บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

เมทานอลเป็นสารที่ใช้ในอุตสาหกรรมเคมีในหลากหลายด้าน เช่น building block และ anti freeze รวมถึง precursor ในสารประกอบอื่นๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งใช้เป็นพลังงานที่สำคัญสำหรับเครื่องยนต์ต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นประเภท heat engine หรือ fuel cell นอกจากนี้เมทานอลที่ผ่านกระบวนการ dehydration ยังสามารถแปลงให้ได้สารอีกชนิดหนึ่ง อันได้แก่ dimethyl ether (DME) ซึ่งเป็นผลิตผลที่ถือว่าเป็นเชื้อเพลิงดีเซลที่มีคุณภาพสูงมาก โดยให้ค่าออกเทนสูงกว่าเชื้อเพลิงดีเซลปกติทั่วไป ซึ่งกระบวนการผลิตเมทานอลนั้น ในปัจจุบันมีกระบวนการที่ซับซ้อนและยุ่งยากมาก โดยจะใช้การสังเคราะห์ syngas ซึ่งเป็นวิธีการทางเคมี ภายใต้สภาวะที่มีอุณหภูมิ 350 – 400 องศาเซลเซียสและความดันสูงที่ระดับ 8 ถึง 10 เมกะปาสคาล (MPa) ซึ่งอาศัยพลังงานในการผลิตที่มากพอ เพื่อสังเคราะห์ syngas นอกจากนี้ยังต้องใช้เครื่องมือที่จำเพาะและพิเศษมาก ทำให้เกิดค่าใช้จ่ายสูงในการผลิต

จากที่ได้กล่าวมาแล้ว ผู้วิจัยจึงต้องการที่จะหาแนวทางในการสังเคราะห์เมทานอลโดยใช้กระบวนการทางชีวภาพ และจากการค้นคว้าและศึกษาจากรายงานการวิจัยในหลายๆ เรื่อง พบว่ากระบวนการที่สามารถสังเคราะห์เมทานอลได้ ก็คือการใช้แบคทีเรียกลุ่ม Methanotroph สังเคราะห์เมทานอล จากกระบวนการเมทาบอลิสมภายในเซลล์ของแบคทีเรีย ซึ่งต้องอาศัยตัวแปรและสภาวะที่เหมาะสม แต่ในการวิจัยต่างๆ ยังพบปัญหาที่จะต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมก็คือ สภาวะต่างๆที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียและการใช้ไอออนโลหะเป็นตัวเร่งให้แบคทีเรียสังเคราะห์เมทานอลได้สูงสุด รวมไปถึงการใช้ถังปฏิกรณ์ที่จำเพาะกับกระบวนการสังเคราะห์เมทานอล ซึ่งผู้วิจัยจึงสนใจที่จะทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเมทานอลโดยใช้แบคทีเรียกลุ่ม Methanotroph สายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทย โดยศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการทำปฏิกิริยาในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ อาทิเช่น สัดส่วนเปอร์เซนต์ของมีเทนต่อก๊าซผสม การเติมไอออนโลหะ เกลือ และอุณหภูมิ นอกจากนี้ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยได้ทำการออกแบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพต้นแบบให้มีความจำเพาะต่อการเจริญเติบโตและการผลิตเมทานอลของแบคทีเรีย โดยอาศัยข้อมูลในการออกแบบในการควบคุมอุณหภูมิ ความเป็นกรดเป็นด่าง และปริมาณก๊าซผสมเพื่อใช้สร้างถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่จำเพาะต่อกระบวนการผลิตเมทานอลของแบคทีเรีย ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงถือว่าเป็นแนวทางใหม่ที่จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเมทานอล โดยใช้กระบวนการทางชีวภาพ ซึ่งเป็นการนำก๊าซมีเทนไปเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ของแบคทีเรียเพื่อให้ได้ผลผลิตเป็นเมทานอล ซึ่ง

สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในด้านพลังงานและลดปัญหาก๊าซมีเทนซึ่งเป็นก๊าซเรือนกระจก ที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดภาวะโลกร้อน

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อคัดเลือกแบคทีเรีย Methanotroph สายพันธุ์ของประเทศไทยที่มีความสามารถในการผลิตเมทานอล

1.2.2 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรีย Methanotroph ในปฏิกิริยาการผลิตเมทานอลในถังปฏิกรณ์ชีวภาพจำเพาะ โดยศึกษาผลของปัจจัยต่างๆเหล่านี้ ได้แก่

1) สัดส่วนเปอร์เซ็นต์ของ CH_4, CO_2, O_2 และ N_2 ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาในถังปฏิกรณ์ชีวภาพจำเพาะ

2) การเติมไอออนโลหะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

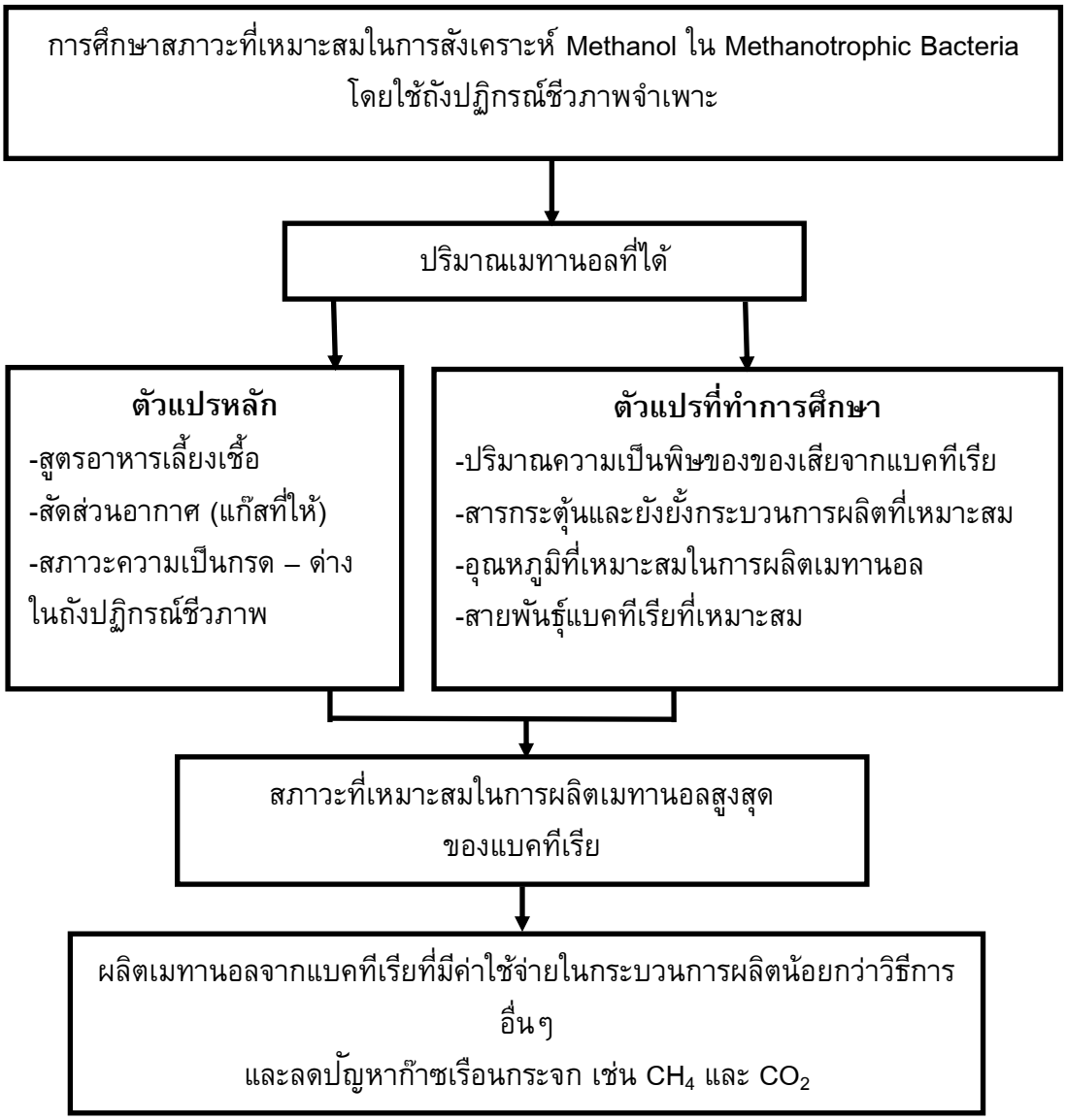
3) การเติมเกลือ ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

4) อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตเมทานอลของแบคทีเรีย Methanotroph สายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทย

1.3 กรอบแนวคิดในการวิจัย

จากแนวทางคิด ทฤษฎีและงานวิจัยที่ได้ศึกษามา ทำให้ทราบหลักการการทำงานของแบคทีเรีย พวก Methanotroph ซึ่งมีการออกซิไดซ์ และเปลี่ยนก๊าซมีเทนไปเป็นเมทานอล ซึ่งมีปัจจัยและสภาวะที่เหมาะสมกับกลไกการผลิตอยู่หลายปัจจัย ซึ่งการวิจัยจำเป็นจะต้องทำการศึกษาปัจจัยต่างๆ นี้ รวมถึง การปรับสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการเร่งการผลิตเมทานอลให้มากที่สุดในกระบวนการนี้ นอกจากนี้ยังจำเป็นต้องศึกษาถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ที่เหมาะสมกับการบ่มเชื้อ การแยกผลผลิตที่ได้ รวมถึงการส่งสารบางส่วนกลับเข้าสู่กระบวนการผลิตเมทานอลอีกครั้ง ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาตัวแปรหลักและตัวแปรเสริมที่มีอิทธิพลต่อกระบวนการผลิตเมทานอลของแบคทีเรียพวก Methanotroph โดยการผันแปรปัจจัยต่างๆ พวกศึกษาสภาวะที่เหมาะสมกับการผลิเมทานอลมากที่สุด จึงได้กำหนดกรอบแนวคิดไว้ดังนี้

กรอบความคิดการวิจัย



ภาพที่ 1.1 กรอบแนวคิดในการวิจัยการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์เมทานอลใน Methanotrophic Bacteria โดยใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่จำเพาะ

1.4 **ขอบเขตการวิจัย**

การวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาเพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในการผลิตเมทานอล โดยอาศัยปฏิกิริยาเมทาบอลิสมภายในเซลล์ของแบคทีเรียในกลุ่ม Methanotrophs ซึ่งมีคุณสมบัติในการออกซิไดซ์มีเทนไปเป็นเมทานอล เพื่อใช้ในงานด้านต่างๆ ซึ่งจะทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีอยู่ในประเทศไทย โดยการเก็บตัวอย่างเพื่อนำมาแยกเชื้อแบคทีเรีย

Methanotroph ในครั้งนี้จะเก็บตัวอย่างดินหลุมฝังกลบ บริเวณพื้นที่กำจัดขยะมูลฝอย ตำบลคลองขวาง อำเภอไทรน้อย จังหวัดนนทบุรี นอกจากนี้ในการวิจัยครั้งนี้ยังจะทำการวิเคราะห์หาความเป็นไปได้ในการผลิตเมทานอลจากการผันแปรอิทธิพลในสภาวะที่จะใช้กระตุ้นให้แบคทีเรียสามารถผลิตเมทานอลได้มากที่สุด

1.5 คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย

เมทาโนเจน (Methanogens) หรือแบคทีเรียเมทาโนโทฟิก (Methanotrophic bacteria) คือ แบคทีเรียที่ดำรงชีวิตภายใต้สภาพไร้อากาศ (anaerobic) ในวงชีวิตของเมทาโนเจนจะย่อยสารอาหารและปล่อยก๊าซต่างๆ ซึ่งรวมถึงแก๊สมีเทนด้วย (Alexander, 1961)

เมทานอล (methanol) หรือ เมทิลแอลกอฮอล์ (methyl alcohol) มีสูตรโครงสร้างแบบย่อ CH_3OH เป็นของเหลวใส มีมวลโมเลกุล 32.04 ระเหยง่าย เป็นพิษ จุดเดือดและจุดเยือกแข็งเท่ากับ 64.7 และ –97.8 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ความหนาแน่น 0.7915 กรัมต่อมิลลิลิตร นิยมใช้เป็นตัวทำละลาย และใช้เป็นเชื้อเพลิง ในธรรมชาติ เมทานอลเป็นผลิตภัณฑ์จากการสลายสารอาหารแบบไม่ใช้ออกซิเจนของแบคทีเรียหลายชนิด ซึ่งเมทานอลจะระเหยออกสู่อากาศภายนอก แล้วสลายตัวได้คาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ (Bailey & Bailey, 2000)

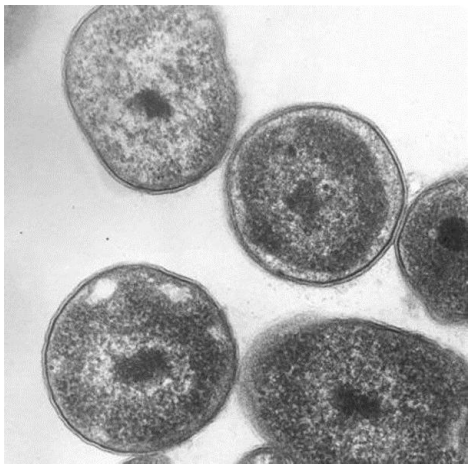
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ผลการศึกษาในส่วนของการคัดเลือกและศึกษาสภาวะของแบคทีเรียกลุ่ม Methanotrophic ในการผลิตเมทานอลจากก๊าซมีเทน ซึ่งสามารถนำไปเป็นข้อมูลพื้นฐานในการกำหนดผลิตเมทานอลที่มีราคาแพงในท้องตลาด โดยไม่ส่งผลกระทบต่อโครงสร้างและหน้าที่ของระบบนิเวศ และเป็นการวิจัยศักยภาพของสายพันธุ์แบคทีเรียไทยในด้านเทคโนโลยีชีวภาพ ซึ่งนำไปสู่การพัฒนาในเชิงวิชาการและเชิงพาณิชย์ต่อไป

บทที่ 2
แนวคิด ทฤษฎี เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เมทาโนโทรฟิกแบคทีเรีย

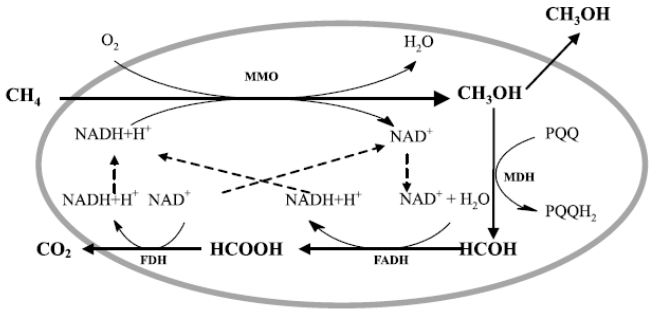
Methanotrophic แบคทีเรียหรือ Methanotrophs เป็นแบคทีเรียที่สามารถใช้มีเทนเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน แบคทีเรียกลุ่มนี้พบทั่วไปในดินโคลน หนองน้ำ นาข้าว สระน้ำ แม่น้ำ มหาสมุทร และในน้ำโสโครก (Heyer, 1977) เซลล์ของ Methanotrophs แสดงในภาพที่ 2.1 ลักษณะที่สำคัญของ Methanotrophs คือมีเอนไซม์ methane monooxygenase (MMO) ที่เร่งปฏิกิริยาการ oxidation มีเทนไปเป็นเมทานอล (Hanson, 1996) Methanotrophs สามารถใช้คาร์บอนจากสารประกอบหลายชนิด อาทิเช่น มีเทน, เมทานอล, methylated amines, halomethanes และ methylated compound containing sulfur (Dijkhuizen & Vries, 1992) นอกจากนี้ Methanotrophs บางตัวสามารถตัด methyl group จากสารประกอบอินทรีย์เช่น choline หรือสารกำจัดศัตรูพืช carbofuran (Topp *et al*., 1993)



ภาพที่ 2.1 เซลล์แบคทีเรีย Methanotrophs
ที่มา http://www.wgbh.org/News/Articles/2011/2/9/Images/8117_800x600.jpg

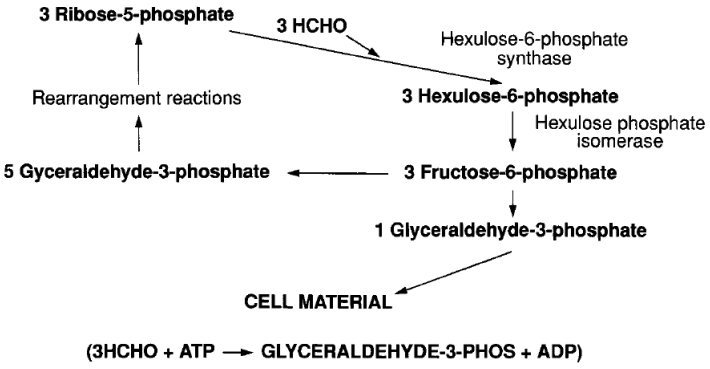
แบคทีเรียกลุ่ม Methanotrophs ออกซิไดซ์มีเทนเป็นเมทานอล โดยการทำงานของเอนไซม์ MMO เมื่อมีเทนถูกออกซิไดซ์เป็นเมทานอล เมทานอลที่ได้จะถูกออกซิไดซ์ต่อเป็นฟอร์มาลดีไฮด์ ฟอร์เมตและคาร์บอนไดออกไซด์ตามลำดับ โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ Methanol dehydrogenase (MDH) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนเมทานอลไปเป็นฟอร์มาดีไฮด์

ส่วนเอนไซม์ Formaldehyde dehydrogenase (FADH) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนฟอร์มาลดีไฮด์ไปเป็นฟอร์เมต สุดท้ายเอ็นไซม์ Formate dehydrogenase (FDH) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนฟอร์เมตไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งอิเล็กตรอนที่ปลดปล่อยออกมาใน Pathway นี้จะเข้าสู่วัฏจักรอิเล็กตรอน ทรานสปอร์ต (electron transport chain) เพื่อสังเคราะห์ ATP ต่อไปดังภาพที่ 2.2 และฟอร์มาลดีไฮด์บางส่วนจะถูกเก็บสะสมอยู่ในเซลล์ (Hanson, 1996)

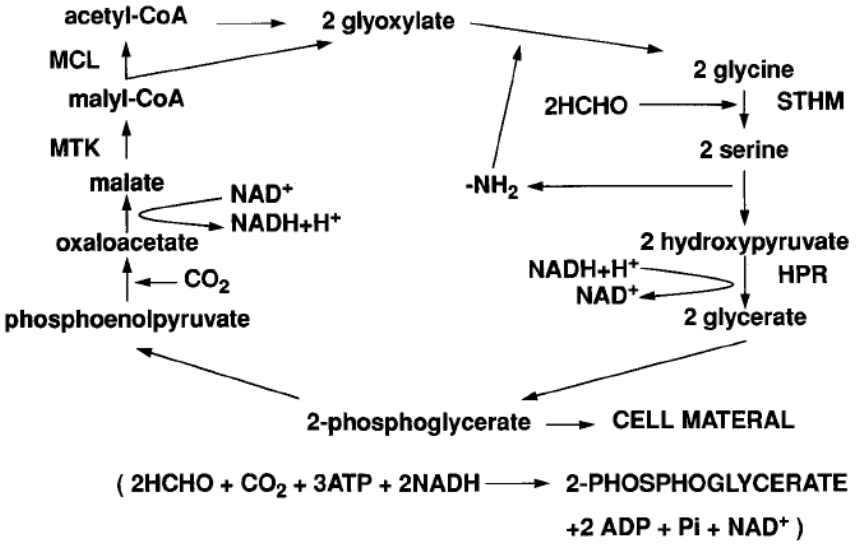


ภาพที่ 2.2 Pathway ของการสังเคราะห์และการสลายเมทานอลในแบคทีเรียกลุ่ม Methanotrophs, FDH: Formate dehydrogenase; FADH: Formaldehyde dehydrogenase; MDH: Methanol dehydrogenase; MMO: Methane monooxygenase
ที่มา (Hanson, 1996)

การสะสมฟอร์มาลดีไฮด์ในเซลล์ที่พบใน Methanotrophs เกิดขึ้นได้ 2 Pathway ได้แก่ RuMP pathway และ Serine pathway (Keller, 1990; Anthony, 1991) ดังภาพที่ 2.3 และ 2.4 ตามลำดับ



ภาพที่ 2.3 RuMP pathway สำหรับการตรึงฟอร์มาลดีไฮด์ โดยเอนไซม์ที่ใช้เร่งปฏิกิริยาใน pathway นี้ได้แก่ hexulose-6-phosphate synthase และ hexulose-phosphate isomerase
ที่มา (Anthony, 1991; Anthony, 1992)



ภาพที่ 2.4 Serine pathway สำหรับการตรึงฟอร์มาลดีไฮด์ โดยเอนไซม์ที่ใช้เร่งปฏิกิริยาใน pathway นี้ได้แก่ serine hydroxymethyl transferase (STHM), hydroxypyruvate reductase (HPR), malate thiokinase (MTK) และ malyl coenzyme A lyase (MCL)
ที่มา (Anthony, 1991; Anthony, 1992)

Whittenbury และคณะในปี 1984 (Whittenbury and Krieg, 1984) ได้จำแนกแบคทีเรียกลุ่ม Methanotrophs ออกเป็น 5 จีนัสได้แก่จีนัส *Methylomonas*, *Methylobacter*, *Methylococcus*, *Methylocystis* และ *Methylosinus* และเมื่อไม่นานมานี้ได้มีการค้นพบจีนัสใหม่ได้แก่ *Methylomicrobium* (Bowman *et al*, 1995)โดยแบคทีเรียในจีนัสเหล่านี้ถูกจัดจำแนกได้ 3 กลุ่ม ได้แก่ type I, type II และ type X โดย type I ได้แก่ จีนัส *Methylomonas* และ *Methylobacter* ส่วน type II ได้แก่ จีนัส *Methylosinus* และ *Methylocystis* และ type X ได้แก่ จีนัส *Methylococcus*

ลักษณะสำคัญที่แตกต่างกันของทั้ง 3 กลุ่ม ได้แก่ pathway สำหรับการตรึงฟอร์มาลดีไฮด์ โดย type I ตรึงฟอร์มาลดีไฮด์ โดยผ่าน RuMP pathway ส่วน type II ตรึงฟอร์มาลดีไฮด์ โดยผ่าน Serine pathway และ type X ตรึงฟอร์มาลดีไฮด์ โดยผ่าน RuMP pathway เหมือน type I แต่ก็สามารถสร้างเอนไซม์ที่ใช้ใน Serine pathway ได้ด้วย (Hanson *et al*, 1991และ Green, 1992) นอกจากนี้ methanotroph type X ยังมีความแตกต่างจาก methanotroph type I และ type II อีกหลายประการ อาทิเช่น สามารถเจริญในอุณหภูมิที่สูงกว่า methanotroph type I และ type II และมี % G+C content ในโมเลกุลของ DNA สูงกว่า type I เป็นต้น ลักษณะสำคัญของ Methanotroph ทั้ง 3 กลุ่ม แสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ลักษณะสำคัญของ Methanotroph type I, type II และ type X

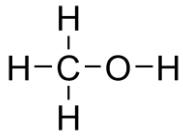
Characteristic	Type I	Type II	Type X
Cell morphology	Short rods, usually occur singly; some cocci or elipsoids	Crescent-shaped rods, rods, pear-shaped cells, sometimes occur in rosettes	Cocci, often found as pairs
Growth at 45°C	No	No	Yes
G+C content of DNA (mol%)	49–60	62–67	59–65
Membrane arrangement			
Bundles of vesicular disks	Yes	No	Yes
Paired membranes aligned to periphery of cells	No	Yes	No
Nitrogen fixation	No	Yes	Yes
Resting stages formed			
Exospores	No	Some strains	No
Cysts	Some strains	Some strains	Some strains
RuMP pathway present	Yes	No	Yes
Serine pathway present	No	Yes	Sometimes
Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase present	No	No	Yes
Major PLFAs	14.0, 16:1ω7c, 16:1ω5t	18:1ω8c	16:0, 16:1ω7c
Proteobacterial subdivision	Gamma	Alpha	Gamma
Phylogenetic signature probe(s)[a] *(50)*	1041 (5′-CTCCGCTATCTCTAACAGATT-3′), 1035 (5′-GATTCTCTGGATGTCAAGGG-3′), MM650 (5′-CCTCTACTCAACTCTAGT-3′), MM850 (5′-TACGTTAGCTCCACCACTAA-3′)	1034 (5′-CCATACCGGACATGTCCAAAGC-3′)	No specific probe has been tested

[a] Phylogenetic signature probes 1041 and 1035 will not hyidize with 16S rRNAs from members of the genus *Methylomonas*. Probes MM650 and MM850 have been employed to detect some species in this genus (180).

ที่มา (Bowman, 1993)

2.2 เมทานอล

เมทานอล (methanol) หรือ เมทิลแอลกอฮอล์ (methyl alcohol) มีสูตรโมเลกุลคือ CH_3OH และมีโครงสร้างของโมเลกุลดังภาพที่ 2.5 เมทานอลมีมวลโมเลกุล 32.04 มีสถานะเป็นของเหลว ใสละลายน้ำได้ในทุกอัตราส่วนจุดเดือดและจุดเยือกแข็งเท่ากับ 64.7 และ –97.8 °ซ ตามลำดับ ความหนาแน่น 0.7915 กรัมต่อมิลลิลิตร (Bailey & Bailey, 2000) เมทานอลเป็นแอลกอฮอล์ประเภทหนึ่งที่มีการใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวาง โดยในปี คศ. 1980 มีการผลิตเมทานอลในโลกประมาณ 12 ล้านเมตริกตัน (Ghisalba & Heizer, 1982) เมทานอลสามารถใช้เป็นพลังงานโดยตรงทดแทนพลังงานน้ำมันเชื้อเพลิง หรือใช้ในกระบวนการผลิต ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น การผลิตสี การล้างอุปกรณ์ต่างๆ การใช้เป็นตัวทำละลาย เป็นวัตถุดิบในการผลิตฟอร์มาลดีไฮด์ (ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตเรซินและ พลาสติก) กรดน้ำส้ม เมทิลเอมีนคลอโรมีเทน (chloromethanes) เมทิลเมทาคริเลต (methyl-methacrylate) สารไดเมทิลเตตรา-พาทาเลต หรือดีเอ็มที (dimethyl terephthalate: DMT) และสารเมทิลเทอชีรี่บิวทิลอีเทอร์ (methylbutyl ether: MTBE) สารป้องกันการแข็งตัว เป็นต้น (Weissermel & Arpe, 1993)



ภาพที่ 2.5 โครงสร้างของโมเลกุล
ที่มา http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/d/d1/Methanol_flat_structure.png

เนื่องจากเมทานอลเป็นแอลกอฮอล์ที่ได้จากกระบวนการกลั่นไม้ตัสภาวะไร้อากาศจึงเรียกว่า แอลกอฮอล์จากไม้ (wood alcohol) และยังสามารถเตรียมได้จากกระบวนการแยกเมทานอลจากถ่านหิน (liquefaction) กระบวนการหมัก (fermentation) วัสดุอินทรีย์ประเภทต่างๆ เช่น เยื่อไม้ กากพืชไร่ เศษผักผลไม้ หรือกระบวนการเปลี่ยนก๊าซธรรมชาติเป็นเมทานอลโดยอาศัยตัวเร่งปฏิกิริยา (catalyst) (Grisalba and Heinzer, 1982) สำหรับกระบวนการสังเคราะห์เมทานอลโดยการใช้ก๊าซชีวภาพหรือก๊าซมีเทนเป็นสารตั้งต้นนั้น มีข้อดีหลายประการ เช่น เมทานอลสะดวกในการขนย้าย การบรรจุมากกว่ามีเทนเนื่องจากการขนส่งมีเทนในสถานะของของเหลวภายใต้ความดันบรรยากาศจะต้องเก็บควบคุมและรักษาอุณหภูมิที่ – 162 °C (Grisalba & Heinzer, 1982) และเมทานอลสามารถนำไปใช้งานมีเทน อีกทั้งการเปลี่ยนมีเทนเป็นเมทานอลนั้นยังช่วยลดก๊าซเรือนกระจก ซึ่งทำให้เกิดปัญหาสภาวะโลกร้อนโดยกระบวนการที่ใช้ในการเปลี่ยนมีเทนเป็นเมทานอลนั้นมีทั้งกระบวนการทางเคมีและชีวภาพสำหรับการสังเคราะห์เมทานอลจากมีเทนด้วยกระบวนการทางเคมีนั้นอาศัยพื้นฐานจาก 3 สมการดังนี้ (Grisalba & Heinzer, 1982)

1) กระบวนการรีฟอร์มมิ่งด้วยไอน้ำ (stream reforming)

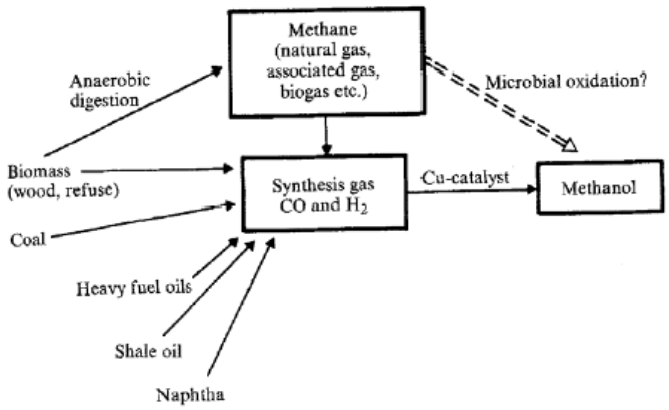
$$CH_4 + H_2O \xrightarrow[700-900\,^{\circ}C,\ 1-25\ bar]{Ni\text{-}catalyst\ (15-20\ \%\ on\ Al_2O_3\ or\ SiO_2)} CO + 3H_2$$

2) กระบวนการเปลี่ยนคาร์บอนไดออกไซด์เป็นคาร์บอนมอนอกไซด์ (shift reaction)

$$CO_2 + H_2 \xrightarrow{Ni\text{-}catalyst} CO + H_2O$$

3) กระบวนการสังเคราะห์เมทานอลโดยใช้ความดันต่ำ (low pressure methanol synthesis)

$$CO + 2H_2 \xrightarrow[230-280\,^{\circ}C,\ 50-100\ bar]{Cu\text{-}catalyst} CO + 3H_2$$



ภาพที่ 2.6 การสังเคราะห์เมทานอล
ที่มา (Ghisalba and Heinzer, 1982)

เนื่องจากกระบวนการสังเคราะห์เมทานอลทางเคมีโดยอาศัยสมการข้างต้นนั้นมีประสิทธิภาพต่ำโดยต้องให้พลังงานตั้งต้นของปฏิกิริยาสูงถึงร้อยละ 60 ของพลังงานที่ได้รับจากเมทานอลซึ่งเป็น ผลผลิตจากกระบวนการ (Grisalba & Heinzer, 1982) นอกจากนั้นยังมีข้อจำกัดอีกหลายประการ เช่น ค่าใช้จ่ายที่ใช้ในการจัดตั้ง ดำเนินการและดูแลระบบสูง ต้องการความร้อนสูงในระหว่างเกิดปฏิกิริยา และสารเร่งปฏิกิริยาเป็นสารกัดกร่อน (corrosive) ซึ่งเป็นอันตรายต่อผู้ปฏิบัติงานและสิ่งแวดล้อม (Grisalba & Heinzer, 1982; Xin *et al*., 2004) ด้วยข้อจำกัดดังกล่าวทำให้การผลิตเมทานอลจากมีเทน ด้วยกระบวนการทางชีวภาพได้รับความสนใจมากกว่า เนื่องจากการผลิตเมทานอลจากมีเทนในกระบวนการทางชีวภาพไม่จำเป็นต้องใช้สารเคมีที่เป็นอันตรายพลังงานที่ใช้น้อยกว่ากระบวนการทางเคมีมากและมีค่าใช้จ่ายที่ต่ำกว่าอีก

ด้วย (Xin *et al*., 2004)โดยการผลิตเมทานอลจากมีเทนด้วยกระบวนการทางชีวภาพนั้นจะอาศัยกระบวนการมีเทน-ออกซิเดชั่นของจุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการใช้มีเทนซึ่งมีชื่อว่า เมทาโนโทรฟ (methanotroph) (สยามมล, 2551)

2.3 การใช้ประโยชน์เมทานอล

เมทานอล เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการผลิตของอุตสาหกรรมต่างๆ มากมาย เช่น ผลิต MTBE ฟอร์มาดีไฮด์ กรดอะซิติก และใช้ในกระบวนการทรานเอสเตอริฟิเคชั่นในการผลิตไบดอดีเซล นอกจากนี้ศักยภาพของเมทานอลเองยังสามารถที่จะใช้ในแหล่งพลังงานใน PEM fuel cell หรือแม้แต่ในอุตสาหกรรมการผลิตรถยนต์และผลิตกระแสไฟฟ้า ซึ่งการเมทานอลจะไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมเหมือนกับวัตถุดิบอื่น เนื่องจากเมทานอลเอง เมื่อปล่อยออกสู่ธรรมชาติ ไม่ว่าจะเป็นทางน้ำหรือพื้นดินก็ดี จะสามารถสลายโดยกระบวนการ photo – oxidation หรือ กระบวนการ bio – degradation ได้ (Khoshtinat *et al*., 2010)

2.4 การผลิตเมทานอลจากมีเทนโดยเมทาโนโทรฟ

การใช้มีเทนเป็นแหล่งพลังงานของเชื้อเมทาโนโทรฟ มีการเปลี่ยนรูปของมีเทนเป็นเมทานอลก่อนโดยเชื้อเมทาโนโทรฟจะใช้มีเทนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานในสภาพที่มีออกซิเจนแล้วให้ผลิตภัณฑ์เป็นเมทานอลโดยอาศัยเอนไซม์มีเทนมอนอออกซีจีเนสหรือเอ็มเอ็มโอ (Methane Monooxygenase: MMO) โดยแสดงสมการได้ดังนี้

$$CH_4 + \tfrac{1}{2}\,O_2 \xrightarrow{MMO} CH_3OH + H_2O$$

อย่างไรก็ตามโดยธรรมชาติแล้วเมทานอลจะถูกใช้ต่อในเซลล์เมทาโนโทรฟโดยเปลี่ยนเป็นฟอร์มัลดีไฮด์ ฟอร์เมทและคาร์บอนไดออกไซด์ตามลำดับ

$$CH_3OH \xrightarrow{MDH} HCHO \xrightarrow{FADH} HCOOH \xrightarrow{FAD} CO_2$$

จากสมการเอนไซม์ที่มีความสำคัญเกี่ยวข้องกับเมทานอลคือ เอนไซม์มีเทนมอนอออกซีจีเนสและเมทานอลดีไฮโดรจีเนส (Anthony, 1986) โดยมีเทนมอนอออกซีจีเนสเป็นเอนไซม์ที่ออกซิไดซ์มีเทนเป็นเมทานอลและเมทานอลดีไฮโดรจีเนสจะเปลี่ยนเมทานอลเป็นฟอร์มัลดีไฮด์

2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเมทานอลของเมทาโนโทรฟ

1) อุณหภูมิ อุณหภูมิมีผลโดยตรงต่อกระบวนการเมทาบอลิซึมภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิมีความสำคัญต่อจุลินทรีย์แต่ละชนิด อย่างไรก็ตาม

อุณหภูมิสูงมักจะมีผลต่อจุลินทรีย์มากกว่าอุณหภูมิต่ำ มีหลายงานวิจัยที่ศึกษาผลของอุณหภูมิในดินต่อแบคทีเรียเมทาโนโทรฟ Boeckx and Cleemput (1996) ได้รายงานอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเกิดมีเทนออกซิเดชัน คือ 25 – 30 ^{o}C ในขณะที่ Visvanathan *et al*. (1999) ได้รายงานอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเกิดมีเทนออกซิเดชัน 30 - 36 ^{o}C อย่างไรก็ตามอุณหภูมิที่เหมาะสมการผลิตเมทานอลด้วยเมทาโนโทรฟควรเป็น อุณหภูมิเดียวกับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเมทาโนโทรฟนั้น

2) ชนิดและปริมาณของเมทาโนโทรฟ การใช้เมทาโนโทรฟในการผลิตสารอินทรีย์ต่างๆ ได้ มีรายงานการใช้เมทาโนโทรฟสายพันธุ์ต่างๆหลากหลายชนิด เช่น การผลิตเมทิลโลคีโต (Methyloketone) จาก *Methylococcus capsulatus* (Texas strain) *Methylosinu*s sp. (CRL-15) และ *Methylobacterium* sp. (CRL-26) (Patel *et al*., 1980) แต่สำหรับการผลิตเมทานอลจากเมทาโนโทรฟในปัจจุบันยังมีการรายงานการใช้เชื้อบริสุทธิ์ *Methylosinus trichosporium* เท่านั้น การผลิตสารด้วยเชื้อบริสุทธิ์เพียงชนิดเดียวสามารถควบคุมกระบวนการเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ได้ง่าย ผลได้ของผลิตภัณฑ์ (yield) มีความแปรปรวนต่ำ แต่ต้องควบคุมให้อยู่ในสภาวะที่ไม่มีการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์อื่น เนื่องจากเมื่อมีการปนเปื้อน เชื้อบริสุทธิ์อาจไม่สามารถแข่งขันกับเชื้อชนิดอื่นได้ ในขณะที่การใช้เชื้อแบบผสมไม่ต้องควบคุมเรื่องการปนเปื้อนมากนัก โดยเชื้อแบบผสมสามารถอยู่ในระบบการผลิตแบบต่อเนื่องได้ยาวนานกว่า (ดุษฎี, 2546)

3) องค์ประกอบของก๊าซในบรรยากาศ ยังไม่มีรายงานอัตราส่วนมีเทนบริสุทธิ์ต่อก๊าซบรรยากาศ ที่เหมาะสม แต่นิยมใช้ปริมาณมีเทนเริ่มต้นในการผลิตเมทานอลแบบเป็นครั้งอยู่ระหว่างร้อยละ 10 – 30 (Yu *et al*., 1998; Lee *et al.,* 2004) อย่างไรก็ตามองค์ประกอบของก๊าซในบรรยากาศมีความสำคัญต่อการผลิตเมทานอลของเมทาโนโทรฟ Xin *et al.* (2004) ได้รายงานปริมาณอัตราส่วนของก๊าซแต่ละชนิดที่เหมาะสมต่อการผลิตเมทานอลโดยเชื้อ *Methylosinus trichosporium* OB3b ที่อยู่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7 โดยไม่มีสารยับยั้งเมทานอลดีไฮโดรจีเนสคือ มีเทนร้อยละ 20 ออกซิเจนร้อยละ 20 ไนโตรเจนร้อยละ 20 และคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 40 ในระบบการผลิตแบบต่อเนื่อง โดยคาร์บอนไดออกไซด์ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายในกระบวนการเมตะบอลิซึม ของเมทาโนโทรฟนั้นก็สามารถยับยั้งการออกซิเดชันของเมทานอลได้

4) ความเป็นกรด – ด่าง (พีเอช) ความเป็นกรด – ด่างมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของเมทาโนโทรฟ โดยปกติเมทาโนโทรฟสามารถเจริญได้ดีที่สภาพพีเอชเป็นกลาง แต่เมทาโนโทรฟบางสายพันธุ์ เช่น *Methylocella palustris* และ *Methylocapsa acidiphila* เป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ในพื้นที่ที่มีความเป็นกรด โดยสามารถเจริญได้ที่ค่าความเป็นกรดด่างระหว่าง 5.5 – 6.7 (Dedysh *et al*., 1998a) สำหรับพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเมทานอลของเมทาโนโทรฟควรเป็นกลาง (Yu *et al*., 1998; Lee *et al.,* 2004)

5) สารกระตุ้นเอ็มเอ็มโอ เนื่องจากเอ็มเอ็มโอแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ เอสเอ็มเอ็มโอ และพีเอ็มเอ็มโอ ซึ่งการแสดงออกของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้จะขึ้นอยู่กับปริมาณของคอปเปอร์ไอออนและชนิดของเมทาโนโทรฟ โดยถ้าต้องการให้เอ็มเอ็มโอชนิดใดทำงานจะต้องควบคุมปริมาณของคอปเปอร์-ไอออนในอาหาร อย่างไรก็ตามการผลิตเมทานอลโดยเซลล์ของ *Methylosinus trichosporium* OB3b จะเติมคอปเปอร์ไอออนในระดับที่มากเพียงพอเพื่อกระตุ้นการทำงานของพีเอ็มเอ็มโอ(5 ไมโครโมลาร์) (Furoto *et al*., 1999; Lee *et al*., 2004) แต่ในการผลิตเอ็มเอ็มโอเพื่อสกัดออกมาใช้ภายนอกเซลล์จะไม่เติมคอปเปอร์ไอออนในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Park *et al*., 2004; Lee *et al*., 2004)

6) สารยับยั้งเมทานอลดีไฮโดรจีเนส การผลิตเมทานอลจากมีเทนโดยใช้เซลล์เมทาโนโทรฟมีความจำเป็นที่ต้องยับยั้งการทำงานของเมทานอลดีไฮโดรจีเนส มีรายงานการใช้สารยับยั้งเมทานอลดีไฮโดรจีเนสหลายชนิดได้แก่ ไดไทโอไตรอิทอล(dithiotriotheitol) ฟีนิวไฮดราซีน (phenylhydrazine) สารจับโลหะ (metal chelating agent) ไอโอโดอะซีเตท (iodoacetate) ไซโคลโพรเพน(cyclopropane) และสารละลายที่มีความเข้มข้นของฟอสเฟตสูง (Anthony, 1986; Carver *et al*.,1984; Frank *et al*., 1989; Shimoda and Okura, 1991) Furoto *et al.* (1999) ได้รายงานการใช้ไซโคลโพรพานอล (cyclopropanol) เป็นสารยับยั้งเมทานอลดีไฮโดรจีเนส พบว่าไซโคลโพรพานอลจะเข้าไปจับกับพีคิวคิวซึ่งเป็นโคเอนไซม์ของเมทานอลดีไฮโดรจีเนสทำให้เมทานอลดีไฮโดรจีเนสไม่สามารถทำงานได้ และในการผลิต เมทานอลในระบบกึ่งต่อเนื่อง (semicontinuous) ด้วยเชื้อ *Methylosinus trichosporium* OB3b ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 12.9 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7 ซึ่งมีโซเดียมฟอร์เมทและไซโคลโพรพานอล 14.3 มิลลิโมลาร์ โดยทำการผลิตเมทานอล 5 ครั้งในระยะเวลา 6 ชั่วโมงพบว่าอัตราการผลิตเมทานอลเฉลี่ยเท่ากับ 3.17 ไมโครโมลต่อชั่วโมงต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง อย่างไรก็ตามไซโคลโพรพานอล เป็นสารที่ยากต่อการสังเคราะห์และการรักษาความเสถียรในสภาวะที่มีอากาศ และเนื่องจากกรดอะมิโนลิวซิว (lysyl residues) ซึ่งอยู่บนผิวของเมทานอลดีไฮโดรจีเนสกับหมู่คาร์บอกซีเลท (carboxylate) บนผิวของ cytochrome *cL* เชื่อมต่อกันด้วยแรงไอออนนิค (ionic interactions) Cox *et al.* (1992) พบว่าสารที่มีแรงไอออนิคสูง (high ionic strength) ได้แก่ สารละลายเกลือสามารถยับยั้งการเคลื่อนย้ายอิเล็คตรอนระหว่างเมทานอลดีไฮโดรจีเนสและ cytochrome *cL* ทำให้เมทานอลดีไฮโดรจีเนสไม่สามารถทำงานได้ Lee *et al*. (2004) ได้รายงานการใช้โซเดียมคลอไรด์ในการยับยั้งเมทานอลดีไฮโดรจีเนส พบว่าโซเดียมคลอไรด์สามารถยับยั้งเมทานอลดีไฮโดรจีเนสได้อย่างมีประสิทธิภาพและเหมาะที่จะนำมาใช้มากกว่าไซโคลโพรพานอล(cyclopropanol) เนื่องจากเก็บรักษาได้ง่าย มีความเสถียร และราคาถูกกว่ามาก สภาวะที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการผลิตเมทานอลโดยเชื้อ *Methylosinus trichosporium* OB3b คือ ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 200 มิลลิโมลาร์ ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 0.6 มิลลิกรัมของเซลล์แห้งต่อมิลลิลิตรใน 12.9 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7 โดยมีโซเดียมฟอร์เมต

ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 25 °C อัตราส่วนมีเทนต่ออากาศเริ่มต้นเท่ากับ 1:4 อย่างไรก็ตามไม่มีการรายงานถึงการใช้เกลือชนิดอื่นๆ ในการยับยั้งเมทานอลดีไฮโดรจีเนสในการผลิตเมทานอล

7) สารส่งเสริมการเจริญชนิดอื่นๆ Xing *et al.* (2006) ได้รายงานการใช้สารอินทรีย์อื่นๆ ได้แก่ ไรโบฟลาวิน (riboflavin) กรดฟอลิก (folic acid) เตตราไฮโดรฟูราน (tetrahydrofuran) ไกลซีน (glycine)ไทโรซีน (tyrosine) ซิสเทอีน (cysteine) มาเลท (malate) ซัคซิเนท (succinate) มาลีเอท (maleate)ซิเตรท (citrate) และไพรูเวท (pyruvate) ผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็นเอ็มเอสเพื่อเลี้ยงเซลล์ *Methylosinus trichosporium* OB3b พบว่าสารอินทรีย์เหล่านี้จะช่วยเพิ่มเมทาบอซึมในวัฏจักรเครป ทำให้เซลล์มีจำนวนสูงขึ้นในสภาวะที่มีมีเทนและในสภาวะที่ไม่มีมีเทนนั้นเมทาโนโทรฟจะไม่สามารถใช้สารอินทรีย์เหล่านี้เป็นแหล่งคาร์บอนได้ โดยซิเตรตเป็นสารที่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์มากที่สุด โดยความเข้มข้นที่มีความเหมาะสมคือ 0.015 มิลลิโมลาร์ ต่อลิตร โดยการใส่สารส่งเสริมการเจริญ เหล่านี้ในอาหารมีผลทำให้ปริมาณเมทานอลที่ปลดปล่อยออกมาภายนอกเซลล์สูงขึ้น

2.6 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

การใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดใหญ่ ซึ่งสามารถทำให้ปราศจากเชื้อได้ในกระบวนการหมักในระดับอุตสาหกรรมเริ่มขึ้นตั้งแต่สมัยสงครามโลกครั้งที่ 1 (ค.ศ. 1914 – 1918) ในประเทศอังกฤษ โดย Weizmann และคณะได้พัฒนากระบวนการผลิตอะซิโตนจาก *Clostridium scetobutylicum* ซึ่งเป็นกระบวนการหมักที่ไม่ต้องการออกซิเจน ในอาหารเหลว (deep liquid fermentation) โดยใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพรูปทรงกระบอก ทำจากเหล็กกล้าชนิดอ่อน (mild steel) มีฝาและก้นถังเป็นรูปโค้ง มีระบบท่อ ข้อต่อ และวาล์ว ซึ่งสามารถทำให้เกิดสภาวะปราศจากเชื้อได้โดยใช้ไอน้ำภายใต้ความดันสูง เพื่อแก้ปัญหาการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่นๆ โดยเฉพาะแบคทีเรียริโอฟาจ (bacteriophage) ซึ่งทำให้เกิดความเสียหายอย่างมากในกรณีที่มีการปนเปื้อนตั้งแต่ระยะแรกของการหมัก เพราะถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ใช้ในสมัยก่อนนั้นไม่สามารถทำให้ปราศจากเชื้อได้ และไม่มีระบบที่จะทำให้ใส่เชื้อเริ่มต้นเข้าสู่ถังปฏิกรณ์ชีวภาพได้อย่างปลอดเชื้อ

ซึ่งต่อมาในปี ค.ศ. 1930 – 1940 ในยุโรปชั้นกลาง ได้เริ่มมีการใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดใหญ่ในกระบวนการหมักแบบต้องการออกซิเจนเป็นครั้งแรก ในการผลิต compressed yeast โดยใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพรูปทรงกระบอกขนาดใหญ่ ซึ่งมีระบบท่อให้อากาศเข้าไปภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพทางด้านล่าง และมีการพัฒนาใช้เครื่องกวนที่มีใบพัดช่วยเพิ่มอัตราการผสมและทำให้ฟองอากาศตกกระจายออก เพื่อลดปริมาณอากาศที่ต้องอัดเข้าสู่ถังปฏิกรณ์ชีวภาพซึ่งทำให้ลดต้นทุนการผลิตลงได้มาก เนื่องจากตามปกติค่าใช้จ่ายสำหรับพลังงานที่จำเป็นต้องใช้ในการอัดอากาศนี้มีค่าสูง 10 – 20 เปอร์เซ็นต์ของต้นทุนการผลิตทั้งหมด นอกจากนี้ยังมีการสร้าง

เหล็กกั้นหรือกระบัง (baffle) ที่ผนังด้านในของถังปฏิกรณ์ชีวภาพเพื่อป้องกันการเกิดน้ำวนอีกด้วย

2.7 คุณสมบัติพื้นฐานของถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

หน้าที่ที่สำคัญของถังปฏิกรณ์ชีวภาพคือ ทำให้เกิดสภาพแวดล้อมที่ควบคุมได้ สำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ เพื่อให้ได้ผลผลิตตามต้องการ การออกแบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพ เพื่อใช้ในกระบวนการหมักแต่ละชนิดอาจแตกต่างกันไปบ้าง แต่โดยทั่วไปจะต้องมีคุณสมบัติพื้นฐานดังนี้คือ

1) มีความแข็งแรง ทนความร้อนและความดันสูงได้

2) มีระบบการให้อากาศและระบบการกวนที่ดี

3) มีระบบควบคุมอุณหภูมิ

4) มีระบบควบคุมการเกิดฟอง

5) มีระบบควบคุม pH

6) มีที่เก็บตัวอย่างจากถังปฏิกรณ์ชีวภาพได้สะดวก โดยไม่ให้เกิดการปนเปื้อน

7) มีการสูญเสียเนื่องจากการระเหยจากถังปฏิกรณ์ชีวภาพได้น้อย

8) มีรูปแบบที่ควบคุมการทำงาน การเก็บเกี่ยวผลผลิต การทำความสะอาดและการบำรุงรักษาได้ง่ายและใช้แรงงานน้อย

9) ควรใช้กับกระบวนการหมักได้หลายชนิด

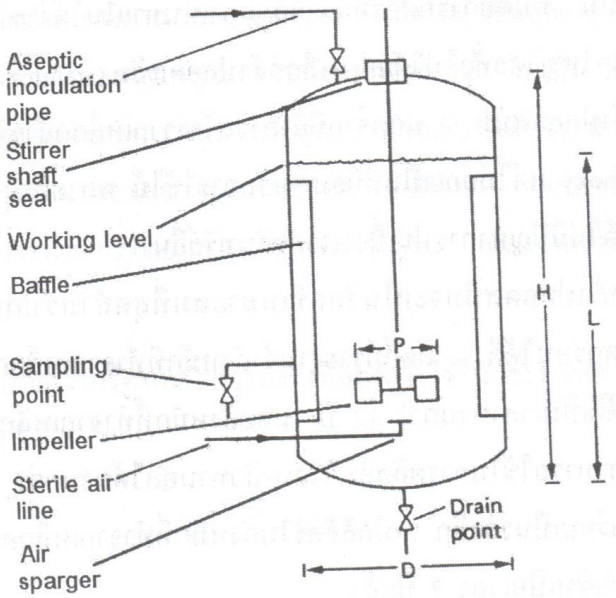
10) ด้านในของถังปฏิกรณ์ชีวภาพควรมีผิวเรียบ

11) อยู่ในสภาพปลอดเชื้อในขณะใช้งานได้เป็นเวลานาน

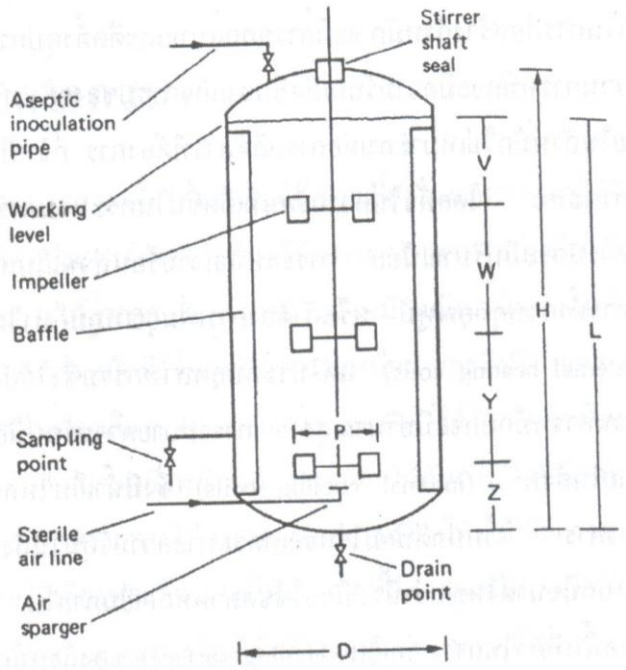
12) ทนต่อการกัดกร่อน และไม่เป็นพิษ

13) ทำจากวัสดุราคาถูกที่สุด แต่คุณภาพตามต้องการ

การออกแบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ดีนั้นต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญในด้านต่างๆ หลายสาขาคือ นักจุลชีววิทยา นักชีวเคมี วิศวกรรมเคมี วิศวกรรมเครื่องกล นักวิเคราะห์ต้นทุน ในปัจจุบันแม้ว่าจะมีการออกแบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพกันหลายแบบ แต่ก็มีเพียงไม่กี่แบบเท่านั้นที่ใช้ได้ดีกับกระบวนการหมักที่ต้องการอากาศในระดับอุตสาหกรรม ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบที่นิยมใช้กันมากที่สุด ได้แก่ ถังปฏิกรณ์ชีวภาพรูปทรงกระบอกตั้งที่มีใบพัดสำหรับการกวนผสม และมีท่อให้อากาศทางด้านล่างใต้ใบพัดดังภาพที่ 2.7 และ 2.8



ภาพที่ 2.7 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ประกอบด้วยใบพัดชุดเดียว
ที่มา (Stanbury and Whitaker, 1984)



ภาพที่ 2.8 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ประกอบไปด้วยใบพัด 3 ชุด
ที่มา (Stanbury and Whitaker, 1984)

2.8 การสร้างตัวถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

การสร้างตัวถังปฏิกรณ์ชีวภาพปฏิกิริยา สำหรับกระบวนการหมักที่ต้องการสภาพปลอดเชื้ออย่างเข้มงวด จำเป็นต้องใช้วัสดุที่ทนทานต่อความร้อนและความดันไอน้ำที่ใช้ในการสเตอริไลส์ได้ดี วัสดุที่นิยมใช้ในการสร้างถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดเล็ก (1-30 ลิตร) ได้แก่ แก้ว เนื่องจากมีข้อดี คือ สามารถทำให้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพมีผิวเรียบได้ ไม่เป็นพิษ ทนต่อการกัดกร่อน และมองเห็นภายในได้ง่าย ส่วนการสร้างถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดใหญ่นั้น วัสดุที่นิยมใช้กันโดยทั่วไปได้แก่ เหล็กกล้าไร้สนิม (Stainless steel) หรืออย่างน้อยที่สุดก็เคลือบด้วยเหล็กกล้าไร้สนิม นอกจากนี้ยังอาจสร้างจากเหล็กกล้าชนิดอ่อนเคลือบด้วยแก้วหรือสารพวก phenolic epoxy แต่ไม่ค่อยเป็นที่นิยม หรืออาจใช้ไม้ พลาสติกหรือคอนกรีต ก็ได้ในกรณีที่ใช้กับกระบวนการผลิตที่ไม่เป็นปัญหาการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่น

แม้ว่าเหล็กกล้าไร้สนิมจะเป็นวัสดุที่เหมาะสมที่สุดสำหรับใช้ในการสร้างถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดใหญ่ เนื่องจากทนต่อการกัดกร่อนได้ดี แต่ก็มีรายงานว่าถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ทำจากเหล็กกล้าชนิดอ่อนก็สามารถใช้ในการหมักเพนนิซิลินได้ดีเป็นเวลานานกว่า 12 ปี และถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ทำจากเหล็กกล้าชนิดอ่อนเคลือบด้วยเหล็กกล้าไร้สนิทสามารถใช้ในการผลิตอะซิโตน-บิวทานอลได้นานกว่า 25 ปี อย่างไรก็ตามถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ทำจากเหล็กกล้าชนิดอ่อน หลังจากที่ใช้ในการผลิตสเตรปโตมัยซิน เป็นเวลา 7 ปีแล้วพบว่ามีรอยกัดกร่อนเป็นรูลึก 7 มิลลิเมตร เกิดขึ้น

การสร้างถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดใหญ่นอกจากจะต้องพิจารณาเลือกใช้ชนิดของวัสดุให้เหมาะสมแล้วความหนาของวัสดุที่ใช้ก็ต้องเหมาะสมตามขนาดของถังปฏิกรณ์ชีวภาพด้วย ตามปกติถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีขนาดใหญ่ก็ต้องมีความหนามากขึ้นตามไปด้วย ตัวอย่างเช่น ถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดความจุ 300,000 – 400,000 ลิตร ควรใช้แผ่นโลหะที่มีความหนา 7 มิลลิเมตร สร้างเป็นตัวถัง และใช้แผ่นโลหะที่มีความหนา 10 มิลลิเมตร สร้างฝาและก้นถังเป็นรูปโค้ง เพื่อให้ทนต่อความดันได้ดี

ตามปกติในการก่อสร้างถังปฏิกรณ์ชีวภาพจะมีการออกแบบและติดตั้งอุปกรณ์ควบคุมอุณหภูมิเข้าไว้ด้วย เนื่องจากในกระบวนการหมักจะมีความร้อนเกิดขึ้นจากกิจกรรมของจุลินทรีย์และการกวนผสม ซึ่งถ้าทำให้อุณหภูมิภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพไม่เหมาะสมต่อการผลิตสารที่ต้องการแล้ว ก็จำเป็นที่จะต้องมีการเพิ่มหรือลดความร้อนเพื่อให้ได้อุณหภูมิที่เหมาะสม โดยทั่วไปในระดับห้องปฏิบัติการ ความร้อนที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดเล็กมักจะมีปริมาณน้อย การระบายความร้อนส่วนเกินออกจากถังปฏิกรณ์ชีวภาพทำได้โดยการวางถังปฏิกรณ์ชีวภาพลงในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ หรือถ้าต้องการเพิ่มอุณหภูมิก็ทำได้โดยใช้ขดลวดให้ความร้อนภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (internal heating coils) แต่ในระดับอุตสาหกรรมซึ่งต้องใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดใหญ่ ความร้อนที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักจะมีปริมาณมาก การระบายความร้อนนิยมใช้แจคเกต หรือขดลวดหล่อเย็น

ภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (internal cooling coils) ซึ่งมีน้ำเย็นไหลหมุนเวียนเข้าไปควบคุมอุณหภูมิได้ตามต้องการ ตามปกติจะนิยมใช้เจคเกตระบายความร้อนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีขนาดความจุไม่เกิน 500 ลิตร ส่วนถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีขนาดใหญ่กว่านี้จะนิยมใช้ขดลวดหล่อเย็นภายใน

การคำนวณหาปริมาณความร้อนหรือความเย็น ที่ต้องการใช้ในกระบวนการหมักแต่ละชนิดสามารถทำได้โดยการใช้สูตรดังนี้

$$\mathbf{Q = u \times A \times t_m}$$

เมื่อ Q = ปริมาณความร้อนที่ส่งผ่านเข้าหรือออกจากถังปฏิกรณ์ชีวภาพต่อ หน่วยเวลา

U = สัมประสิทธิ์การส่งผ่านความร้อนทั้งหมด

A = พื้นที่ผิวที่ใช้ในการส่งผ่านความร้อนได้

t_m = ค่า logarithmic mean ของอุณหภูมิที่แตกต่างกันระหว่างสารให้ความ ร้อนหรือสารให้ความเย็นกับอุณหภูมิของของเหลวในถังปฏิกรณ์ ชีวภาพ

2.9 การให้อากาศและการกวน

การให้อากาศ มีวัตถุประสงค์เพื่อให้จุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวได้รับออกซิเจนอย่างเพียงพอ ส่วนการกวน มีวัตถุประสงค์เพื่อให้จุลินทรีย์และสารอาหารในถังปฏิกรณ์ชีวภาพกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ การเลือกใช้ระบบให้อากาศและอาหารในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแต่ละชนิดขึ้นอยู่กับลักษณะเฉพาะของกระบวนการหมัก ในกระบวนการหมักที่ใช้อาหารเหลวความหนืดต่ำ และมีปริมาณของแข็งทั้งหมดน้อย จะสามารถใช้ระบบให้อาการเป็นฟองเล็กๆ (fine bubble aerator) ได้โดยไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องกวน ซึ่งมีข้อดีก็คือใช้อุปกรณ์น้อยกว่าและประหยัดพลังงานกว่า ปกตินิยมใช้กับถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีอัตราส่วนความสูงต่อเส้นผ่าศูนย์กลาง (H/D ratio) 5: 1 เพราะการให้อากาศเพียงอย่างเดียวก็ทำให้เกิดแรงหมุนวนของน้ำมากพอที่จะทำให้เกิดการผสมได้เพียงพออยู่แล้ว แต่ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีลักษณะเป็นคอลัมน์ทรงสูงจะไม่นิยมใช้ระบบให้อากาศโดยไม่มีเครื่องกวน เพราะต้องใช้พลังงานสูงมากในการอัดอากาศ นอกจากนี้ในกระบวนการหมักที่ใช้เชื้อราและแอคติโนมัยซีท ซึ่งมีการเจิญเป็นเส้นใย ทำให้อาหารมีความหนืดสูงขึ้น ก็จำเป็นต้องใช้เครื่องกวนช่วยด้วย

1. ส่วนประกอบของถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการให้อากาศและการกวน

1.1) เครื่องกวน (stirrer)

1.2) เหล็กกั้นหรือกระบัง (baffle)

1.3) ระบบให้อากาศ (aeration system)

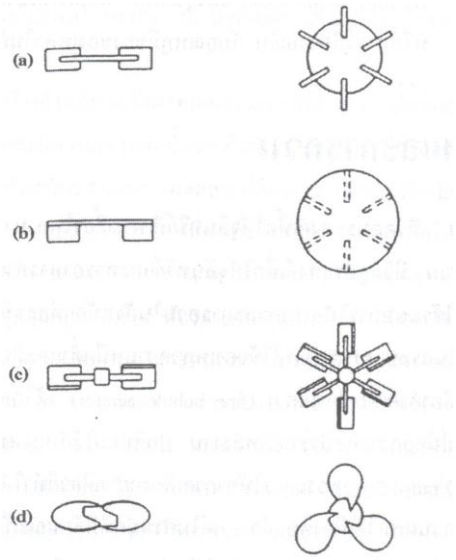
1.1) เครื่องกวน ประกอบด้วยใบพัด (impeller or agitator) ซึ่งติดตั้งอยู่บนแกนหมุนกลางถังปฏิกรณ์ชีวภาพ และมอเตอร์ซึ่งใช้พลังงานไฟฟ้า เพื่อหมุนใบพัด

1.1.1) ใบพัด มีหน้าที่หลัก 2 ประการ คือ

1) ลดขนาดของฟองอากาศ ซึ่งทำให้พื้นที่ผิวในการส่งผ่านออกซิเจนเพิ่มขึ้น และลดระยะทางในการแพร่ลง

2) รักษาสภาพแวดล้อมต่างๆ ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพให้มีความสม่ำเสมอ

ชนิดของใบพัดสามารถจำแนกได้หลายแบบคือ disc turbine, vaned disc, open turbine และ propeller ดังภาพที่ 2.9



ภาพที่ 2.9 รูปแบบของใบพัดชนิดต่างๆ (a) disc turbine (b) vaned disc (c) open turbine (d) marine propeller

ที่มา (Stanbury & Whitaker, 1984)

ใบพัดแบบที่เหมาะสมที่สุดสำหรับถังปฏิกรณ์ชีวภาพโดยทั่วไปได้แก่ disc turbine เพราะใบพัดแบบนี้สามารถตีอากาศเป็นฟองอากาศขนาดเล็กได้ โดยไม่มีปัญหาฟองท่วมใบพัด แม้ว่าจะมีการอัดอากาศเข้าสู่ถังปฏิกรณ์ชีวภาพด้วยอัตราความเร็วสูง ตามปกติอัตราความเร็วของอากาศที่ส่งผ่านเข้าสู่ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (v_m) ขึ้นอยู่กับพื้นที่หน้าตัดของถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ถ้าใช้อัตราความเร็วมากกว่า 21 เมตรต่อชั่วโมง มักจะมีปัญหาฟองอากาศท่วมในกรณีที่ใช้ใบพัดแบบ propeller หรือ open turbine แต่ถ้าใช้ใบพัด แบบ disc turbine ที่มีใบพัด 2 ชุดอยู่บนแกนเดียวกัน จะสามารถใช้อัตราความเร็วสูงถึง 121 เมตรต่อชั่วโมง โดยไม่มีปัญหาฟองอากาศท่วม นอกจากนี้ใบพัดแบบ propeller ยังมีข้อเสียก็คือ มีประสิทธิภาพต่ำในการตี

ฟองอากาศให้แตกเป็นฟองเล็กๆ และทำให้ของเหลวภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพไหลวนตามแนวแกนมากกว่าตามแนวรัศมี

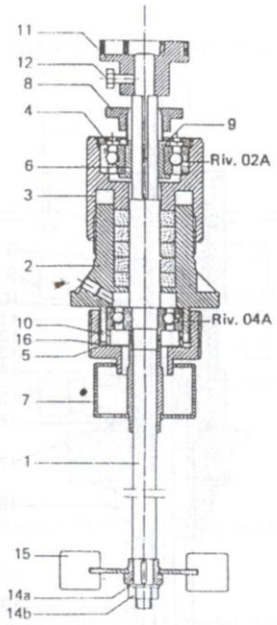
นอกจากชนิดของใบพัดแล้ว ขนาดและตำแหน่งของใบพัดก็มีความสำคัญเช่นกัน ในทางทฤษฎีใบพัดควรอยู่เหนือก้นถังประมาณ 1/3 – 1/2 ของความยาวเส้นผ่าศูนย์กลางของถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (D) และในถังปฏิกรณ์ชีวภาพทรงสูง ซึ่งมีอัตราส่วนระหว่างส่วนสูงจากก้นถังถึงผิวหนังของเหลวในถังปฏิกรณ์ชีวภาพกับเส้นผ่าศูนย์กลางของถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (L/D ratio) มากกว่า 1 ถ้าต้องการให้มีการให้อากาศและการกวนผสมที่เพียงพอ จะต้องใช้ใบพัดมากกว่า 1 ชุด

1.1.2 การประกอบแกนหมุนใบพัดเข้ากับถังปฏิกรณ์ชีวภาพปฏิกิริยา

การประกอบแกนหมุนใบพัดเข้ากับถังปฏิกรณ์ชีวภาพให้แน่นสนิท เพื่อให้สามารถทำงานภายใต้สภาพปลอดเชื้อได้เป็นเวลานาน เป็นปัญหาที่ยากที่สุดในการสร้างถังปฏิกรณ์ชีวภาพแกนหมุนใบพัดอาจมีติดตั้งเข้าไปในถังปฏิกรณ์ชีวภาพทางด้านบน ด้านข้าง หรือด้านล่างก็ได้ แต่โดยทั่วไปนิยมติดตั้งเข้าทางด้านบนมากกว่า และไม่นิยมติดตั้งเข้าทางด้านล่าง เนื่องจากจะทำให้ฝาประกบเพลาจมอยู่ในน้ำ อย่างไรก็ตามการติดตั้งแกนหมุนใบพัดเข้าทางด้านล่างนั้นก็มีข้อดีในกรณีที่ต้องการพื้นที่บนฝาจานด้านบนมากขึ้น เพื่อใช้เป็นช่องทางเติมสารต่างๆ เข้าสู่ถังปฏิกรณ์ชีวภาพนอกจากนี้ยังใช้แกนหมุนสั้นกว่า ทำให้สามารถใช้อัตราความเร็วในการหมุนได้สูงกว่าโดยไม่เกิดปัญหากับแกนหมุนแกว่ง

การประกอบแกนหมุนใบพัดให้สนิทแน่นกับถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ใช้กันมาจนถึงปัจจุบันนี้ มีวิธีการพื้นฐาน 4 แบบ คือ packed –gland seal (stuffing box) simple bush seal, mechanical seal และ magnetic drive

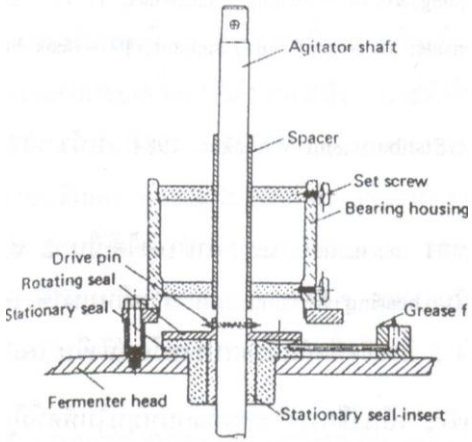
Packed-gland seal เป็นวิธีการประกอบแกนหมุนใบพัดเข้ากับถังปฏิกรณ์ชีวภาพโดยใช้หิน (asbestos) หรือเส้นใยฝ้าย (cotton yarn) อัดแน่นเป็นวงหลายๆ ชั้น รอบแกนหมุนใบพัดและมีปลอกหุ้มรอบนอกอีกชั้นหนึ่ง (ภาพที่ 2.10) การประกอบแกนหมุนใบพัดโดยวิธีนี้เคยเป็นที่นิยมใช้ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดใหญ่ แต่เนื่องจากวัสดุที่ใช้ในการอัดแกนหมุนใบพัดให้แน่นนั้น ทำให้ปราศจากเชื้อยาก เพราะความร้อนแทรกซึมเข้าไปได้ไม่ดี จึงต้องมีการตรวจสอบและเปลี่ยนวัสดุอัดแกนใหม่แทนที่อย่างสม่ำเสมอ ในปัจจุบันจึงไม่เป็นที่นิยมใช้กันมากนัก



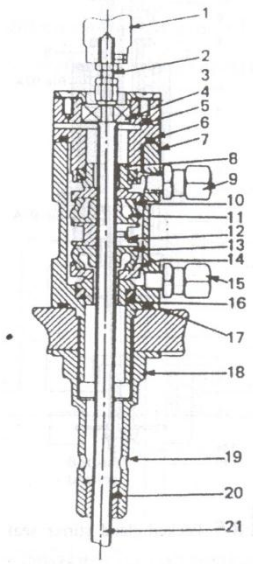
ภาพที่ 2.10 Packed – gland stirrer seal
ที่มา (Stanbury & Whitaker, 1984)

Simple bush seal เป็นวิธีการประกอบแกนหมุนใบพัดที่พัฒนาขึ้นเพื่อใช้กับถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดเล็กในห้องปฏิบัติการ มีลักษณะดังภาพที่ 2.11

Mechanical seal เป็นวิธีการประกอบแกนหมุนใบพัดที่นิยมใช้กับถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดใหญ่ในปัจจุบัน มีลักษณะดังภาพที่ 2.12

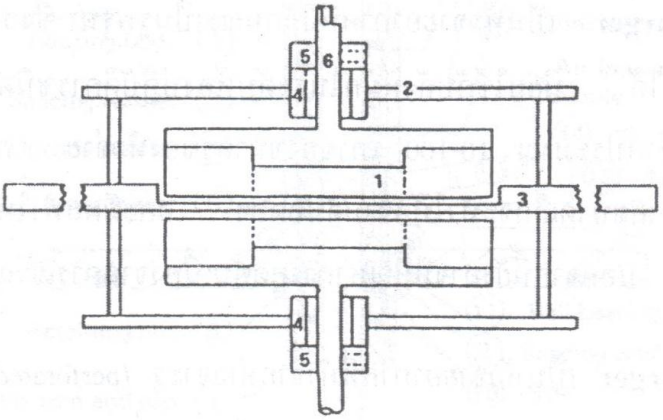


ภาพที่ 2.11 Simple bush seal
ที่มา (Stanbury & Whitaker, 1984)



ภาพที่ 2.12 Mechanical seal assembly
ที่มา (Stanbury & Whitaker, 1984)

Magnetic drive เป็นวิธีการประกอบแกนหมุนใบพัดที่มีลักษณะดังภาพที่ 2.13 มีส่วนประกอบที่สำคัญคือ drive magnet ซึ่งเชื่อมต่ออยู่กับเพลาทางด้านนอกของฝาถังปฏิกรณ์ชีวภาพและ driven magnet ซึ่งเชื่อมต่ออยู่กับเพลทางด้านในของฝาถังปฏิกรณ์ชีวภาพในกรณีที่ใช้ multiple ceramic magnet จะสามารถกวนน้ำในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบมีกะบัง (baffle) ได้ปริมาตรถึง 300 ลิตร ที่อัตราเร็ว 300 – 2,000 รอบต่อนาที



ภาพที่ 2.13 Driving magnet และ Driven magnet เข้ากับถังปฏิกรณ์ชีวภาพ
ที่มา (Stanbury & Whitaker, 1984)

1.2 เหล็กกั้นหรือกะบัง โดยทั่วไปถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีเครื่องกวนจะมีกะบังติดอยู่ 4 อัน เพื่อป้องกันการเกิดน้ำวนและเพิ่มประสิทธิภาพในการให้อากาศ ตามปกติกะบังจะเป็นแผ่นโลหะที่มีลักษณะยาวและมีความกว้างประมาณ 1/10 –ของความยาวเส้นผ่าศูนย์กลางของถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ติดตั้งฉากกับผนังด้านข้างของถังปฏิกรณ์ชีวภาพ โดยมีระยะห่างจากผนังของถังปฏิกรณ์ชีวภาพพอสมควร เพื่อให้ของเหลวภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพสามารถเคลื่อนที่ได้รอบกะบัง และทำให้จุลินทรีย์มีการเจริญบนกะบังและผนังของถังปฏิกรณ์ชีวภาพได้น้อยที่สุด ในปี ค.ศ. 1953 Wegrich และ Shurter ได้รายงานการใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 150 เซนติเมตร ความจุ 10,000 ลิตร ใช้กะบัง 4 อัน ขนาดกว้าง 10 เซนติเมตร ติดตั้งอยู่อยู่ห่างจากผนังของถังปฏิกรณ์ชีวภาพ 3.5 เซนติเมตร และในปี ค.ศ. 1978 Paca และคณะ ได้รายางานการใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 51 เซนติเมตร ความจุ 300 ลิตร ใช้กะบังกว้า 5 เซนติเมตร ติดตั้งอยู่ห่างจากผนังของถังปฏิกรณ์ชีวภาพ 5 มิลลิลิตร

1.3 ระบบให้อากาศ หมายถึง อุปกรณ์ที่ทำหน้าที่นำอากาศเข้าสู่ของเหลวภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ซึ่งมีส่วนประกอบที่สำคัญ เครื่องสูบอากาศ เครื่องกรองอากาศ และหัวจ่ายอากาศ (air sparger) การออกแบบหัวจ่ายอากาศเพื่อให้ได้ฟองอากาศที่มีขนาดเริ่มต้นตามต้องการนั้น จำเป็นต้องทราบว่าจะใช้ระบบให้อากาศเพียงอย่างเดียวหรือจะใช้ร่วมกับเครื่องกวน หัวจ่ายอากาศที่นิยมใช้กันโดยทั่วไปมี 4 แบบ คือ porous sparger, orifice sparger, nozzle sparger และcombined sparger-agitator

Porous sparger เป็นหัวจ่ายอากาศที่มีลักษณะเป็นรูพรุน ซึ่งอาจทำจาก sintered glass เซรามิก หรือโลหะก็ได้ นิยมใช้กับถังปฏิกรณ์ชีวภาพในระดับห้องปฏิบัติการชนิดที่ไม่มีเครื่องกวนฟองอากาศที่เกิดขึ้นจะมีขนาดประมาณ 10 -100 เท่าของขนาดรูหัวจ่าย การอัดอากาศผ่านเข้าสู่ของเหลวภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพได้น้อย นอกจากนั้ยังอาจมีปัญหาการอุดตันเนื่องจากการเจริญของจุลินทรีย์อีกด้วย

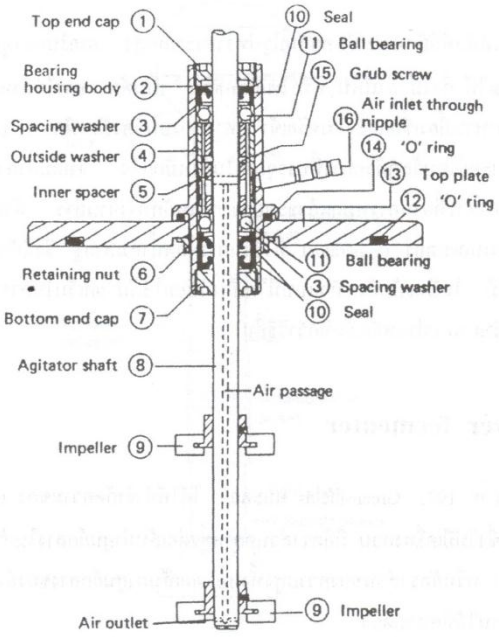
Orifice sparger เป็นหัวจ่ายให้อากาศที่ทำจากรูท่อเจาะรู (perforated pipe) ใช้ได้ทั้งในถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีที่กวนและไม่มีที่กวน ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดเล็กที่มีเครื่องกวนอาจใช้ท่อรูปวงแหวนหรือรูปกากบาท เจาะรูที่ผิวด้านล่าง ติดตั้งใต้ใบพัด สำหรับถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ไม่มีเครื่องกวนนั้น จะใช้ orifice sparger ได้จำกัดเฉพาะในการผลิตเซลยีสต์ การกำจัดน้ำเสีย และการผลิต SCP (Single Cell Protein) เท่านั้น

Nozzle sparger หัวจ่ายอากาศแบบนี้ มีลักษณะเป็นท่อปลายเปิดขนาดเล็กเพียงวางจุดเดียว (single open or partially closed pipe) ซึ่งในปัจจุบันนิยมใช้กันมากทั้งในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดเล็กและขนาดใหญ่ การติดตั้งหัวจ่ายอากาศแบบนี้ ควรติดอยู่ตรงกลางถังปฏิกรณ์ชีวภาพใต้ใบพัดโดยมีระยะห่างจากใบพัดมากที่สุดเท่าที่จะทำได้ เพื่อป้องกันฟองอากาศท่วม

ใบพัด ระบบให้อากาศแบบ single – nozzle sparger นี้ จะมีการสูญเสียความดันน้อยกว่าระบบให้อากาศแบบอื่นและตามปกติแล้วไม่มีปัญหาการอุดตัน

Combied sparger – agitator เป็นระบบที่ใช้ช่องกลวงภายในแกนหมุนใบพัดเป็นช่องทางให้อากาศเข้าสู่ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ แล้วปล่อยออกมาตามรูที่อยู่ระหว่างใบพัดแบบ disc turbine (ภาพที่ 2.14)

ระบบให้อากาศแบบนี้ใช้ได้ดีกับถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีกะบังขนาดเล็ก (1ลิตร) เมื่อใช้ความเร็วในการหมุนใบพัดในระดับปานกลาง



ภาพที่ 2.14 Combined sparger-agitator
ที่มา (Stanbury & Whitaker, 1984)

2.10 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอื่น

นอกจากถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ได้กล่าวมาแล้ว ยังมีถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอื่นๆ อีกหลายชนิด เช่น packed – tower, tower fermenter, Waldhof-type fermenter, acetator และ cavitator และcyclone column แต่ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเหล่านี้มีข้อจำกัดในการใช้งามากกว่า เนื่องจากเป็นถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่พัฒนาขึ้นสำหรับกระบวนการหมักที่จำเพาะหรือกระบวนการหมักที่มีลักษณะใกล้เคียงกันเท่านั้น

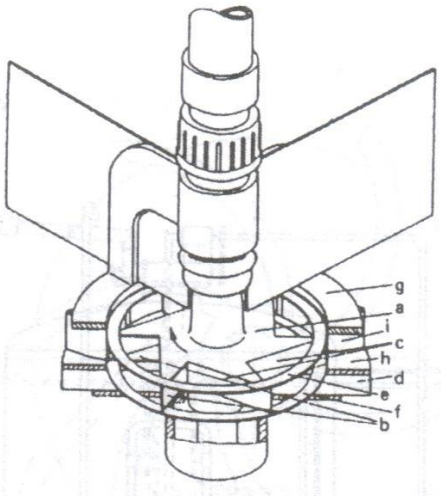
Packed tower มีลักษณะเป็นคอลัมน์รูปทรงกระบอกสูง ภายในบรรจุสารเฉื่อยที่มีลักษณะเป็นชิ้นๆ เช่น เศษไม้ กิ่งไม้ ถ่านหิน หรือโพลีเอทีลิน เป็นต้น การใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบนี้ตอนเริ่มต้นทำได้โดยเติมอาหารเลี้ยงเชื้อและจุลินทรีย์เข้าไปทางด้านบนของถังปฏิกรณ์ชีวภาพ เมื่อจุลินทรีย์เจริยขึ้นเป็นฟิลม์บางๆ มาเกาะอยู่รอบวัสดุตัวกลางที่บรรจุอยู่ภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแล้ว จึงเติมอากาศใหม่เข้าไปทางด้านบนของถังปฏิกรณ์ชีวภาพ อาหารที่ผ่านการหมักแล้วจะออกจากถังปฏิกรณ์ชีวภาพทางด้านล่าง

Tower fermenter เป็นถังปฏิกรณ์ชีวภาพทรงสูงซึ่งไม่มีเครื่องกวน มีอัตราความสูงต่อเส้นผ่าศูนย์กลางในส่วนของ tubular section ได้น้อยกว่า 6 : 1 หรืออัตราส่วนของความสูงทั้งหมดต่อเส้นผ่าศูนย์กลางของถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ไม่น้อยกว่า 10 : 1 และก๊าซไหลผ่านได้ในทิศทางเดียว ซึ่งแบบที่ง่ายที่สุด ประกอบด้วยคอลัมน์แก้วที่มีเครื่องสูบสับสเตรทและเครื่องให้อากาศเข้าสู่ถังปฏิกรณ์ชีวภาพทางด้านฐาน ให้ผลผลิตออกมาทางด้านบนของถังปฏิกรณ์ชีวภาพ สามารถใช้หมักได้ทั้งแบบต่อเนื่องและแบบ batch การใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบนี้ในครั้งแรกในการผลิตกรดซิตริกโดยใช้คอลัมนีแก้วที่มีอัตราส่วนความสูงต่อเส้นผ่าศูนย์กลาง 16 : 1 และมีปริมาตร 3 ลิตรและต่อมาเพิ่มเป็น 36 ลิตร

Waldhof – type fermenter ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบนี้ออกแบบขึ้นเพื่อใช้ศึกษาการเจริยเติบโตของยีสต์ใน sulphite waste liquid การให้อากาศทำได้โดยใช้เครื่องให้อากาศแบบ rotating pin – wheel ซึ่งประกอบด้วยใบพัดรูปโค้ง ก็จะช่วยให้ดูดอากาศจากผิวหน้าอาหารเหลวได้ดีขึ้น และช่วยทำหน้าที่ในการทำลายฟองที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักด้วย

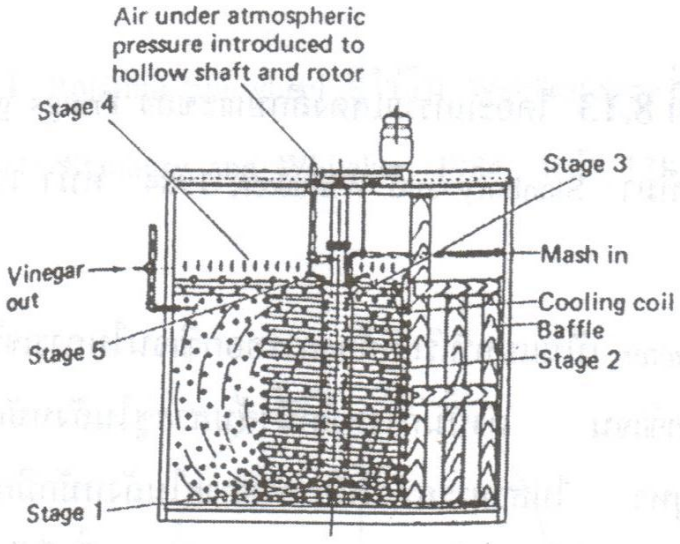
Acetator และ Cavitator เป็นถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ออกแบบโดย Heindrich Frings เพื่อใช้ในการหมักน้ำส้มสายชูโดยเฉพาะ

เนื่องจาก Acetobacter เป็นแบคทีเรียที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญและสร้างกรดอะซิติกและตายได้ง่ายเมื่อขาดออกซิเจน ดังนั้นการหมักน้ำส้มสายชูในถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีเครื่องกวนและเครื่องให้ออกซิเจนตามปกติจึงมักมีปัญหา ไม่สามารถทำให้อากาศภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพมีการกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ การแก้ปัญหานี้ acetator ทำได้โดยวิธี self – priming aerator ช่วยดูดอากาศเข้าไปในถังปฏิกรณ์ชีวภาพได้ตามปริมาณที่ต้องการโดยที่จำเป็นต้องใช้คอมเพรสเซอร์ และทำให้อากาศมีการกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (ภาพที่ 2.15) นอกจากนี้ปัญหาเรื่องฟองก็เป็นสิ่งที่จะต้องพิจารณาด้วย เนื่องจากเกิดฟองจำนวนมากเวลาหมัก ซึ่งแก้ปัญหาได้โดยการออกแบบวิธีกลจะช่วยกำจัดฟองได้ดีกว่าการใช้สารเคมี



ภาพที่ 2.15 ลักษณะของ self – priming aerator
ที่มา (Stanbury & Whitaker, 1984)

Cavitator เป็นถังปฏิกรณ์ชีวภาพอีกชนิดหนึ่งซึ่งพัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการหมักน้ำส้มสายชู บริเวณถังปฏิกรณ์ชีวภาพมีท่อปลายเปิดซึ่งจะช่วยทำให้ฟองอากาศมีการกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอได้ดีขึ้น การออกแบบเครื่องกวนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดนี้มีหลายแบบแต่ก็มีหลักการทำงานคล้ายกับเครื่องกวนแบบ acetator (ภาพที่ 2.16)



ภาพที่ 2.16 ลักษณะของ cavitator และการหมุนเวียนของอากาศใน cavitator
ที่มา (Stanbury & Whitaker, 1984)

2.11 ทฤษฎีการส่งผ่านออกซิเจน

การส่งผ่านออกซิเจนจากอากาศเข้าสู่เซลล์ เป็นกระบวนการที่มีขั้นตอนดังนี้คือ

1. การส่งผ่านออกซิเจนจากฟองอากาศให้ละลายเข้าไปในอาหารเหลว
2. การส่งผ่านออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอากาศเหลวไปยังเซลล์จุลินทรีย์
3. การดูดซึมออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหารเหลวเข้าสู่เซลล์จุลินทรีย์

อัตราการส่งผ่านออกซิเจนจากฟองอากาศให้ละลายเข้าไปในของเหลวสามารถอธิบายได้โดยใช้สมการดังนี้

$$dL_L / dt = K_L a (C^M - C_L)$$

เมื่อ

C_L = ความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายในอาหารเหลว มีหน่วยเป็นมิลลิโมลต่อลิตร (mM/l)

L = เวลา มีหน่วยเป็นชั่วโมง (h)

dC_L/dt = การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของออกซิเจนในระยะเวลาหนึ่ง หรืออัตราการส่งผ่านออกซิเจน มีหน่วยเป็นมิลลิโมลของออกซิเจนต่อลิตรต่อชั่วโมง (mM O_2/l/h)

K_L = สัมประสิทธิ์การส่งผ่านออกซิเจน มีหน่วยเป็น เซนติเมตรต่อชั่วโมง (cm/h)

a = พื้นที่ผิวอยู่ระหว่างฟองอากาศและของเหลวต่อปริมาตรของของเหลวมีหน่วยเป็นตารางเซนติเมตรต่อลูกบาศก์เมตร (cm^2/cm^3)

C^M = ความเข้มข้นอิ่มตัวของออกซิเจนที่ละลายได้ในอาหารเหลว มีหน่วยเป็นมิลลิโมลต่อลิตร (mM/l)

ค่า K_L อาจพิจารณาได้อีกอย่างหนึ่งว่าเป็นส่วนกลับของความต้านทานต่อการส่งผ่านออกซิเจนจากแก๊สไปยังของเหลว และ ($C^M - C_L$) หมายถึง แรงผลักที่จะเอาชนะความต้านทาน ในทางปฏิบัติการวัดค่า K_L และ a ในกระบวนการหมักนั้นทำได้ยากมาก ดังนั้น โดยทั่วไปจึงวัดค่าทั้งสองนี้รวมกันเป็น K_La (สัมประสิทธิ์การส่งผ่านออกซิเจนต่อหน่วยปริมาตร มีหน่วยเป็นชั่วโมง$^{-1}$) โดยวัดความสามารถในการให้อากาศ (aeration capacity) ของถังปฏิกรณ์ชีวภาพภายใต้สภาวะที่ทำการทดสอบ ถ้าถังปฏิกรณ์ชีวภาพมีความสามารถในการให้อากาศสูง ค่า K_La ก็จะมีค่าสูงตามไปด้วย

2.12 การเก็บเกี่ยวผลผลิต

การเก็บเกี่ยวผลผลิตจากกระบวนการหมัก ควรเลือกใช้วิธีการที่มีประสิทธิภาพ รวดเร็ว ให้ผลผลิตคุณภาพสูง ใช้เครื่องมือเหมาะสมทั้งชนิดและปริมาณ เพื่อลดค่าใช้จ่าย ซึ่งอาจจำเป็นจะต้องพิจารณาปัจจัยต่างๆ ดังต่อไปรวมด้วย

1) ตำแหน่งของผลผลิต อยู่ภายในหรือภายนอกเซลล์
2) ความเข้มข้นของผลผลิตในของเหลวที่ได้จากการหมัก
3) คุณสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ของผลผลิตที่ต้องการ
4) วัตถุประสงค์ของการนำผลผลิตไปใช้
5) มาตรฐานความบริสุทธิ์ต่ำสุดที่ยอมรับได้
6) สารเจือปนที่มีอยู่ในของเหลวที่ได้จากการหมัก
7) ราคาขายของผลผลิตในตลาด

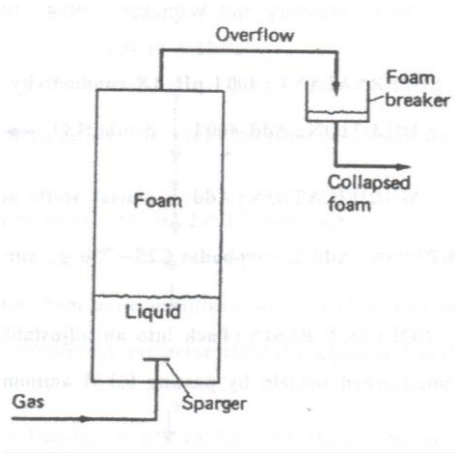
1. การเก็บเกี่ยวผลผลิตที่อยู่ภายนอกเซลล์

การเก็บเกี่ยวผลผลิตที่อยู่ภายนอกเซลล์ โดยทั่วไปในขั้นตอนแรกมีวัตถุประสงค์หลักเพื่อแยกอนุภาคของแข็งที่มีขนาดใหญ่และเซลล์จุลินทรีย์ออกไป โดยใช้เครื่องเซนตริฟิวจ์ เครื่องกรอง หลังจากนั้นจึงนำของเหลวที่ได้ไปสกัดแยกเป็นส่วนๆ โดยเทคโครมาโตกราฟีแบบดูดซับ (adsorption chromatography) หรือโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (ion – exchange chromatography) หรือสกัดโดยใช้ตัวทำละลายที่เป็นของเหลว (liquid- liquid solvent extraction) หรือแยกโดยวิธีการตกตะกอน (precipitation) แล้วจึงนำส่วนที่มีผลผลิตที่ต้องการอยู่ไปทำให้บริสุทธ์โดยวิธีตกตะตอนแยกเป็นลำดับส่วน (fractional precipitation) ใช้เทคนิคทางโครมาโตกราฟฟีและวิธีตกผลึก (crystallization)

2. วิธีการกำจัดของเซลล์จุลินทรีย์และของแข็งอื่นๆ ออกจากอาหารเหลว

การแยกเซลล์จุลินทรีย์และสารอื่นๆ ที่ไม่ละลายน้ำออกจากอาหารเหลวสามารถทำได้หลายวิธีคือ การแยกโดยใช้ฟองอากาศ (foam separation) การตกตะกอน การกรอง และเซนตริฟิวจ์ แต่ที่นิยมก็คือวิธีการกรองและการเซนตริฟิวจ์

2.1 การแยกโดยใช้ฟอง เป็นวิธีการการแยกสารโดยอาศัยความแตกต่างของคุณสมบัติที่ผิวของสารหลายชนิด ซึ่งสามารถดูดซับหรือยึดติดกับฟองอากาศและลอยขึ้นสู่ชั้นบนของของเหลวได้ หลังจากนั้นก็จะแยกสารเหล่านี้ออกได้โดยการปล่อยให้ฟองอากาศส่วนบนไหลล้นออกไป (ดังภาพที่ 2.17) สารที่สามารถแยกได้โดยวิธีนี้อาจเป็นทั้งเซลล์ทั้งเซลล์ หรือโปรตีนหรือคอลลอยด์ก็ได้



ภาพที่ 2.17 วิธีการแยกสารโดยใช้ฟอง
ที่มา (Stanbury & Whitaker, 1984)

ในทางปฏิบัตินิยมใช้สารลดแรงตึงผิว ช่วยทำให้สารที่ต้องการแยกสามารถดูดซับหรือยึดติดกับฟองอากาศได้ดีขึ้น สำหรับปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการแยกสารโยวิธีนี้ได้แก่ pH อัตราการให้อากาศ ชนิดและปริมาณของสารลดแรงตึงผิว

2.2 การตกตะกอน เป็นวิธีที่สามารถใช้แยกผลผลิตบางอย่างออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อได้ โดยอาจเติมสารที่ทำให้ผลผลิตที่ต้องการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเกลือหรือสารประกอบเชิงซ้อนซึ่งไม่ละลายน้ำ ทำให้ผลผลิตที่ต้องการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเกลือหรือสารประกอบเชิงซ้อนซึ่งไม่ละลายน้ำ ทำให้ตกตะกอนแยกออกมาได้ง่าย หรืออาจใช้ในการกำจัดสารเจือปนที่ไม่ต้องการออกไปได้

2.3 การกรอง เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการแยกอนุภาคแขวนลอยออกจากของของเหลวหรือแก๊สโดยใช้วัสดุกรองที่มีลักษณะพรุน ทำหน้าที่กั้นอนุภาคของของแข็งไว้ แต่ของเหลวและแก๊สสามารถไหลผ่านได้ วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการกรองมีหลายชนิด การเลือกใช้วัสดุอุปกรณ์ที่เหมาะสมเพื่อให้ได้ผลดีที่สุดและเสียค่าใช้จ่ายน้อยที่สุด โดยพิจารณาปัจจัยดังต่อไปนี้

2.3.1 คุณสมบัติของของเหลวที่ต้องการกรอง โดยเฉพาะความหนาแน่นและความหนืด

2.3.2 คุณสมบัติของอนุภาคของแข็งที่ต้องการกรอง โดยเฉพาะขนาดและรูปร่างลักษณะการกระจายตัว

2.3.3 อัตราส่วนของของแข็งต่อของเหลว

2.3.4 วัตถุประสงค์ของการกรอง ต้องการเก็บเกี่ยวส่วนที่เป็นของแข็งหรือของเหลวหรือทั้งสองส่วน

2.3.5 ปริมาณของเหลวที่ต้องการกรอง

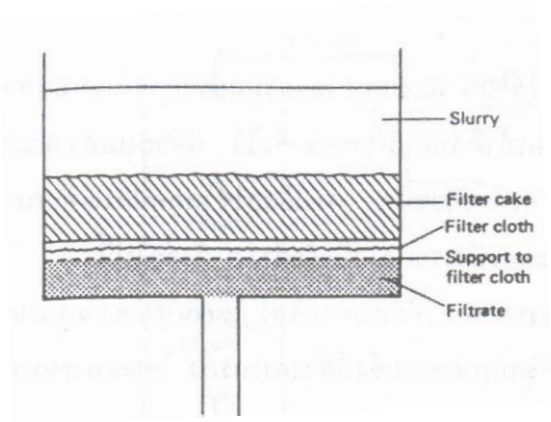
2.3.6 ควรใช้ระบบ batch หรือระบบต่อเนื่องในการกรอง

2.3.7 จำเป็นต้องใช้สภาพปลอดเชื้อหรือไม่

2.3.8 ใช้ความดันหรือการดูดด้วยระบบสุญญากาศ (vacuum suction) เพื่อช่วยให้ของเหลวมีอัตราการไหลที่ดีพอ

ตามปกติแล้วการกรองแบคทีเรียหรือสารอื่นที่มีขนาดเล็กมากๆ หรือซัสเพนชันที่มีลักษณะเหนียว จะนิยมใช้สารช่วยกรอง (filter aid) เช่น kieselguhr (diatomaceous earth) เคลือบแผ่นกรองก่อนที่จะใช้งาน เพื่อป้องกันการอุดตัน หรืออาจเติมสารช่วยกรองผสมลงไปในของเหลวที่ต้องการกรอง แต่เนื่องจาก kieselguhr สามารถดูดซับของเหลวที่ต้องการกรองไว้ได้บางส่วน และการใช้สารช่วยกรองปริมาณมาก จะทำให้ต้นทุนการผลิตสูงขึ้นอีกด้วย

เครื่องกรองแบบง่ายๆ มีลักษณะดังภาพที่ 2.18 ประกอบด้วยตัวค้ำจุน (support) ซึ่งมีรูพรุนอยู่ภายใต้ชั้นผ้ากรอง ด้านบนของผ้ากรองมีสารช่วยกรองและของแข็งที่ต้องการกรองสะสมอยู่ในชั้นที่เรียกว่า filter cake ซึ่งจะมีความหนามากขึ้นตามลำดับระยะเวลาในการกรองที่นานขึ้น ถ้าfilter cake ยิ่งหนามาก ก็จะทำให้มีความต้านทานต่อการไหลของของเหลวมากขึ้นด้วย ดังนั้นถ้าใช้ความดันที่กดลงบนผิวหน้าของของเหลวที่ต้องการกรอง ก็จะทำให้อัตราการไหลของของเหลวลดลงตามความลึกของ filter cake ที่เพิ่มขึ้น



ภาพที่ 2.18 ลักษณะและส่วนประกอบของเครื่องกรองแบบง่าย
ที่มา (Stanbury & Whitaker, 1984)

สำหรับชนิดของการกรองที่ใช้ในอุตสาหกรรมการหมัก อาจแบ่งได้ 2 แบบใหญ่ๆ คือ

เครื่องกรองแบบ batch เป็นเครื่องกรองที่ทำงานแบบไม่ต่อเนื่อง แบบที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมได้แก่ plate-frame filter ซึ่งอาศัยความดันช่วยในการกรอง แบบง่ายที่สุดจะประกอบด้วยเพลท (plate) ที่คลุมด้วยผ้ากรองหรือแผ่นกรอง เรียงสลับกับกรอบ (frame)

เครื่องกรองแบบต่อเนื่อง เหมาะสมสำหรับกรณีที่ต้องการกรองของเหลวปริมาณมากๆ ด้วยถังทรงกระบอก มีแกนหมุนอยู่ที่ศูนย์กลาง ภายในแบ่งเป็นช่องๆ ตามแนวรัศมี เพื่อเป็นช่องทางสำหรับดูดของเหลวเข้าไปภายในเครื่อง และด้านนอกห่อหุ้มด้วยผ้ากรองหรือแผ่นกรองที่ทำจากโลหะ (metal filter)

ในขณะกรอง ถังกรองจะหมุนช้าๆ ด้วยความเร็วประมาณ 1 รอบต่อนาที โดยมีบางส่วนของถังจุ่มอยู่ในอ่างบรรจุอาหารเหลว อาหารเหลวจะถูกดูดผ่านแผ่นกรองเข้าไปตามช่องภายในถัง โดยการใช้แรงดูดสูญญากาศจากด้านใน แล้วไหลเข้าสู่ท่อทางออกไปโดยการลดแรงดูดสุญญากาศจากภายใน หรืออาจใช้ความดันอากาศส่งเข้าไปช่วยดันตะกอนไม่ให้ติดแน่นกับถังกรอง แล้วจึงขูดออกโดยใช้เส้นลวด (string discharge) หรือใบมีด (scraper discharge)

2.13 การสกัดโดยใช้ตัวทำละลายที่เป็นของเหลว

การสกัดผลผลิตโดยวิธีนี้ ทำได้โดยใช้ตัวทำละลายที่สามารถละลายผลผลิตที่ต้องการได้ดีกว่าน้ำ การเลือกใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมตามปกติจะพิจารณาจาก polarity ของโมเลกุลของสาร โดยทั่วไปจะใช้ตัวทำละลายที่มี polarity ใกล้เคียงกับผลผลิต ตารางที่ 2.2 เป็นตัวอย่างของตัวทำละลายที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรม และค่า dielectric constant ซึ่งเป็นค่าที่แสดง polarity ของสารชนิดต่างๆ นอกจากนี้การเลือกชนิดตัวทำละลายยังต้องพิจาณาค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัว (K) ซึ่งหมายถึงอัตราส่วนของความเข้มข้นของผลผลิตในน้ำด้วย ถ้าค่า K มีค่ามาก แสดงว่าตัวทำละลายนั้นมีประสิทธิภาพในการสกัดผลผลิตที่ต้องการได้สูง แต่ถ้า K มีค่าน้อย ก็แสดงว่าตัวทำละลายนั้นมีประสิทธิภาพในการสกัดผลผลิตได้ต่ำ

ตารางที่ 2.2 ตัวทำละลายที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรม และค่า dielectric constant ของตัวทำละลายชนิดต่างๆ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

Solvent	Dielectric constant
Hexane	1.90 (least polar)
Cyclohexane	2.02
Carbon tetrachloride	2.24
Benzene	2.28
Diethyl ether	4.34
Chloroform	4.87
Ethyl acetate	6.02
Butan – 2-ol	15.8
Butan – 1- ol	17.8
Propan – 1- ol	20.1
Acetone	20.7
Ethanol	24.3
Methanol	32.6
Water	78.54 (most polar)

ที่มา (Stanbury & Whitaker, 1984)

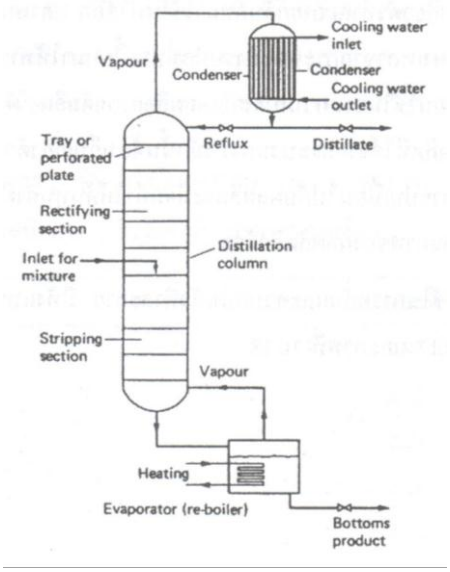
สำหรับปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการสกัดผลผลิตโดยใช้ตัวทำละลายที่เป็นของของเหลว นอกจากนี้ชนิดของตัวทำละลายแล้ว ยังขึ้นอยู่กับ pH อีกด้วย ดังนั้นในทางปฏิบัติจึงต้องทดลองค่า pH ที่เหมาะสมสำหรับการสกัด ในขณะเดียวกันก็ต้องพิจาณาผลของ pH ต่อความคงตัวของผลผลิต รวมทั้งสภาพแวดล้อม ในการสกัดที่อาจมีผลต่อความคงตัวของผลผลิต เช่น อุณหภูมิและแสง เป็นต้น

2.14 การเก็บเกี่ยวตัวทำละลาย

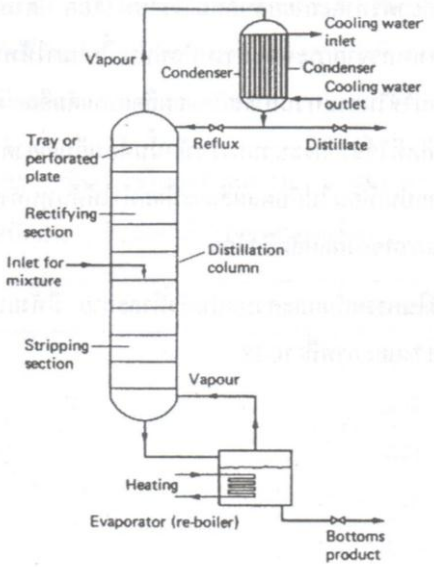
ในกระบวนการสกัดผลผลิตโดยใช้ตัวทำละลายที่เป็นของเหลว โดยทั่วไปจะมีหน่วยกลั่น (distillation unit) เพื่อเก็บเกี่ยวตัวทำละลายกลับคืนมาใช้ใหม่ได้อีก ตามปกติแล้วการเก็บเกี่ยวตัวทำละลายนี้ไม่จำเป็นต้องกำจัดของเหลวจากกระบวนการหมักที่ปนเปื้อนมาให้หมดไปอย่างสิ้นเชิง เพราะตัวทำละลายที่ได้จะถูกนำกลับไปหมุนเวียนใช้ในกระบวนการสกัดผลผลิตแบบเดิมอีก ดังนั้นการปนเปื้อนนี้จึงไม่มีปัญหา แต่ของเหลวหรือผลผลิตที่ได้จากกระบวนการ

หมักนั้นต้องเก็บเกี่ยวตัวทำละลายออกให้หมด เพราะการสูญเสียตัวทำละลายปนเปื้อนไปกับผลผลิตจะมีผลให้ต้นทุนค่าตัวทำละลายเพิ่มขึ้น และยังอาจทำให้เกิดปัญหาต่อคุณภาพของผลผลิตอีกด้วย

สำหรับเครื่องมือที่ใช้ในการกลั่นและควบแน่นตัวทำละลายเพื่อนำกลับมาใช้ใหม่นั้น มีทั้งแบบ batch และแบบต่อเนื่อง ดังภาพที่ 2.19 และ 2.20



ภาพที่ 2.19 เครื่องกลั่นและควบแน่นตัวทำละลายแบบ batch
ที่มา (Stanbury & Whitaker, 1984)



ภาพที่ 2.20 เครื่องกลั่นและควบแน่นตัวทำละลายแบบต่อเนื่อง
ที่มา (Stanbury & Whitaker, 1984)

2.15 โครมาโตกราฟฟี

เทคนิคโครมาโตกราฟฟีที่นิยมใช้ในการแยกผลผลิตจากกระบวนการหมัก โดยทั่วไปแบ่งเป็น 4 วิธีการ คือ โครมาโตกราฟฟีแบบดูดซับ โครมาโตกราฟฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ gel filtration chromatography และ affinity chromatograpy เทคนิคโครมาโตกราฟฟีเหล่านี้นอกจากจะใช้ในการแยกผลผลิตที่ต้องการได้แล้ว ยังสามารถใช้ในการทำบริสุทธิ์ในขั้นตอนสุดท้ายได้อีกด้วย

1. โครมาโตกราฟฟีแบบดูดซับ เป็นเทคนิคที่อาศัยแรง Van de waals ซึ่งเป็นแรงดูดซับอย่างอ่อนที่เกิดขึ้นระหว่างผลผลิตกับ solid phase ที่บรรจุในคอลัมน์ ทำให้สามารถแยกผลผลิตที่ต้องการออกจากส่วนประกอบอื่นๆ ได้

2. โครมาโตกราฟฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ เป็นเทคนิคที่ใช้การแยกสารที่ต้องการได้โดยอาศัยการแลกเปลี่ยนไอออนระหว่างผลผลิตกับ Solid phase สารอินทรีย์ที่นิยมใช้เป็น solid phase ตามปกติจะเป็นเรซินที่มีส่วนประกอบหลักคือ vinyl styrene copolymer เชื่อมอยู่กับหมู่อะตอมที่มีประจุในการสกัดผลผลิตในอุตสาหกรรมการหมัก ได้แก่ การสกัดสเตรปโตมัยซิน โดยใช้ cationic resin เช่น amberlite IRC50 สเตรปโตมัยซินจะเข้าไปแทนที่ Na^+ ในเรซิน ทำให้ดูดซับอยู่ในคอลัมน์ ดังสมการ

$$R\text{–}COO\text{–}Na^+ + \text{streptomycin} \longrightarrow R\text{–}COO^- \text{streptomycin}^+ + NaOH$$

(resin) (resin)

3. Gel filtration chromatography เป็นเทคนิคการแยกสารที่อาศัยความแตกต่างของขนาดโมเลกุลของสาร โดยผ่านสารเหล่านี้ที่ต้องการแยกลงไปบนคอลัมน์ที่บรรจุด้วยสารที่มีรูพรุน เช่น เจล โมเลกุลขนาดเล็กจะแพร่ผ่านเข้าไปในรูเล็กๆ ที่อยู่ในเจล แต่โมเลกุลขนาดใหญ่จะไม่สามารถแพร่เข้าไปในเจลได้ จึงแทรกอยู่ตามช่องว่างระหว่างเจล และถูกชะล้างออกจากคอลัมน์ได้เป็นพวกแรก เทคนิคจึงเหมาะสมกับโมเลกุลสูงๆ เช่น โพลิเมอร์

4. Affinity chromatography เป็นเทคนิคที่ใช้แยกสารชีวโมเลกุลส่วนใหญ่ได้ โดยอาศัยพื้นฐานเกี่ยวกับโครงสร้างทางเคมีหรือหน้าที่ของสาร ซึ่งทำให้เกิดปฏิกิริยาที่มีความจำเพาะสูงมาก เช่น ปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์-สับเสตรท เอนไซม์-ตัวยับยั้ง และแอนติบอดี – แอนติเจน ฯลฯ สารที่ต้องการแยกจะถูกดูดซับโดยสารที่มีความจำเพาะต่อกันซึ่งถูกตรึงอยู่บนตัวค้ำจุนที่ไม่ละลายน้ำ

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

สยามมล (2551) ศึกษาการผลิตเมทานอลจากก๊าซมีเทนด้วยเชื้อเมทาโนโทรฟ โดยพิจารณาช่วงสภาวะที่เหมาะสมในการผสมเมทานอลโดยการทดลองแบบกะที่ใช้เซลล์แบบแขวนลอยโดยใช้ชนิดและความเข้มข้นของเกลือ $Mgcl_2$ เป็นสารยับยั้งเอนไซม์เมทานอลดีไฮโดรจีเนส พบว่าสามารถผลิตเมทานอลได้ 1,806 μM

Mehta และคณะ (1991) ศึกษาการผลิตเมทานอลโดยใช้แบคทีเรีย พบว่า 100 mg ของน้ำหนักเซลล์แห้ง สามารถผลิตเมทานอลในปฏิกิริยาต่อเนื่องได้ 100 $\mu mol\ h^{-1}$ นอกจากนี้ Kim และคณะ (2010) ได้ทำการศึกษาการผลิตเมทานอลโดยใช้แบคทีเรีย *Methylosinus trichosporium* สายพันธุ์ OB3b จากผลการศึกษาพบว่า 1 mg ของน้ำหนักเซลล์แห้ง สามารถผลิตเมทานอลได้ในปริมาณ 2.17 $\mu mol\ h^{-1}$

Furuto และคณะ (1999) และ Mehta และคณะ (1991) การเติม cyclopropanol หรือ EDTA ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Methanol dehydrogenase ทำให้การออกซิเดชั่นของเมทานอลใน pathway หยุดลง เกิดการสะสมของเมทานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่อย่างไรก็ตามเมื่อการออกซิเดชั่นของเมทานอลใน pathway หยุดลง มีผลทำให้ nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) ลดลงจนหยุดสร้าง ทำให้ไม่มี NADH ไปใช้ในการออกซิไดซ์มีเทนไปเป็นเมทานอล

Xin และคณะ (2004) ทดลองใช้แบคทีเรีย *Methylosinus trichosporium* สายพันธุ์ IMV 3011FDH เพื่อผลิตเมทานอล โดยทำการศึกษาความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ต่อประสิทธิภาพในการผลิตเมทานอล พบว่าการให้ความเข้มข้นของ CO_2 ที่เหมาะสมในถังปฏิกิริยามีผลต่อปริมาณเมทานอลที่ได้ โดยในการศึกษาครั้งนี้พบว่า 120 mg ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ผลิตเมทานอลได้ 0.13 $\mu mol\ h^{-1}$

Markowska และ Michalkiewicz (2008) พบว่าคอปเปอร์มีบทบาทในปฏิกิริยาการออกซิเดชั่นมีเทนไปเป็นเมทานอลของแบคทีเรีย *Methylosinus trichosporium* OB3b โดยให้ความเข้มข้นของคอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$) ในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่าง 0.125×10^{-6} mol dm^{-3} และ 1.5×10^{-6} mol dm^{-3} พบว่าที่ความเข้มข้นของ $CuSO_4$ 1.0×10^{-6} mol dm^{-3} แบคทีเรีย *Methylosinus trichosporium* OB3b เจริญและผลิตเมทานอลได้ในปริมาณสูง แต่อย่างไรก็ตามการผลิตเมทานอลโดยแบคทีเรียได้ถูกยับยั้งเมื่อมีปริมาณเมทานอลประมาณ 4.76×10^{-5} mol dm^{-3} ซึ่งตรงกับรายงานของ Takeguchi และ Okura (1999) ซึ่งกล่าวว่าการยับยั้งนี้เกิดเนื่องจากเอนไซม์ methane monooxygenase หยุดทำงานเมื่อมีเมแทบอไลต์สะสมอยู่มากในอาหารเลี้ยงเชื้อ

สมมติฐานนี้ได้รับการยืนยันจากหลายงานวิจัยที่ผ่านมา อาทิเช่น Harwood และ Pirt (1972) Wilkinson และ Harrison (1973) โดยทำการศึกษาการผลิตเมทานอลในแบคทีเรียกลุ่ม

Methanotrophs พบว่าการเจริญของแบคทีเรียเริ่มหยุดลง เมื่อในอาหารเลี้ยงเชื้อมีปริมาณเมทานอลสะสมอยู่ในระดับหนึ่ง การสะสมของเมทานอลและเมแทบอไลต์ทำให้ขบวนการออกซิไดซ์มีเทนของเซลล์ไม่สามารถเกิดขึ้นได้

Takeguchi และคณะ (1997); Furuto และคณะ (1999) พบว่าการเติม reducing powder สำหรับเอนไซม์ methane monooxygenase (MMO) ลงในปฏิกิริยาการผลิตเมทานอล มีผลทำให้ปฏิกิริยาการออกซิไดซ์เมทานอลต่อเป็นฟอร์มาลดีไฮด์ และการสะสมฟอร์มาลดีไฮด์ในเซลล์ ตลอดจนการสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ไม่เกิดขึ้น

Anthony (1986) พบว่าโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) สามารถยับยั้ง electrostatic interaction ระหว่างเอนไซม์ Methanol dehydrogenase (MDH) และ cytochrome c_L ใน pathway ของการผลิตเมทานอล โดยสมมติฐานนี้ตรงกับการศึกษาของ Lee และคณะ (2004)