก็บตัวอย่าง โดยดูดน้ำหมักมาครั้งละ 10 มิลลิลิตร โดยเริ่มเก็บตัวอย่าง ตั้งแต่ ชั่วโมงที่ 0 และทุกๆ 3-4 ชั่วโมงเป็นระยะเวลาประมาณ 4-5 วัน จนกว่าค่า ความขุ่น (การเจริญ) ของเชื้อเริ่มคงที่ (เข้าสู่ระยะ stationary phase) รวมทั้งเมื่อค่า pH มีค่าคงที่ หลังจากนั้นนำมาวิเคราะห์สารต่างๆต่อไป

2.4.2 กระบวนการหมักแบบกึ่งกะ

ในกระบวนการหมักแบบนี้จะมีระบบเหมือนกับแบบกะข้างต้น และมีการเพิ่มการป้อน สารอาหารที่แตกต่างกันระหว่าง 0.02-0.1 กรัมสารตั้งต้นต่อวินาทีต่อกรัมเซลล์ จากนั้นจะทำการศึกษา กระบวนการหมักพร้อมทั้งจลนศาสตร์การหมัก เพื่อเปรียบเทียบหารูปแบบที่มีการผลิตกรดแล็กติกได้ สูงและคุ้มค่าที่สุด

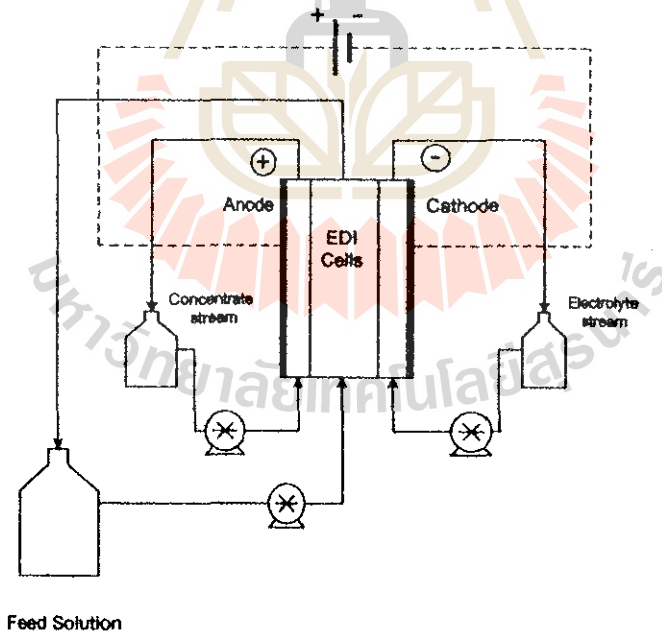


รูปภาพ 10 อุปกรณ์ในการทดลองกระบวนการหมัก (Fermentation processes)

2.5 EDI experimental setup

การศึกษาการดูดซับโดยใช้เรซินแลกเปลี่ยนประจุ เป็นการศึกษาเบื้องต้นถึงประสิทธิภาพของเรซินในการแยกกรดเล็กติกจากสารละลายโดยมีการใช้คอลัมน์แก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 ซม. ยาว 40 ซม. โดยทำการบรรจุ mixed-bed ion-exchange resins (purolite strong acid cation-exchange, C-100E และ strong base type I anion resins, A-400) ในอัตราส่วน 50:50 จำนวน 55 กรัมลงในคอลัมน์และทำการทดสอบการดูดซับของเรซินโดยใช้สารละลายกรดเล็กติกในความเข้มข้น 3.5 กรัมต่อลิตร โดยใช้อัตราป้อนเท่ากับ 5 มิลลิลิตรต่อนาที

การจัดชุดการทดลองการแยกกรดเล็กติกด้วยระบบ EDI สามารถแสดงได้จาก รูปภาพ 11 และมีเนื้อแผ่นพื้นที่ 50 cm² สำหรับทุกส่วนของโมดูลนั้นจะมีการเติมเรซินดังข้างต้น พร้อมกันนี้ได้มีการใช้ Platinum และ stainless steel สำหรับขั้ว anode และ cathode ตามลำดับ ช่องว่างภายในระหว่าง compartment ประมาณ 3 มิลลิเมตร สำหรับแหล่งกำเนิดไฟฟ้าได้มีการติดตั้งขึ้น โดยที่สามารถให้กระแสไฟฟ้าได้ระหว่าง 0–100 Volts และ 0–1.2 Ampere ตามลำดับ ระบบ EDI จะประกอบไปด้วย 2 streams นั่นคือ feed solution stream และ concentrated solution stream ทั้งนี้จะมีการควบคุมระบบให้เป็นไปอย่างต่อเนื่อง และมีอัตราการบีบไหลเวียนสารละลายผ่านระบบ EDI ที่ 1–4 ลิตรต่อชั่วโมง



รูปภาพ 11 Experimental setup สำหรับกระบวนการแยกกรดเล็กติกด้วย EDI technique.

2.6 การศึกษาการหมักกรดแล็กติกในถังปฏิกรณ์ชีวภาพด้วยระบบ EDI

การศึกษานี้ได้แสดงทำการจัดการทดลองศึกษาระบบสารป้อนสังเคราะห์ ที่มีการแปรผันค่าพารามิเตอร์ต่างๆเช่น กระแสไฟฟ้าในระบบ (0-20 โวลต์) ความเข้มข้นกรดแล็กติกเริ่มต้น (0-50 กรัมต่อลิตร) เป็นต้น เพื่อหาสภาวะหรือรูปแบบการทดลองที่เหมาะสมในการเชื่อมกับระบบการหมักที่มีการดำเนินงานควบคู่ไปพร้อมกัน ทั้งนี้ในส่วนการศึกษาทางด้านจลนศาสตร์การหมักนั้นจะใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2 ลิตร ทั้งนี้เพื่อต้องการควบคุมระบบให้จัดการได้ง่าย ควบคู่ไปกับการแยกกรดแล็กติกออกจากน้ำหมักด้วยระบบ EDI นั้นเอง

2.7 การวิเคราะห์

นำตัวอย่างที่เก็บได้จากถังปฏิกรณ์ชีวภาพ มาทำการวิเคราะห์ดังนี้คือ

- ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี Dinitrosalicylic (DNS) method

- ความเข้มข้นของเซลล์โดยวัดค่าความขุ่นที่ 600 นาโนเมตรด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่มีการเทียบกับค่า dry cell weight

- ผลผลิตการผลิตแล็กติกรวมทั้งปริมาณน้ำตาลหรือวัตถุดิบ โดยใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

ในกระบวนการหมัก โดยเครื่อง HPLC

ซึ่งผลที่ได้สามารถนำมาใช้หาค่าผลได้ (yield) อัตราผลผลิตของกรดแล็กติก (productivity) และชีวมวล (biomass)

2.7.1 การวิเคราะห์เชิงปริมาณของกรดแล็กติก

ตัวอย่างน้ำหมักจะถูกกรองผ่านแผ่นกรองชนิด poly carbonate ขนาด 0.2 ไมครอน (Sartorius, Germany) เพื่อกำจัดเซลล์แบคทีเรียกรดแล็กติก ก่อนที่จะทำการวิเคราะห์ ส่วนตัวอย่างในด้านตัวทำละลายอินทรีย์จะถูกฉีดเข้าเครื่องวิเคราะห์โดยตรง ซึ่งการวิเคราะห์เชิงปริมาณของกรดแล็กติก จะทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC (THERMA SEPARATION[®] PRODUCTS) และใช้คอลัมน์ Rezex[™] ROA-Organic acid ที่มีขนาด 300 × 7.8 มิลลิเมตร โดยใช้ mobile phase เป็น 0.005 N H₂SO₄ อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เวลา 40 นาทีที่อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที และถูกวิเคราะห์ด้วย UV ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร จากนั้นทำการคำนวณปริมาณของกรดแล็กติกเปรียบเทียบกับพื้นที่ใต้กราฟของสารละลายตัวอย่างมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

2.7.2 การวัดความเข้มข้นของเซลล์

ความเข้มข้นของเซลล์ในน้ำหมักได้ถูกวัดโดยใช้เครื่องวัดความเข้มของการดูดกลืนแสง หรือ spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร โดยตัวอย่างน้ำหมักจะถูกนำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 12000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำส่วนที่เป็นอาหารเหลว (Supernatant) ทิ้งไป ก่อนที่จะเติมฟอสเฟตบัพเฟอร์ให้มีปริมาตรเท่าเดิม และ ทำการเจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร (OD_{600}) และ เปลี่ยนเป็นความเข้มข้นของเซลล์ (Dry Cell Weight, DCW) ตามสมการ

$$C_x = 0.34 \times OD_{600}$$

กราฟมาตรฐาน (standard calibration curve) สามารถสร้างได้โดย ทำการกรองแบคทีเรียกรดแล็กติก ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผ่านกระดาษกรอง ขนาดรูพรุน 0.2 ไมครอน (Whatman, UK) ที่ผ่านการอบให้แห้ง และ ชั่งน้ำหนักมาแล้ว จากนั้นนำกระดาษกรองดังกล่าวไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานของการวัดความเข้มข้นของเซลล์แบคทีเรียกรดแล็กติกนี้ อยู่ที่ \pm ร้อยละ 5 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

2.7.3 การวิเคราะห์น้ำตาล

การวิเคราะห์ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดในตัวอย่างน้ำหมักได้ถูกวิเคราะห์ โดยใช้วิธีไดโนโครซาลิไซลิกแอซิด (Di-nitrosalicylic acid (DNS) method) เพื่อต้องการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่มีการเปลี่ยนแปลงในระบบ แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดจะถูกนำมาเปรียบเทียบกับกราฟความเข้มข้น น้ำตาลมาตรฐาน (ในที่นี้ใช้น้ำตาลกลูโคส) ที่ทราบความเข้มข้นแล้ว (<http://www.engr.umd.edu>)

บทที่ 3 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

3.1 การศึกษาการแยกผลิตภัณฑ์กรดแลกติกด้วยระบบ EDI

ในปัจจุบันกรดแลกติกเป็นสารผลิตภัณฑ์ที่ได้ความนิยมเป็นอย่างมาก เนื่องจากสามารถนำไปใช้ประยุกต์ได้ในหลายอุตสาหกรรม เช่น อุตสาหกรรมอาหาร เครื่องนุ่งห่ม ยา และพอลิเมอร์ โดยขึ้นรูปเป็นพอลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้ (Biodegradable plastics) อีกด้วย สำหรับการผลิตกรดแลกติกให้ได้ปริมาณและคุณภาพสูง เป็นที่ต้องการและให้ความสนใจจากอุตสาหกรรมต่างๆเป็นอย่างมาก ในกระบวนการผลิตกรดแลกติกสามารถผลิตได้ทั้งทางเคมีและทางชีวภาพ เนื่องจากการผลิตกรดแลกติกเพื่อใช้ในประเทศไทยไม่เพียงพอ จึงต้องมีการนำเข้าจากต่างประเทศเป็นจำนวนมากถึงปีละหลายแสน กิโลกรัม ปัจจุบันภายในประเทศไทยได้มีการศึกษาวิจัยในการผลิตกรดแลกติกและเพิ่มผลผลิตในกระบวนการหมัก แต่กรดแลกติกจะอยู่ในรูปที่รวมอยู่กับอาหารเลี้ยงเชื้อ การที่จะแยกกรดแลกติกออกจากอาหารนั้นทำได้ยากและต้องใช้ต้นทุนสูง จึงมีการวิจัยในการแยกนี้ด้วย แต่อย่างไรก็ตามขั้นตอนการแยกกรดแลกติกให้บริสุทธิ์ถือเป็นขั้นตอนที่สำคัญมากในการที่จะนำกรดแลกติกไปใช้ได้ ทั้งยังพัฒนากระบวนการที่แยกให้ได้สารที่มีบริสุทธิ์สูงอีกด้วย เพื่อที่จะพัฒนากระบวนการผลิตกรดแลกติกทั้งระบบต่อไป

การเลือกชนิดของเยื่อแผ่นที่ใช้ในระบบ EDI มีความสำคัญอย่างหนึ่ง เนื่องจากมีความจำเป็นที่ต้องใช้เยื่อแผ่นที่มีความหนาแน่นของประจุอย่างเพียงพอ เพื่อที่จะสามารถแยกกรดแลกติกและเพิ่มประสิทธิภาพการแยกได้เป็นอย่างดี อีกทั้งเยื่อแผ่นที่ใช้ในระบบ EDI นั้นเป็นชนิด ion exchange membrane ซึ่งเยื่อแผ่นแบบนี้มีรายงานว่ามีความสามารถในการแยกเกลือเล็กเตทออกจากน้ำหมัก โดยมีค่าฟลักซ์สูงถึง 0.393 กิโลกรัมต่อตารางเมตรต่อชั่วโมง (Timbuntam *et al.*, 2008) และจากการทบทวนวรรณกรรมถึงหลักการทำงานในระบบอื่นๆเปรียบเทียบกับระบบที่ใช้อยู่ ทำให้ต้องมีการศึกษากระบวนการแยกที่ใช้สารละลายสังเคราะห์กรดแลกติก (dilute solutions) เพื่อที่จะใช้เป็นพื้นฐานหรือแบบจำลองที่จะศึกษากลไกของการแพร่และการถ่ายเทมวลในระบบการแยก ที่มีการใช้เยื่อแผ่น (Lazarova *et al.*, 1994) หรือในที่นี้คือ EDI นั้น และพัฒนาระบบที่เชื่อมกับกระบวนการหมักในหัวข้อต่อไปได้

อีกทั้งเพื่อที่จะลดผลการยับยั้งเซลล์แบคทีเรียด้วยกรดแลกติกจะต้องทำการแยกกรดแลกติกออกจากระบบอย่างต่อเนื่อง (Yabannavar *et al.*, 1991) ในการผลิตระดับอุตสาหกรรมส่วนมาก มักที่มีการใช้การตกตะกอนในการแยกกรดแลกติก และเสร็จสิ้นกระบวนการจะทำให้เหลือเป็นกาก crude

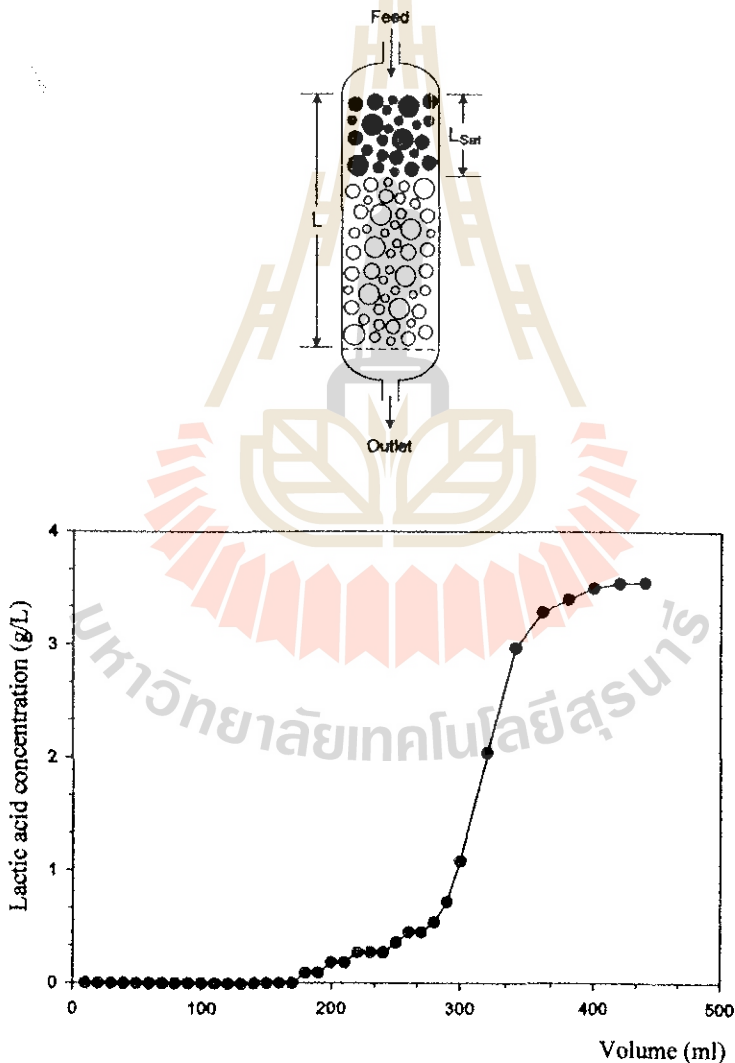
calcium sulphate ที่เป็นกากของเสีย ขาดต่อการทำลาย ดังนั้นเพื่อลดกากของเสียเหล่านี้จึงต้องหาระบบใหม่ที่ลดกากให้เหลือน้อยที่สุด เพื่อไม่ให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมต่อไปได้ (John *et al.*, 2008)

3.2 การศึกษาพฤติกรรมการถ่ายเทมวลของกรดแกล็กติกในระบบ EDI

การศึกษาการดูดซับ (Adsorption)

โดยปกติกรดแกล็กติกถูกผลิตขึ้นและสะสมในน้ำหมักทำให้ production rate ต่ำ (Hbov *et al.*, 2004) นั่นก็มีการเปลี่ยนแปลงสารตั้งต้นไปเป็นผลิตภัณฑ์ที่ต่ำ ดังนั้นจึงมีการศึกษาหาเทคนิคหรือวิธีการแยกกรดแกล็กติกในน้ำหมัก โดยสามารถแยกออกจากระบบได้หลากหลายกระบวนการ เช่น การตกตะกอนด้วยแคลเซียม, การสกัดด้วยตัวทำละลาย เป็นต้น กระบวนการแยกกรดแกล็กติกด้วยระบบอื่นๆ เช่น การตกผลึก (crystallization), การสกัดโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ (solvent extraction) และการดูดซับ (absorption) เป็นต้น ถึงแม้ว่าจะได้มีการศึกษาวิจัยในการแยกกรดแกล็กติกหลากหลายวิธี แต่ตรงกันข้ามคือที่ระบุว่า มีข้อจำกัดต่างๆ ยกตัวอย่างเทคนิค crystallization มีข้อเสียคือมีอัตราการผลิต (yield) ต่ำ ใช้สารเคมีในกระบวนการแยก ทำให้มีต้นทุนสูง และสุดท้ายกระบวนการก่อให้เกิดของเสีย ส่วนเทคนิค Solvent extraction ที่มีการใช้สารละลายอินทรีย์ในการแยกกรดแกล็กติก ทำให้หลังเสร็จสิ้นเกิดสารละลายอินทรีย์นี้อยู่ และเป็นสารที่อันตรายต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วย (Lee, 1998) ส่วนการดูดซับโดยใช้เรซินแลกเปลี่ยนประจุ (ion-exchange resin) นั้น พบว่าได้ผลการทดลองที่ดีในการแยกกรดแกล็กติกออกจากสิ่งเจือปนต่าง ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งน้ำตาล และ กรดอินทรีย์ชนิดอื่น ๆ (Thang *et al.*, 2008a) แต่ปัญหาหลักของ ระบบดูดซับก็คือการที่มีพื้นผิวที่จำกัดของเรซินที่ใช้ ซึ่งการดูดซับนั้นเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นที่พื้นผิวโดยจะมีการดูดซับระหว่างประจุบนเรซินกับกรดแกล็กติก โดยเรซินจะถูกบรรจุไว้ในคอลัมน์ก่อนที่จะทำการบีบน้ำหมักเข้าไปในคอลัมน์ การดูดซับของกรดแกล็กติกโดยเรซินจะทำให้เรซินไม่สามารถดูดซับกับกรดแกล็กติกได้อีก (แสดงถึงวงกลมสีค่าและมีความยาวของคอลัมน์เท่ากับ L_{sat} ดังแสดงในรูปภาพ 12) หลังจากที่มีการดูดซับไปเรื่อย ๆ จะส่งผลให้ส่วนของ L_{sat} มีค่าเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนเมื่อพื้นที่ของเรซินได้จับกับกรดแกล็กติกจนหมดแล้วตลอดคอลัมน์ ($L=L_{sat}$) จะทำให้เรซินไม่สามารถจับกรดแกล็กติกได้อีกต่อไป โดยประสิทธิภาพของการดูดซับนั้นสามารถที่จะทำการศึกษาได้โดยกราฟที่เรียกว่า breakthrough curve ซึ่งในการทดลองการดูดซับในเรื่องนี้จะมีการใช้เรซินแลกเปลี่ยนประจุแบบผสม (mixed ion-exchange resin) จำนวน 200 กรัมบรรจุลงในคอลัมน์แก้ว และความเข้มข้นของกรดแกล็กติกในส่วนของสารป้อน (feeding solution) เท่ากับ 3.5 กรัมต่อลิตร จากนั้นจะมีการเก็บส่วนของ outlet ทุก ๆ 10 มิลลิลิตรแล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดที่มีอยู่จากการทดลองจะเห็นได้ว่าในช่วงแรกของการทดลองนั้น ความเข้มข้นของกรดแกล็กติกในด้านที่ออก

จากคอลัมน์ (outlet) จะมีค่าเท่ากับศูนย์ แสดงให้เห็นว่ากรดทั้งหมดได้ถูกดูดซับไว้ภายในคอลัมน์ จากนั้นเมื่อถึงปริมาณของ outlet ที่ประมาณ 180 มิลลิลิตรนั้นจะพบว่าความเข้มข้นของกรดเล็กน้อยเพิ่มขึ้น จุดนี้เรียกว่า breakthrough volume จากนั้นความเข้มข้นของกรดเล็กน้อยใน outlet จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและมีค่าเท่ากับด้านของสารป้อนที่ปริมาตรของ outlet เท่ากับประมาณ 400 มิลลิลิตร ซึ่งถึงจุดนี้ระบบจะไม่มีกรดดูดซับเกิดขึ้นอีก และจากการวิเคราะห์หุ้มสมดุลมวลสารจาก breakthrough curve พบว่าความสามารถในการจับกรดเล็กน้อยของเรซินดังกล่าวอยู่ที่ 25 mg.g^{-1} wet resin ซึ่งมีค่าต่ำกว่าเรซินชนิด Amberlite IRA-400 ก่อนคือ 180.6 mg.g^{-1} wet resin (Cao *et al.*, 2002a) อย่างไรก็ตาม ระบบการดูดซับนั้น จะต้องมีการชะ (elution) เพื่อนำเรซินกลับมาใช้ใหม่ ซึ่งเป็นขั้นตอนที่ยุ่งยากและเสียเวลา อีกทั้งยังอาจจะทำให้เกิดการสูญเสียผลิตภัณฑ์ในระหว่างการทำกรดเล็กน้อยให้บริสุทธิ์อีกด้วย



รูปภาพ 12 ความสามารถในการดูดซับกรดเล็กน้อยในระบบการดูดซับ

ดังที่กล่าวไว้แล้วว่า ในระบบดูดซับนั้นจะต้องทำการชะล้างเอากรดเล็กคิกออกจากเรซินเพื่อเป็นการแยกผลิตภัณฑ์ออกและเป็นการล้างเรซินเพื่อที่จะนำกลับ ไปใช้ใหม่อีกครั้งหนึ่ง ซึ่งโดยปกตินั้น จะใช้กรดซัลฟูริกเจือจาง ซึ่งพบว่าระบบนี้จะเกิดความยุ่งยากขึ้นหลายประการ เช่น จำเป็นต้องใช้ตัวชะ (eluent) จำนวนมาก อีกทั้งจะต้องหยุดระบบในระหว่างการล้างเรซินอีกด้วย อย่างไรก็ตาม เนื่องจากกรดเล็กคิกสามารถแตกตัวได้เป็นเกลือเล็กน้อย ทำให้สามารถเคลื่อนที่ได้ภายใต้สนามไฟฟ้ากระแสตรง ในขณะที่สารปนเปื้อนที่ไม่สามารถแตกตัวได้ (เช่น น้ำตาล เป็นต้น) จะไม่เคลื่อนที่ ทำให้เกิดการแยกชั้น ดังนั้นระบบ electrodeionization (EDI) ซึ่งใช้เยื่อแผ่นแลกเปลี่ยนประจุในการแยกเกลือคิกออนนั้น สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการแยกกรดเล็กคิกออกจากน้ำหมักอย่างดี (Datta *et al.*, 1995) และจากการศึกษาหลักการของระบบนี้นั้นพบว่าประกอบด้วย cell stack เพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวของเยื่อแผ่น โดยที่เยื่อแผ่นที่ใช้คือ ion exchange membrane ในการแยกกรดเล็กคิกออกจากระบบ และการดูดซับนั้นจะเกิดขึ้นเมื่อกรดเล็กคิกถูกจับอยู่บนตัวดูดซับของแข็ง (Solid adsorbent) หรือในที่นี้คือ เรซิน และเรซินที่ใช้เป็นชนิดที่สามารถแลกเปลี่ยนไอออน (Mixed ion exchange resins) ที่เป็นพอลิเมอร์สังเคราะห์ซึ่งโครงสร้างประกอบด้วยหมู่ที่มีประจุเช่น $-SO_3^-$, $-COO^-$ เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการดูดซับกรดเล็กคิกในระบบ EDI โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อความเข้มข้นของกรดเล็กคิกในน้ำหมักมีค่าต่ำ

การดูดซับเกิดขึ้นได้โดย ขั้นตอนแรกคือ สารละลายที่ป้อน (Feed solution) ซึ่งประกอบด้วยกรดเล็กคิกถูกเติมหรือสัมผัสกับเรซิน ขั้นที่สอง กรดเล็กคิกจะถูกดูดซับอยู่บนผิวของเรซินและการแยกจะเกิดขึ้น ขั้นที่สาม เป็นการเอาหรือหมุนไหลสารละลายที่เหลือออก และในขั้นตอนสุดท้าย เป็นการชะกรดเล็กคิกที่ถูกดูดซับออกจากเรซินโดยใช้เยื่อแผ่นแลกเปลี่ยนประจรร่วมกับการใช้ไฟฟ้ากระแสตรง จากนั้นกรดเล็กคิกจะเคลื่อนที่และจะถูกย้ายไปเก็บไว้ในด้าน concentration side สำหรับทั้งกระบวนการดูดซับและกระบวนการแยกกรดเล็กคิกที่มีทั้งเทคนิคที่มีการคัดเลือกสาร โดยเยื่อแผ่น ion exchange membrane ทำงานร่วมกับ การดูดซับ (resin adsorption) ทำให้มีความสามารถในการคัดเลือก (Selectivity) กรดเล็กคิกผ่านระบบ EDI ได้สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคอื่นๆ อีกทั้งสถานะการจัดการทดลองตามระบบนี้ไม่รุนแรงและไม่ทำลายผลิตภัณฑ์ ซึ่งเป็นผลดีต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในกระบวนการแยกผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพต่างๆ เช่น โปรตีน เป็นต้น

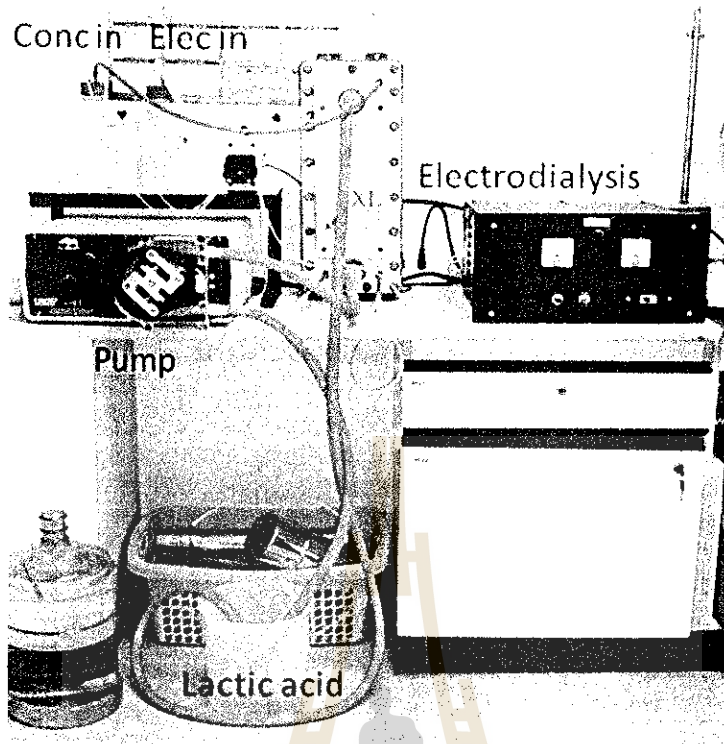
ในงานวิจัยนี้จึงได้มีการศึกษาระบบการแยกกรดเล็กคิกนั้นก็คือ ระบบ EDI ที่มีหลักการคล้ายคลึงกับ electrodialysis โดยที่หลักการของระบบ EDI ประกอบด้วย ตัวให้กระแสไฟฟ้า เรซิน ion exchange membranes (anion, cation exchange membranes) diluting side (ถ้าในกรณีแยกควบคู่กันดังหมัก ส่วนนี้คือส่วนที่เป็นของเหลวในถังหมักหรือน้ำหมักนั่นเอง) และ concentrating stream ส่วนที่กรดเล็กคิกจะถูกเก็บไว้ในส่วนนี้หลังจากที่แยกออกมาจากระบบแล้ว ระหว่างการดำเนินการ

สารละลายสังเคราะห์ในด้าน feed หรือสารป้อนจะมีการบีบให้ไหลเวียนผ่านระบบ EDI และกลับเข้าไปในส่วนสารป้อนคังเคิม ทำเป็นวงจร พร้อมกับให้กระแสไฟฟ้า เพื่อส่งเสริมให้ระบบมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น เพื่อให้เกิดการแลกเปลี่ยนกรดเกลือในสารละลายสังเคราะห์ไปยัง membrane และเรซินสุดท้ายจะถูกเก็บไว้ในด้าน concentration side

3.3 การศึกษาปัจจัยต่างๆที่มีอิทธิพลต่อการแยกกรดเกลือด้วยระบบ EDI โดยสารละลายป้อนสังเคราะห์ (Abiotic experiment)

สำหรับในส่วนการแยก (purification process) นั้น นับว่าเป็นหัวใจหลักหรือเป็นขั้นตอนหลักในการผลิตกรดเกลือเพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นของผลิตภัณฑ์ในอุตสาหกรรมอื่นๆ การทดลองที่จะใช้เทคโนโลยีใหม่ๆ ในการจัดสร้างระบบการแยกกรดเกลือ นั้น ได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เพื่อที่จะหาเทคนิคที่มีประสิทธิภาพและจัดสร้างได้ง่าย มีต้นทุนการผลิตไม่มากเกินไป พร้อมทั้งที่จะสนับสนุนให้พัฒนาต่อไปได้อีก (Walter, 1998) ทั้งนี้ในงานวิจัยนี้จึงได้มุ่งเน้นในการศึกษาถึงระบบการแยกกรดเกลือออกจากระบบ คือระบบ EDI เพื่อให้สามารถใช้เวลาในกระบวนการหมัก ให้เกิดการผลิตกรดเกลืออย่างต่อเนื่อง พร้อมทั้งแยกกรดเกลือออกมาให้บริสุทธิ์ เพื่อให้ได้กรดเกลือสำหรับนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นหรือวัตถุดิบในงานต่อไป

หลังจากได้ทำการประกอบและติดตั้งระบบ Electrodeionization (EDI) เป็นที่เรียบร้อยแล้ว (รูปภาพ 13) จึงดำเนินการทดลองในการแยกกรดเกลือออกจากสารละลาย โดยใช้สภาวะในการทดลองต่าง ๆ เช่น ปริมาณของกรดเริ่มต้น ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ปริมาณของกระแสที่ใช้ (โวลต์หรือแอมป์) เป็นต้น โดยจุดประสงค์ของการทดลองในช่วงนี้คือการเข้าใจในพฤติกรรมของการถ่ายเทมวลของกรดเกลือจากด้านของสารป้อน ไปสู่ด้านของสารละลายตัวรับ (receiving solution) และปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการถ่ายเทมวลนี้



รูปภาพ 13 การประกอบและติดตั้งระบบ EDI

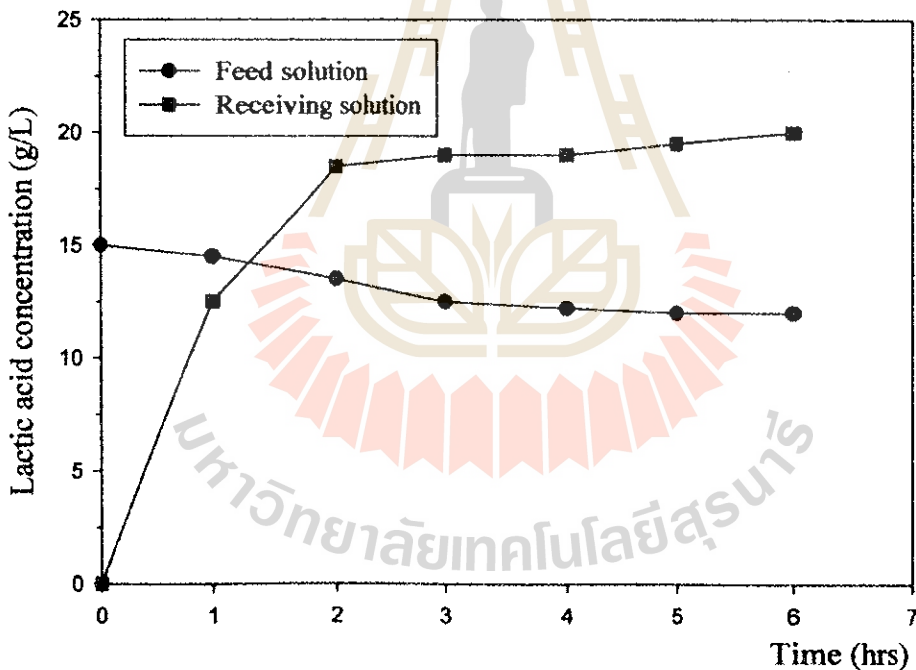
ในการทดลองมีการแปรผันค่าตัวแปรต่างๆในระบบ Abiotic ที่เป็นคล้ายแบบจำลองเพื่อพัฒนาในกระบวนการแยกที่เชื่อมรวมกับการผลิตโดยกระบวนการทางชีวภาพในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (Fermenter) ซึ่งมีการศึกษาถึงผลของกระแสไฟฟ้าที่ใช้ (0, 5, 15 โวลต์) และความเข้มข้นกรดแล็กติกเริ่มต้น (5, 10, 15, 20 กรัมต่อลิตร) และมีการศึกษาของทั้งสองเฟสคือ ทางด้านสารป้อน (Feed solution) ที่มีปริมาตร 2,000 มิลลิลิตร กับทางด้านสารละลายตัวรับ (Receiving solution) ที่มีปริมาตร 500 มิลลิลิตร ของกระบวนการแยกโดย ระบบ อิเลคโตรไดอัลไอซิสในแซน (EDI)

3.3.1 การศึกษาถึงผลของกระแสไฟฟ้าที่ใช้

มีการศึกษาผลของกระแสไฟฟ้าที่ใช้ในระบบ EDI เป็น 0, 5, 15 โวลต์ เพื่อที่จะหากระแสไฟฟ้าที่เหมาะสมในการให้กับระบบการแยกกรดแล็กติกสำหรับ ion exchange membrane เพื่อให้เกิดการแตกตัวของประจุ และเกิดการแยกได้ โดยใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำหมักที่ 15 กรัมต่อลิตรซึ่งเป็นการจำลองระบบการหมักแบบกะ

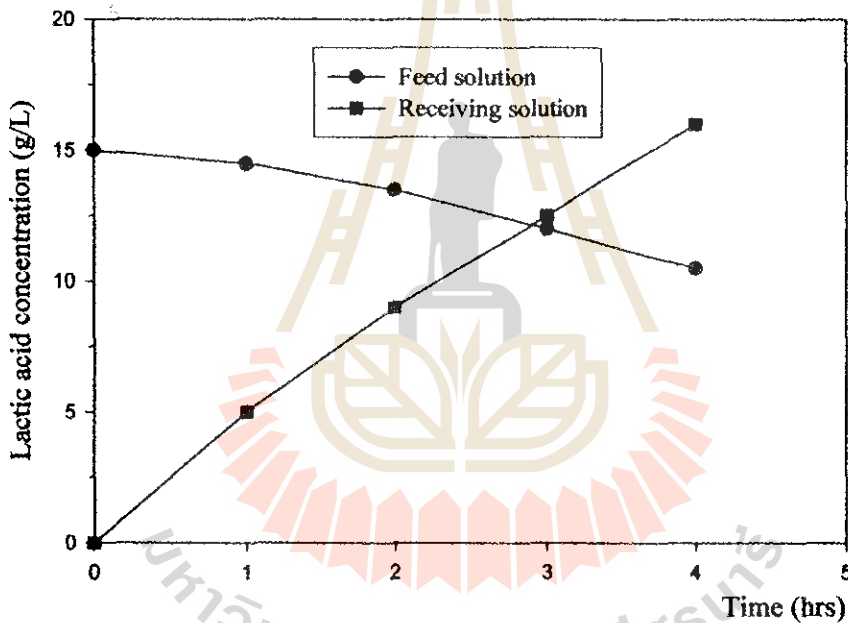
รูปภาพ 14 แสดงการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของกรดแล็กติกในด้านของสารป้อนและด้านของสารละลายตัวรับ พบว่าเมื่อทำการทดลองที่ 0 โวลต์ คือไม่มีการปล่อยกระแสไฟฟ้าเข้าไปในระบบ โดย

จะสังเกตเห็นว่าความเข้มข้นของกรดแล็กติกในสารป้อนนั้นมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย จากเริ่มต้นความเข้มข้นอยู่ที่ 15 กรัมต่อลิตรและจะลดลงในช่วง 3 ชั่วโมงแรก ก่อนที่ความเข้มข้นจะคงที่โดยมีความเข้มข้นสุดท้ายอยู่ที่ประมาณ 13 กรัมต่อลิตร สำหรับในด้านของสารละลายตัวรับนั้น พบว่าความเข้มข้นของกรดแล็กติกจะเพิ่มขึ้นในช่วง 3 ชั่วโมงแรกเช่นกัน ก่อนที่จะมีค่าคงที่ และมีความเข้มข้นของกรดแล็กติกอยู่ที่ประมาณ 20 กรัมต่อลิตร โดยใช้ปริมาตรสารละลาย 500 มิลลิลิตร จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าไฟฟ้ากระแสตรงมีผลต่อการถ่ายเทมวลของกรดแล็กติกเป็นอย่างมาก ถึงแม้ว่าความเข้มข้นของกรดแล็กติกในด้านของสารละลายตัวรับจะเพิ่มขึ้นในช่วงแรกก็ตาม แต่ความเข้มข้นจะไม่เพิ่มขึ้นอีก ซึ่งความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นนี้ คาดว่าจะเกิดจากการแพร่ตามธรรมชาติ (natural diffusion) ของกรดแล็กติกที่แพร่ผ่านเยื่อแผ่นแลกเปลี่ยนประจุที่ใช้ ดังนั้นผลการทดลองจึงยืนยันได้ว่าไฟฟ้ากระแสตรงนั้นมีผลโดยตรงต่อการถ่ายเทมวลของกรดแล็กติกในระบบ การทดลองต่อไปจึงมีการแปรค่ากระแสไฟฟ้าที่เข้าระบบเพื่อวิเคราะห์และเปรียบเทียบกับผลการทดลองนี้



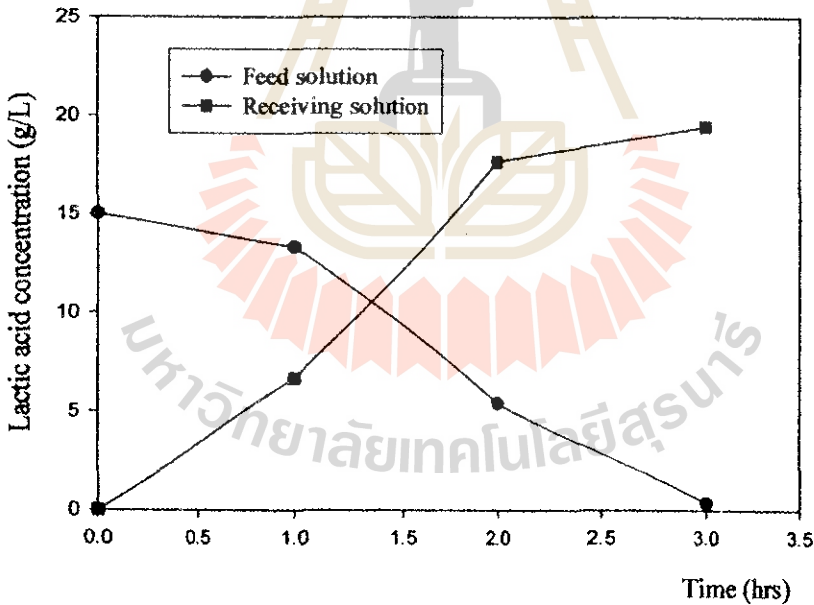
รูปภาพ 14 กราฟระหว่างค่าความเข้มข้นกรดแล็กติกกับเวลาของทางด้านสารป้อนและด้านสารละลายตัวรับในกระบวนการแยก ที่มีค่ากระแสไฟฟ้า 0 โวลต์ และความเข้มข้นกรดแล็กติกเริ่มต้น 15 กรัมต่อลิตร อัตราการป้อนเท่ากับ 20 มิลลิลิตรต่อนาที

รูปภาพ 15 แสดงผลการทดลองการแยกกรดแล็กติกค่าความเข้มข้นของกรดแล็กติกที่เท่ากัน คือ 15 กรัมต่อลิตร และมีการปรับกระแสไฟฟ้าเข้าระบบที่ 5 โวลต์ ผลพบว่า เมื่อเปรียบเทียบกับ การทดลองที่ไม่มีการป้อนกระแสไฟฟ้าเข้าระบบ การทดลองนี้จะมีอัตราการแยกกรดแล็กติกจากสารป้อนที่สูงกว่า คือ จากเริ่มต้น 15 กรัมต่อลิตร สุดท้ายประมาณ 10 กรัมต่อลิตร ภายในระยะเวลา 4 ชั่วโมง ในขณะที่ความเข้มข้นของกรดแล็กติกในด้านของสารละลายตัวรับนั้น จากเส้นกราฟจะเห็นได้ว่ามีค่าเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องและมีค่าความเข้มข้นประมาณ 4.25 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีความเข้มข้น ณ เวลาดังกล่าวคือ 17 กรัมต่อลิตร ซึ่งจะเห็นได้กรดแล็กติกสามารถเคลื่อนที่ได้ภายใต้สนามไฟฟ้า ดังที่ได้ตั้งสมมุติฐานไว้ก่อนการทดลอง



รูปภาพ 15 กราฟระหว่างค่าความเข้มข้นกรดแล็กติกกับเวลาของทางด้านสารป้อนและด้านสารละลายตัวรับในกระบวนการแยก ที่มีค่ากระแสไฟฟ้า 5 โวลต์ และความเข้มข้นกรดแล็กติกเริ่มต้น 15 กรัมต่อลิตร อัตราการป้อนเท่ากับ 20 มิลลิลิตรต่อนาที

รูปภาพ 16 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกรดแล็กติกในด้านของสารป้อนและสารละลายตัวรับ โดยปรับกระแสไฟฟ้าที่ 15 โวลต์ เมื่อเวลาผ่านไป 3 ชั่วโมง ความเข้มข้นของกรดแล็กติกในด้านของสารป้อนจะลดลงอย่างรวดเร็ว จนเหลือ 0 กรัมต่อชั่วโมง ในขณะที่ความเข้มข้นในด้านของสารละลายตัวรับนั้น มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องเช่นกัน โดยมีค่าความเข้มข้นอยู่ที่ 6.67 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง รูปภาพ 14 ถึง รูปภาพ 16 พบว่าที่กระแสไฟฟ้าสูงสุด 15 โวลต์ ทำให้เกิดการแยกกรดแล็กติกจากสารป้อน ได้สูงสุด ในที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 15 กรัมต่อลิตร เมื่อมีการให้กระแสไฟฟ้าทำให้เกิดประจุซึ่ง cations จะถูกดึงดูดไปที่ขั้ว negative electrode และ anions ถูกดึงไปยังขั้ว positive electrode สำหรับกรดแล็กติกที่มีคุณสมบัติเป็นประจุลบจะถูกดึงไปที่ ion exchange membrane เกิดการถ่ายเทและเก็บไว้ในด้านของ concentration side และจากการทดลองในหัวข้อนี้สามารถสรุปได้ว่ากระแสไฟฟ้าที่ให้นั้นมีความสัมพันธ์ คือ กระแสไฟฟ้าสูงจะส่งผลต่อการแยกกรดแล็กติกได้ดี และสามารถแยกกรดแล็กติกออกจากน้ำหมักได้ในอัตราที่สูง และเมื่อวิเคราะห์แล้วพบว่าสารละลายในด้าน concentration side มีเพียงเฉพาะกรดแล็กติก



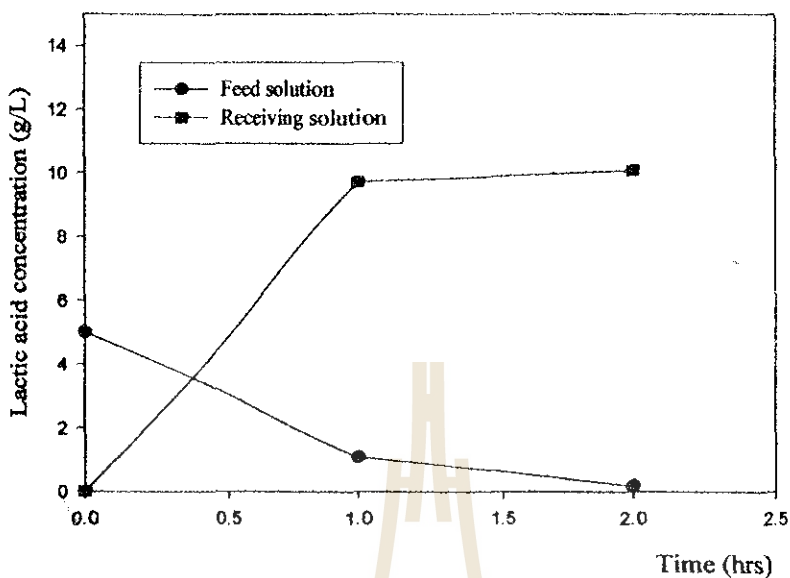
รูปภาพ 16 กราฟระหว่างค่าความเข้มข้นกรดแล็กติกกับเวลาของทางด้านสารป้อนและด้านสารละลายตัวรับในกระบวนการแยก ที่มีค่ากระแสไฟฟ้า 15 โวลต์ และความเข้มข้นกรดแล็กติกเริ่มต้น 15 กรัมต่อลิตร อัตราการป้อน 20 มิลลิลิตรต่อนาที

โดยทั่วไปแล้ว จะเห็นได้ว่ากระแสไฟฟ้าที่มีผลโดยตรงต่อการถ่ายเทมวลของกรดแกล็กติกจากสารป้อนไปยังด้านของสารละลายเป็นอย่างมาก ซึ่งผลการทดลองนี้คาดว่า จะมีความเป็นไปได้ที่จะนำไปประยุกต์ใช้กับกระบวนการหมักที่ควบคู่กับการแยกกรดแกล็กติก หรือเรียกว่า *in situ product removal* ซึ่งในกระบวนการหมักนั้นจะมีการผลิตกรดแกล็กติกขึ้นในระบบอยู่ตลอดเวลา และในจุดประสงค์งานวิจัยนี้เมื่อทราบผลของกระแสไฟฟ้าแล้ว ผลของค่าความเข้มข้นกรดแกล็กติกเริ่มต้นในด้านของสารป้อน ที่มีต่อระบบการแยกโดยเทคนิค *electrodeionization* นั้นมีความสำคัญเพียงใด ดังนั้นการทดลองต่อไป จะเป็นการแปรผันความเข้มข้นเริ่มต้นของกรดแกล็กติกที่แตกต่างกัน

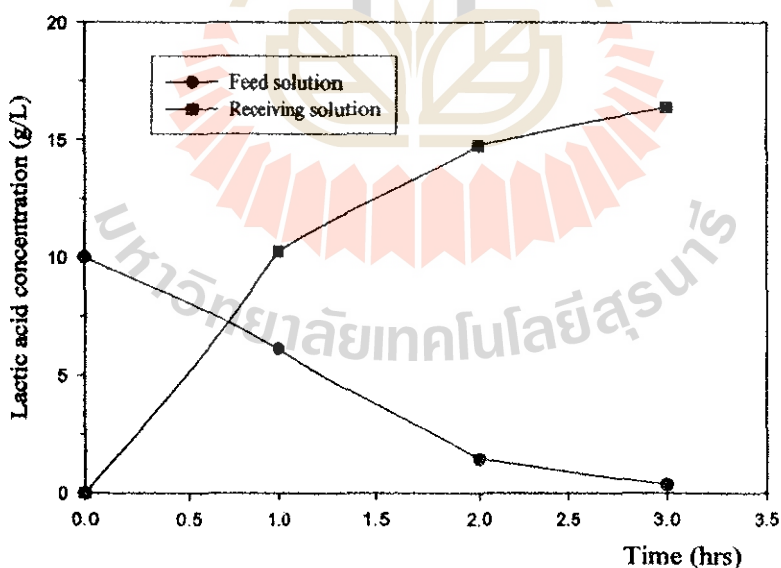
3.3.2 การศึกษาถึงผลของความเข้มข้นกรดแกล็กติกเริ่มต้น

จากผลการทดลองหัวข้อข้างต้นพบว่า ที่กระแสไฟฟ้า 15 โวลต์ ได้ผลการแยกกรดแกล็กติกดีที่สุด ในการทดลองนี้ จะมีการศึกษาผลของความเข้มข้นของสารป้อน ในระบบ EDI เป็น 5, 10, และ 20 กรัมต่อลิตร เนื่องจากว่าในระบบ EDI ประกอบด้วยเยื่อแผ่น และเรซิน ที่จะช่วยดูดซับและเลือกเฉพาะกรดแกล็กติกเพื่อให้ผ่านไปยังด้านของ *concentration side* ดังนั้นความเข้มข้นเริ่มต้นในสารป้อน คาดว่าจะมีผลต่อการแยกเป็นอย่างมาก เนื่องจากว่าเกี่ยวข้องกับความแตกต่างของความเข้มข้นของสารละลายทั้งสองด้าน

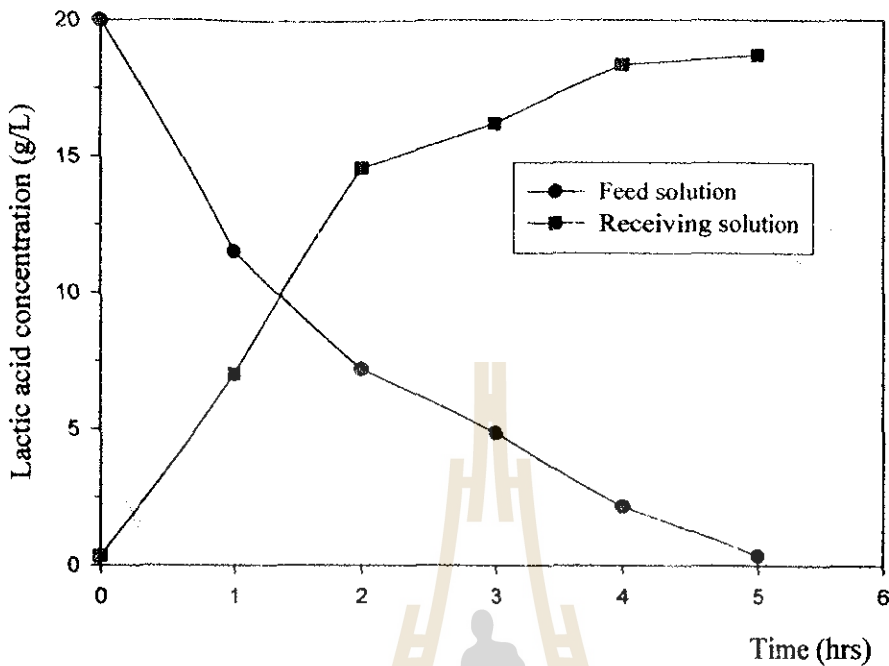
รูปภาพ 17 รูปภาพ 18 และ รูปภาพ 19 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความผลของความเข้มข้นเริ่มต้นกรดแกล็กติกต่อเวลา โดยมีความเข้มข้นเริ่มต้นของสารป้อนระหว่าง 5-20 กรัมต่อลิตร ในการทดลองนี้มีการปรับค่ากระแสไฟฟ้าให้คงที่ 15 โวลต์ จากผลการทดลองทั้ง 3 สถานะ พบว่าถ้าความเข้มข้นของสารละลายด้านป้อน (*feed side*) เพิ่มขึ้น จะส่งผลต่ออัตราการถ่ายเทมวลจากด้านป้อนไปยังด้านสารละลายตัวรับตามไปด้วย โดยอัตราการถ่ายเทมวลของกรดแกล็กติกที่ความเข้มข้นในด้านของสารป้อนสูงจะมีค่าที่มากกว่าที่ความเข้มข้นต่ำกว่า โดยมีอัตราการลดลงของความเข้มข้นเริ่มต้นในด้านของสารป้อนที่ 5, 10 และ 20 กรัมต่อลิตรอยู่ที่ประมาณ 4.0, 5.1 และ 7.5 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงตามลำดับ จากการทดลองวิจัยนั้นได้ตามวัตถุประสงค์ทั้งหมดและได้รับผลดังนี้ คือ สำหรับการแปรผันกระแสไฟฟ้าที่ใช้ในระบบที่ 15 โวลต์ ที่มีประสิทธิภาพในการแยกกรดแกล็กติกจากสารป้อนสังเคราะห์ (*synthetic feed*) ได้ดีที่สุด ในสถานะอุณหภูมิห้อง นอกจากนี้แล้วความเข้มข้นของกรดแกล็กติกเริ่มต้นที่สูงก็จะส่งผลทำให้อัตราการถ่ายเทมวลนั้นสูงตามไปด้วย ซึ่งผลการทดลองนี้สามารถนำไปพัฒนาสู่ระบบของการแยกกรดแกล็กติกจากน้ำหมักจริงและเพื่อเป็นแนวทางที่จะนำไปใช้ประยุกต์ในอุตสาหกรรมได้ต่อไป



รูปภาพ 17 กราฟระหว่างค่าความเข้มข้นกรดแล็กติกกับเวลาของทางด้านสารป้อนและด้านสารละลายตัวรับในกระบวนการแยก ที่มีค่ากระแสไฟฟ้า 15 โวลต์ และความเข้มข้นกรดแล็กติกเริ่มต้น 5 กรัมต่อลิตร อัตราการป้อน 20 มิลลิลิตรต่อนาที



รูปภาพ 18 กราฟระหว่างค่าความเข้มข้นกรดแล็กติกกับเวลาของทางด้านสารป้อนและด้านสารละลายตัวรับในกระบวนการแยก ที่มีค่ากระแสไฟฟ้า 15 โวลต์ และความเข้มข้นกรดแล็กติกเริ่มต้น 10 กรัมต่อลิตร อัตราการป้อน 20 มิลลิลิตรต่อนาที



รูปภาพ 19 กราฟระหว่างค่าความเข้มข้นกรดแลกติกกับเวลาของทางด้านสารป้อนและด้านสารละลายตัวรับในกระบวนการแยก ที่มีค่ากระแสไฟฟ้า 15 โวลต์ และความเข้มข้นกรดแลกติกเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร

Thang และคณะ (Thang *et al.*, 2008a) ได้รายงานว่า neutral polymeric resin XAD1600 แสดงถึงปัจจัยที่มีผลต่อการดูดซับของเรซินชนิดนี้คือ ความเข้มข้นของสารละลายป้อน เนื่องจากว่า เมื่อมีความเข้มข้นกรดแลกติกน้อยจะสามารถดูดซับด้วยเรซินนั้นได้เรื่อย จนกระทั่งความเข้มข้นของกรดแลกติกเริ่มสูงขึ้นจะทำให้เข้าสู่ภาวะสมดุล (Equilibrium) เช่นเดียวกับความเข้มข้นของ hydrogen ion ได้แตกตัวจากสถานะที่เป็นกรดนั่นเอง ผลการทดลองนี้สามารถยืนยันผลลัพธ์ที่ได้จากงานวิจัยนี้ ซึ่งเป็นไปในแนวทางเดียวกัน ทั้งนี้ยังพบว่าเรซินนั้นจะไม่สามารถดูดซับสารอนินทรีย์ต่างๆ และน้ำตาล ทำให้ง่ายต่อการที่จะใช้ระบบ EDI ที่มีเรซินช่วยดูดซับกรดแลกติก ออกมาจากระบบและพัฒนาให้ดีขึ้น

Wee และคณะ (Wee *et al.*, 2005) เมื่อทำการเปรียบเทียบกับระบบ electrodialysis ร่วมกับการแยกจากน้ำหมักนั้น โดยที่สารป้อนหรือน้ำหมักนั้นมีความเข้มข้นประมาณ 76 กรัมต่อลิตร ด้าน permeate มีความเข้มข้น 0.8 กรัมต่อลิตร และให้กระแสไฟฟ้าคงที่ที่ 16 โวลต์ เมื่อศึกษากระบวนการแล้วพบว่าความเข้มข้นในด้าน permeate เพิ่มขึ้นจากเดิมเป็น 166.3 กรัมต่อลิตร จากผลนี้เมื่อเทียบกับระบบ EDI แล้วนั้น แสดงได้ว่าระบบที่มีการใช้เยื่อแผ่น ion exchange membrane นั้นมีประสิทธิภาพในการ

แยกกรดแล็กติกออกจากระบบเป็นอย่างมาก ทั้งนี้เป็นที่รู้กันอยู่แล้วว่ากรดแล็กติกเป็นกรดอินทรีย์ที่มีประจุ ทำให้เยื่อแผ่นที่มีประจุสามารถแยกกรดแล็กติกออกจากสารอื่นๆ ได้ เฉลี่ยเฉพาะกรดแล็กติกที่ออกจากน้ำหมักไปยังสารละลายค้ำวน permeate

โดยสรุปแล้ว จาก รูปภาพ 17 ถึง รูปภาพ 19 นั้น มีการแปรความเข้มข้นเริ่มต้นที่แตกต่างกัน และใช้กระแสไฟฟ้าเท่ากันคือ 15 โวลต์ ผลพบว่า ประสิทธิภาพในการแยกกรดแล็กติกออกจากสารป้อนนั้น ไม่แตกต่างกัน นั่นคือ สามารถแยกกรดแล็กติกได้ดี แตกต่างกันที่อัตราการถ่ายเทมวลเท่านั้น ซึ่งเป็นผลมาจากอิทธิพลของไฟฟ้ากระแสตรงนั่นเอง อีกทั้งยังสามารถแยกได้ดีที่ความเข้มข้นต่ำอีกด้วย ดังนั้นระบบ อิเล็กโทรไดโอดอนไนเซชัน (EDI) นั้นมีประสิทธิภาพและมีความสามารถที่ดีว่า คุณสมบัติเด่นกว่าระบบ electrodialysis เนื่องจากมีการใช้เรซินร่วมกับ ion exchange membrane ในการแยกกรดแล็กติก ทำให้มีประสิทธิภาพที่ดีขึ้น ซึ่งโดยทั่ว ๆ ไปแล้วเรซินนี้ จะอาศัยหลักการดูดซับ (adsorption) ที่สามารถทำการ regenerate ทำให้ประสิทธิภาพเหมือนดังเดิมด้วยการชะล้างด้วยสารละลาย เพื่อนำกลับมาใช้ใหม่ ซึ่งภายหลังจากการล้างเรซินแล้ว ก็จะทำให้สามารถแยกกรดแล็กติกได้ดีดังเดิม ซึ่งเป็นลักษณะเด่นของระบบ EDI ที่มี 2 ระบบทำงานร่วมกันนั่นเอง โดยจะเป็นการ regenerate ด้วยไฟฟ้า ทำให้ระบบสามารถทำงานได้อย่างต่อเนื่อง สำหรับการใส่เรซินแลกเปลี่ยนประจุชนิดอื่นในระบบ EDI นั้น ก็ได้มีรายงานว่า ได้มีการประยุกต์ใช้ polymeric adsorbent ในการแยกกรดซิทริกจากน้ำหมัก (Thang *et al.*, 2008b) โดยใช้ Amberlite XAD1600 resin จากบริษัท Rohm and Haas ที่ได้มีการทดลองใส่เรซินชนิดนี้แยกสารจำพวก antibiotics, water-soluble steroids, amino acids และ proteins ได้ผลสำเร็จมาแล้ว จากผลนี้สามารถยืนยันถึงประสิทธิภาพของระบบ EDI ที่สามารถใช้ในการแยกกรดอินทรีย์ได้อย่างแพร่หลาย

สำหรับการทดลองในขั้นต่อไปจะเป็นการศึกษาการเชื่อมระบบ อิเล็กโทรไดโอดอนไนเซชันกับถังปฏิกรณ์ชีวภาพ เพื่อให้เกิดการแยกกรดแล็กติกที่เป็น ไปอย่างต่อเนื่อง โดยอยู่บนพื้นฐานของผลการทดลองที่ศึกษาในครั้งนี้อย่างต่อเนื่อง ทั้งนี้ยังต้องพัฒนาระบบเพื่อให้เหมาะสมกับการเชื่อมระบบดังกล่าว เนื่องจากอาจมีผลของความเข้มข้นของเชื้อในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ อาหารเลี้ยงเชื้อ และอื่นๆ ที่ส่งผลต่อระบบการแยกนี้ ดังนั้นในขั้นนี้เป็นการศึกษาระบบพื้นฐานเบื้องต้น เพื่อนำไปสู่ขั้นต่อไป และยังคงต้องมีการศึกษาทั้งกระแสไฟฟ้าและปัจจัยอื่น ๆ ที่มีผลต่อประสิทธิภาพการแยกด้วย ในการศึกษาผลของกระแสไฟฟ้าโดยทั่ว ๆ ไปนั้น จะไม่สามารถทำได้โดยง่าย เนื่องจากจะต้องมีการใช้อุปกรณ์ที่ต้องสั่งทำเป็นพิเศษในการแปลงไฟฟ้า เพื่อป้อนเข้าสู่ระบบ แต่ในงานวิจัยนี้ ได้มีการพัฒนาและจัดสร้างชุดตัวแปลงไฟ เพื่อให้สามารถศึกษาปริมาณกระแสได้ในค่าที่กว้าง นั่นคืออยู่ในช่วงระหว่าง 0-100 โวลต์ ซึ่งทำให้การทดลองเป็นไปในแนวทางที่ต้องการ และผลการทดลองวิจัยเป็นที่น่าพอใจ ก่อให้เกิดการ

พัฒนาทั้งกระบวนการแยกกรดแล็กติกและระบบจัดสร้างเครื่องมือต่อไป จากผลการทดสอบการแยกกรดแล็กติกดังกล่าวที่กล่าวข้างต้นนั้น มีการใช้สารป้อนเป็นสารละลายสังเคราะห์ เพื่อให้ผลการทดลองที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการหมักจริง ดังนั้น จึงมีการทดลองในการใช้สารป้อนที่เป็นสารละลายน้ำหมักที่ได้จากกระบวนการหมักเพื่อที่จะสามารถศึกษาข้อมูลได้อย่างชัดเจนเพื่อประยุกต์ใช้ควบคู่ทั้งระบบการหมักและการแยกไปด้วยกัน

3.4 การศึกษาของนักวิทยาศาสตร์กระบวนการผลิตกรดแล็กติกโดยวิธีการหมัก (Fermentation processes)

สำหรับอุณหภูมิและ pH นั้นถือเป็นปัจจัยหลักในการศึกษาว่ามีผลต่อกระบวนการผลิตกรดแล็กติกโดยกระบวนการหมักหรือ จึงต้องมีการศึกษาเพื่อที่จะหาสภาวะที่เหมาะสมทั้งสำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกและการผลิตกรดแล็กติกในระบบ (Yuwono *et al.*, 2008) และจากการศึกษาจากงานวิจัยต่างประเทศ ซึ่งสามารถระบุได้ว่าความสามารถของเอนไซม์ H⁺-ATPase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวกับการเจริญเติบโตและการใช้แหล่งอาหารต่างๆของเชื้อ *S. bovis* ที่เหมาะสมนั้นจะดีที่สุดที่ pH 5.5 (Miwa *et al.*, 2000) ซึ่งใกล้เคียงกับผลการทดลองของ *P. pentosaceus* ที่สามารถสรุปได้ว่า ค่า pH ที่เหมาะสมในกระบวนการหมัก คือ ที่ pH 6.0 และจากผลนี้ในการทดลองศึกษาขั้นต่อไปจะมีการจัดชุดการทดลองที่ pH ดังกล่าว เนื่องจากเป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตกรดแล็กติก ทั้งนี้ในการศึกษามีความต้องการที่จะหาวิธีหรือกระบวนการที่จะทำให้ผลิตกรดแล็กติกได้ในปริมาณที่สูงสุด จากนั้นจะมีการนำไปประยุกต์ใช้สำหรับระดับอุตสาหกรรมต่อไป สำหรับอิทธิพลของอุณหภูมินั้น พบว่าถ้าอุณหภูมิในกระบวนการหมักสูงกว่า 40 องศาเซลเซียสและค่า pH ต่ำกว่า 5.0 สำหรับการผลิตกรดแล็กติกโดยเชื้อ *P. pentosaceus* ซึ่งที่สภาวะนี้จะส่งเสริมให้เกิดการสร้างผลพลอยได้อื่นๆ (By-product formation) ขึ้น (Akerberg *et al.*, 1998) ด้วยเหตุผลที่ว่าเกิดจาก proteolytic activity and diacetyl formation ภายในกระบวนการเมแทบอลิซึมของเชื้อ *P. pentosaceus* (de Giori *et al.*, 1986) นั่นเอง

ปัจจัยอย่างหนึ่งที่มีอิทธิพลต่อการผลิตกรดแล็กติก นั่นก็คือ แหล่งคาร์บอนหรือน้ำตาลชนิดต่างๆนั้น ควรมีความเหมาะสมที่จะใช้เป็นสารตั้งต้นหรือแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดแล็กติก และในการทำให้กรดแล็กติกมีความบริสุทธิ์ออกมามีต้นทุนต่ำ เนื่องจาก เชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกสามารถเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นกรดแล็กติกได้เกือบทั้งหมด ส่งผลให้ในกระบวนการหมักมีสารตกค้างน้อย กระบวนการสกัดจึงง่ายกว่า การผลิตกรดแล็กติกจากวัตถุดิบจำพวกกลีโคไลสนั้นมีการศึกษาเพื่อเป็นตัวเปรียบเทียบในการทดลองนี้ โดยในกระบวนการจะต้องมีการย่อยวัตถุดิบดังกล่าวด้วยวิธีทางเคมี

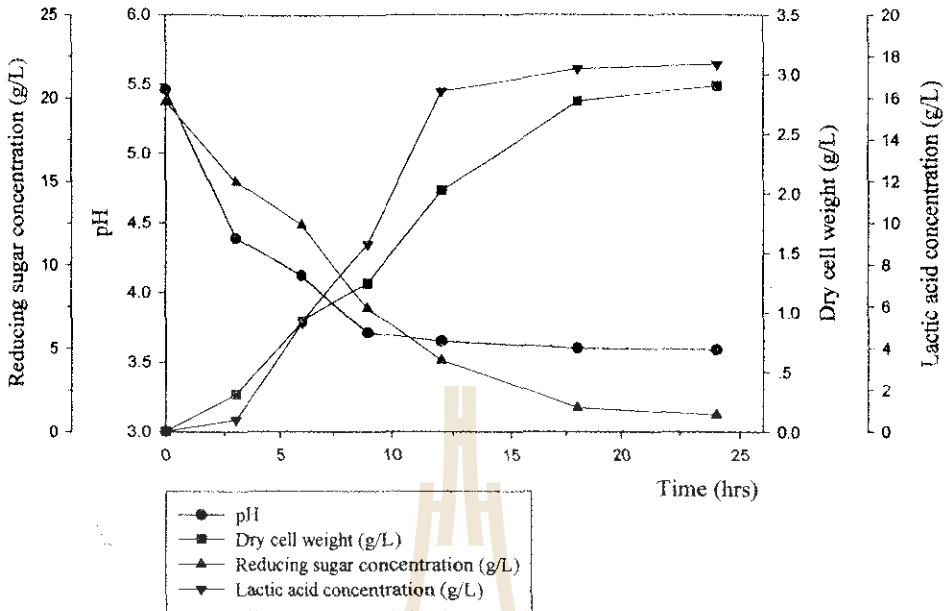
คือ มีการใช้เอนไซม์เพื่อย่อยเซลลูโลสเพื่อให้เป็นโมเลกุลที่เล็กลงหรือเรียกกระบวนการนี้ว่า enzymatic saccharification ให้ได้เป็นน้ำตาลชนิดต่างๆ เพื่อง่ายต่อการนำไปใช้ของเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกในกลุ่ม *Lactobacillus* sp. แต่อย่างไรก็ตามในการผลิตกรดแล็กติกโดยเชื้อจุลินทรีย์ผ่านกระบวนการหมักนั้นก็มีปัจจัยสำคัญหลายอย่าง เช่น pH อัตราการกวน แหล่งคาร์บอน อุณหภูมิ ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาณและอายุของความเข้มข้นหัวเชื้อเริ่มต้น อัตราการให้อากาศ ความเข้มข้นแหล่งคาร์บอนเริ่มต้นและรูปแบบกระบวนการหมัก (continuous, semicontinuous หรือ batch fermentations) เพื่อสุดท้ายจะได้สภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตกรดแล็กติกให้ได้ประสิทธิภาพมากที่สุดสำหรับกระบวนการหมักนั้นๆ (Tada et al., 2007)

อย่างเป็นที่ทราบโดยทั่วกันว่าน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดของจุลินทรีย์ทุกชนิดเนื่องจากสามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตได้ทันที แต่อย่างไรก็ตามยังคงมีราคาแพง ต้นทุนการผลิตสูงจึงต้องมีการพัฒนาในส่วนของวัตถุดิบที่นำมาใช้ในกระบวนการหมัก ทั้งยังอาจกล่าวได้ว่าการผลิตกรดแล็กติกด้วย *P. pentosaceus* ได้รับอิทธิพลจากแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในกระบวนการหมัก ซึ่งเกี่ยวเนื่องสัมพันธ์กับการที่จะเปลี่ยนแปลงไปใช้วัตถุดิบประเภทอื่นๆ ว่าจะต้องมีการควบคุมและศึกษาความเข้มข้นของสารตั้งต้น เช่นกันว่าจะมีผลต่อกระบวนการผลิตกรดแล็กติกหรือไม่ อย่างไร เพราะถ้ามีการสะสมสารตั้งต้นในกระบวนการจากการที่แบคทีเรียกรดแล็กติกนำไปใช้ไม่ได้ไม่หมดแล้วนั้น ก็จะสูญเสียวัตถุดิบโดยเปล่าประโยชน์นั่นเอง

ในกระบวนการผลิตกรดแล็กติกทางอุตสาหกรรมมีความต้องการในการลดต้นทุนการผลิต ดังนั้นจึงต้องมีการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการเพื่อพัฒนาในระดับใหญ่ต่อไป สำหรับแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตกรดแล็กติกโดยเชื้อ *P. pentosaceus* ได้รับความสนใจในสารจำพวกที่มีราคาถูก สามารถหาได้ง่ายในท้องตลาด อีกทั้งเป็นของเหลือทิ้งต่างๆ ที่สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ เพราะยังคงมีสารอาหารเหลืออยู่ ซึ่งนับว่ามีประโยชน์เป็นอย่างมาก และถือเป็นการลดขยะเหลือทิ้งทางการเกษตร ซึ่งส่งผลโดยตรงต่อสิ่งแวดล้อม และแหล่งคาร์บอนที่จะนำมาใช้นี้ จะต้องอยู่บนพื้นฐานที่หาได้ตลอดทั้งปี เพื่อที่จะสนับสนุนการผลิตในระดับใหญ่และต่อเนื่องต่อไป ในหัวข้อนี้จึงมีการใช้แหล่งคาร์บอนที่มีคุณสมบัติดังได้กล่าวไปข้างต้น เช่น หางนม แป้งที่ละลายน้ำได้ (soluble starch) แป้งมันสำปะหลังและแป้งมันสำปะหลังที่ย่อยแล้ว (hydrolyzed cassava starch) ที่เป็นวัตถุดิบทางการเกษตร ที่ประเทศไทยเป็นผู้นำทางการผลิต อีกทั้งสามารถผลิตได้เพียงพอต่อความต้องการภายในประเทศ ราคาถูกและมีส่วนที่สามารถนำมาพัฒนาให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีประโยชน์ได้อีกทางหนึ่ง

อย่างไรก็ตามในการศึกษาหรือปรับปรุงสูตรอาหารสำหรับ *P. pentosaceus* เพื่อที่จะลดต้นทุนการผลิต และใช้วัตถุดิบที่มีราคาถูกนั้น นอกจากประยุกต์ใช้วัตถุดิบทางการเกษตรเป็นแหล่งคาร์บอน

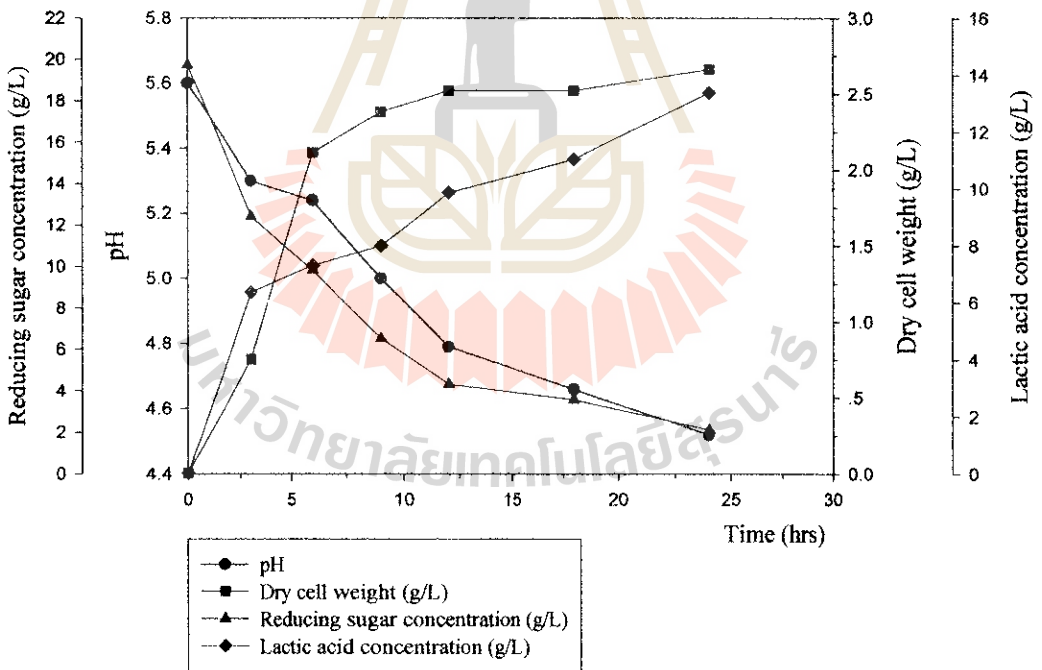
ดังกล่าวเพื่อก่อให้เกิดการลดมูลค่าต้นทุนการผลิตได้เนื่องจากมีราคาถูก อย่างไรก็ตามแหล่งคาร์บอนอย่างเดียวอาจไม่พอ จะต้องมีการลดต้นทุนของแหล่งไนโตรเจนร่วมด้วย โดยพบว่า commercial yeast extract ที่ใช้กันทั่วไปนั้นมีประสิทธิภาพดีที่สุด เนื่องจากมีเป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นเป็นตัวช่วยส่งเสริมให้กระบวนการหมักโดยเชื้อ *P. pentosaceus* สมบูรณ์ที่สุดซึ่งมีรายงานต่างประเทศระบุไว้ว่า commercial yeast extract นั้นประกอบด้วยเบสชนิด purine, pyridine bases และ B group vitamins (Amrane *et al.*, 1994) เมื่อเปรียบเทียบกับแหล่งไนโตรเจนอื่นๆ เช่น meat extract, peptone, corn steep liquor เป็นต้นซึ่ง ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาหาแหล่งอื่นๆเพื่อมาทดแทน commercial yeast extract ในกระบวนการหมักกรดแล็กติก เช่น peptone, corn steep liquor และ brewer's yeast extract ซึ่งต้องมีการเปรียบเทียบและอ้างอิงกับสูตรอาหารมาตรฐานสำหรับแบคทีเรียกรดแล็กติก ดัง รูปภาพ 20 นั่นคือ อาหาร MRS โดยมีค่าผลผลิต (yield) อยู่ที่ร้อยละ 90 และค่าผลิตผล (volumetric productivity) อยู่ที่ 1.78 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้มีการศึกษาความสามารถในการใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นสารตั้งต้นหรือแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดแล็กติกด้วยแบคทีเรียกรดแล็กติก *P. pentosaceus* เพื่อดูความเป็นไปได้ที่จะใช้แป้งมันสำปะหลังนี้แทนน้ำตาลชนิดต่างๆที่ใช้ในการผลิตกรดแล็กติก ส่งผลให้สามารถลดต้นทุนการผลิตและนำผลผลิตทางการเกษตรมาเพิ่มมูลค่าได้อีกด้วย สำหรับในกระบวนการหมักกรดแล็กติก หลังจากกระบวนการหมักดำเนินอยู่นั้น ซึ่งถ้ามีการใช้ substrate ของ *P. pentosaceus* ก็เป็นผลสืบเนื่องให้มีการสร้างกรดแล็กติกได้สูงสุดเช่นเดียวกัน แต่การที่กรดในระบบสูงทำให้ค่า pH สูงตามไปด้วยแล้วนั้น เชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกมีความสามารถทนสถานะเป็นกรดได้ในระดับหนึ่งแต่เมื่อค่ากรดมากเกินไป จะไม่สามารถเจริญและมีชีวิตอยู่ได้ เป็นผลให้ตายในที่สุด ด้วยเหตุนี้คืออาจเนื่องมาจากเกิดสถานะ Product inhibition นั้นเอง (Moueddeb *et al.*, 1996a)



รูปภาพ 20 กระบวนการผลิตกรดแล็กติกโดยกระบวนการหมักจากเชื้อ *P. pentosaceus* ด้วย สูตรอาหาร MRS

ในการทดลองมีการใช้ สารสกัดจากยีสต์ที่ได้จากโรงงานเบียร์ (brewer's yeast extract) แทน สารสกัดยีสต์ทางการค้าที่นิยมใช้ทั่วไป แต่เนื่องจากว่าสารสกัดยีสต์ทางการค้ามีราคาแพง เป็นการเพิ่มต้นทุนในการผลิต ทั้งยังไม่เหมาะสมทางเศรษฐกิจสำหรับการผลิตในระดับอุตสาหกรรม และในกระบวนการผลิตเบียร์จะมีของเหลือทิ้งที่เป็นเซลล์ยีสต์ตกตะกอนเป็นจำนวนมาก และไม่ได้ใช้ประโยชน์ แต่อย่างไรก็ตามยังคงมีสารอาหารอยู่เป็นจำนวนมาก เช่น โปรตีน แร่ธาตุ ต่างๆที่มีอยู่ในตัวเซลล์ของยีสต์เอง ด้วยเหตุนี้จึงได้นำมาเป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับเชื้อ *P. pentosaceus* ทั้งนี้มีการนำยีสต์ที่เหลือทิ้งนี้เข้าสู่ระบบและทำการขับน้ำออกและเข้าสู่กระบวนการ freeze dry ทำให้แห้ง และสามารถนำมาใช้ผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ โดยในหัวข้อนี้จึงได้มีการปรับเปลี่ยนใช้สารสกัดจากยีสต์ที่ได้จากโรงงานเบียร์ (brewer's yeast extract) กับแหล่งคาร์บอนที่เป็นแป้งมันสำปะหลัง คือ กลูโคสไซรัป ซึ่งศึกษาการผลิตกรดแล็กติก จากนั้นจะได้นำผลที่ได้ออกมาไปใช้ในการศึกษาของลดนศาสตร์การหมักด้านต่างๆ เพื่อให้เกิดกระบวนการที่มีประสิทธิภาพดีในการผลิตกรดแล็กติกต่อไป

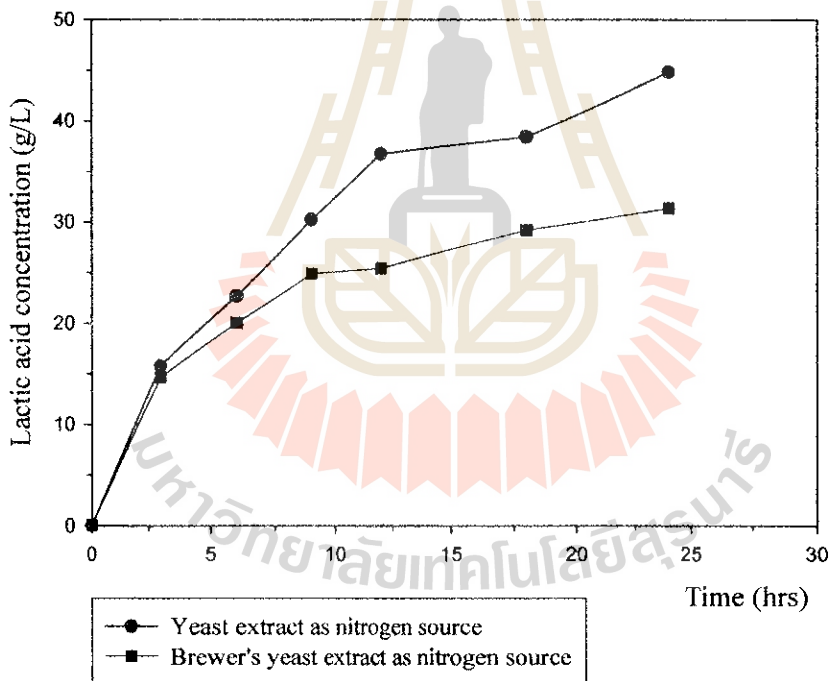
สำหรับ รูปภาพ 21 เป็นการศึกษาวิเคราะห์ค่าต่างๆเช่น pH, ปริมาณ reducing sugar, ปริมาณ dry cell weight, และปริมาณของกรดแล็กติก ที่มีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักจากการที่ใช้ brewer's yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจนทดแทน commercial yeast extract จากเส้นกราฟของทุกค่าพารามิเตอร์ที่ทำการศึกษานั้น พบว่าเป็นไปตามรูปแบบการเจริญของเชื้อ *P. pentosaceus* คือปริมาณเซลล์เริ่มต้นหลังจากการถ่ายเชื้อ จะเพิ่มขึ้นจนกระทั่ง 2.5 กรัมต่อลิตร ปริมาณ reducing ก็มีค่าลดลงเรื่อยๆ เกือบเข้าใกล้ 0 นั้นหมายความว่าเชื้อสามารถนำอาหารไปใช้ได้เกือบทั้งหมด โดยจะเปลี่ยนไปเป็นการสร้างผลิตภัณฑ์กรดแล็กติกออกมาปริมาณ 13 กรัมต่อลิตร ซึ่งถือว่าสามารถปริมาณได้ในปริมาณเป็นที่น่าพอใจ ในระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมง แต่จากการเปรียบเทียบกับกรเลี้ยงเชื้อโดยใช้อาหารชนิด MRS ดัง รูปภาพ 20 นั้น จะพบว่าความเข้มข้นของกรดแล็กติกที่ได้ นั้นจะมีค่าต่ำกว่า ทั้งนี้สาเหตุหลักนั้น คาดว่า brewer's yeast extract ที่นำมาใช้นั้น มีคุณค่าทางอาหารต่ำกว่า MRS ซึ่งอาจจะขาดแร่ธาตุที่จะเป็นบางชนิดไป แต่อย่างไรก็ตามการพัฒนาสูตรอาหารโดยมีเป้าหมายในการเพิ่มค่าผลผลิตนั้น ไม่ได้อยู่ในจุดประสงค์ของงานวิจัย



รูปภาพ 21 กระบวนการผลิตกรดแล็กติกจากน้ำตาลกลูโคสเสริมด้วย brewer's yeast extract โดยใช้ *Lactococcus lactis* ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที

รูปภาพ 22 จากการทดลองพบว่า brewer's yeast extract เมื่อเสริมลงไปในการเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส ไซรัปเป็นแหล่งคาร์บอนแล้วนั้น พบว่าสามารถผลิตกรดแล็กติกได้ใกล้เคียงกัน ซึ่งทดแทน yeast extract ทางการค้าได้เป็นอย่างดี อีกทั้งมีราคาถูกกว่าถึง 10 เท่า (Nanci *et al.*, 2005)

และสิ่งที่ได้กล่าวมาแล้วว่า brewer's yeast extract เป็นวัตถุดิบที่มีราคาถูกประกอบกับใช้กลูโคส ไซรัปมาใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับสร้างกรดแล็กติก ซึ่งถือว่าต้นทุนที่ต่ำ แต่อย่างไรก็ตามสูตรอาหารดังกล่าวจะยังไม่สามารถเทียบเท่ากับอาหาร MRS ที่ขายทางการค้า ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงต้องมีการศึกษารูปแบบกระบวนการหมักต่างๆ เช่นกระบวนการหมักแบบกะ (Batch fermentation) หรือกระบวนการหมักแบบกึ่งกะ (Fed batch fermentation) เพื่อให้ได้ปริมาณความเข้มข้นกรดแล็กติกที่ดีขึ้นกว่าเดิม เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาการใช้วัตถุดิบประเภทอื่นๆ และนำสูตรอาหารดังกล่าวที่มีการใช้แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนราคาถูกประยุกต์ใช้ในการผลิตสารที่มีประโยชน์อื่นๆ ดังเช่น เอทานอล หรือ กรดอินทรีย์ต่างๆ เป็นต้น



รูปภาพ 22 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของแหล่งไนโตรเจนที่เป็น commercial yeast extract และ brewer's yeast extract ที่มีกลูโคส ไซรัปเป็นแหล่งคาร์บอน ในกระบวนการผลิตกรดแล็กติกด้วยเชื้อ *P. pentosaceus*

3.5 กระบวนการหมักกรดแล็กติกโดยดั่งปฏิกรณ์ชีวภาพ

สำหรับกระบวนการเมแทบอลิซึมการใช้น้ำตาลของ *P. pentosaceus* นั้นเกิดขึ้นได้โดย น้ำตาล จะเข้าสู่ phosphoenol pyruvate (PEP)-dependent phosphotransferase system (PTS) เปลี่ยนไปเป็น galactose-6-phosphate และเกิดเป็นกรดแล็กติกเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายในที่สุด (Hickey *et al.*, 1986) ยกตัวอย่างน้ำตาลชนิดอื่นๆเช่น น้ำตาล galactose โดยมีกระบวนการเมแทบอลิซึมเป็นดังนี้ คือ galactose จะแพร่ผ่าน lactose-galactose antiport mechanism (Hutkins *et al.*, 1987) เพื่อนำเข้าสู่เซลล์ ไปใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึมโดยเชื้อ *Lactococcus* strains ที่มีทั้ง β -galactosidase และ β -P-galactosidase (Thomas *et al.*, 1984) เป็นตัวช่วยที่จะใช้น้ำตาลgalactose ได้ ซึ่งสามารถระบุได้ว่า ความสามารถของเอนไซม์ H⁺-ATPase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวกับการเจริญเติบโตและการใช้แหล่งอาหารต่างๆของเชื้อ *P. pentosaceus* ที่เหมาะสมนั้น จะดีที่สุดที่ pH 6.0 ดังนั้นจึงมีการควบคุมให้อยู่ใน สภาวะดังกล่าว นอกจากนี้ยังพบว่าการผลิตกรดแล็กติกในระดับถังหมัก (fermenter) สามารถผลิตกรด แล็กติกได้มากกว่าการผลิตในระดับ flask เนื่องจากสามารถควบคุมสภาวะต่างๆคือ ควบคุม pH อุณหภูมิ ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแล็กติกของเชื้ออีกด้วย

ถังหมักปฏิกรณ์ชีวภาพเมมเบรนเริ่มมีการใช้อย่างกว้างขวางเมื่อกว่า 7 ปีที่ผ่านมา โดยที่ระบบ นี้จะเป็นการประสานระหว่างการคัดแยกสารผลิตภัณฑ์ออกจากระบบและเพิ่มปฏิกิริยาทางชีวเคมีที่ เกิดขึ้น (Giomo *et al.*, 2000) การแยกผลิตภัณฑ์ออกตลอดเวลาจะทำให้ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ใน น้ำ หมักต่ำอยู่เสมอ ซึ่งจะมีประโยชน์มากในกรณีที่ผลิตภัณฑ์มีผลในการก่อให้เกิดความเป็นพิษของกร ดแล็กติก สำหรับเทคนิคการแยกผลิตภัณฑ์ขณะกระบวนการกำลังดำเนินการ (*in situ* product removal technique) นั้นถูกนำมาศึกษาเนื่องจากสามารถควบคุมระบบได้ง่ายและผลผลิตจะไม่ยับยั้งกระบวนการ หรือปฏิกิริยา

อ้างอิงจากวารสารอื่นๆที่มีการศึกษาผลของกระบวนการหมักเพื่อผลิตกรดแล็กติกที่ใช้เป็งเป็น วัคซีน โดยเชื้อ นั้น *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* B84 พบว่ามีระยะเวลาในกระบวนการหมัก ประมาณ 165 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที และส่วนประกอบ ต่างๆของสูตรอาหารที่มีการศึกษาดังๆออกไปก่อให้เกิดผลต่ออัตราการผลิตกรดแล็กติกที่เป็น ผลิตภัณฑ์สุดท้ายด้วย และในการศึกษาการปรับเปลี่ยนสูตรอาหารเลี้ยงเชื่อนั้น ก็เพื่อวัตถุประสงค์ที่จะ ทำให้เพิ่มอัตราการผลิตกรดแล็กติกและเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตให้ดีที่สุด ในอาหารที่สามารถผลิต กรดแล็กติกได้สูงสุดคืออาหารที่ไม่มี meat extract และ yeast extract โดยได้ 5.10 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ อาหารที่มีเฉพาะ yeast extract แต่ไม่มี meat extract นั้นสามารถผลิตได้ 3.5 กรัมต่อลิตร และเซลล์ สูงสุดที่ความเข้มข้น 1.9 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อสายพันธุ์นี้จะมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ในการ

ย่อยแป้งได้เล็กน้อยโดยที่ความสามารถในการย่อยเป็น 7.5 กรัมต่อลิตรจากแป้งเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร ณ สิ้นสุดกระบวนการ (Petrov *et al.*, 2008) ทั้งนี้จากการศึกษาดังกล่าวได้นำเป็นตัวอย่างในการศึกษากระบวนการหมักในถังปฏิกรณ์ชีวภาพได้

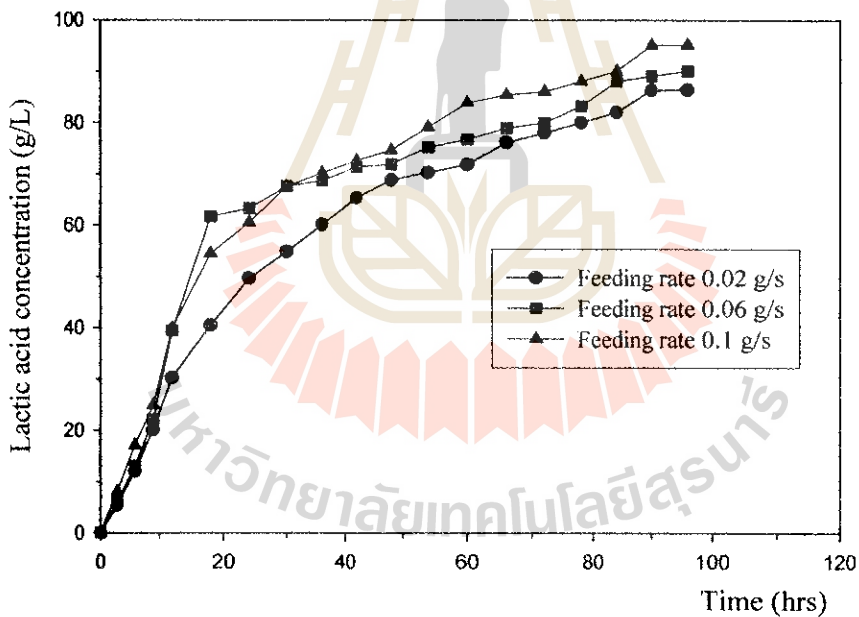
ถึงแม้ว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อมีอาหารอุดมสมบูรณ์ ที่ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน แร่ธาตุ วิตามิน และสารเสริมการเจริญเติบโตต่างๆ และเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกสามารถสร้างผลิตภัณฑ์ในความเข้มข้นที่สูงก็ตาม ในระหว่างการหมักเมื่อค่า pH ลดต่ำลง น้อยกว่าประมาณ 4.0 แล้วนั้น เชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติก รวมทั้ง *P. pentosaceus* ไม่สามารถทนสภาวะดังกล่าวนี้ได้ (ถึงแม้จะเป็น จุลินทรีย์ชนิดที่สามารถทนกรดได้ก็ตาม) ดังนั้นหากจัดการทดลองให้ค่า pH นั้นอยู่ในระดับหรือในช่วงที่เชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติก *P. pentosaceus* สามารถเจริญเติบโตและสร้างกรดแล็กติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักนั้น ก็จะสามารถยืดอายุและการเจริญของเชื้อต่อไปได้อีก ซึ่งเป็นผลดีเป็นอย่างมาก เพราะ *P. pentosaceus* จะสามารถเจริญในสภาวะที่เหมาะสมนี้ นั่นคือ ต้องมีการแยกผลิตภัณฑ์ออกจากกระบวนการเพื่อลดความเข้มข้นของกรดแล็กติกภายในน้ำหมักลงได้ด้วยการทดลองในหัวข้อต่อไป

ทั้งนี้ *P. pentosaceus* เป็นแบคทีเรียกรดแล็กติกที่มีคุณสมบัติผลิตกรดแล็กติกชนิด L แต่อย่างไรก็ตาม มีบางรายงานศึกษาว่าในสภาวะบางอย่างคือ การที่มีน้ำตาลไม่เพียงพอที่จะใช้เป็นสารอาหารในการเจริญ (Fordyce *et al.*, 1984) หรือในสภาวะที่เจริญในอาหารที่มีน้ำตาลกาแล็กโตสหรือน้ำตาลมอลโตส เป็นแหล่งคาร์บอนหลัก (Garrigues *et al.*, 1997) จากการที่ *P. pentosaceus* มีการกรดแล็กติกเพียงอย่างเดียว อาจเปลี่ยนกระบวนการภายในให้ผลิตสารอื่นๆออกมาด้วย เช่น กรดชนิดต่างๆ เอทานอล และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ออกมาโดยที่เชื้อ *P. pentosaceus* ไม่สามารถนำไปใช้ได้หมด ถือว่าไม่คุ้มทุนการผลิต เนื่องจากยังคงเหลือสารอาหารภายในน้ำหมัก อีกทั้งหลังจากดำเนินการหมักไปไ้ระยะหนึ่งจะมีการสะสมของกรดแล็กติกที่ความเข้มข้นสูงทำให้เชื้อ *P. pentosaceus* เจริญต่อไปไม่ได้ อีกทั้งเมื่อถึงระยะเวลาหนึ่ง อาหารของเชื้อเริ่มหมดลง เนื่องจากว่าไม่มีการป้อนอาหารเลี้ยงเชื้อลงไปในถังหมัก เมื่อไม่มีอาหารเชื้อก็ไม่เจริญและเริ่มตายลงตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตาม กระบวนการหมักก็จะหยุดเนื่องจากอาหารหมด ดังนั้นในหัวข้อต่อไปจึงจัดการทดลองให้มีการศึกษาถึงกระบวนการหมักแบบกึ่งกะ (fed-batch fermentation) ที่มีการป้อนอาหารเพิ่มลงไปในถังหมักให้เหมาะสมกับการผลิตกรดแล็กติกต่อไป

3.6 การหมักกรดแล็กติกแบบกึ่งกะ (Fed-batch fermentation process)

กระบวนการหมักกรดแล็กติกแบบกะ (batch process) นั้นผลการทดลองพบว่า มีผลผลิตกรดแล็กติกต่ำกว่าแบบกึ่งกะ (fed batch process) อาจเนื่องมาจากสาเหตุที่เกิดการยับยั้งจากสารตั้งต้นที่มีความเข้มข้นสูงและผลผลิตที่ได้มีผลยับยั้งต่อเซลล์ *P. pentosaceus* ดังนั้นเพื่อที่จะสามารถ

แก้ไขปัญหาดังกล่าวในการทดลองนี้จึงมีการใช้กระบวนการหมักแบบกึ่งกะ ในกระบวนการมีการใช้ peristaltic pump เพื่อเพิ่มปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างต่อเนื่อง และทำการวิเคราะห์ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ เช่น ปริมาณ biomass, reducing sugar, และปริมาณกรดแลกติกที่เกิดขึ้นควบคู่ไปด้วย โดยหลังจากที่เชื้อ *P. pentosaceus* หยุดเจริญเติบโต ในการให้อาหารนั้นจะหยุดลง สำหรับอาหารที่ถูกบ่มเข้าสู่ถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่อัตราการป้อนคงที่นั้นมีค่าอยู่ระหว่าง 0.02 กรัมต่อวินาที ถึง 0.1 กรัมต่อวินาที โดยมีความเข้มข้นของน้ำเชื่อมกลูโคสอยู่ที่ 100 กรัมต่อลิตรและมีการควบคุมระบบการทำงานให้คงที่ จาก รูปภาพ 23 ได้มีการแสดงผลของอัตราการป้อนสารอาหารเข้าสู่ระบบในกระบวนการหมักแบบกึ่งกะ ในระหว่างการทดลองนี้ปริมาตรของน้ำหมักเพิ่มขึ้นแต่ในระยะสุดท้าย ของการหมักจะมีปริมาตรที่ใกล้เคียงจากเริ่มต้นนั่นหมายความว่ามีการเปลี่ยนแปลงปริมาตรเพียงเล็กน้อยในกระบวนการนี้เนื่องจากสารอาหารที่ป้อนเข้าไปจะมีความเข้มข้นที่สูงเพื่อที่ต้องการให้ปริมาตรของถังหมักมีการเพิ่มขึ้นไม่มากนัก และ ปริมาตรสุดท้ายอยู่ที่ ประมาณ 1.8 ลิตร (จากปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น 1.5 ลิตร ในถังหมักขนาด 2 ลิตร)



รูปภาพ 23 กราฟการเปรียบเทียบอัตราการป้อนของสารอาหารในกระบวนการกรดผลิตแลกติกโดยเชื้อ *P. pentosaceus*

สำหรับความเข้มข้นของกรดแลกติกที่มีค่าต่ำที่สุดคือ 86.4 กรัมต่อลิตร ในระยะเวลาการหมัก 96 ชั่วโมง จากอัตราการป้อนสารอาหารที่ 0.02 กรัมต่อวินาที อัตราการผลิตกรดแลกติกในการป้อนนี้มีค่าต่ำเมื่อเทียบกับที่อัตราการป้อนอาหารอื่นๆ เป็นที่ชัดเจนแล้วว่าเนื่องจากอัตราการป้อนอาหารต่ำจะ

ทำให้อัตราการผลิตกรดแล็กติกต่ำด้วย เนื่องจากอัตราการเจริญของเชื้อจะต่ำกว่าอัตราการป้อนที่สูงกว่า นั่นเอง ดังนั้นจึงมีการใช้อัตราการป้อนที่สูงขึ้นในการทดลองต่อไป พบว่าความเข้มข้นของกรดแล็กติกที่สูงที่สุด คือ 95.04 กรัมต่อลิตร ซึ่งได้จากอัตราการป้อนแป้งมันสำปะหลังที่ 0.1 กรัมต่อวินาที ค่า volumetric productivity ประมาณ 3.0 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

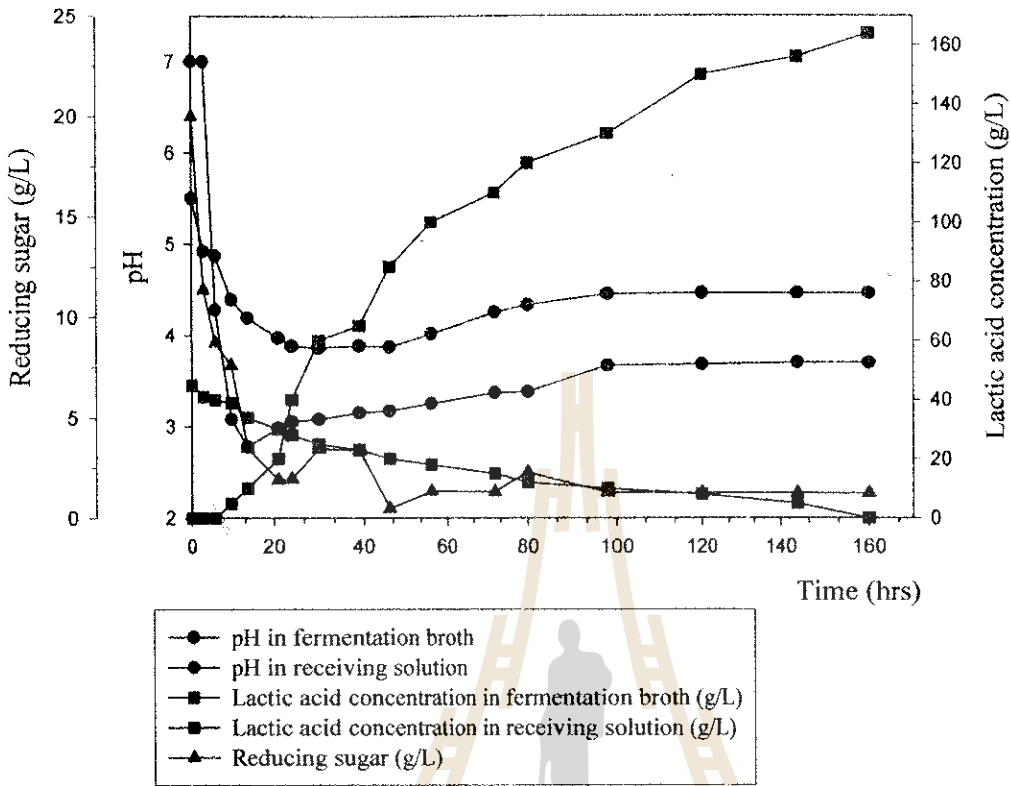
เมื่อเปรียบเทียบในการทดลองแบบกะ (ที่มีความเข้มข้นชีวมวล (biomass) เท่ากับประมาณ 3 กรัมต่อลิตร) มีค่าต่ำกว่ากระบวนการหมักแบบกึ่งกะและส่งผลต่อการผลิตกรดแล็กติกด้วย และสำหรับกระบวนการหมักแบบกึ่งกะ ผลสำเร็จที่ได้รับนี้เนื่องมาจากปริมาณสารอาหารที่เติมลงไปในการทดลอง นอกจากนั้นการยับยั้งจากความเข้มข้นของอาหารเริ่มต้น (ปริมาณน้ำตาล หรือปริมาณแหล่งคาร์บอนต่างๆ เช่น ความเข้มข้นของแป้ง หรือความเข้มข้นของสารที่ได้จากแป้งมันสำปะหลังที่ข่อยแล้ว เป็นต้น) ที่สูงมีน้อย อย่างไรก็ตามการผลิตกรดแล็กติกโดยเชื้อ *P. pentosaceus* จะเริ่มหยุดลงในระยะสุดท้ายของกระบวนการหมักเหตุผลมาจากมีการสะสมปริมาณกรดแล็กติกในน้ำหมักที่มากส่งผลให้เกิดการยับยั้งการผลิตและรบกวนเซลล์แบคทีเรียกรดแล็กติก

3.7 การหมักกรดแล็กติกควบคุมระบบ EDI ในอั่งหมักปฏิกรณ์ชีวภาพแบบหมุนวน

ซึ่งจากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่ากระบวนการหมักแบบกึ่งกะมีปัญหาจากการยับยั้ง โดยกรดแล็กติกที่เป็นผลผลิตที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมัก การแยกหรือเก็บเกี่ยวกรดแล็กติกออกจากกระบวนการจะสามารถช่วยลดการยับยั้งจากผลิตภัณฑ์ (end product inhibition) ทั้งยังช่วยเพิ่มผลิตผล (productivity) และผลผลิต (yield) กรดแล็กติกที่เกิดขึ้นได้อีกด้วยความสามารถในการแยกผลิตภัณฑ์กรดแล็กติกออกจากกระบวนการหมักนั้นประสบความสำเร็จโดยใช้ระบบ EDI ในการวิจัยนี้ โดยสามารถวัดวิเคราะห์ผลที่ได้ด้วยเครื่องมือที่มีความแม่นยำและเป็นที่ยอมรับได้คือ เครื่อง HPLC โดยที่จะสามารถวัดน้ำตาล กรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ เป็นต้น ที่เป็นการยืนยันประสิทธิภาพของระบบการแยกนี้ได้

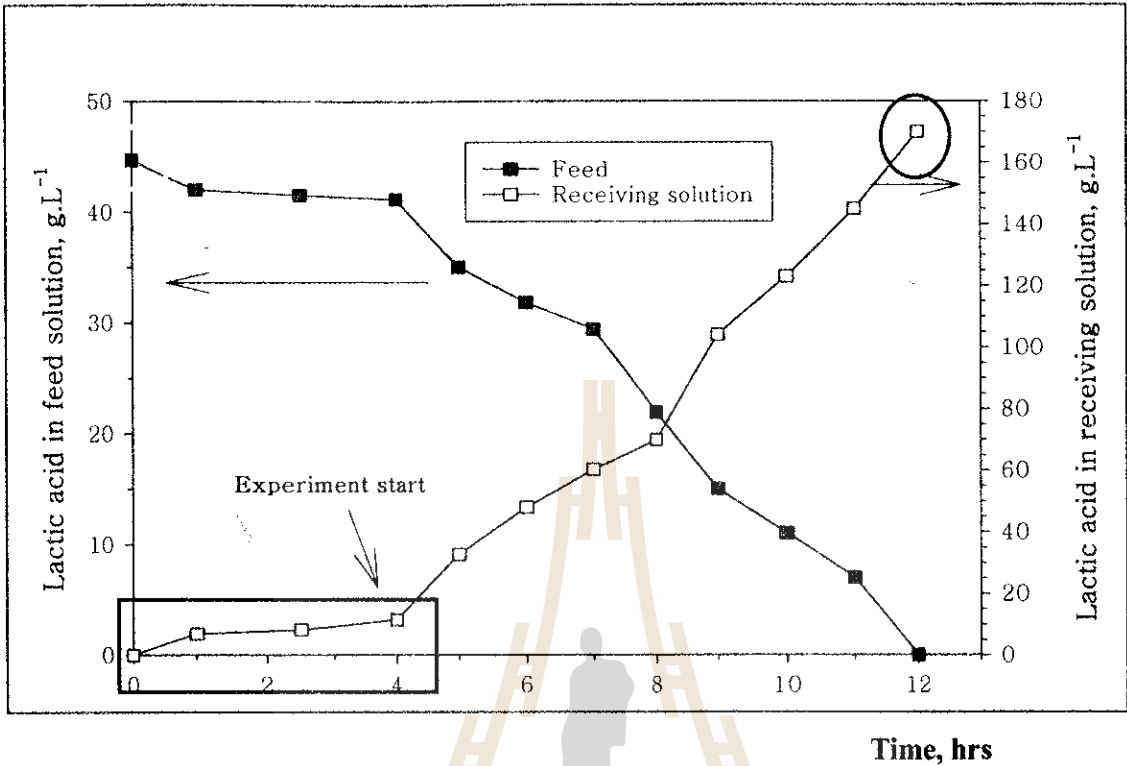
สำหรับกระบวนการในหัวข้อนี้นั้น ควรที่จะมีการแยกเซลล์ในน้ำหมักก่อนที่จะไหลเวียนน้ำหมักเพื่อผ่านระบบ EDI เนื่องจากว่าเซลล์มีโมเลกุลใหญ่ ทั้งยังมีสารประกอบอื่นๆและผลพลอยได้อื่นๆมากมายที่อาจจะรบกวนระบบได้ (Madzingaidzo *et al.*, 2002b) ดังนั้นจึงควรจะมีการแยกเซลล์ด้วยเยื่อแผ่นก่อนระดับหนึ่ง ซึ่งอาจใช้เป็นเทคนิคที่เรียกว่า microfiltration , electrodialysis หรืออาจใช้เทคนิค Ion exchange chromatography แยกกรดต่างๆ เมทานอล แอมโมเนีย หรือสารละลายผสมออกจากกรดแล็กติก (Cao *et al.*, 2002b) ทั้งยังเพื่อที่จะคัดกรองแยกเอาน้ำตาลกลูโคส เซลล์แบคทีเรีย โปรตีน สารอาหารอื่นๆ ออกก่อน เหลือเพียงสารละลายกรดแล็กติกที่ผ่านการกรองระดับแรกแล้วเข้าสู่ระบบ EDI (Lee, 2005)

รูปภาพ 24 แสดงผลการทดลองการแยกกรดแล็กติกออกจากน้ำหมัก ที่มีอัตราการป้อนอาหาร 0.1 กรัมต่อวินาที โดยมีความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นในน้ำหมักอยู่ที่ 20 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยเชื้อ *P. pentosaceus* ในขณะที่การหมักกำลังดำเนินไปด้วยระบบ EDI แบบต่อเนื่อง โดยจุดประสงค์หลักของการทดลองนี้คือการประยุกต์ใช้เทคนิคดังกล่าวเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการหมักของเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ทั้งผลิตภัณฑ์ (productivity) และผลผลิต (yield) ของกรดแล็กติก และจะเห็นได้ว่าความเข้มข้นของกรดแล็กติกในส่วนของด้าน permeate หรือในกราฟแสดงเป็นส่วน concentration side นั้นจะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นหลังจากที่เริ่มการทดลองไปแล้วประมาณ 6 ชั่วโมงเนื่องจากก่อนหน้านี้ เป็นช่วงเวลาที่กรดแล็กติกได้ถูกดูดซับและอยู่ระหว่างการแพร่ผ่านชั้นของเยื่อแผ่น ion exchange membrane อีกทั้งในระยะแรกของการหมักจะมีกรดแล็กติกเกิดขึ้นในปริมาณที่ยังไม่มากนัก ทำให้แรงขับเคลื่อนที่เกิดขึ้นเนื่องจากความต่างของความเข้มข้นระหว่างทั้งสองด้านของเยื่อแผ่น (ΔC) มีค่าต่ำ หลังจากที่ผ่านมา 6 ชั่วโมงแล้ว พบว่าความเข้มข้นของกรดแล็กติกใน concentration side (permeate) จะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ และมีความสัมพันธ์ที่เพิ่มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป (Moueddeb *et al.*, 1996b) ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสำเร็จในการประยุกต์ใช้ระบบ EDI ควบคู่ไปกับการหมัก นอกจากนี้ความเข้มข้นสูงสุดของกรดแล็กติกที่ได้ในด้าน concentration คือประมาณ 167.5 กรัมต่อลิตรหลังจากที่เวลาผ่านไป 160 ชั่วโมง สำหรับในด้านของน้ำหมักนั้นพบว่ากรดแล็กติกได้ถูกผลิตขึ้นตั้งแต่ระยะแรกของการทดลอง โดยที่ความเข้มข้นของกรดแล็กติกในน้ำหมักมีค่าอยู่ที่ประมาณ 10 กรัมต่อลิตรก่อนที่จะเพิ่มขึ้นเป็น 40 กรัมต่อลิตร ส่วนของด้าน permeate เริ่มต้นระบบมีความเข้มข้น 0 กรัมต่อลิตร และเพิ่มเป็น 167.5 กรัมต่อลิตร ในช่วงสุดท้ายของการทดลอง



รูปภาพ 24 กระบวนการหมักแบบกึ่งควบคุมคู่ไปกับระบบการแยก EDI

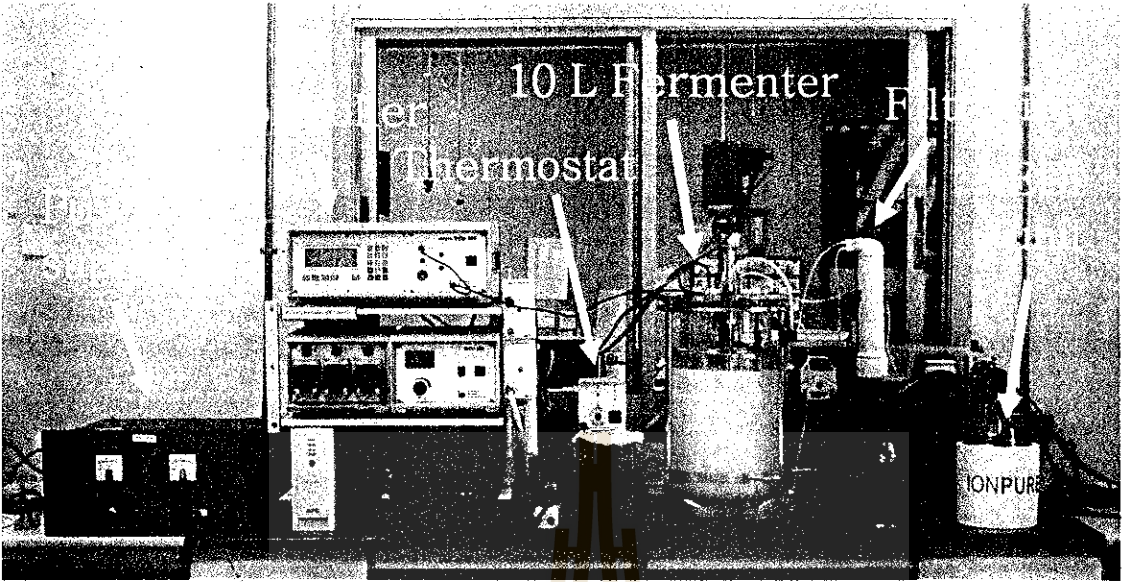
รูปภาพ 25 เป็นการทดลองการแยกกรดแลกติกออกจากน้ำหมัก ซึ่งใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของกรดแลกติกอยู่ที่ 50 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นที่ 10 กรัมต่อลิตร โดยมีปริมาตรเริ่มต้นที่ 2 ลิตร ในขณะที่ปริมาตรเริ่มต้นในด้านของสารละลายตัวรับนั้นอยู่ที่ 0.3 ลิตร โดยในการทดลองนี้ได้ทำการกำหนดค่ากระแสไฟฟ้าอยู่ที่ 15 โวลต์ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ผลการทดลองพบว่าในช่วงชั่วโมงเริ่มต้น ที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 4 นั้นเป็นช่วงเริ่มต้นของระบบการแยกกรดแลกติก ยังไม่มีการปล่อยกระแสไฟฟ้า ซึ่งจะเห็นได้ว่าความเข้มข้นของกรดแลกติกในด้านของสารป้อนและสารละลายตัวรับ มีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย แต่หลังจากที่มีการปล่อยกระแสไฟฟ้าเข้าไปในระบบ ความเข้มข้นของกรดแลกติกในด้านของสารป้อนนั้นจะลดลงอย่างรวดเร็ว ในขณะที่ความเข้มข้นในด้านของสารละลายตัวรับก็เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเช่นกันและมีค่าความเข้มข้นของเส้นกราฟอยู่ที่ 20 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง จากการทดลองพบว่าความปริมาตรของกรดแลกติกในด้านของสารป้อนนั้น จะหมดลงเมื่อเวลาผ่านไป 12 ชั่วโมง ส่วนความเข้มข้นในด้านของสารละลายตัวรับนั้น จะอยู่ที่ประมาณ 170 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ตาราง 4 สรุปผลการทดลองของรูปภาพ 25



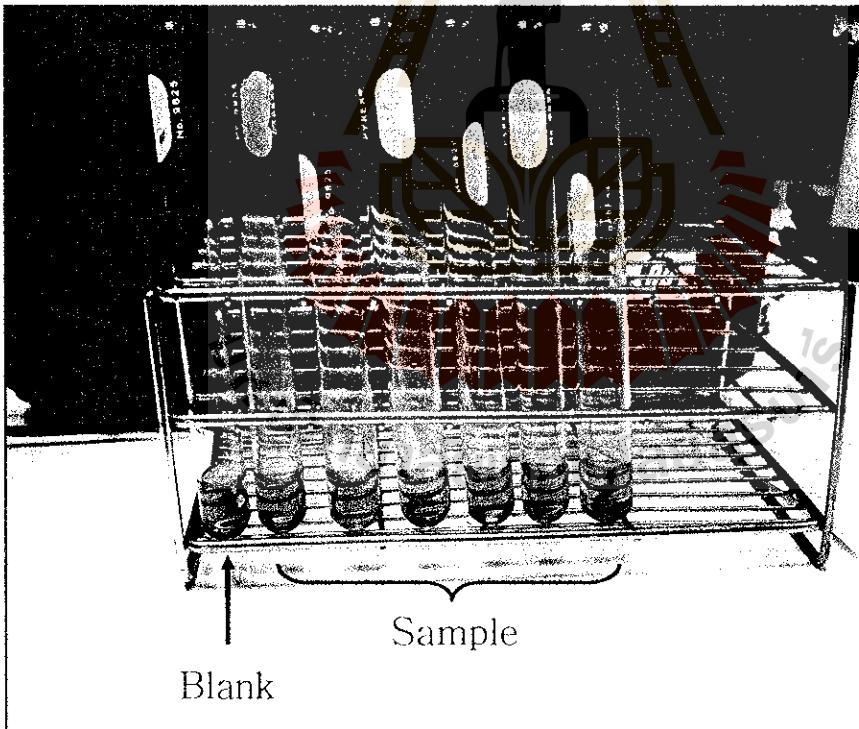
รูปภาพ 25 แสดงความเข้มข้นของกรดแล็กติกของทั้งสองด้านของสารละลายในระบบ EDI

ตาราง 4 เปรียบเทียบความเข้มข้นของกรดแล็กติกโดยกระบวนการหมักและการแยกกรดแล็กติกออกจากน้ำหมักโดยใช้ระบบ EDI กระแสไฟฟ้า 15 โวลต์

ปัจจัยต่างๆ	ความเข้มข้นของกรดแล็กติก ด้าน concentration side	ความเข้มข้นกรดแล็กติกของ สารป้อน (น้ำหมัก)
ก่อนแยกด้วย EDI		
- ปริมาตร	0.3 ลิตร	2 ลิตร
- ความเข้มข้นกรดแล็กติก	11.5 กรัมต่อลิตร	40 กรัมต่อลิตร
- ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส	0 กรัมต่อลิตร	10 กรัมต่อลิตร
หลังแยกด้วย EDI		
- ปริมาตร	0.44 ลิตร	1.8 ลิตร
- ความเข้มข้นกรดแล็กติก	167 กรัมต่อลิตร	0 กรัมต่อลิตร
- ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส	0 กรัมต่อลิตร	10 กรัมต่อลิตร



รูปภาพ 26 การแยกกรดแล็กติกออกจากน้ำหมักแบบต่อเนื่องด้วยระบบ EDI (Continuous lactic acid removal from fermentation broth using EDI technique)



รูปภาพ 27 การแยกกรดแล็กติกออกจากน้ำหมักโดยที่ไม่มีน้ำตาลออกจากระบบเปรียบเทียบจากสีซึ่งไม่เข้มข้นเมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายตัวอย่าง blank

รูปภาพ 27 แสดงผลการทดลองในการวัดปริมาณน้ำคาลรีควซ์ในตัวอย่างของค้ำนสารละลายตัวรับ โดยใช้วิธี DNS ซึ่งจากการสุ่มตัวอย่าง (sample) เพื่อทำการตรวจสอบการทดลองนั้น พบว่าน้ำคาลจะไม่สามารเคลื่อนที่ผ่านเยื่อแผ่นแลกเปลี่ยนประจุได้ ซึ่งสามารถยืนยันได้จากผลการทดลอง โดยตัวอย่างจะไม่เปลี่ยนสีหลังจากที่ทาปฏิกิริยาแล้ว ข้อดีของผลการทดลองดังกล่าวคือสามารถที่จะทำการกำจัดสิ่งปนเปื้อนที่ไม่สามารถแตกตัวออกจากระบบได้ เป็นการช่วยลดขั้นตอนในการทำกรดเล็กติกให้บริสุทธิ์ได้ในเบื้องต้นอีกประการหนึ่ง

จะพบว่าการใช้ระบบ EDI ร่วมกับการหมักนี้ ได้ผลการทดลองที่ดีกว่าอย่างชัดเจน ทั้งในด้านการลดค่าความเป็นพิษของกรดเล็กติกที่มีต่อเซลล์แบคทีเรียและอัตราการผลิตกรดเล็กติก ซึ่งจะเห็นได้จากการทำงานของระบบสามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพและเวลาที่ยาวนาน ในขณะที่ปฏิกิริยาการหมักในแบบกึ่งกะจะหยุดอยู่ที่ประมาณ 96 ชั่วโมงเท่านั้น ค่า volumetric productivity ในระบบ EDI และการหมักแบบกึ่งกะ อยู่ที่ 3.39 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง การแยกเอากรดเล็กติกออกจากรุ่น้ำหมักในระหว่างที่ปฏิกิริยาล้างค้ำนเงินไปอยู่นั้นจะส่งผลในการลดการสะสมของกรดเล็กติกในน้ำหมัก ทำให้เชื้อแบคทีเรียกรดเล็กติกไม่ถูกยับยั้ง และสามารถผลิตกรดเล็กติกได้เพิ่มมากขึ้น ทั้งยังสามารถแยกเพียงกรดเล็กติกออกจากน้ำหมักเท่านั้น โดยที่น้ำคาลหรือสารอื่นๆ ไม่ออกจากระบบ ดังแสดงตามรูปภาพ 27 และ ตาราง 4 อีกทั้งตลอดการทดลองเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดได้ถูกกักกันไว้ภายในถังหมักเป็นการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาที่มีอยู่ให้เกิดประโยชน์สูงสุด

โดยสรุปแล้ว ระบบ electrodeionization สามารถประยุกต์ใช้ในการแยกสารอื่นๆออกจากระบวนการหมักทำให้กระบวนการหมักร่วมกับกระบวนการแยกนี้มีประโยชน์ทางเศรษฐกิจ เนื่องจากว่า สามารถเพิ่มความเข้มข้นของสารที่ต้องการแยกออกมาได้ ทำให้เพิ่มมูลค่าของสารผลิตภัณฑ์ (Åkerberg *et al.*, 2000) สังเกตได้ว่าได้มีการสาธิตวิชาการต่างประเทศได้มีการศึกษาเกี่ยวกับระบบ electro dialysis แยกผลิตภัณฑ์ออกจากระบบหลายงาน (Cheng *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2007; Timbuntam *et al.*, 2008) ทั้งนี้เนื่องจากเป็นระบบที่ศึกษากันมานานและมีพื้นฐานในการศึกษาได้อย่างต่อเนื่อง ทั้งยังมีประสิทธิภาพสูง แต่สำหรับระบบ EDI ในงานวิจัยนี้ เนื่องจากว่าเป็นระบบที่เป็นเทคโนโลยีใหม่ กระบวนการและส่วนประกอบต่างๆต้องมีการใช้ความเชี่ยวชาญในการจัดการทดลอง ทำให้มีการศึกษาระบบนี้น้อยกว่า แต่อย่างไรก็ตามถือว่าเป็นระบบการแยกที่มีความสามารถประสิทธิภาพสูง และแยกกรดเล็กติกได้เป็นอย่างดี เช่นเดียวกับระบบ electro dialysis แต่เพิ่มระบบการดูดซับ (adsorption) ที่มีการใช้เรซิน เพื่อช่วยการแยกสารประกอบต่างๆเพิ่มขึ้น ทั้งยังกักกรองให้ได้แต่สารที่ต้องการเพียงอย่างเดียว ให้มีความบริสุทธิ์สูงนั่นเอง

บทที่ 4 บทสรุป

4.1 สรุปผลการทดลอง

การวิจัยทั้งหมดได้แบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ การศึกษาระบบ EDI การศึกษา จลนศาสตร์การหมัก และ การหมักกรดแล็กติกควบคุมระบบ EDI ในดังหมักปฏิกรณ์ชีวภาพ ใน กระบวนการหมักเพื่อผลิตเอทานอลนั้นสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียที่ใช้คือ *P. pentosaceus* ถือว่าเป็น เชื้อที่ผลิตกรดแล็กติกได้ดี อีกนัยหนึ่งในการผลิตระดับใหญ่นั้นจำเป็นต้องคำนึงถึงด้านการลงทุนที่ต่ำ ซึ่งแบคทีเรียสายพันธุ์นี้มีความต้องการแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่มีราคาถูก ถ้ามีการพัฒนา ในกระบวนการหมักที่มีการใช้ของเหลือจากการเกษตรได้จะนับว่าลดต้นทุนการผลิตได้มากและเกิด ประโยชน์สูงสุด แต่อย่างไรก็ตามกระบวนการผลิตกรดแล็กติกแบบดั้งเดิมพบว่าจะมีปัญหาเกี่ยวกับการ ขยับยั้งจากผลิตภัณฑ์จากการสะสมของกรดแล็กติกในระบบการผลิต ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีการพัฒนา ประยุกต์ใช้ระบบ EDI เพื่อที่จะแยกกรดแล็กติกออกจากน้ำหมัก โดยผ่านเยื่อแผ่นและเปลี่ยนประจุ และพบว่าประสบผลสำเร็จอย่างดี

จากจลนศาสตร์การหมักในกระบวนการหมักแบบกึ่งกะพบว่าการสะสมของความเข้มข้น กรดแล็กติกที่สูงในน้ำหมักก่อให้เกิดการยับยั้ง ดังนั้นจึงมีการใช้การแยกกรดแล็กติกออกขณะที่ระบบ กำลังดำเนินงานควบคู่กับระบบ EDI โดยมี ion-exchange membrane และเรซิน เป็นสารตัวกลางในการ แยกกรดแล็กติก หลักการทำงานของระบบดังกล่าวนี้คือ กรดแล็กติกจะถูกแยกออกจากระบบผ่านเยื่อ แผ่นค้ำวระบบ EDI อย่างต่อเนื่องทำให้ผลจากการยับยั้งโดยกรดแล็กติกลดลง การทดลองนี้สามารถจะ ประยุกต์ใช้ได้ดังหมักปฏิกรณ์ชีวภาพหลากหลายเพื่อที่จะใช้ในกระบวนการถ่ายเทชีว โมเลกุล/ กระบวนการหมัก (biotransformation/fermentation) จากผลการทดลองแสดงการพัฒนากระบวนการ หมักกรดแล็กติกเพื่อเพิ่มอัตราการผลิต (productivity) กรดแล็กติกและผลผลิต (yield) กรดแล็กติกที่ได้ อีกทั้งมีการศึกษาเทคนิคที่ใช้ในการเก็บเกี่ยวกรดแล็กติกจากระบบวิธีอื่นๆเพื่อให้มีประสิทธิภาพสูงสุด นอกจากนี้แล้วเทคนิคการแยกผลิตภัณฑ์ในขณะที่ระบบกำลังดำเนินงาน (*in situ* product removal technique)ในระดับขนาดใหญ่ (pilot-scale) ได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆได้ในอนาคต

4.2 ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

หลังจากที่สามารถแยกกรดแล็กติกออกจากน้ำหมัก จะได้เป็นสารละลายผสมระหว่างน้ำกับกรดแล็กติกในความเข้มข้นที่ค่อนข้างต่ำ โดยพบว่าเป็นการทำน้ำหมักให้เข้มข้นขึ้นเท่านั้น อีกทั้งถึงแม้จะการวิเคราะห์กรดแล็กติกด้วยเครื่อง HPLC แต่ก็ตาม แต่ก็จะต้องวิเคราะห์สารละลายดังกล่าวด้วยเครื่องมือวิเคราะห์ชนิดอื่นๆ เพื่อให้เกิดความแม่นยำและเชื่อถือได้ เช่น เครื่องวิเคราะห์ออสอน เป็นต้น ทั้งนี้เพื่อที่จะวิเคราะห์สิ่งเจือปนอื่นๆ ที่ไม่สามารถวัดได้ด้วยเครื่อง HPLC เช่น โซเดียม แอมโมเนียม และ โปรตีน เป็นต้น เป็นเช่นนี้เนื่องจากว่าหลังจากกระบวนการแยกกรดแล็กติกจะต้องมีการทำให้บริสุทธิ์และมีความเข้มข้นสูงขึ้น เพื่อที่จะทำให้สารละลายที่ได้มีเพียงเฉพาะกรดแล็กติกกับน้ำเท่านั้น เพราะหากมีสารอื่นจะทำให้กระบวนการขั้นตอนไปเกิดปัญหาและมีความยุ่งยากในระบบ และการนำผลิตภัณฑ์ที่มีความเข้มข้นสูงนั้นไปใช้มีประสิทธิภาพที่ไม่ดี เช่น การนำกรดแล็กติกความเข้มข้นสูงนี้ไปขึ้นรูปพอลิเมอร์ ถ้าไม่บริสุทธิ์จริง จะทำให้ไม่สามารถขึ้นรูปพลาสติกได้และมีคุณภาพที่ไม่ดี ซึ่งเป็นผลจากวัตถุดิบเริ่มต้นนี้เอง โดยที่จะมีมาตรฐานของกรดแล็กติกที่เป็นมาตรฐานรู้โดยทั่วกันตามตาราง 5

ตาราง 5 มาตรฐานกรดแล็กติกระดับ food grade (Gonzlez et al., 2008)

ปัจจัยต่างๆ	กรดแล็กติกในน้ำหมัก	กรดแล็กติกมาตรฐาน
กระบวนการ	กระบวนการหมัก	กระบวนการหมักและการทำให้บริสุทธิ์
กรดแล็กติก (wt%)	5.55	49.5-50.5
ความหนาแน่น ที่ 20°C (g/ml)	1.04	1.12-1.14
Ash (wt%)	2.8	ไม่เกิน 0.06
แคลเซียม (ppm)	495	ไม่เกิน 20
คลอไรด์ (ppm)	2900	ไม่เกิน 10

หลังจากที่สามารถแยกสารละลายผสมระหว่างกรดแล็กติกกับน้ำได้แล้วนั้น จะต้องมีการบวนการที่ทำให้ความเข้มข้นของกรดแล็กติกสูงขึ้นด้วยเทคนิคต่างๆ เช่น esterification ที่มีความสามารถในการเพิ่มความเข้มข้นขึ้นและกำจัดสิ่งปลอมปนที่อาจหลุดรอดในสารละลายได้ สุดท้ายเมื่อเสร็จสิ้นระบบดังกล่าวจะสามารถผลิตกรดแล็กติกได้ความเข้มข้นสูงและตรงตามมาตรฐานที่ระบุไว้ เหตุที่จะเป็นเช่นนี้ได้มันจะต้องขึ้นอยู่กับตั้งแต่กระบวนการหมัก (Fermentation) ระบบการแยกกรดแล็กติกออกจาก

ระบบ (Recovery) ที่ถือว่ามีค่าสำคัญสูงสุด เนื่องจากถ้ากรณีเด็กติดมีคุณภาพที่ขั้นตอนการแยกที่ดี จะส่งผลถึงขั้นตอนสุดท้ายคือ การทำให้บริสุทธิ์ขึ้นคือ Purification (Joglekar *et al.*, 2006)



ภาคผนวก ก

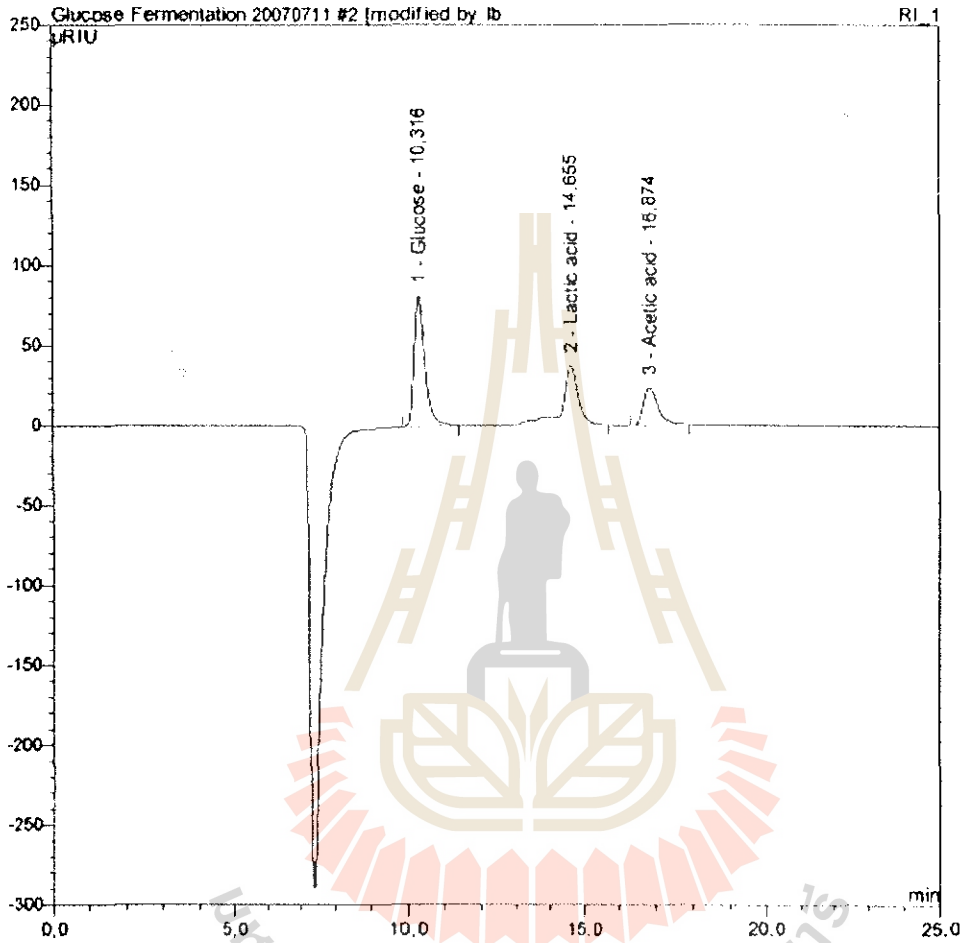
สูตรอาหาร MRS

ประกอบด้วย (หน่วยต่อลิตร):

แหล่งไนโตรเจน	10 กรัม
แหล่งคาร์บอน	20 กรัม
Tween 80	1 กรัม
Ammonium citrate	2 กรัม
Sodium acetate	5 กรัม
Magnesium sulphate	0.1 กรัม
Mangenes sulphate	0.05 กรัม
Dipotassium phosphate	2 กรัม

และปรับ pH ให้ได้ 6.0 ก่อนทำการนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (psi) อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

ภาคผนวก ข



รูปภาพ 28 โครมาโตแกรมของกรดแลคติกจากน้ำหมักหลังจากทำการวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง HPLC

ภาคผนวก ค

การคำนวณ

$$1. \text{ การหาค่า } Y_{x/s} = \frac{\Delta x}{\Delta s}$$

โดยที่ Δx = ผลต่างของ biomass เริ่มต้นกับสุดท้าย (กรัมต่อลิตร)

ΔS = ปริมาณ substrate ที่ใช้ไป (กรัมต่อลิตร)

$$\begin{aligned} \therefore Y_{x/s} &= \frac{\Delta x}{\Delta s} \\ &= \frac{\text{Biomass (สุดท้าย)} - \text{Biomass (เริ่มต้น)}}{\text{Substrate (เริ่มต้น)} - \text{Substrate (สุดท้าย)}} \end{aligned}$$

$$2. \text{ การหาค่า } Y_{p/s} = \frac{\Delta P}{\Delta S}$$

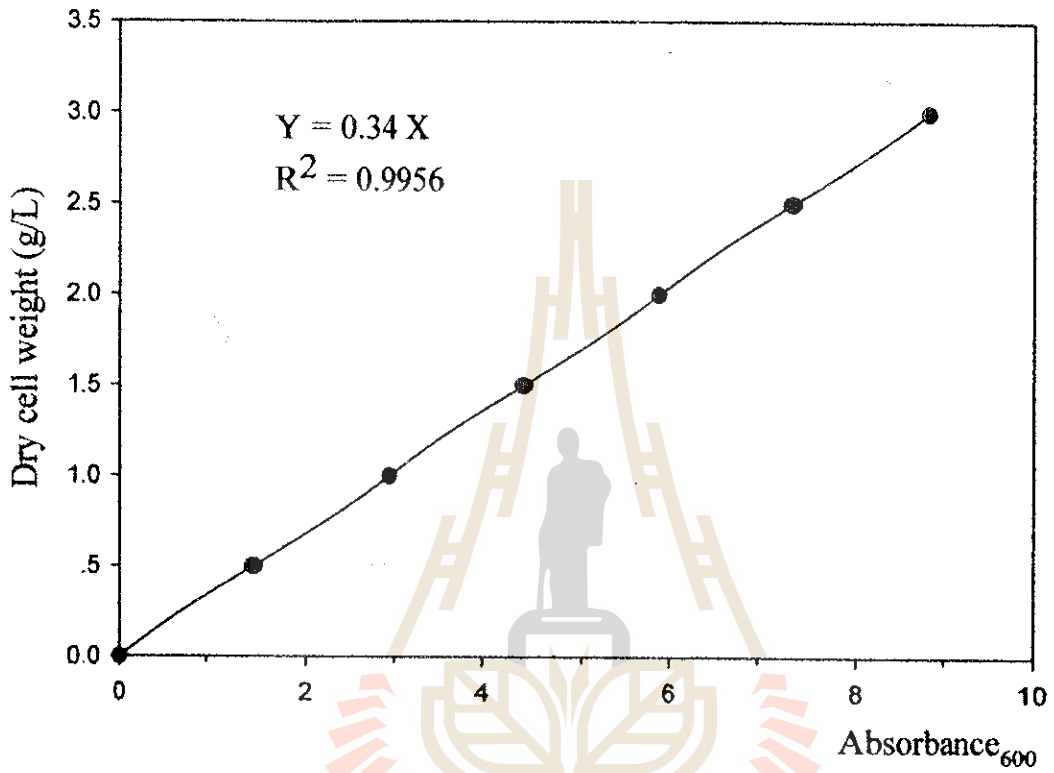
โดยที่ ΔP = ปริมาณผลิตภัณฑ์ (lactic acid) ที่ผลิตได้ (กรัมต่อลิตร)

ΔS = ปริมาณ substrate (reducing sugar) ที่ใช้ไป

$$\begin{aligned} \therefore Y_{p/s} &= \frac{\Delta P}{\Delta S} \\ &= \frac{\text{Lactic acid (สุดท้าย)} - \text{Lactic acid (เริ่มต้น)}}{\text{Substrate (เริ่มต้น)} - \text{Substrate (สุดท้าย)}} \end{aligned}$$

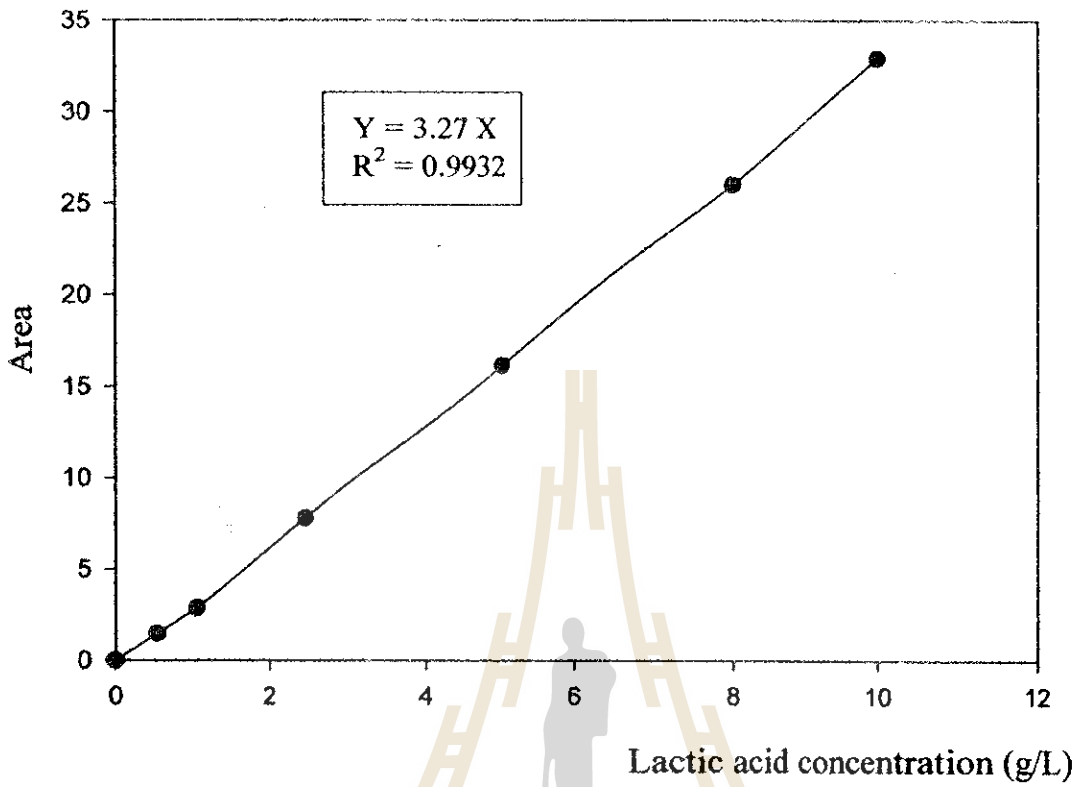
3. การหาค่า Volumetric productivity จะเลือกในช่วงความชันของกราฟมีค่าสูงสุดเท่านั้น ไม่ได้นำทุกช่วงของกราฟมาคำนวณ

$$= \frac{\text{Concentration (g/L)}}{\text{Time (hrs)}}$$

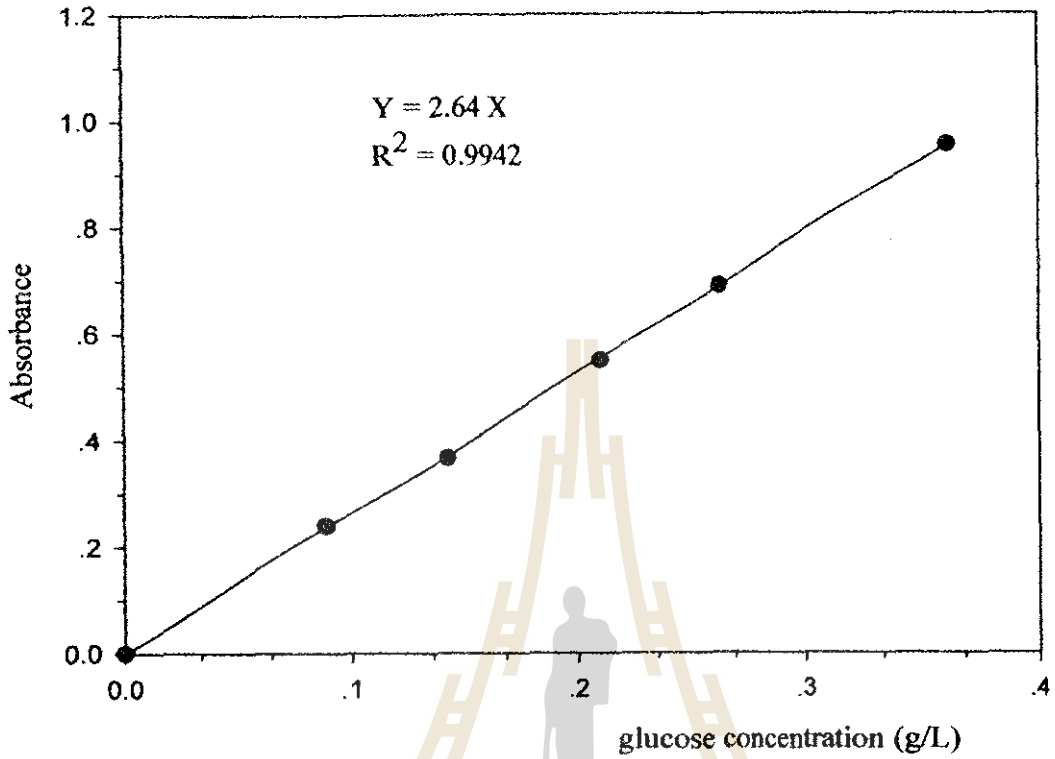


รูปภาพ 29 กราฟมาตรฐานของ Dry cell weight กรดแบคทีเรียเล็กติก โดยวัดค่าความขุ่นที่ 600 นาโนเมตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รูปภาพ 30 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกรดแล็กติกที่ทำการวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง HPLC



รูปภาพ 31 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลรีดิวซ์ในกระบวนการหมักโดยวิธี DNS method

ประวัติผู้วิจัย

1. ชื่อ(ภาษาไทย) คร. อภิชาติ บุญทาวิน
(ภาษาอังกฤษ) Apichat Boontawan, Ph.D.
2. ตำแหน่งปัจจุบัน : อาจารย์ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
3. หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ 111 ถนน มหาวิทยาลัย ต. สุรนารี
สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร อ. เมือง จ. นครราชสีมา
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โทร 0-44-224234
โทรสาร 0-44-224154
E-mail address : apichat@sut.ac.th
4. ประวัติการศึกษา

ปีจบการศึกษา	ระดับปริญญา	ชื่อปริญญา	สาขาวิชา	วิชาเอก	ชื่อสถาบันศึกษา	ประเทศ
2548	ปริญญาเอก	Ph.D.	Chemical Engineering	Biochemical Engineering	Imperial college London	อังกฤษ
2543	ปริญญาโท	M.Sc.	Biochemical Engineering	Biochemical Engineering	University of Birmingham	อังกฤษ
2538	ปริญญาตรี	วท.บ.	อุตสาหกรรมเกษตร	วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	ไทย
2534	มัธยมศึกษาตอนปลาย	-	-	-	โรงเรียนปริณตรอยัลวิทยาลัยเชียงใหม่	ไทย

5. สาขาวิชาการที่มีความสนใจและชำนาญพิเศษ

Biochemical Engineering, Membrane separation processes, Biochemistry, Petroleum biotechnology, Biocatalysis and Biotransformation.

6. ประสิทธิภาพที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย: ชื่อโครงการวิจัยและแหล่งทุน

1. การศึกษาการพัฒนาการผลิตเอทานอลแบบต่อเนื่องจากกากน้ำตาลฮ้อยโดยใช้เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ในถังหมักแบบใช้เยื่อแผ่น
แหล่งทุน: มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (เสร็จสมบูรณ์)
เงินสนับสนุน: 100,000.- (1 ปี; กรกฎาคม 2548- มิถุนายน 2549)
2. การสังเคราะห์เมทานอลแบบต่อเนื่องด้วยเชื้อ *Methylosinus trichosporium* OB3b ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเมมเบรนโดยใช้เทคนิคเพอร์สแทรกชั่น
แหล่งทุน: สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (กำลังอยู่ในระหว่างการดำเนินการ)
เงินสนับสนุน: 305,000.- (2 ปี; ตุลาคม 2549- กันยายน 2551)
3. การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายกรดไขมันจากสมุนไพรในสภาวะไร้ออกซิเจน
แหล่งทุน: สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (กำลังอยู่ในระหว่างการดำเนินการ)
เงินสนับสนุน: 200,000.- (1 ปี; กันยายน 2549- สิงหาคม 2550)

ผลงานตีพิมพ์ทางวิชาการ

- 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. **Impact factor** 1.635
- 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.

Impact factor 2.358

- 3 **Boontawan, A.,** Stuckey D.C. (2006), Biotransformation of α -pinene oxide to isonovalal using fed-batch cultivation of *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11671, *Submitted*.
- 4 Panvichit, P., Kanchanatawee, S. and **Boontawan, A.** (2006), Application of composite PDMS/PVDF membrane in fed-batch fermentation of ethanol from sugar cane molasses by *Saccharomyces cerevisiae* using perstraction technique, *Submitted*.
- 5 Panvichit, P., Kanchanatawee, S. and **Boontawan, A.** (2006), Mass transfer characteristic of ethanol from diluted aqueous solution through silicone membranes in a liquid-liquid contacting system, *Submitted*.

6.3 ผลงานวิจัยที่เผยแพร่ในที่ประชุมวิชาการ

6.3.1 ระดับนานาชาติ

1. Panvichit, P., Kanchanatawee, S. and **Boontawan, A.** Application of composite PDMS/PVDF membrane in fed-batch fermentation of ethanol from sugar cane molasses by *Saccharomyces cerevisiae* using perstraction technique. *6th European Symposium on Biochemical Engineering Science*, 27th-30th August 2006 Salzburg, Austria. (Poster presentation)
2. Panvichit, P., Kanchanatawee, S. and **Boontawan, A.** Mass transfer characteristic of ethanol from diluted aqueous solution through silicone membranes in a liquid-liquid contacting system. *Membrane Science & Technology 2006*, 26th-29th April 2006, Nanyang Technological University, Singapore. (Poster presentation)
3. **Boontawan, A.** and Stuckey, D.C. A Membrane Bioreactor for Biotransformation of Monoterpene. *3rd Regional Symposium on Membrane Science & Technology 2005*, 27th-28th April 2005, Institut Teknologi Bandung, Indonesia. (Oral presentation)

บรรณานุกรม

- วิจิตรศิริ, ป. (2004). แบคทีเรียแล็กติก (*Lactic acid bacteria*).
- วิสุทธิแพทย์, จ. (2542). จุลชีววิทยา (*microbiology*). คณะวิทยาศาสตร์: มหาวิทยาลัยมหาสารคาม, มหาสารคาม.
- <http://www.kanchanapisek.or.th>
- Widiassa, I. N., Sutrisna, P. D., and Wenten, I. G. (2004). Performance of a novel electrodeionization technique during citric acid recovery. **Sep Purif Technol.** 39: 89-97.
- Nelson, D. L., and Cox, M. M. (2000). *Lehninger principles of biochemistry* (3 ed.): Worth publishers.
- ศิริสันตนิยกุล, ส. (2547). เทคโนโลยีชีวภาพอาหาร การหมักและสิ่งแวคคูล้อม. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, คณะอุตสาหกรรมเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Narayanan, N., Roychoudhury, P. K., and Srivastava, A. (2004a). L (+) lactic acid fermentation and its product polymerization. **Electronic Journal of Biotechnology.** 7.
- Narayanan, N., Roychoudhury, P. K., and Srivastava, A. (2004b). L (+) lactic acid fermentation and its product polymerization. **Electronic Journal of Biotechnology.** 7: 167-179.
- วิสุทธิแพทย์, จ. (2542). จุลชีววิทยา (*microbiology*). มหาสารคาม: คณะวิทยาศาสตร์: มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.
- Hofmeyr, J. H. S., 1997, Anaerobic energy metabolism in yeast as a supply-demand system, *in* A. C. Bowden, ed., *New Beer In an Old Bottle: Eduard Buchner and the Growth of Biochemical Knowledge*, ^Universitat de Valencia, Spain, p. 225-242.
- วิจิตรศิริ, ป., 2004, แบคทีเรียแล็กติก (*Lactic acid bacteria*), บทความวิชาการ.
- Salminen, S., and von Wright, A. (1998). *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects*. New York: Marcel Dekker, Inc., .
- Stiles, M. E., and Holzapfel, W. H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. **International Journal of Food Microbiology.** 36: 1-29.
- Bai, D., Yan, Z., Wei, Q., Zhao, X., Li, X., and Xu, S. (2004). Ammonium lactate production by *Lactobacillus lactis* BME5-18M in pH-controlled fed-batch fermentations. **Biochemical Engineering Journal.** 19: 47-51.

- Yun, J. S., and Ryu, H. W. (2001). Lactic acid production and carbon catabolite repression from single and mixed sugars using *Enterococcus faecalis* RKY1. **Process Biochemistry**. 37: 235-240.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., and Parker, J. (2000). *Brock, Biology of micro-organisms* (Vol. 22).
- Doran, P. M. (1995). *Bioprocess Engineering Principles*: Academic Press, London.
- Juang, R.-S., Huang, R.-H., and Wu, R.-T. (1997). Separation of citric and lactic acids in aqueous solutions by solvent extraction and liquid membrane processes. **J Membr Sci**. 136: 89-99.
- Sun, X., Wang, Q., Zhao, W., Ma, H., and Sakata, K. (2006). Extraction and purification of lactic acid from fermentation broth by esterification and hydrolysis method. **Separation and Purification Technology**. 49: 43-48.
- Lye, G. J., and Woodley, J. M. (1999). Application of *in situ* product-removal techniques to biocatalytic process. **Trends Biotechnol**. 17: 395-402.
- Doig, S. D., Boam, A. T., Leak, D. I., Livingston, A. G., and Stuckey, D. C. (1998). A Membrane Bioreactor for Biotransformation of Hydrophobic Molecules. **Biotechnology and bioengineering**. 58: 587-594.
- Baker, R. W. (2004). *Membrane technology and applications* (2nd ed.): John Wiley & Sons, England.
- Mulder, M. (1991). *Basic Principles of Membrane Technology*: Kluwer academic, Dordrecht.
- Cussler, E. L. (1997). *Diffusion; Mass Transfer in fluid systems* (second ed.): Cambridge University press, United Kingdom.
- Author. (1991). *Pervaporation Membrane Separation Process* (Trans. ed. Vol.). Elsevier, USA.
- Gyo Lee, E., Moon, S.-H., Keun Chang, Y., Yoo, I.-K., and Nam Chang, H. (1998). Lactic acid recovery using two-stage electrodialysis and its modelling. **J Membr Sci**. 145: 53-66.
- Habova, V., Melzoch, K., Rychtera, M., and Sekavova, B. (2004). Electrodialysis as a useful technique for lactic acid separation from a model solution and a fermentation broth. **Desalination**. 162: 361-372.
- Madzingaidzo, L., Danner, H., and Braun, R. (2002a). Process development and optimisation of lactic acid purification using electrodialysis. **J Biotechnol**. 96: 223-239.
- Belter, P. A., Cussler, E. L., and Hu, W. S. (1988). *Bioseparations; Downstream Processing for Biotechnology*. New York, USA: John Wiley and Sons.

- Matsuura, T. (1994). *Synthetic Membrane and Membrane Separation processes*: CRC Press, Florida.
- Mattiasson, B., and Holst, O. (1991). *Extractive Bioconversions*: Marcel Dekker, New York.
- Giorno, L., and Drioli, E. (2000). Biocatalytic membrane reactors: applications and perspectives. **Trends Biotechnol.** 18: 339-349.
- Timbuntam, W., Siroth, K., Piyachomkwan, K., and Tokiwa, Y. (2008). Application of bipolar electro dialysis on recovery of free lactic acid after simultaneous saccharification and fermentation of cassava starch. **Biotechnology letters.** 30: 1747-1752.
- Lazarova, Z., and Peeva, L. (1994). Facilitated transport of lactic acid in a stirred transfer cell. **Biotechnology and Bioengineering.** 43: 907-912.
- Yabannavar, V. M., and Wang, D. I. C. (1991). Extractive fermentation for lactic acid production. **Biotechnology and Bioengineering** 37: 1095-1100.
- John, R. P., Nampoothiri, K. M., and Pandey, A. (2008). L-(+)-Lactic Acid Recovery from Cassava Bagasse Based Fermented Medium Using Anion Exchange Resins. **Braz Arch Biol Technol.** 51: 1241-1248.
- Hbov, V., Melzoch, K., Rychtera, M., and Sekavov, B. (2004). Electro dialysis as a useful technique for lactic acid separation from a model solution and a fermentation broth. **Desalination.** 162: 361-372.
- Lee, E. G., 1998, Recovery of lactic acid from fermentation broth using electro dialysis, Department of Chemical Engineering, Korea.
- Thang, V. H., and Novalin, S. (2008a). Green Biorefinery: Separation of lactic acid from grass silage juice by chromatography using neutral polymeric resin. **Bioresource Technol.** 99: 4368-4379.
- Cao, X., Yun, H. S., and Koo, Y.-M. (2002a). Recovery of L-(+)-lactic acid by anion exchange resin Amberlite IRA-400. **Biochem Eng J.** 11: 189-196.
- Datta, R., Tsai, S.-P., Bonsignore, P., Moon, S.-H., and Frank, J. R. (1995). Technological and economic potential of poly(lactic acid) and lactic acid derivatives. **FEMS Microbiology Reviews.** 16: 221-231.
- Walter, K. J. (1998). *Bio-separations and Bio-processing* (Vol. 2). Weinheim: Wiley-VCH.

- Wee, Y.-J., Yun, J.-S., Lee, Y. Y., Zeng, A.-P., and Ryu, H.-W. (2005). Recovery of lactic acid by repeated batch electrodialysis and lactic acid production using electrodialysis wastewater. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. 99: 104-108.
- Thang, V. H., and Novalin, S. (2008b). Green Biorefinery: Separation of lactic acid from grass silage juice by chromatography using neutral polymeric resin. **Bioresource Technology**. 99: 4368-4379.
- Yuwono, S. D., and Kokugan, T. (2008). Study of the effects of temperature and pH on lactic acid production from fresh cassava roots in tofu liquid waste by *Streptococcus bovis*. **Biochemical Engineering Journal**. 40: 175-183.
- Miwa, T., Abe, T., Fukuda, S., Ohkawara, S., and Hino, T. (2000). Effect of reduced H⁺-ATPase activity on acid tolerance in *Streptococcus bovis* mutan. **Anaerobe**. 6: 197-203.
- Akerberg, C., Hofvendahl, K., Zacchi, G., and Hahn-Hagerdal, B. (1998). Modelling the influence of pH, temperature, glucose and lactic acid concentrations on the kinetics of lactic acid production by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 19435 in whole-wheat flour. **Applied Microbiology and Biotechnology** 49: 682-690.
- de Giori, G. S., de Valdes, G. F., de Ruiz Holgado, A. P., and de Oliver, G. (1986). Effect of pH and temperature on diacetyl production by lactic acid bacteria **Milchwissenschaft** 41: 80-81.
- Tada, S., Katakura, Y., Ninomiya, K., and Shioya, S. (2007). Fed-batch coculture of *Lactobacillus kefirifaciens* with *Saccharomyces cerevisiae* for effective production of kefiran. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. 103: 557-562.
- Amrane, A., and Prigent, Y. (1994). Mathematical model for lactic acid production from lactose in batch culture: model development and simulation. **Journal of Chemical Technology Biotechnology**. 60: 241-246.
- Moueddeb, H., Sanchez, J., Bardot, C., and Fick, M. (1996a). Membrane bioreactor for lactic acid production. **J Membr Sci**. 114: 59-71.
- Nanci, A., Nanci, N., Meziane-Cherif, D., Boubendir, A., Fick, M., and Boudrant, J. (2005). Joint effect of nitrogen sources and B vitamin supplementation of date juice on lactic acid production by *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*. **Bioresource Technology** 96 96: 63-67.

- Hickey, M. W., Hillier, A. J., and Jago, R. G. (1986). Transport and metabolism of lactose, glucose, and galactose in homofermentative Lactobacilli. **Applied Environmental and Microbiology**. 51: 825-831.
- Hutkins, R. W., and Morris, H. A. (1987). Carbohydrate metabolism by *Streptococcus thermophilus*: a review. **Journal of Food Protein** 50: 876-884.
- Thomas, T. D., and Crow, V. L. (1984). Selection of galactose-fermenting *Streptococcus thermophilus* in lactose-limited chemostat cultures. **Applied Environmental and Microbiology**. 48: 186-191.
- Petrov, K., Urshev, Z., and Petrova, P. (2008). l(+)-Lactic acid production from starch by a novel amylolytic *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* B84. **Food Microbiology**. 25: 550-557.
- Fordyce, A. M., Crow, V. L., and Thomas, T. D. (1984). Regulation of product formation during glucose or lactose limitation in nongrowing cells of *Streptococcus lactis*. **Applied Environmental and Microbiology**. 48: 332-337.
- Garrigues, C., Loubiere, P., Lindley, N. D., and Cocaign-Bousquet, M. (1997). Control of shift from homolactic acid to mixed-acid fermentation in *Lactococcus lactis*: predominant role of the NADH/NAD⁺. **Journal of Bacteriology** 179: 5282-5287.
- Madzingaidzo, L., Danner, H., and Braun, R. (2002b). Process development and optimisation of lactic acid purification using electro dialysis
Journal of Biotechnology 96: 223-239.
- Cao, X., Yun, H. S., and Koo, Y. M. (2002b). Recovery of L-(+)-lactic acid by anion exchange resin Amberlite IRA-400. **Biochemical Engineering Journal** 111: 189-196.
- Lee, K. (2005). A media design program for lactic acid production coupled with extraction by electro dialysis
Bioresource Technology 96: 1505-1510.
- Moueddeb, H., Sanchez, J., Bardot, C., and Fick, M. (1996b). Membrane bioreactor for lactic acid production. **Journal of Membrane Science** 114: 59-71.
- Åkerberg, C., and Zacchi, G. (2000). An economic evaluation of the fermentative production of lactic acid from wheat flour. **Bioresource Technology**. 75: 119-126.

Cheng, G., Wang, Q., Sun, X., Meng, H., and Li, J. (2008). Experimental study on concentration of ammonium lactate solution from kitchen garbage fermentation broth by two-compartment electro dialysis. **Sep Purif Technol.** 62: 205-211.

Huang, C., Xu, T., Zhang, Y., Xue, Y., and Chen, G. (2007). Application of electro dialysis to the production of organic acids: State-of-the-art and recent developments. **J Membr Sci.** 288: 1-12.

Gonzalez, M. I., Alvarez, S., Riera, F. A., and Alvarez, R. (2008). Lactic acid recovery from whey ultrafiltrate fermentation broths and artificial solutions by nanofiltration. **Desalination.** 228: 84-96.

Joglekar, H. G., Rahman, I., Babu, S., Kulkarni, B. D., and Joshi, A. (2006). Comparative assessment of downstream processing options for lactic acid. **Sep Purif Technol.** 52: 1-17.

