วิทยานิพนธ์

การผลิตเมทานอลจากมีเทนด้วยเชื้อจุลินทรีย์เมทาโนโทรฟ

METHANOL PRODUCTION FROM METHANE USING METHANOTROPH

นางสาวสยามมล พิมพ์ทอง

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2551

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต (วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม)

ปริญญา

วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม	วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม
สาขา	**ภาควิชา**

เรื่อง การผลิตเมทานอลจากมีเทนด้วยเชื้อจุลินทรีย์เมทาโนโทรฟ

Methanol Production from Methane Using Methanotroph

นามผู้วิจัย นางสาวสยามมล พิมพ์ทอง

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

(รองศาสตราจารย์วิไล เจียมไชยศรี, D.Tech.Sc.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

(รองศาสตราจารย์ภัชราภรณ์ สุวรรณวิทยา, M.Appl.Sc.)

หัวหน้าภาควิชา .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์มงคล ดำรงค์ศรี, Dr. Ing)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....

(รองศาสตราจารย์วินัย อาจคงหาญ, M.A.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 22 **เดือน** พฤษภาคม **พ.ศ.** 2551

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การผลิตเมทานอลจากมีเทนด้วยเชื้อจุลินทรีย์เมทาโนโทรฟ

Methanol Production from Methane Using Methanotroph

โดย

นางสาวสยามมล พิมพ์ทอง

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต (วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม)
พ.ศ. 2551

สยามมล พิมพ์ทอง 2551: การผลิตเมทานอลจากมีเทนด้วยเชื้อจุลินทรีย์เมทาโนโทรฟ ปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต (วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม) สาขาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์วิไล เจียมไชยศรี, D.Tech.Sc. 109 หน้า

การวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาการผลิตเมทานอลจากก๊าซมีเทนด้วยเชื้อเมทาโนโทรฟผสมที่แยกได้จากดินฝังกลบมูลฝอยจำลอง โดยนำเชื้อผสมดังกล่าวมาศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเมทานอลด้วยการทดลองแบบกะที่ใช้เซลล์แบบแขวนลอย ดังนี้ 1) ปริมาณของมีเทนในช่วงร้อยละ 10-30; 2) ชนิดของเกลือและความเข้มข้นที่ใช้เป็นสารยับยั้งเอนไซม์เมทานอลดีไฮโดร-จีเนส (MDH) ได้แก่ KCl, NaCl, $CaCl_2$, $MgCl_2$; 3) แหล่งของมีเทนได้แก่ มีเทนบริสุทธิ์และก๊าซชีวภาพ และ 4) เปรียบเทียบการผลิตเมทานอลในเซลล์แบบแขวนลอยกับการใช้เซลล์ที่ถูกตรึงในแคลเซียมอัลจิเนตที่แปรผันขนาดต่างๆของเม็ดเจล

ผลการทดลองพบว่าเชื้อเมทาโนโทรฟผสมมีปริมาณร้อยละ 67.21 + 12.92 ของจุลินทรีย์ทั้งหมดสามารถนำมาใช้ในการผลิตเมทานอลได้ โดยการทดลองแปรผันปริมาณมีเทนที่ร้อยละ 10, 20 และ 30 เมื่อใช้เกลือ NaCl เป็นสารยับยั้ง MDH พบว่าการผลิตเมทานอลสูงสุดแตกต่างกันเล็กน้อย (413, 478 และ 466 ไมโครโมลาร์ตามลำดับ) และพบว่าชนิดของเกลือที่ให้เมทานอลสูงสุด คือ $MgCl_2$ (300 มิลลิโมลาร์) โดยให้เมทานอลเท่ากับ 1,806 ไมโครโมลาร์ เมื่อเปรียบเทียบกับค่าสูงสุดของ $CaCl_2$ NaCl และ KCl ให้เมทานอลเท่ากับ 765, 421 และ 123 ไมโครโมลาร์ตามลำดับ และเมื่อใช้ก๊าซชีวภาพแทนมีเทนบริสุทธิ์กรณีที่ไม่มีเกลือร่วมด้วยพบว่าก๊าซมีเทนไม่สามารถให้เมทานอลได้ ในขณะที่ก๊าซชีวภาพให้เมทานอล 240 ไมโครโมลาร์ สำหรับกรณีที่ใช้ $MgCl_2$ ร่วมด้วยพบว่าก๊าซมีเทนให้ปริมาณเมทานอลสูงกว่าก๊าซชีวภาพโดยให้ เมทานอลสูงสุด 1,806 และ 964 ไมโครโมลาร์ตามลำดับ แต่ก๊าซชีวภาพให้ความเสถียรและอัตราการผลิตเมทานอลต่อมีเทนที่ใช้ไปได้ดีกว่าก๊าซมีเทนโดยให้เมทานอลเท่ากับ 4,559 และ 1,029 ไมโครกรัมเมทานอลต่อกรัมมีเทนตามลำดับ ในการทดลองใช้เซลล์เมทาโนโทรฟที่ตรึงในแคลเซียมอัลจิเนตพบว่าได้ปริมาณเมทานอลเท่ากับ 737 ไมโครโมลาร์ เมื่อใช้เม็ดเจลเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 2 มิลลิเมตรซึ่งต่ำกว่าเซลล์แบบแขวนลอย (1,509 ไมโครโมลาร์) เมื่อใช้ $CaCl_2$ เป็นสารยับยั้ง ดังนั้นแคลเซียมอัลจิเนตจึงไม่เหมาะสมในการตรึงเซลล์เมทาโนโทรฟเพื่อผลิตเมทานอลโดยใช้เกลือเป็นสารยับยั้งในการศึกษานี้

สยามมล พิมพ์ทอง 6 / พ / 51

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Siammon Pimthong 2008: Methanol Production from Methane Using Methanotroph. Master of Engineering (Environmental Engineering), Major Field: Environmental Engineering, Department of Environmental Engineering.
Thesis Advisor: Associate Professor Wilai Chiemchaisri, D.Tech.Sc. 109 pages.

The objective of this study was to investigate potential of methanol production by the mixed culture of methanotrophs bacteria isolated from the simulated landfill cover soil. The cell suspensions were utilized in batch experiments to find the optimal conditions involving methanol production, which were 1) methane contents (10-30%), 2) type and concentrations of salts used as methanol dehydrogenase (MDH) inhibitor, 3) methane sources: pure methane and biogas and 4) comparing suspended cells and the immobilized cells in various sizes of calcium alginate.

The results showed the mixed culture had 67.21+ 12.92 % methanotrophs of total bacteria and could be used in methanol production. The variation of methane content (10-30%) gave slight differences in methanol products (413, 478 and 466 μM) when 200 mM NaCl utilized as MDH inhibitor. However, when 300 mM $MgCl_2$ was used, the methanol had more stability and reach the highest level (1,806 μM) as compared to other inhibitors of $CaCl_2$, NaCl and KCl (765, 421 and 123 μM respectively). Without any inhibitor, methanol was not found under available methane, and for biogas, 240 μM methanol was found. When $MgCl_2$ was added, methanol concentration had increased to 1,806 and 964 μM, respectively. However, considering for methanol produced to methane utilized ratio, methanol produced from biogas was higher than that from methane by giving 4,559 and 1,029 $\mu gCH_3OH/gCH_4$, respectively. In the immobilized-cells' study, $CaCl_2$ gave the most stable beads and methanol production of 737 μM in calcium alginate beads of 2 mm diameter, however lower methanol production as compared to the suspended cells' (1,509 μM). So, calcium alginate was not appropriate to immobilized methanotrophs for methanol production in this study.

Siammon Pimthong — Student's signature

W. Chiemchaisri — Thesis Advisor's signature

6 / 05 / 08

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ รศ. ดร.วิไล เจียมไชยศรี ประธานกรรมการที่ปรึกษาที่ให้ความช่วยเหลือในการวางแผนการวิจัยและให้คำปรึกษาตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สำเร็จลุล่วง ขอขอบพระคุณ รศ.ภัชราภรณ์ สุวรรณวิทยา กรรมการวิชาเอก อ.ดร.สุชาติ เหลืองประเสริฐ ประธานในการสอบวิทยานิพนธ์และผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก รศ.ดร.สุธา ขาวเธียร หัวหน้าภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้คำแนะนำในการเขียนวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอขอบพระคุณสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (KURDI) ที่ได้ให้การสนับสนุนเงินทุนในการวิจัยประจำปีงบประมาณ 2549 ขอขอบพระคุณอาจารย์ และเจ้าหน้าที่ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมทุกท่านที่ให้คำแนะนำปรึกษา และอำนวยความสะดวกในด้านสถานที่ อุปกรณ์ในการทำวิจัยจนเสร็จสมบูรณ์ ขอขอบพระคุณคุณพ่ออุบลและคุณแม่สุนิสา พิมพ์ทอง ที่ให้กำลังใจจนสำเร็จการศึกษา และเพื่อนๆ พี่ๆ ในภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ที่ช่วยเหลือและเป็นกำลังใจตลอดระยะเวลาการศึกษา

ขอขอบคุณอาจารย์และเพื่อนๆ โรงเรียนสุรนารีวิทยา รุ่น 69 รวมทั้งอาจารย์และเพื่อนๆ ภาควิชาจุลชีววิทยา รุ่น 20 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรีทุกคนที่เป็นกำลังใจให้ตลอดมา ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งใจเป็นอย่างยิ่ง จึงขอขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ. โอกาสนี้

สยามมล พิมพ์ทอง

มีนาคม 2551

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(7)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	5
อุปกรณ์และวิธีการ	29
อุปกรณ์	29
วิธีการ	30
ผลและวิจารณ์	39
สรุปและข้อเสนอแนะ	59
สรุป	59
ข้อเสนอแนะ	60
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	62
ภาคผนวก	69
ภาคผนวก ก สารเคมี วัสดุและอุปกรณ์ต่างๆ ที่ใช้ในการทดลอง	70
ภาคผนวก ข การคำนวณและผลการทดลอง	76
ภาคผนวก ค การศึกษาและวิเคราะห์จำนวนเมทาโนโทรฟ Type I และ Type II ด้วยวิธีฟิช	93
ภาคผนวก ง เอกสารประกอบการประชุมวิชาการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ ครั้งที่ 7	98
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	109

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	องค์ประกอบโดยทั่วไปของก๊าซชีวภาพ	6
2	แหล่งกำเนิดก๊าซมีเทนและปริมาณก๊าซมีเทนที่ปลดปล่อยในแต่ละปี	6
3	การเปรียบเทียบลักษณะการจำแนกเชื้อเมทาโนโทรฟ Type I, Type II และ Type X	13
4	แบคทีเรียชนิดเมทาโนโทรฟที่พบในหน้าดินกลบทับของหลุมฝังกลบมูลฝอยรัสเซีย	14
5	ตัวอย่างเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนตและผลผลิตที่ได้	28
6	สภาวะเริ่มต้นที่ใช้ในการศึกษาเบื้องต้นในการผลิตเมทานอลของเชื้อเมทาโนโทรฟ	32
7	การทดสอบอัตราส่วนระหว่างเชื้อเมทาโนโทรฟต่ออัลจิเนตที่เหมาะสม	38
8	แนวทางในการผลิตเมทานอลจากมีเทนโดยใช้เชื้อเมทาโนโทรฟผสม	61

ตารางผนวกที่

ก1	อัตราส่วนระหว่างสารละลาย A และ B ที่ใช้ในการเตรียม 12.9 มิลลิโมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์	75
ข1	ค่าเฉลี่ยปริมาณเมทานอลในแต่ละสภาวะของการทดสอบเบื้องต้น	78
ข2	ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นเมทานอลที่สภาวะต่างๆในการคัดเลือกสารละลายเพื่อใช้ปรับสภาพเชื้อเมทาโนโทรฟ	78
ข3	ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของเมทานอลในการทดสอบชนิดและความเข้มข้นของสารยับยั้ง	79
ข4	ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นเมทานอลในการทดสอบการผลิตเปรียบเทียบระหว่างมีเทนบริสุทธิ์กับก๊าซชีวภาพ	80
ข5	ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของเมทานอลจากเซลล์ที่ตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนตโดยมีอัตราส่วนระหว่างเซลล์กับอัลจิเนตต่างๆกัน	80
ข6	ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของเมทานอลที่ตรึงเซลล์ด้วยแคลเซียมอัลจิเนตโดยมีขนาดเม็ดเจลต่างๆกัน	80

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
ข7	ผลการวิเคราะห์ก๊าซในการศึกษาความเข้มข้นของมีเทนต่อกิจกรรมเมทาโนโทรฟในการทดลองแบบเป็นกะ	81
ข8	ผลการวิเคราะห์ก๊าซในการศึกษาเบื้องต้นในการผลิตเมทานอลของเมทาโนโทรฟที่คัดแยกได้	82
ข9	ผลการวิเคราะห์ก๊าซในการคัดเลือกสารละลายและขั้นตอนเพื่อใช้ในการปรับสภาพเมทาโนโทรฟให้มีความเหมาะสมต่อการผลิตเมทานอล	83
ข10	ผลการวิเคราะห์ก๊าซในการศึกษาปริมาณมีเทนที่เหมาะสมต่อการผลิตเมทานอลของเมทาโนโทรฟ	83
ข11	ผลการวิเคราะห์ก๊าซในศึกษาการผลิตเมทานอลโดยใช้เกลือร่วมกับก๊าซชีวภาพ	84
ข12	ผลการวิเคราะห์ก๊าซในศึกษาการศึกษาอัตราส่วนระหว่างเซลล์เมทาโนโทรฟและสารละลายโซเดียมอัลจิเนตที่เหมาะสม	85
ข13	ผลการวิเคราะห์ก๊าซในศึกษาการศึกษาขนาดของเม็ดเจลที่มีความเหมาะสมในกระบวนการผลิตเมทานอล	85
ค1	โพรบที่ใช้ในการศึกษาด้วยวิธีการฟลูออเรสเซนต์ไฮบริไดเซชัน	96

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้างโมเลกุลของเมทานอล	8
2	การสังเคราะห์เมทานอลจากสารตั้งต้นชนิดต่างๆ	9
3	ลักษณะภายในของเซลล์จุลินทรีย์เมทาโนโทรฟ	11
4	วิถีทางในการเกิดมีเทนออกซิเดชันและการดูดซึมฟอร์มัลดีไฮด์ของเชื้อเมทาโนโทรฟ Type I และ Type II	12
5	โครงสร้างจตุรภูมิของเอนไซม์เอสเอ็มเอ็มโอ	17
6	การจับกันระหว่างพีคิวคิวกับแคลเซียมไอออนที่บริเวณเร่งของเอ็มดีเอช	19
7	รูปแบบการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีต่างๆ	23
8	ขั้นตอนกระบวนการในการทดลองผลิตเมทานอลที่สภาวะต่างๆ	34
9	การตรึงเซลล์ด้วยแคลเซียมอัลจิเนต	36
10	เซลล์จุลินทรีย์ที่ย้อมด้วยโพรปชนิดต่างๆ ในการวิเคราะห์ฟีช	40
11	การเปลี่ยนแปลงของมีเทน คาร์บอนไดออกไซด์ และออกซิเจนในบรรยากาศมีเทนเริ่มต้นร้อยละ 10 ในการศึกษาผลของความเข้มข้นมีเทนต่อกิจกรรมเมทาโนโทรฟ	42
12	การเปลี่ยนแปลงของมีเทน คาร์บอนไดออกไซด์ และออกซิเจนในบรรยากาศมีเทนเริ่มต้นร้อยละ 20 ในการศึกษาผลของความเข้มข้นมีเทนต่อกิจกรรมเมทาโนโทรฟ	42
13	การเปลี่ยนแปลงของมีเทน คาร์บอนไดออกไซด์ และออกซิเจนในบรรยากาศมีเทนเริ่มต้นร้อยละ 30 ในการศึกษาผลของความเข้มข้นมีเทนต่อกิจกรรมเมทาโนโทรฟ	43
14	การเปลี่ยนแปลงของมีเทน คาร์บอนไดออกไซด์ และออกซิเจนในบรรยากาศมีเทนเริ่มต้นร้อยละ 40 ในการศึกษาผลของความเข้มข้นมีเทนต่อกิจกรรมเมทาโนโทรฟ	43
15	การผลิตเมทานอลตามเวลาเมื่อมีแหล่งมีเทนบริสุทธิ์และก๊าซชีวภาพภายใต้สภาวะการกระตุ้นด้วยคอปเปอร์และยับยั้งด้วยโซเดียมคลอไรด์	45

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
16	การผลิตเมทานอลต่อมวลมีเทนที่ใช้ไปเมื่อใช้มีเทนบริสุทธิ์และก๊าซชีวภาพเป็นสารอาหารภายใต้สภาวะการกระตุ้นด้วยคอปเปอร์และยับยั้งด้วยโซเดียมคลอไรด์	46
17	อัตราการผลิตเมทานอลของแต่ละสภาวะการทดลองในการคัดเลือกสารละลายและขั้นตอนในการปรับสภาพเมทาโนโทรฟ	48
18	ปริมาณเมทานอลที่ตรวจวัดในเวลา 7 วัน โดยมีความเข้มข้นมีเทนในบรรยากาศแตกต่างกัน	49
19	การเปลี่ยนแปลงของเมทานอล มีเทน คาร์บอนไดออกไซด์และออกซิเจนในบรรยากาศมีเทนเริ่มต้นร้อยละ 10	50
20	การเปลี่ยนแปลงของเมทานอล มีเทน คาร์บอนไดออกไซด์และออกซิเจนในบรรยากาศมีเทนเริ่มต้นร้อยละ 20	50
21	การเปลี่ยนแปลงของเมทานอล มีเทน คาร์บอนไดออกไซด์และออกซิเจนในบรรยากาศมีเทนเริ่มต้นร้อยละ 30	51
22	ผลของความเข้มข้นและชนิดของเกลือโปแทสเซียมคลอไรด์ โซเดียมคลอไรด์ แมกนีเซียมคลอไรด์ และแคลเซียมคลอไรด์ในการผลิตเมทานอล	52
23	ปริมาณเมทานอลที่ตรวจพบโดยใช้ 300 มิลลิโมลาร์แมกนีเซียมคลอไรด์เป็นสารยับยั้งเมทานอลดีไฮโดรจีเนส เปรียบเทียบระหว่างสภาวะที่มีก๊าซมีเทนและก๊าซชีวภาพในบรรยากาศในการทดลอง	53
24	ผลผลิตเมทานอลต่อปริมาณมีเทนที่ใช้ไปและอัตราการออกซิเดชันมีเทนต่อเซลล์ต่อวันที่ตรวจพบโดยใช้ 300 มิลลิโมลาร์ แมกนีเซียมคลอไรด์เป็นสารยับยั้งเมทานอลดีไฮโดรจีเนสในการผลิตเมทานอล เปรียบเทียบสภาวะที่มีมีเทนบริสุทธิ์และก๊าซชีวภาพในการทดลอง	54
25	เม็ดเจลของแคลเซียมอัลจิเนตเริ่มต้นก่อนเข้าสู่ระบบ	55
26	เม็ดเจลที่อยู่ในตัวกลางสารยับยั้งชนิดต่างๆ จากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า	56
27	ปริมาณเมทานอลที่ตรวจวัดที่เวลาต่างๆ โดยมีอัตราส่วนเซลล์ต่ออัลจิเนตแตกต่างกัน เมื่อใช้แคลเซียมคลอไรด์เป็นสารยับยั้งเมทานอลดีไฮโดรจีเนสที่ขนาด 3 มิลลิเมตร	57

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

28 ปริมาณเมทานอลที่ตรวจวัดที่เวลาต่างๆ โดยมีขนาดเม็ดเจลแตกต่างกัน เมื่อใช้แคลเซียมคลอไรด์เป็นสารยับยั้งเมทานอลดีไฮโดรจีเนส 58

ภาพผนวกที่

ก1 ขวดซีรัมขนาด 25 และ 118 มิลลิลิตรที่ใช้ในการทดลอง 71
ก2 ขวดซีรัมขนาด 25 มิลลิลิตรที่บรรจุเชื้อเมทาโนโทรฟในอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็นเอ็มเอส 71
ก3 สารเคมีโซเดียมอัลจิเนตของบริษัทซิกมาที่ใช้ในการทดลอง 72
ข1 กราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของเมทานอลกับพื้นที่ใต้กราฟโครมาโตกราฟ 77
ข2 กราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงมวลของก๊าซในขวดทดลองเมื่อเทียบกับเวลา 91
ข3 ผลการศึกษาอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันในการทดสอบปริมาณก๊าซมีเทนเริ่มต้นในการเลี้ยงเชื้อเมทาโนโทรฟ 92
ข4 ผลการศึกษาอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันในการศึกษาปริมาณมีเทนที่มีความเหมาะสมต่อการผลิตเมทานอลของเมทาโนโทรฟผสม 92

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

$CaCl_2$	=	แคลเซียมคลอไรด์ (Calcium Chloride)
FAD	=	ฟลาวินอะดินีนไดนิวคลีโอไทด์ (Flavin Adenine Dinucleotide)
g	=	กรัม (gram)
FADH	=	ฟอร์มัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส (Formaldehyde Dehydrogenase)
FISH	=	ฟลูออเรสเซนส์อินซิตูไฮบริไดซ์เซชัน (Fluoresence in Situ Hybridization)
KCl	=	โปแทสเซียมคลอไรด์ (Potassium Chloride)
kDa	=	กิโลดอลตัน (Kilo Dalton)
hr.	=	ชั่วโมง (Hour)
MeOH	=	เมทานอล (Methanol)
$MgCl_2$	=	แมกนีเซียมคลอไรด์ (Magnesium Chloride)
MDH	=	เมทานอลดีไฮโดรจีเนส (Methanol Dehydrogenase)
ml.	=	มิลลิลิตร (Millilites)
ml/min	=	มิลลิลิตรต่อนาที (Millilites per minute)
MMO	=	มีเทนมอนอออกซีจีเนส (Methane Monooxygenase)
MOR	=	อัตรามีเทนออกซิเดชัน (Methane Oxidation Rate)
NaCl	=	โซเดียมคลอไรด์ (Sodium Chloride)
NADH	=	นิโคตินาไมด์อะดินีนไดนิวคลีโอไทด์ (Nicotinamind Adenine Dinucleotide)
NMS	=	ไนเตรทมิเนอร์รอลซอลต์ (Nitrate Mineral Salt)
PQQ	=	ไพโรโลควิโนลีน ควินนีน (Pyrroloquinoline quinine)
μ	=	ไมโคร (Micro)
n	=	นาโน (Nano)
^{o}ซ	=	องศาเซลเซียส (Degree Celsius)

การผลิตเมทานอลจากมีเทนด้วยเชื้อเมทาโนโทรฟ

Methanol Production from Methane Using Methanotrophs

คำนำ

การใช้น้ำมันเป็นมาเป็นแหล่งพลังงานเป็นสิ่งที่สำคัญสำหรับการผลิตในอุตสาหกรรม เนื่องจากเชื้อเพลิงของโลกมีจำนวนจำกัด และมีราคาสูง การใช้ก๊าซมีเทนจากกระบวนการบำบัดของเสียแบบไร้อากาศ หรือจากหลุมฝังกลบมูลฝอยเป็นเชื้อเพลิงโดยตรงเป็นวิธีการหนึ่งที่ได้รับความนิยม แต่วิธีนี้มีข้อจำกัดคืออัตราการผลิตก๊าซมีเทนไม่แน่นอนและมีความแปรปรวนค่อนข้างมาก และยังมีค่าใช้จ่ายสูงในการทำให้ก๊าซมีเทนมีความบริสุทธิ์มากขึ้น ในธรรมชาติมีเชื้อเมทาโนโทรฟ (methanotroph) สามารถเปลี่ยนมีเทนเป็นเมทานอลในสภาพที่มีอากาศได้ซึ่งพบตามแหล่งที่มีมีเทน เช่น หน้าดินหลุมฝังกลบมูลฝอย การเปลี่ยนรูปมีเทนที่ผลิตจากกระบวนการดังกล่าวให้เป็นเมทานอลมีข้อดีคือ สามารถนำเมทานอลไปใช้ในกระบวนการต่างๆ ได้อย่างกว้างขวางมากขึ้น นอกจากนี้เมทานอลยังเก็บรักษาได้ง่ายและสะดวกในการขนส่งกว่าก๊าซมีเทน (Grisalba and Heinzer, 1982)

โดยปกติแล้วเมทานอลเป็นแอลกอฮอล์ที่ได้จากกระบวนการกลั่นไม้ใต้สภาวะไร้อากาศ จึงเรียกว่า แอลกอฮอล์จากไม้ (wood alcohol) ยังสามารถเตรียมได้จากกระบวนการแยกเมทานอลจากถ่านหิน (liquefaction) กระบวนการหมัก (fermentation) วัสดุอินทรีย์ประเภทต่างๆ เช่น เยื่อไม้ กากพืชไร่ เศษผักผลไม้ สำหรับการเปลี่ยนรูปของมีเทนเป็นเมทานอลโดยกระบวนการทางเคมีเป็นไปได้แต่ต้องใช้พลังงานที่สูงมาก ซึ่งตรงกันข้ามกับกระบวนการทางชีวภาพที่ใช้พลังงานต่ำ (Grisalba and Heinzer, 1982) โดยกระบวนการเมตะบอลิซึมของเมทาโนโทรฟจะใช้มีเทนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานในสภาพที่มีออกซิเจน แล้วให้ผลิตภัณฑ์เป็นเมทานอลโดยอาศัยเอนไซม์ที่มีชื่อว่ามีเทนมอนอออกซิจีเนส (methane monooxygenase: MMO) (สมการที่ 1) หลังจากนั้นเมทานอลจะถูกนำไปใช้ต่อในเซลล์โดยเปลี่ยนเป็นฟอร์มัลดีไฮด์ ด้วยเอนไซม์เมทานอล-ดีไฮโดรจีเนส (methanol dehydrogenase: MDH) ผลผลิตสุดท้ายของกระบวนการคือคาร์บอนไดออกไซด์ (Hanson and Hanson, 1996) ดังสมการที่ 2

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

$$CH_3OH \xrightarrow{MDH} HCHO \xrightarrow{FADH} HCOOH \xrightarrow{FAD} CO_2 \qquad (2)$$

(หมายเหตุ MMO: Methane monooxygenase MDH: Methanol dehydrogenase;
FADH: Formaldehyde dehydrogenase; FAD: Formate dehydrogenase)

การผลิตเมทานอลโดยเมทาโนโทรฟจึงจำเป็นต้องยับยั้ง เมทานอลดีไฮโดรจีเนส (Grisalba and Heinzer, 1982; Furoto *et al.*, 1999; Lee *et al*. 2004; Xin *et al.*, 2004) เนื่องจากกรดอะมิโนลิวซิว (lysyl residues) ซึ่งอยู่บนผิวของเมทานอลดีไฮโดรจีเนสกับหมู่คาร์บอกซีเลท (carboxylate) บนผิวของ cytochrome c_L เชื่อมต่อกันด้วยแรงไอออนนิค (ionic interactions) Cox *et al.* (1992) พบว่าสารที่มีแรงไอออนิคสูง ได้แก่ สารละลายเกลือสามารถยับยั้งการเคลื่อนย้ายอิเล็คตรอนระหว่างเมทานอลดีไฮโดรจีเนสและ cytochrome c_L ทำให้เมทานอลดีไฮโดรจีเนส ไม่สามารถทำงานได้ โดย Lee *et al*.(2004) รายงานว่าความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 200 มิลลิโมลาร์เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการยับยั้งเมทานอลดีไฮโดรจีเนส อย่างไรก็ตามไม่มีการรายงานถึงการใช้เกลือชนิดอื่นๆ ในการยับยั้งเมทานอลดีไฮโดรจีเนสในการผลิตเมทานอล นอกจากนี้คาร์บอนไดออกไซด์ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายในกระบวนการเมทาบอลิซึมของเมทาโนโทรฟนั้นก็สามารถยับยั้งเมทานอลดีไฮโดรจีเนส ได้เช่นกันโดย Xin *et al.* (2004) ได้รายงานการปริมาณอัตราส่วนของก๊าซแต่ละชนิดที่เหมาะสมต่อการผลิตเมทานอลโดยเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์ *Methylosinus trichosporium* OB3b คือ มีเทนร้อยละ 20 ออกซิเจนร้อยละ 20 ไนโตรเจนร้อยละ 20 และคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 40 ในระบบการผลิตแบบต่อเนื่อง

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาการผลิตเมทานอลโดยเชื้อเมทาโนโทรฟผสมซึ่งมีข้อดีกว่าการใช้เชื้อบริสุทธิ์เนื่องจากไม่จำเป็นต้องระวังเรื่องการปนเปื้อนเชื้อภายนอกมากนัก โดยทำการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของเกลือที่มีความเหมาะสมในการยับยั้งเมทานอลดีไฮโดรจีเนส ชนิดของสารละลายในการผลิตเมทานอล ปริมาณมีเทนที่มีความเหมาะสมในการผลิตเมทานอล การใช้เกลือร่วมกับก๊าซชีวภาพในการผลิตเมทานอลแบบเซลล์แขวนลอยและการผลิตเมทานอลโดยการตรึงเซลล์ด้วยแคลเซียมอัลจิเนต โดยการตรึงเซลล์ด้วยแคลเซียมอัลจิเนตเป็นวิธีที่ปลอดภัยและได้รับการยอมรับให้ใช้เป็นวัตถุเจือปนในอาหารได้ (สมใจ, 2545; ดุษฎี, 2546) เนื่องจากเมทาโนโทรฟเป็นแบคทีเรียที่มีโปรตีนสูง (Hanson and Hanson, 1996) ดังนั้นการตรึงเซลล์ด้วยแคลเซียมอัลจิเนตจึงสามารถนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์ได้หลังจากสิ้นสุดกระบวนการ นอกจากนั้นยังรักษาสภาพแบคทีเรียได้นานสามารถนำมาใช้ต่อได้หลายครั้ง (สมใจ, 2545; ดุษฎี, 2546)

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาสภาวะต่างๆ ที่มีผลต่อกระบวนการผลิตเมทานอลจากก๊าซมีเทนทางชีวภาพของจุลินทรีย์เมทาโนโทรฟแบบผสมในเซลล์แขวนลอย ได้แก่ ปริมาณมีเทนที่มีความเหมาะสมต่อกิจกรรมของเมทาโนโทรฟ อุณหภูมิ ชนิดของสารละลายและขั้นตอนที่ใช้ในการปรับสภาพเชื้อเมทาโนโทรฟในการผลิตเมทานอล ปริมาณมีเทนที่มีความเหมาะสมในการผลิตเมทานอล ชนิดและความเข้มข้นของเกลือที่มีความเหมาะสมในการยับยั้งเอนไซม์เมทานอลดีไฮโดรจีเนส และการศึกษาการใช้เกลือร่วมกับก๊าซชีวภาพในการผลิตเมทานอล

2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเมทานอลโดยเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ได้แก่ ชนิดของเกลือที่ใช้เป็นสารยับยั้งเมทานอลดีไฮโดรจีเนสที่มีผลต่อความคงตัวของเม็ดเจล อัตราส่วนเซลล์ต่อแคลเซียมอัลจิเนต และ ขนาดของเม็ดเจล

ขอบเขตของการวิจัย

1. การทดลองใช้ระบบการผลิตเมทานอลแบบเป็นกะในห้องปฏิบัติการทั้งหมด โดยเชื้อเมทาโนโทรฟที่ใช้เป็นเชื้อเมทาโนโทรฟแบบผสมซึ่งคัดแยกจากดินหลุมฝังกลบจำลอง

2. ก๊าซมีเทนบริสุทธิ์ที่ใช้ในการทดลองคือก๊าซมีเทนความบริสุทธิ์ร้อยละ 99.9 และก๊าซชีวภาพสังเคราะห์ที่ใช้มีอัตราส่วนระหว่างก๊าซมีเทนต่อก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เท่ากับ 60 ต่อ 40

3. การตรวจหาชนิดเชื้อเมทาโนโทรฟแบคทีเรีย Type I และ Type II ด้วยวิธีการฟิช

4. สารยับยั้งเมทานอลดีไฮโดรจีเนสที่ใช้คือ เกลือโซเดียมคลอไรด์ แมกนีเซียมคลอไรด์ แคลเซียมคลอไรด์ และโปแทสเซียมคลอไรด์

5. วัสดุที่ใช้ในการตรึงเซลล์ในการวิจัยคือแคลเซียมอัลจิเนต

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถผลิตเมทานอลจากก๊าซชีวภาพโดยแบคทีเรียเมทาโนโทรฟได้อย่างมีประสิทธิภาพในระบบการผลิตแบบเป็นกะทั้งในรูปแบบเซลล์แขวนลอยและเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต

การตรวจเอกสาร

1. ก๊าซชีวภาพ

ก๊าซชีวภาพ (biogas) คือ ก๊าซที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ จากปฏิกิริยาย่อยสลายพวกอินทรียวัตถุต่าง ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน ฯลฯ ซึ่งเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ (พัชริน, 2538; วีรพันธ์, 2538; มงคลและคณะ, 2535) การย่อยสลายจะเกิดขึ้นโดยการทำปฏิกิริยาของจุลินทรีย์ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน (anaerobic process) ผลผลิตที่ได้จากการย่อยสลาย คือ ก๊าซผสมหลายชนิดขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรีย (กรมควบคุมมลพิษ, 2540)

1.1 องค์ประกอบและแหล่งกำเนิดของก๊าซชีวภาพ

องค์ประกอบส่วนใหญ่ของก๊าซชีวภาพจะเป็นก๊าซมีเทน (CH_4) ร้อยละ 50 – 70 และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ร้อยละ 25 – 40 ส่วนที่เหลือเป็นก๊าซอื่นๆ เช่น ก๊าซไนโตรเจน ก๊าซไฮโดรเจน ก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ และก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ องค์ประกอบของก๊าซชีวภาพแสดงในตารางที่ 1

ก๊าซมีเทนเป็นก๊าซที่มีปริมาณมากที่สุดในองค์ประกอบของก๊าซชีวภาพ ในแต่ละปีมีการปลดปล่อยก๊าซมีเทนออกมาสู่ชั้นบรรยากาศโลกเป็นจำนวนมาก แหล่งธรรมชาติที่มีการปลดปล่อยก๊าซมีเทน ได้แก่ พื้นที่ชุมน้ำ บ่อน้ำ นาข้าว ฯลฯ นอกจากนี้ยังมีการแพร่ระบายออกมาจากอุตสาหกรรมปิโตรเลียม มูลสัตว์ โรงงานบำบัดน้ำเสีย หลุมฝังกลบมูลฝอย แหล่งกำเนิด ก๊าซมีเทนและปริมาณก๊าซมีเทนที่ปลดปล่อยดังแสดงในตารางที่ 2

1.2 อิทธิพลของก๊าซชีวภาพต่อสภาพภูมิอากาศโลก

เนื่องจากก๊าซชีวภาพมีมีเทนและคาร์บอนไดออกไซด์เป็นองค์ประกอบซึ่งเป็นก๊าซที่ก่อให้เกิดสภาวะเรือนกระจกทั้งคู่ แต่ก๊าซมีเทนจะส่งผลกระทบมากกว่าเพราะก๊าซมีเทนสามารถดูดความร้อนในชั้นบรรยากาศมากกว่าคาร์บอนไดออกไซด์ถึง 21 เท่า โดยผลกระทบของก๊าซเรือนกระจกที่มีผลต่อโลกมีดังนี้ (IPCC, 1992)

ตารางที่ 1 องค์ประกอบโดยทั่วไปของก๊าซชีวภาพ

องค์ประกอบ	ร้อยละโดยปริมาตร
มีเทน	50 – 70
คาร์บอนไดออกไซด์	25 – 40
ไนโตรเจน	0.5 – 3.0
ไฮโดรเจน	0.5 – 1.5
คาร์บอนมอนอกไซด์	0.5 – 1.5
ไฮโดรเจนซัลไฟด์	0.01 – 0.5
ก๊าซอื่นๆ	0.01 – 0.5

ที่มา: กรมควบคุมมลพิษ (2538)

ตารางที่ 2 แหล่งกำเนิดก๊าซมีเทนและปริมาณก๊าซมีเทนที่ปลดปล่อยในแต่ละปี

แหล่งกำเนิด	ปริมาณการปลดปล่อยก๊าซมีเทน (ตัน/ปี)		
	1970	1990	2050
นาข้าวที่ชุ่มน้ำ	53	59	52
พื้นที่ชุ่มน้ำตามธรรมชาติ	111	111	111
หลุมฝังกลบมูลฝอย	24	36	81
การบำบัดของเสียชุมชน	17	25	47
สัตว์เคี้ยวเอื้อง	66	79	161
มูลสัตว์	12	14	28
ปลวก	20	20	20
แหล่งน้ำ	15	15	15
การเผาไหม้มวลชีวภาพ			
- การตัดไม้ทำลายป่า	16	14	12
- การเผาทุ่งหญ้า	17	16	6
- การเผาของเสียจากการเกษตร	7	8	9

ที่มา: Kreileman and Bouwman (1994)

1) ผลกระทบต่อภูมิอากาศ คือ ทำให้เกิดภาวะความกดดันของอากาศเพิ่มขึ้นซึ่งก่อให้เกิดมรสุมพัดแรงกว่าปัจจุบัน เกิดหิมะละลายและเกิดน้ำเซาะดินพังทลาย

2) ผลกระทบต่อแหล่งน้ำ คือ เกิดความแห้งแล้งขึ้นในบางพื้นที่ เกิดปัญหาพืชมีความต้องการน้ำสูงขึ้นเนื่องจากเกิดการเร่งอัตราการสังเคราะห์แสงของพืช

3) ผลกระทบต่อพลังงาน คือ ความแปรปรวนของภูมิอากาศซึ่งเป็นอุปสรรคต่อการสำรวจค้นหาแหล่งน้ำมันดิบ

4) ผลกระทบต่อการเกษตรกรรม คือ อาจมีพืชบางพันธุ์สูญพันธุ์ไปเนื่องจากไม่สามารถปรับตัวได้กับการแปรปรวนของภูมิอากาศ

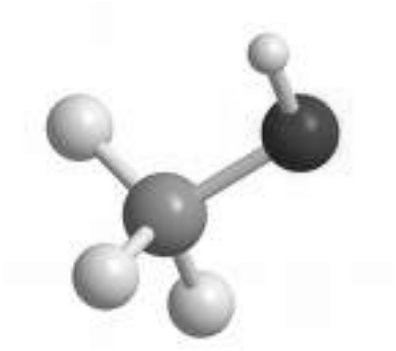
5) ผลกระทบต่อระดับน้ำทะเล คือ ถ้าโลกมีอุณหภูมิสูงขึ้น 1.5 – 4.5 ^{o}ซ จะทำให้ระดับของน้ำทะเลสูงขึ้น 0.4 – 1.2 เมตร เนื่องจากการละลายของน้ำแข็งขั้วโลก

1.3 การนำก๊าซชีวภาพมาใช้ประโยชน์

เนื่องจากก๊าซชีวภาพมีระดับของก๊าซมีเทนค่อนข้างสูง จึงนิยมนำก๊าซชีวภาพมาใช้ประโยชน์ในการเป็นเชื้อเพลิงสำหรับเตาหุงต้ม ผลิตพลังงานไฟฟ้า หม้อต้มไอน้ำฯ (สมพงษ์, 2549) โดยเฉพาะจากหลุมฝังกลบมูลฝอยมาเป็นเชื้อเพลิง (EMCON, 1980) อย่างไรก็ตามการใช้มีเทนโดยตรงจากก๊าซธรรมชาติ มีข้อจำกัดกล่าวคืออัตราการผลิตก๊าซชีวภาพไม่แน่นอนและมีความแปรปรวนค่อนข้างมากซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของสารอินทรีย์และสภาพภูมิอากาศ นอกจากนี้ยังมีค่าใช้จ่ายสูงในการทำให้ก๊าซมีเทนมีความบริสุทธิ์มากขึ้นและการเก็บรักษาก๊าซมีเทนยุ่งยากและมีอันตราย

2. เมทานอล

เมทานอล (methanol) หรือ เมทิลแอลกอฮอล์ (methyl alcohol) มีสูตรโมเลกุลคือ CH_3OH และมีโครงสร้างของโมเลกุลดังภาพที่ 1 เมทานอลมีมวลโมเลกุล 32.04 มีสถานะเป็นของเหลว ใส ละลายน้ำได้ในทุกอัตราส่วนจุดเดือดและจุดเยือกแข็งเท่ากับ 64.7 และ –97.8 ^{o}ซ ตามลำดับ ความหนาแน่น 0.7915 กรัมต่อมิลลิลิตร (ประเสริฐ, 2546; Bailey and Bailey, 2000)



ภาพที่ 1 โครงสร้างโมเลกุลของเมทานอล
ที่มา: Jordan (2008)

เมทานอลเป็นแอลกอฮอล์ประเภทหนึ่งที่มีการใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวาง โดยในปี คศ. 1980 มีการผลิตเมทานอลในโลกประมาณ 12 ล้านเมตริกตัน (Ghisalba and Heizer, 1982) เมทานอลสามารถใช้เป็นพลังงานโดยตรงทดแทนพลังงานน้ำมันเชื้อเพลิง หรือใช้ในกระบวนการผลิตในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น การผลิตสี การล้างอุปกรณ์ต่างๆ การใช้เป็นตัวทำละลาย เป็นวัตถุดิบในการผลิตฟอร์มาลดีไฮด์ (ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตเรซินและพลาสติก) กรดน้ำส้ม เมทิลเอมีน คลอโรมีเทน (chloromethanes) เมทิลเมทาคริเลต (methyl-methacrylate) สารไดเมทิลเตตรา-พาทาเลต หรือดีเอ็มที (dimethyl terephthalate: DMT) และสารเมทิลเทอชีรี่บิวทิลอีเทอร์ (methyl-butyl ether: MTBE) สารป้องกันการแข็งตัว เป็นต้น (ประเสริฐ, 2546; Weissermel and Arpe, 1993)

เนื่องจากเมทานอลเป็นแอลกอฮอล์ที่ได้จากกระบวนการกลั่นไม้ใต้สภาวะไร้อากาศจึงเรียกว่า แอลกอฮอล์จากไม้ (wood alcohol) และยังสามารถเตรียมได้จากกระบวนการแยกเมทานอลจากถ่านหิน (liquefaction) กระบวนการหมัก (fermentation) วัสดุอินทรีย์ประเภทต่างๆ เช่น เยื่อไม้ กากพืชไร่ เศษผักผลไม้ หรือกระบวนการเปลี่ยนก๊าซธรรมชาติเป็นเมทานอลโดยอาศัยตัวเร่งปฏิกิริยา (catalyst) (Grisalba and Heinzer, 1982) ดังแสดงในภาพที่ 2

สำหรับกระบวนการสังเคราะห์เมทานอลโดยการใช้ก๊าซชีวภาพหรือก๊าซมีเทนเป็นสารตั้งต้นนั้นมีข้อดีหลายประการ เช่น เมทานอลสะดวกในการขนย้าย การบรรจุมากกว่ามีเทนเนื่องจากการขนส่งมีเทนในสถานะของของเหลวภายใต้ความดันบรรยากาศจะต้องเก็บควบคุมและรักษาอุณหภูมิที่ – 162 ^{o}ซ (Grisalba and Heinzer, 1982) และเมทานอลสามารถนำไปใช้งานมีเทน อีกทั้งการเปลี่ยนมีเทนเป็นเมทานอลนั้นยังช่วยลดก๊าซเรือนกระจก ซึ่งทำให้เกิดปัญหาสภาวะโลกร้อน โดยกระบวนการที่ใช้ในการเปลี่ยนมีเทนเป็นเมทานอลนั้นมีทั้งกระบวนการทางเคมีและชีวภาพ

สำหรับการสังเคราะห์เมทานอลจากมีเทนด้วยกระบวนการทางเคมีนั้นอาศัยพื้นฐานจาก 3 สมการดังนี้ (Grisalba and Heinzer, 1982)

1) กระบวนการรีฟอร์มมิ่งด้วยไอน้ำ (stream reforming)

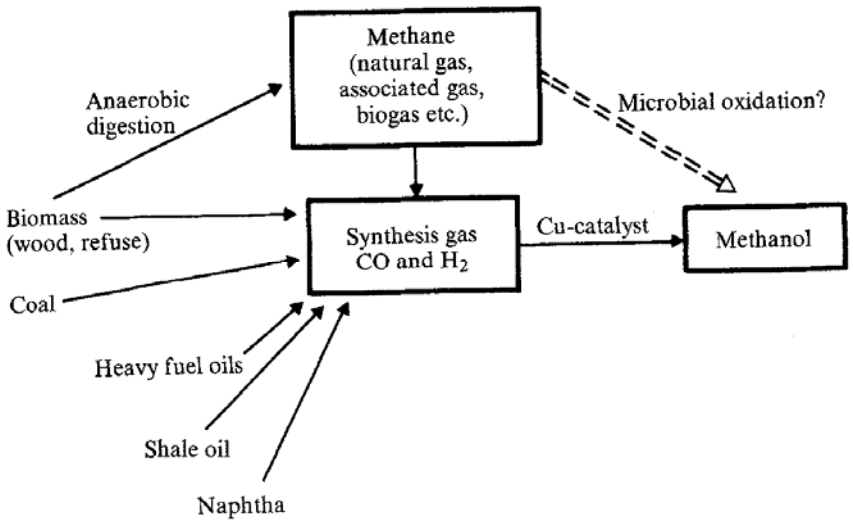
$$CH_4 + H_2O \xrightarrow[700 - 900\ ^{o}C,\ 1 - 25\ bar]{\text{Ni-catalyst } (15 - 20\ \%\ on\ Al_2O_3\ or\ SiO_2)} CO + 3H_2 \qquad (3)$$

2) กระบวนการเปลี่ยนคาร์บอนไดออกไซด์เป็นคาร์บอนมอนอกไซด์ (shift reaction)

$$CO_2 + H_2 \xrightarrow{\text{Ni-catalyst}} CO + H_2O \qquad (4)$$

3) กระบวนการสังเคราะห์เมทานอลโดยใช้ความดันต่ำ (low pressure methanol synthesis)

$$CO + 2H_2 \xrightarrow[230 - 280\ ^{o}C,\ 50 - 100\ bar]{\text{Cu-catalyst}} CO + 3H_2 \qquad (5)$$



ภาพที่ 2 การสังเคราะห์เมทานอลจากสารตั้งต้นชนิดต่างๆ

ที่มา: Ghisalba and Heinzer (1982)

เนื่องจากกระบวนการสังเคราะห์เมทานอลทางเคมีโดยอาศัยสมการข้างต้นนั้นมีประสิทธิภาพต่ำโดยต้องให้พลังงานตั้งต้นของปฏิกิริยาสูงถึงร้อยละ 60 ของพลังงานที่ได้รับจากเมทานอลซึ่งเป็นผลผลิตจากกระบวนการ (Grisalba and Heinzer, 1982) นอกจากนั้นยังมีข้อจำกัดอีกหลายประการ เช่น ค่าใช้จ่ายที่ใช้ในการจัดตั้ง ดำเนินการและดูแลระบบสูง ต้องการความร้อนสูงในระหว่างเกิดปฏิกิริยา และสารเร่งปฏิกิริยาเป็นสารกัดกร่อน (corrosive) ซึ่งเป็นอันตรายต่อผู้ปฏิบัติงานและสิ่งแวดล้อม (Grisalba and Heinzer, 1982; Xin *et al*., 2004) ด้วยข้อจำกัดดังกล่าวทำให้การผลิตเมทานอลจากมีเทนด้วยกระบวนการทางชีวภาพได้รับความสนใจมากกว่า เนื่องจากการผลิตเมทานอลจากมีเทนในกระบวนการทางชีวภาพไม่จำเป็นต้องใช้สารเคมีที่เป็นอันตราย พลังงานที่ใช้น้อยกว่ากระบวนการทางเคมีมากและมีค่าใช้จ่ายที่ต่ำกว่าอีกด้วย (Xin *et al*., 2004) โดยการผลิตเมทานอลจากมีเทนด้วยกระบวนการทางชีวภาพนั้นจะอาศัยกระบวนการมีเทน-ออกซิเดชั่นของจุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการใช้มีเทนซึ่งมีชื่อว่าเมทาโนโทรฟ (methanotroph)

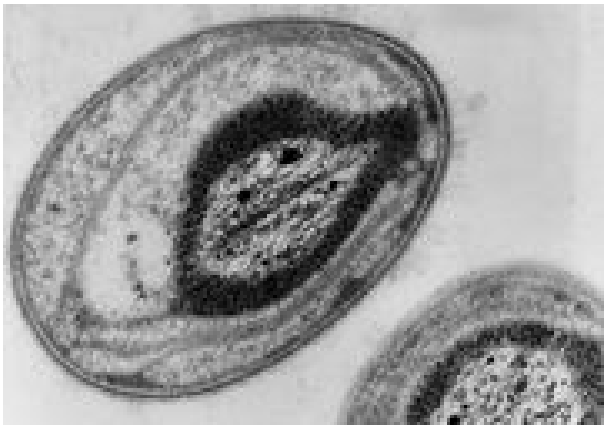
3. เมทาโนโทรฟ

เมทาโนโทรฟ (methanotroph) หรือ เมทาโนโทรฟิคแบคทีเรีย (methanotrophic bacteria) เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (gram negative) มีลักษณะดังภาพที่ 3 โดยเมทาโนโทรฟจัดเป็นแบคทีเรียในกลุ่มเมทิลโลโทรฟ (methylotroph) เมทิลโลโทรฟเป็นแบคทีเรียที่ใช้อากาศ (aerobic) ซึ่งสามารถใช้สารประกอบที่มีคาร์บอน 1 อะตอม เช่น มีเทน (CH_4) เมทานอล (CH_3OH) เมทิลเลท-เอมีน เมทิลเอไมด์ ฮาโลมีเทน ฟอร์เมท และสารประกอบเมทิลที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ สารประกอบหมู่ 7 ของมีเทน (halomethane) และสารประกอบเมทิลที่มีซัลเฟอร์เป็นแหล่งของพลังงานและคาร์บอน บางชนิดสามารถใช้หมู่เมทิลโดยการแตกของสารประกอบอินทรีย์ที่มีคลอรีนหรือยาฆ่าแมลงพวกคาร์โบฟูแรน (carbofuran) สำหรับจุลินทรีย์กลุ่มเมทาโนโทรฟใช้คาร์บอนอะตอมจากก๊าซมีเทนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานในการเจริญ (Anthony, 1982, 1986, 1991) โดยในปี ค.ศ. 1906 Sohgen *et al*. ได้แยกแบคทีเรียตัวแรกที่สามารถออกซิไดซ์มีเทนในสภาวะที่มีอากาศ คือ *Bacillus methanicus* ซึ่งถือว่าเป็นจุลินทรีย์เมทาโนโทรฟตัวแรกที่ค้นพบ

3.1 การจำแนกเชื้อเมทาโนโทรฟทางกายภาพและชีวเคมี

เมทาโนโทรฟเป็นแบคทีเรียที่ใช้คาร์บอนอะตอมจากก๊าซมีเทนเป็นแหล่งคาร์บอนและ

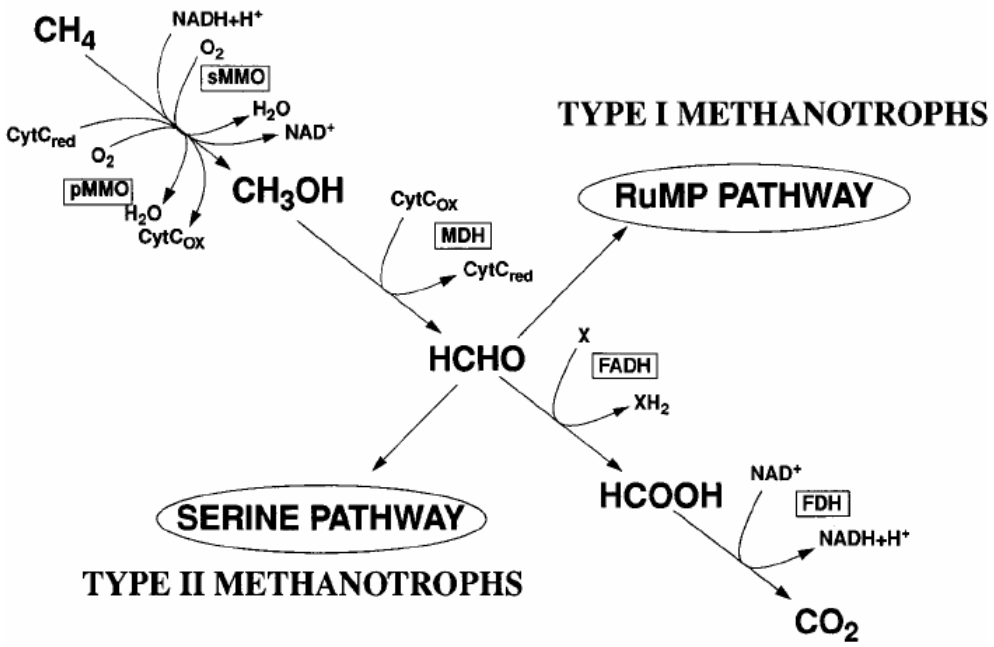
พลังงานในการเจริญ โดย Whittenbury *et al*. (1970, 1984) ได้จำแนกเมทาโนโทรฟได้กว่า 100 ชนิด โดยอาศัยลักษณะรูปร่างของเซลล์ (cell morphology) รูปแบบของระยะพัก (resting stages formed)



ภาพที่ 3 ลักษณะภายในของเซลล์จุลินทรีย์เมทาโนโทรฟ
ที่มา: Artike (2008)

ลักษณะโครงสร้างของเยื่อหุ้มไซโตพลาสมิค (fine structure intracytoplamic membrane) และลักษณะภายนอกทั่วไป (physiological characteristics) โดยสามารถแบ่งเชื้อเมทาโนโทรฟดังกล่าวออกเป็น 2 ชนิดด้วยกัน คือ เมทาโนโทรฟ Type I ซึ่งมีลักษณะรูปร่างเป็นแท่งหรือรูปร่างเป็นทรงกลม ไม่สามารถเจริญในที่ที่มีอุณหภูมิสูงได้ (ประมาณ 45 °ซ) ลักษณะของเยื่อหุ้มไซโตพลาสมิคมีลักษณะเรียงเป็นแผ่นซ้อนกันคล้ายแผ่นจาน ภายในเซลล์มีรูปแบบของระยะพักอยู่ในรูปของซิสท์ (cyst) ได้แก่ สายพันธุ์ *Methylomonas* spp.และ *Methylobacter* spp.ในขณะที่เชื้อเมทาโนโทรฟ Type II มีลักษณะรูปร่างเป็นแท่งและในบางชนิดมีรูปร่างเป็นวงรี ไม่สามารถเจริญในที่ที่มีอุณหภูมิสูงได้ (ประมาณ 45 °ซ) ลักษณะของเยื่อหุ้มไซโตพลาสมิดมีลักษณะเป็นเยื่อหุ้ม 2 ชั้นขนานไปกับผนังเซลล์ รูปแบบของระยะพักอยู่ในรูปของซิสท์ (cyst) และสปอร์ (spore) ได้แก่ สายพันธุ์ *Methylosinus* spp.และ *Methylocystis* spp. ต่อมาได้มีการศึกษาโดยนักวิจัยหลายท่านซึ่งได้สรุปว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้จะอาศัยเอนไซม์มีเทนมอนอออกซี-จีเนสหรือเอ็มเอ็มโอ (Methane Monoxygenase: MMO) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการออกซิเดชันก๊าซมีเทนให้เปลี่ยนรูปเป็นเมทานอลและฟอร์มัลดีไฮด์ตามลำดับ ซึ่งฟอร์มัลดีไฮด์นี้เป็นสารตัวกลางที่สำคัญในการนำไปใช้ประโยชน์ของเซลล์และผลของปฏิกิริยาขั้นสุดท้าย คือ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ดังแสดงในภาพที่ 4 โดยเซลล์จะสามารถนำฟอร์มัลดีไฮด์เข้ามาใช้ประโยชน์ในเซลล์นั้นจะมีทางในการนำเข้าสู่เซลล์ 2 รูปแบบด้วยกัน คือ วิธีอาร์ยูเอ็มพี (RuMP pathway) และวิธีซีรีน (Serine pathway) โดยรูปแบบในการนำเอาฟอร์มัลดีไฮด์เข้าสู่เซลล์นั้นทำให้สามารถจำแนกเชื้อเมทาโนโทรฟออกเป็น 2 ชนิด

ด้วยกัน คือ ชนิดที่นำฟอร์มัลดีไฮด์เข้าสู่เซลล์ด้วยวิธีอาร์ยูเอ็มพีจัดเป็นเมทาโนโทรฟ Type I และชนิดที่นำเอาฟอร์มัลดีไฮด์เข้าสู่เซลล์ด้วยวิธีซีรีนจัดเป็นเมทาโนโทรฟ Type II (Anthony, 1982, 1986, 1991; Large and Bamforth, 1988) นอกจากนี้ยังพบเมทาโนโทรฟสายพันธุ์ใหม่ คือ เมทาโนโทรฟ Type X คือ *Methylococcus capsulatus* เนื่องจากมีลักษณะบางประการร่วมกันระหว่างเมทาโนโทรฟ Type I และ Type II แต่มีลักษณะรูปร่างโดยส่วนใหญ่เป็นทรงกลมและมักพบเป็นคู่ (dicocci) สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 45 °ซ และมีลักษณะของเยื่อหุ้มไซโตพลาสมิดเรียงเป็นแผ่นซ้อนกันคล้ายแผ่นจาน รูปแบบของระยะพักอยู่ในรูปของซิสท์ (cyst) อาศัยกระบวนการวิธีอาร์ยูเอ็มพีและวิธีซีรีนในการดูดซึมฟอร์มัลดีไฮด์เข้าไปใช้ประโยชน์ภายในเซลล์ โดยสามารถสรุปลักษณะเฉพาะของเมทาโนโทรฟแต่ละชนิดดังแสดงในตารางที่ 3



ภาพที่ 4 วิถีทางในการเกิดมีเทนออกซิเดชันและการดูดซึมฟอร์มัลดีไฮด์ของเชื้อเมทาโนโทรฟ Type I และ II

ที่มา: Hanson and Hanson (1996)

3.2 การตรวจพบเชื้อเมทาโนโทรฟในสิ่งแวดล้อม

ในงานวิจัยที่ได้ศึกษาก่อนหน้านี้เกี่ยวกับเชื้อเมทาโนโทรฟพบว่าสามารถตรวจพบเชื้อเมทาโนโทรฟแบคทีเรียในบริเวณต่างๆ ได้แก่ พื้นที่ฝังกลบมูลฝอย พื้นที่ในนาข้าว ทะเลสาบ เป็นต้น โดยในงานวิจัยที่ศึกษาเมทาโนโทรฟแบคทีเรียในหน้าดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยจริง เช่น Nozhevnikova *et al.*(1993) พบว่าในรัสเซียมีแบคทีเรียชนิดเมทาโนโทรฟทั้ง 2

ตารางที่ 3 การเปรียบเทียบลักษณะการจำแนกเชื้อเมทาโนโทรฟ Type I, II และ X

Characteristics	Type I	Type II	Type X
Cell morphology	Short rod, usually occur singly ; some cocci or ellipsoids	Crescent-shaped rods, rods, pear-shaped cells, sometimes occur in rosettes	Cocci, often found as pair
Growth at 45^{o}C	No	No	Yes
Membrane arrangement			
Bundles of vesicular disks	Yes	No	Yes
Paired membranes aligned	No	Yes	No
Nitrogen fixation	No	Yes	Yes
Resting stages formed			
Exospore	No	Some strains	No
Cysts	Some strains	Some strains	Some strains
RuMP pathway	Yes	No	Yes
Serine pathway	No	Yes	Sometimes
Phylogenetic signature probe	1041(5'-CTCCGCTATCTCTAACAGATT-3') 1035(5'GATTCTGGATGTCAAGGG-3') MM650(5'-CCTCTACTCAACTCTAGT-3') MM850(5'-TACGTTAGCTCCACCACTAA-3')	1034(5'-CCATACCGGACATGTCCAAAGC-3')	No specific probe has been tested

ที่มา : Bowman *et al*. (1993)

Type แสดงดังตารางที่ 4 โดยเชื้อเมทาโนโทรฟ Type II มักพบในสภาพอากาศหนาวเย็น ส่วนงานวิจัยที่ศึกษาแบคทีเรียชนิดเมทาโนโทรฟในหน้าดินกลบทับจำลอง เช่น เชื้อเมทาโนโทรฟ Type I สามารถเจริญได้ดีในบริเวณด้านบนของคอลัมน์ดิน ซึ่งเป็นบริเวณที่มีความเข้มข้นของก๊าซมีเทนต่ำในขณะที่เชื้อเมทาโนโทรฟ Type II นั้นสามารถเจริญได้ดีในบริเวณด้านล่างของคอลัมน์ดิน ซึ่งเป็นบริเวณที่มีความเข้มข้นของก๊าซมีเทนสูงและมีความเข้มข้นของออกซิเจนต่ำ แต่อย่างไรอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันในพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยนั้นจะมีค่าลดลงตามระดับความลึกเนื่องด้วยข้อจำกัดทางด้านปริมาณออกซิเจน (Hanson and Hanson, 1996)

ตารางที่ 4 แบคทีเรียชนิดเมทาโนโทรฟที่พบในหน้าดินกลบทับของหลุมฝังกลบมูลฝอยรัสเซีย

สปีชีส์	ชนิดแบคทีเรียเมทาโนโทรฟ	ความถี่ที่พบในการสุ่มตัวอย่าง (ร้อยละ)	ความสามารถในการเจริญเติบโตที่ 6 °ซ (นับจำนวนโดยใช้กล้องจุลทรรศน์
Methylococcus capsulatus	II	30	-
Methylomonas methanica	I	0	-
Methylomonas albus	I	90	++
Methylobacter bovis	I	90	+++
Methylobacter vinelandi	I	0	-
Methylobacter chroccum	I	95	+++
Methylobacter capsulatus	I	30	-
Methylosinus sporium	II	60	+
Methylosinus triosporium	II	30	-
Metylocystis parvas	II	100	+++
Metylocystis minimus	II	30	+
Metylocystis methanolicus	II	0	-
Metylocystis periformis	II	40	-
Metylocystis echinoids	II	70	+/-

หมายเหตุ (-) : 0 เซลล์ , (+/-) : 1-2 เซลล์, (+) : 5 เซลล์ , (++) : 20-50 เซลล์, (+++) : 50-100 เซลล์

ที่มา: Nozhevnikova *et al.* (1993)

3.3 การผลิตเมทานอลจากมีเทนโดยเมทาโนโทรฟ

เนื่องจากในระหว่างการใช้มีเทนเป็นแหล่งพลังงานของเชื้อเมทาโนโทรฟ มีการเปลี่ยนรูปของมีเทนเป็นเมทานอลก่อน โดยเชื้อเมทาโนโทรฟจะใช้มีเทนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานในสภาพที่มีออกซิเจนแล้วให้ผลิตภัณฑ์เป็นเมทานอลโดยอาศัยเอนไซม์มีเทนมอนอ-ออกซีจีเนสหรือเอ็มเอ็มโอ (Methane Monooxygenase: MMO) โดยแสดงสมการได้ดังนี้

$$CH_4 + \tfrac{1}{2} O_2 \xrightarrow{MMO} CH_3OH + H_2O \qquad (6)$$

อย่างไรก็ตามโดยธรรมชาติแล้วเมทานอลจะถูกใช้ต่อในเซลล์เมทาโนโทรฟโดยเปลี่ยนเป็นฟอร์มัลดีไฮด์ ฟอร์เมทและคาร์บอนไดออกไซด์ตามลำดับ

$$CH_3OH \xrightarrow{MDH} HCHO \xrightarrow{FADH} HCOOH \xrightarrow{FAD} CO_2 \qquad (7)$$

(หมายเหตุ MDH: Methanol dehydrogenase; FADH: formaldehyde dehydrogenase; FAD: formate dehydrogenase)

จะเห็นว่าเอนไซม์ที่มีความสำคัญเกี่ยวข้องกับเมทานอลคือ เอนไซม์มีเทนมอนอ-ออกซีจีเนสและเมทานอลดีไฮโดรจีเนส (Anthony; 1986) โดยมีเทนอนออกซีจีเนสเป็นเอนไซม์ที่ออกซิไดซ์มีเทนเป็นเมทานอลและเมทานอลดีไฮโดรจีเนสจะเปลี่ยนเมทานอลเป็นฟอร์มัลดีไฮด์

3.3.1 มีเทนมอนอออกซีจีเนส

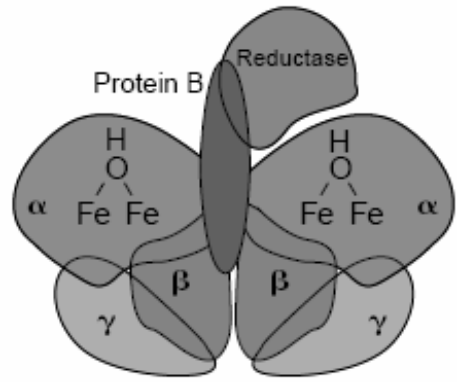
เอนไซม์ชนิดแรกของวิถีมีเทนออกซิเดชันในเมทาโนโทรฟ คือ มีเทนมอนอ-ออกซีจีเนสหรือเอ็มเอ็มโอ (MMO) สามารถแบ่งออกเป็น 2 ชนิดด้วยกันคือ เอสเอ็มเอ็มโอ (soluble methane monooxygenase: sMMO) และ พีเอ็มเอ็มโอ (particulate methane monooxygenase: pMMO)

1) เอสเอ็มเอ็มโอ

เอสเอ็มเอ็มโอเป็นเอนไซม์ที่ละลายอยู่ในไซโตพลาสมิค (cytoplasmic enzyme complex) ซึ่งพบเอนไซม์ชนิดนี้ในบางสายพันธุ์ของเมทาโนโทรฟเท่านั้น โดยจะพบในกลุ่มเมทาโนโทรฟ *Methylosinus*, *Methylocystis* และ *Methylococcus* ในทุกสายพันธุ์ และพบในบางสายพันธุ์ของ *Methylomonas*, *Methylomicrobium* (Murell *et al*, 2000) โครงสร้างเอสเอ็มเอ็มโอของแบคทีเรียเหล่านี้จะมีลักษณะคล้ายคลึงกัน โดยเอสเอ็มเอ็มโอมีส่วนประกอบหลัก 3 ส่วน คือ ส่วน A หรือส่วน ไฮดรอกซีเลส (hydroxylase) ส่วนโปรตีน B และส่วนโปรตีน C หรือส่วนรีดักเตส (reductase) (ภาพที่ 5) โดยส่วนไฮดรอกซีเลสมีน้ำหนักประมาณ 245 kDa. ประกอบไปด้วยเหล็กที่ไม่มีฮีม (nonheme iron) สามารถแบ่งออกเป็น 3 หน่วย คือ อัลฟา (α) เบต้า (β) และ แกรมมา (γ) ซึ่งส่วนไฮดรอกซีเลสเป็น บริเวณเร่งของเอนไซม์ (active site) สำหรับส่วนโปรตีน B เป็นโปรตีนที่ไม่มีสีจับกับส่วนไฮดรอกซีเลส มีน้ำหนัก 15 kDa. ปฏิกิริยามีเทนมอนอออกซีจีเนสจะไม่เกิดขึ้นในส่วนนี้ และในส่วนของโปรตีน C มีน้ำหนัก 38.4 kDa. ประกอบด้วยฟลาวินอะดินีนไดนิวคลีโอไทด์ (flavin adenine dinucleotide: FAD) และนิโคตินาไมด์อะดินีนไดนิวคลีโอ-ไทด์ (dinicotinamind adenine dinucleotide: NADH) โดย FAD จะประกอบด้วยรีดักเตส ทำหน้าที่รับอิเล็กตรอนจาก $NADH_2$ และส่งผ่านไปยังบริเวณ di-iron ของไฮดรอกซีเลสซึ่งเป็นบริเวณเร่งของเอนไซม์ (Murell *et al.*, 2000)

การแสดงออก (express) ของเอสเอ็มเอ็มโอจะเกิดขึ้นเมื่อมีอัตราส่วนคอปเปอร์ต่อชีวมวลในอาหาร (copper-to-biomass ratio) ในระดับต่ำ (low-copper growth condition) คือมีคอปเปอร์ไอออน (Cu^{2+}) น้อยกว่า 0.89 ไมโครโมลาร์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 1 กรัม ดังนั้นถ้าระดับของคอปเปอร์ต่อชีวมวลในอาหารสูงจะสามารถยับยั้ง (inhibit) เอนไซม์ชนิดนี้ได้ (Hanson and Hanson, 1996)

เอสเอ็มเอ็มโอมีความจำเพาะต่อสับสเตรทที่หลากหลาย (broader substrate specificity) โดยในเมทาโนโทรฟบางชนิดที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีคอปเปอร์ในระดับต่ำและมีการเติมแนฟทาลีนเอสเอ็มเอ็มโอจะสามารถเปลี่ยนแนฟทาลีนเป็น 1,2- แนฟทานอลได้ (Hanson and Hanson, 1996; Murell *et al*, 2000)



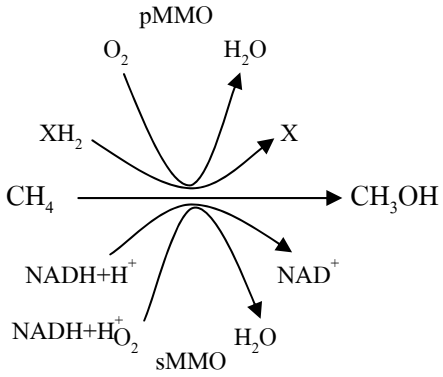
ภาพที่ 5 โครงสร้างจตุรภูมิของเอนไซม์เอสเอ็มเอ็มโอ
ที่มา: Murrell *et al*., 2000

2) พีเอ็มเอ็มโอ

พีเอ็มเอ็มโอเป็นเอนไซม์ที่พบในเมทาโนโทรฟทุกสายพันธุ์ โดยพีเอ็มเอ็มโอจะเกาะติดที่ภายในเยื่อหุ้มไซโตพลาสมิค (membrane bound) (Murell *et al*, 2000) พีเอ็มเอ็มโอจะแสดงออกเมื่ออัตราส่วนคอปเปอร์ต่อชีวมวลในอาหารสูง คือมากกว่า 0.85 – 1 ไมโครโมลาร์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 1 กรัม แต่ไม่เกิน 20 ไมโครโมลาร์ (Hanson and Hanson, 1996) Fox *et al*. (1990) รายงานว่า *Methylosinus trichosporium* OB3b เป็นเมทาโนโทรฟที่มีเอ็มเอ็มโออยู่ทั้ง 2 รูปแบบเมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารเอ็นเอ็มเอส (Nitrate Mineral Salt: NMS)โดยมีการเติมคอปเปอร์-ไอออนในอาหาร 5 ไมโครโมลาร์ จะมีการผลิตพีเอ็มเอ็มโอเพียงชนิดเดียว และเนื่องจากพีเอ็มเอ็มโอเป็นเอนไซม์ที่เกาะติดกับเยื่อหุ้มไซโตพลาสมิคทำให้ในปัจจุบันนี้ยังไม่สามารถสกัดให้บริสุทธิ์ได้เหมือนเอสเอ็มเอ็มโอ (Hanson and Hanson, 1996) ส่วนประกอบและโครงสร้างของพีเอ็มเอ็มโอยังไม่ทราบชัดเจน แต่จากการศึกษาพีเอ็มเอ็มโอจาก *M.capsulatus* (Bath) พบว่าพีเอ็มเอ็มโอประกอบด้วยหน่วยย่อยของโปรตีน 3 หน่วยมีน้ำหนัก 45, 27 และ 23 kDa. ซึ่งบริเวณที่จับกันระหว่างหน่วยย่อยที่มีน้ำหนัก 45 และ 27 kDa. คาดว่าจะเป็นบริเวณเร่งพีเอ็มเอ็มโอมีความจำเพาะต่อสับสเตรทบางชนิดเท่านั้น และไม่สามารถออกซิไดซ์แนฟทาลีนได้

เมทาโนโทรฟที่มีการใช้พีเอ็มเอ็มโอออกซิไดซ์มีเทนเป็นเมทานอลจะมีการเจริญที่สูงกว่าเมทาโนโทรฟที่ใช้ เอสเอ็มเอ็มโอเนื่องจากปฏิกิริยาคะตะไลซ์ของเอสเอ็มเอ็มโอต้องใช้ $NADH+H^+$ เป็นตัวให้อิเล็กตรอน การที่เอสเอ็มเอ็มโอใช้ $NADH+H^+$ เป็นตัวให้อิเล็กตรอนทำให้ส่วนมากจะพบว่า NAD^+ ซึ่งมีอยู่อย่างจำกัดเป็นตัวกำหนดการเจริญเติบโต (limiting growth)

ของเมทาโนโทรฟ ในขณะที่พีเอ็มเอ็มโอใช้สารซึ่งมีศักย์ไฟฟ้าสูงเป็นตัวให้อิเล็กตรอน (สมการที่ 8) ซึ่งในปัจจุบันยังไม่ทราบแน่ชัดว่าสารชนิดนี้ (X) คือสารอะไร (Murell *et al*, 2000)



(8)

3.3.2 เมทานอลดีไฮโดรจีเนส

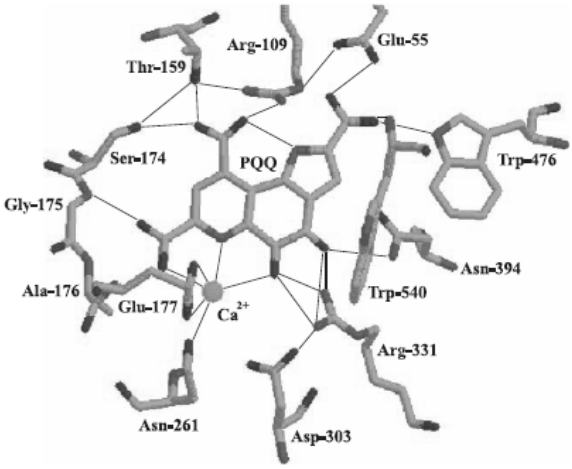
ในแบคทีเรียเมทิลโลโทรฟจะออกซิไดซ์เมทานอลเป็นฟอร์มาลดีไฮด์โดยเอนไซม์ที่มีชื่อว่าเมทานอลดีไฮโดรจีเนสหรือเอ็มดีเอชโครงสร้างจตุรภูมิของเอ็มดีเฮชประกอบด้วย $\alpha_2\beta_2$ น้ำหนักรวมประมาณ 150 kDa. (Reddy and Bruice, 2007) โดยหน่วยย่อยขนาดใหญ่ (α) มีน้ำหนักประมาณ 60 – 67 kDa. โดยหน่วยใหญ่แต่ละหน่วยประกอบด้วยโคเอนไซม์ไพโรโลควิโนลีน-ควินนีนหรือพีคิวคิว (Pyrroloquinoline quinine: PQQ) 1 โมเลกุล และแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) ส่วนหน่วยย่อยขนาดเล็ก (β) มีขนาด 8.5 kDa. บริเวณเร่งของเอนไซม์คือบริเวณที่แคลเซียมไอออนจับกับโคเอนไซม์พีคิวคิว (Antrony and Williams, 2003) ดังแสดงในภาพที่ 6 การเคลื่อนย้ายอิเล็คตรอนจากเมทานอลจะเริ่มจากการส่งผ่านไปยังเอ็มดีเอชและไซโตโครม C_L (cytochrome c_L) หลังจากนั้นอิเล็คตรอนจะถูกส่งผ่านไปยังไซโตโครม C_H (cytochrome C_H) และสิ้นสุดที่ออกซีเดส (oxydase) ดังแสดงในสมการที่ 9 (Dales and Anthony, 1995)

$$\text{MeOH} \longrightarrow \text{MDH} \longrightarrow \text{cytochrome } c_{\text{L}} \longrightarrow \text{cytochrome } c_{\text{H}} \longrightarrow \text{oxidase} \quad (9)$$

3.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเมทานอลของเมทาโนโทรฟ

3.4.1 อุณหภูมิ

อุณหภูมิ มีผลโดยตรงต่อกระบวนการเมทาบอลิซึมภายในเซลล์ของจุลินทรีย์



ภาพที่ 6 การจับกันระหว่างพีคิวคิวกับแคลเซียมไอออนที่บริเวณเร่งของเอ็มดีเอช
ที่มา: Anthony and Williams (2003)

การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิมีความสำคัญต่อจุลินทรีย์แต่ละชนิด อย่างไรก็ตามอุณหภูมิสูงมักจะมีผลต่อจุลินทรีย์มากกว่าอุณหภูมิต่ำ มีหลายงานวิจัยที่ศึกษาผลของอุณหภูมิในดินต่อแบคทีเรียเมทาโนโทรฟ Boeckx and Cleemput (1996) ได้รายงานอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเกิดมีเทนออกซิเดชัน คือ 25 – 30 ^{o}ซ ในขณะที่ Visvanathan *et al*. (1999) ได้รายงานอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเกิดมีเทนออกซิเดชัน 30 - 36 ^{o}ซ อย่างไรก็ตามอุณหภูมิที่เหมาะสมการผลิตเมทานอลด้วยเมทาโนโทรฟควรเป็นอุณหภูมิเดียวกับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเมทาโนโทรฟนั้น

3.4.2 ชนิดและปริมาณของเมทาโนโทรฟ

การใช้เมทาโนโทรฟในการผลิตสารอินทรีย์ต่างๆ ได้มีรายงานการใช้เมทาโนโทรฟสายพันธุ์ต่างๆหลากหลายชนิด เช่น การผลิตเมทิลโลคีโตน (Methyloketone) จาก *Methylococcus capsulatus* (Texas strain) *Methylosinu*s sp. (CRL-15) และ *Methylobacterium* sp. (CRL-26) (Patel *et al*., 1980) แต่สำหรับการผลิตเมทานอลจากเมทาโนโทรฟในปัจจุบันยังมีการรายงานการใช้เชื้อบริสุทธิ์ *Methylosinus trichosporium* เท่านั้น

การผลิตสารด้วยเชื้อบริสุทธิ์เพียงชนิดเดียวสามารถควบคุมกระบวนการเมตะบอลิซึมของจุลินทรีย์ได้ง่าย ผลได้ของผลิตภัณฑ์ (yield) มีความแปรปรวนต่ำ แต่ต้องควบคุมให้อยู่ในสภาวะที่ไม่มีการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์อื่น เนื่องจากเมื่อมีการปนเปื้อนเชื้อบริสุทธิ์อาจ

ไม่สามารถแข่งขันกับเชื้อชนิดอื่นได้ ในขณะที่การใช้เชื้อแบบผสมไม่ต้องควบคุมเรื่องการปนเปื้อนมากนักโดยเชื้อแบบผสมสามารถอยู่ในระบบการผลิตแบบต่อเนื่องได้ยาวนานกว่า (ดุษฎี, 2546)

3.4.3 องค์ประกอบของก๊าซในบรรยากาศ

ยังไม่มีรายงานอัตราส่วนมีเทนบริสุทธิ์ต่อก๊าซบรรยากาศที่เหมาะสม 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 โดยไม่มีสารยับยั้งเมทานอลดีไฮโดรจีเนส คือ มีเทนร้อยละ 20 ออกซิเจนร้อยละ 20 ไนโตรเจนร้อยละ 20 และคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 40 ในระบบการผลิตแบบต่อเนื่อง โดยคาร์บอนไดออกไซด์ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายในกระบวนการเมตะบอลิซึมของเมทาโนโทรฟนั้นก็สามารถยับยั้งการออกซิเดชันของเมทานอลได้

3.4.4 ความเป็นกรด – ด่าง (พีเอช)

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

3.4.5 สารกระตุ้นเอ็มเอ็มโอ

เนื่องจากเอ็มเอ็มโอแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ เอสเอ็มเอ็มโอและพีเอ็มเอ็มโอ ซึ่งการแสดงออกของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้จะขึ้นอยู่กับปริมาณของคอปเปอร์ไอออนและชนิดของเมทาโนโทรฟโดยถ้าต้องการให้เอ็มเอ็มโอชนิดใดทำงานจะต้องควบคุมปริมาณของคอปเปอร์-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)

3.4.6 สารยับยั้งเมทานอลดีไฮโดรจีเนส

การผลิตเมทานอลจากมีเทนโดยใช้เซลล์เมทาโนโทรฟมีความจำเป็นที่ต้องยับยั้งการทำงานของเมทานอลดีไฮโดรจีเนส มีรายงานการใช้สารยับยั้งเมทานอลดีไฮโดรจีเนสหลายชนิด ได้แก่ 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 และในการผลิตเมทานอลในระบบกึ่งต่อเนื่อง (semicontinuous) ด้วยเชื้อ *Methylosinus trichosporium* OB3b ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 12.9 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7 ซึ่งมีโซเดียมฟอร์เมทและไซโคลโพรพานอล 14.3 มิลลิโมลาร์ โดยทำการผลิตเมทานอล 5 ครั้งในระยะเวลา 6 ชั่วโมง พบว่าอัตราการผลิตเมทานอลเฉลี่ยเท่ากับ 3.17 ไมโครโมลต่อชั่วโมงต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง อย่างไรก็ตามไซโคลโพรพานอลเป็นสารที่ยากต่อการสังเคราะห์และการรักษาความเสถียรในสภาวะที่มีอากาศ และเนื่องจากกรดอะมิโนลิวซิว (lysyl residues) ซึ่งอยู่บนผิวของเมทานอลดีไฮโดรจีเนสกับหมู่คาร์บอกซีเลท (carboxylate) บนผิวของ cytochrome c_L เชื่อมต่อกันด้วยแรงไอออนิค (ionic interactions) Cox *et al.* (1992) พบว่าสารที่มีแรงไอออนิคสูง (high ionic strength) ได้แก่ สารละลายเกลือสามารถยับยั้งการเคลื่อนย้ายอิเล็คตรอนระหว่างระหว่างเมทานอลดีไฮโดรจีเนสและ cytochrome c_L ทำให้เมทานอลดีไฮโดรจีเนสไม่สามารถทำงานได้ Lee *et al*. (2004) ได้รายงานการใช้โซเดียมคลอไรด์ในการยับยั้งเมทานอลดีไฮโดรจีเนส พบว่าโซเดียมคลอไรด์สามารถยับยั้งเมทานอลดีไฮโดรจีเนสได้อย่างมีประสิทธิภาพและเหมาะที่จะนำมาใช้มากกว่าไซโคลโพรพานอล (cyclopropanol) เนื่องจากเก็บรักษาได้ง่าย มีความเสถียร และราคาถูกกว่ามาก สภาวะที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการผลิตเมทานอลโดยเชื้อ *Methylosinus trichosporium* OB3b คือ ความเข้มข้นของ

โซเดียมคลอไรด์ 200 มิลลิโมลาร์ ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 0.6 มิลลิกรัมของเซลล์แห้งต่อมิลลิลิตรใน 12.9 มิลลิโมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7 โดยมีโซเดียมฟอร์เมตความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 25 °ซ อัตราส่วนมีเทนต่ออากาศเริ่มต้นเท่ากับ 1:4 อย่างไรก็ตามไม่มีการรายงานถึงการใช้เกลือชนิดอื่นๆ ในการยับยั้งเมทานอลดีไฮโดรจีเนสในการผลิตเมทานอล

3.4.7 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 พบว่าสารอินทรีย์เหล่านี้จะช่วยเพิ่มเมทาบอซึมในวัฏจักรเครปทำให้เซลล์มีจำนวนสูงขึ้นในสภาวะที่มีมีเทนและในสภาวะที่ไม่มีมีเทนนั้นเมทาโนโทรฟจะไม่สามารถใช้สารอินทรีย์เหล่านี้เป็นแหล่งคาร์บอนได้ โดยซิเตรตเป็นสารที่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์มากที่สุด โดยความเข้มข้นที่มีความเหมาะสมคือ 0.015 มิลลิโมลาร์ต่อลิตร โดยการใส่สารส่งเสริมการเจริญเหล่านี้ในอาหารมีผลทำให้ปริมาณเมทานอลที่ปลดปล่อยออกมาภายนอกเซลล์สูงขึ้น

4. การตรึงเซลล์จุลินทรีย์

4.1 ความหมายของเซลล์ที่ถูกตรึง

เซลล์ที่ถูกตรึง (immobilized cells) หมายถึง เซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกจำกัดขอบเขตหรือสถานที่ทางฟิสิกส์ ให้อยู่ในบริเวณที่ทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถสูญเสียความสามารถในการเป็นตัวเร่ง และสามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้หลายครั้ง หรือใช้ได้อย่างต่อเนื่อง โดยเซลล์ที่ถูกตรึงอาจอยู่ในสภาพเซลล์ที่กำลังเจริญ เซลล์ระยะพัก หรือเซลล์ที่ตายแล้วก็ได้ (สมใจ, 2545)

การใช้เซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึงเริ่มมีมาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1823 โดยมีการผลิตน้ำส้มสายชูแบบรวดเร็ว (quick vinegar) โดยใช้ฟิล์มจุลินทรีย์ที่ติดบนเศษไม้ (Abbott, 1977) หลังจากนั้นไม่มีผู้ใดสนใจในเรื่องนี้ จนกระทั่งเริ่มมีการพัฒนาเกี่ยวกับการใช้เอนไซม์เพื่อเป็นตัวเร่งใน

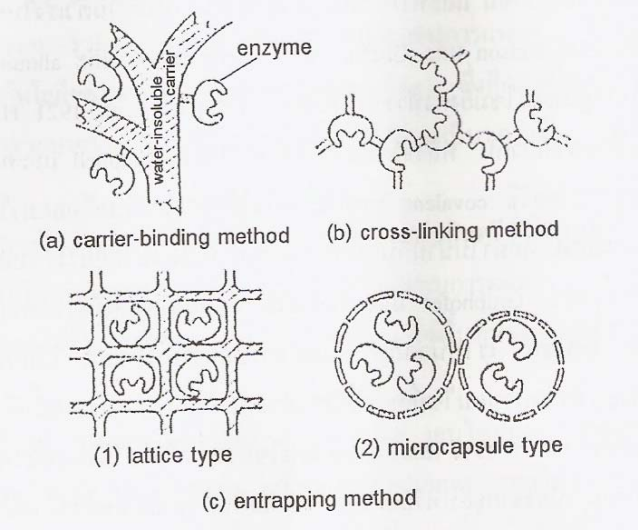
อุตสาหกรรมจึงได้มีการศึกษาเกี่ยวกับการตรึงเอนไซม์ชนิดต่างๆ เช่น อะไมเลส เปปซิน ไรโบนิวคลีเอส และคาร์บอกซีเลสไว้บนสารชนิดต่างๆ และมีการนำเอนไซม์ที่ถูกตรึงไปใช้ในอุตสาหกรรมมากขึ้น

อย่างไรก็ตามเนื่องจากจุลินทรีย์เป็นแหล่งสำคัญในการผลิตเอนไซม์ แต่การสกัดเอนไซม์จากเซลล์โดยทั่วไปเสียค่าใช้จ่ายสูง และในบางกรณีเอนไซม์ที่ได้อาจไม่คงตัว ดังนั้นจึงมีผู้ให้ความสนใจเกี่ยวกับการตรึงเซลล์ เพื่อนำไปใช้เป็นตัวเร่งแทนเอนไซม์ที่ถูกตรึง ซึ่งจะทำให้สามารถลดต้นทุนในการสกัดเอนไซม์ การทำให้บริสุทธิ์ และลดปัญหาความไม่คงตัวของเอนไซม์ (สมใจ, 2545; ดุษฎี, 2546)

ในปัจจุบันมีรายงานเกี่ยวกับการใช้จุลินทรีย์ที่ถูกตรึงในการผลิตสารชนิดต่างๆ กันอย่างกว้างขวาง และที่ประสบความสำเร็จในระดับอุตสาหกรรมแล้ว เช่น การผลิตกรดแอลมาลิก (L-malic) (Olivira and Costa, 1994) ฟรุคโตส (Bucke, 1982) เป็นต้น

4.2 วิธีการตรึงเซลล์

วิธีการตรึงเซลล์แบ่งออกเป็น 3 วิธีใหญ่ๆ เช่นเดียวกับการตรึงเอนไซม์ คือ การยึดด้วยตัวนำ (carrier-binding method) การเชื่อมแบบไขว้ (cross-linking method) และการห่อหุ้ม (entrapping method) ดังแสดงในภาพที่ 7 (Chibata *et al*., 1978)



ภาพที่ 7 รูปแบบการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีต่างๆ
ที่มา: Chibata *et al*. (1974)

4.2.1 การยึดด้วยตัวนำ

การยึดด้วยตัวนำ หมายถึง การเชื่อมเซลล์จุลินทรีย์โดยตรงกับตัวนำที่ไม่ละลายน้ำซึ่งอาจแบ่งย่อยได้ 2 วิธี คือวิธีการดูดซับ (adsorption method) และวิธีการจับกันด้วยพันธะโควาเลนซ์ (covalent binding method)

1) วิธีการดูดซับ

เป็นวิธีการตรึงเซลล์โดยให้เซลล์ดูดซับอยู่กับสารที่เป็นตัวนำด้วยพันธะไอออนิค พันธะไฮโดรโฟบิค หรือพันธะไฮโดรเจนโดยอาศัยหลักธรรมชาติทางเคมีเนื่องจากผนังเซลล์ของแบคทีเรียหรือยีสต์ประกอบด้วยกรดไดอะมิโนพิมีลิก (diaminopimelic acid) และแฮกโซซามีน (hexosamines) ซึ่งสามารถเกิดพันธะไอออนิก (ionic interaction) กับตัวนำที่ใช้ได้ การตรึงด้วยวิธีการนี้เป็นวิธีการที่ง่ายแต่แรงดูดซับค่อนข้างอ่อนและมีการสูญเสียเซลล์ได้ง่ายเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงพีเอช แรงไอออนิค การไหลของอาหารเลี้ยงเชื้อ การเกิดฟองอากาศและการแบ่งเซลล์ ตัวอย่างสารที่ใช้ในการดูดซับด้วยวิธีนี้ ได้แก่ โพลีแซคคาไรด์ที่ไม่ละลายน้ำ โปรตีน โพลิเมอร์สังเคราะห์ และสารอนินทรีย์

2) วิธีการจับกันด้วยพันธะโควาเลนซ์

วิธีการนี้เป็นวิธีการที่นิยมใช้ในการตรึงเอนไซม์ เนื่องจากได้ผลผลิตดี แต่ไม่นิยมใช้ในการตรึงเซลล์ เนื่องจากอาจจำเป็นต้องใช้สารเคมีที่มีพิษ อาจทำให้เซลล์ตายได้ การตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้เป็นการเชื่อมโดยตรงกับ activated support โดยสารที่ใช้เป็นตัวยึดจับนั้นสามารถเชื่อมต่อกับหมู่อะตอมซึ่งเป็นสารประกอบที่ผิวเซลล์ เช่น หมู่อะมิโน หมู่คาร์บอซิล หมู่ไฮดรอกซิล เป็นต้น วิธีการนี้มีข้อดี คือ เซลล์จะเชื่อมอยู่กับผิวหน้าของตัวนำสม่ำเสมอ มีความคงตัวดี และมีการรั่วไหลของเซลล์ได้น้อย แต่มีข้อเสียคือ การตรึงด้วยวิธีนี้ค่อนข้างรุนแรงเนื่องจากการสร้างพันธะ โควาเลนต์ตามปกติต้องใช้สารตัวนำที่มีการดัดแปลงโดยใช้สารเคมี ซึ่งมักมีความเป็นพิษ และอาจทำให้เซลล์สูญเสียความสามารถได้ สารที่ใช้ยึดเซลล์ด้วยวิธีการนี้ เช่น เม็ดซิลิกาที่มีรูพรุน (activated porous silica bead) แก้วบอโรซิลิเกต (borosilicate glass) เจล-อะกาโรส (agarose bead) เซอร์คอเนียเซรามิค (zirconia ceramic) และสารเคมีที่ทำให้เกิดพันธะโควาเลนต์ เช่น อะมิโนโพรพิวไตรออกซีไซลีน (amminopropyltrioxysilene) กลูตารอลอัลดีไฮด์ (glutaraldehyde) ไอโซไซยาเนต (isocyanate) และคาร์บอดีไมด์ (carbodiimide) เป็นต้น

4.2.2 การเชื่อมแบบไขว้

การเชื่อมแบบไขว้ หมายถึง การเชื่อมเซลล์จุลินทรีย์เข้าด้วยกันโดยใช้สารพวกไบ (bi-) หรือ multifunctional reagent เช่น กลูตารอลดีไฮด์ (glutaraldehyde) และโทลูอีนไดไอโซ-ไซยาเนต (toluene di-isocyanate) เป็นต้น

การตรึงเซลล์ด้วยวิธีการนี้ต่างจากวิธีการอื่นๆ คือ เซลล์ไม่ได้ถูกตรึงอยู่กับสารที่เป็นตัวดูดซับหรือถูกห่อหุ้มอยู่ในเจลหรือในเยื่อกึ่งเลือกผ่าน (semipermeable membrane) แต่เป็นการเชื่อมเซลล์เข้าด้วยกันโดยใช้สารเคมีภายใต้สภาวะค่อนข้างจะรุนแรง ทำให้เซลล์อาจตายได้

4.2.3 การห่อหุ้ม

การตรึงเซลล์ด้วยวิธีการนี้แบ่งออกเป็น 2 แบบ คือไมโครเอ็นแคปสูเลชัน (microencapsulation) และแลกติก (lattice type)

1) ไมโครเอ็นแคปสูเลชัน

ไมโครเอ็นแคปสูเลชัน หมายถึง การห่อหุ้มเซลล์ไว้ในเยื่อกึ่งเลือกผ่าน เช่น ซิลิโคน ซึ่งป้องกันการซึมผ่านของเซลล์ได้ แต่ยอมให้สารตั้งต้นหรือผลผลิตซึมผ่านได้อย่างอิสระ เป็นวิธีการที่ง่าย แต่ไม่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมเนื่องจากอาจมีปัญหาการตกตะกอนของเซลล์เกิดขึ้นด้วย ดังนั้นการนำไปใช้ประโยชน์จึงมีจำกัด นิยมใช้ในด้านยาและการวิเคราะห์เท่านั้น

2) แลกติก

แลกติก หมายถึง การตรึงเซลล์โดยห่อหุ้มเซลล์ไว้ภายในช่องว่าง 3 มิติในเจลของสารพอลิเมอร์ เป็นวิธีที่ได้รับความนิยมและประสบความสำเร็จสูงสุด เนื่องจากใช้ได้กับเซลล์เกือบทุกชนิดในขณะที่วิธีอื่นมีข้อเสียเปรียบมากกว่า สารที่นิยมใช้ตรึงเซลล์ด้วยวิธีการนี้ได้แก่ สารจำพวก biochemically inert hydrogel โดยใช้หลักการเกิดเจลซึ่งทำให้โครงร่าง 3 มิติที่ได้มีรูพรุน

4.3 การคัดเลือกสารที่มีความเหมาะสมในการตรึงเซลล์

เนื่องจากการเตรียมเซลล์ที่ถูกตรึงมีหลายวิธี ดังนั้นสมบัติสารที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์แต่ละวิธีจึงอาจมีรายละเอียดบางอย่างที่แตกต่างกันไป แต่โดยทั่วไปแล้วปัจจัยที่สำคัญในการพิจารณาจะคล้ายคลึงกัน คือ

1) ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์และสิ่งแวดล้อม

2) ไม่กระทบกระเทือนต่อระบบเมตะบอลิซึม

3) ความจุของสารพาหะและการตรึง

4) การตรึงเซลล์ในสภาวะปลอดเชื้อ จะต้องเลือกสารพาหะที่ทนต่อความร้อนได้สูง เนื่องจากต้องทำให้สารพาหะนั้นปลอดเชื้อซึ่งต้องใช้อุณหภูมิและความดันสูง

5) การตรึงเซลล์ปริมาณมากๆ ควรจะเลือกใช้สารพาหะที่มีรูพรุนขนาดใหญ่เพื่อช่วยให้สารอาหารผ่านได้ดีขึ้น

6) เป็นสารที่มีราคาถูกและสามารถนำกลับมาใช้ได้อีก

4.4 ข้อดีและข้อเสียของเซลล์ที่ถูกตรึงเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์อิสระ

ข้อดี

1) ในระบบเซลล์ที่ถูกตรึงนั้นสามารถเซลล์ที่ถูกตรึงมาใช้ใหม่ได้ง่าย สะดวก สามารถใช้ซ้ำในระบบการผลิตแบบเป็นครั้งหรือระบบต่อเนื่องได้ง่ายกว่าเซลล์อิสระ

2) โอกาสในการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่นน้อยลง

3) การแยกผลผลิตทำได้ง่าย ลดค่าใช้จ่ายในการแยกผลผลิต

ข้อเสีย

1) เซลล์อาจสูญเสียความสามารถบางส่วนในระหว่างการตรึง

2) ค่าใช้จ่ายในการตรึงเซลล์สูงกว่าการใช้เซลล์อิสระ

3) เกิดการจำกัดการซึมผ่านของสารอาหาร และผลผลิตผ่านตัวกลางที่ใช้ในการตรึงเซลล์

4.5 การตรึงเซลล์ด้วยแคลเซียมอัลจิเนต

อัลจิเนตเป็นสารโพลิเมอร์ที่ประกอบด้วย D-mannuronic acid และ L- guluronic acid สกัดได้จากสาหร่ายทะเลสีน้ำตาล อัลจิเนตสามารถเกิดเป็นเจลได้ดีเมื่ออยู่ในสารละลายที่มีไอออนของโลหะโพลีวาเลนท์ เช่น อลูมิเนียมไอออน (Al^{3+}) และแคลเซียมไอออน (Ca^{2+})

การตรึงเซลล์ด้วยแคลเซียมอัลจิเนตสามารถทำได้โดยผสมซัสเพนชันของเซลล์ลงในสารละลายโซเดียมอัลจิเนต แล้วนำไปหยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ จะเกิดแคลเซียม-อัลจิเนตเจลขึ้นทันที หลังจากนั้นควรแช่เจลไว้ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์อย่างน้อย 20 นาที เพื่อให้เกิดเจลอย่างสมบูรณ์ ตารางที่ 5 เป็นตัวอย่างจุลินทรีย์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนตและผลิตภัณฑ์

ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพของเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยอัลจิเนต ได้แก่ น้ำหนักโมเลกุลและองค์ประกอบทางเคมี (อัตราส่วนระหว่าง D-mannuronic acid และ L-guluronic acid) ของอัลจิเนตความเข้มข้นของอัลจิเนต (ร้อยละ 0.5 – 10) และแคลเซียมคลอไรด์ (ร้อยละ 0.05 – 2) อุณหภูมิที่ใช้ (0 – 80 °ซ) ขนาดเม็ดเจล (เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.1 – 5 มิลลิเมตร) และปริมาณเซลล์ที่ใช้ (สูงสุดได้ถึง 30 กรัมต่อมิลลิลิตร)

การตรึงเซลล์ด้วยแคลเซียมอัลจิเนตมีข้อดีหลายประการคือ ทำได้ง่าย ภายใต้สภาวะปกติ สะดวกและรวดเร็ว ดังนั้นจึงนิยมใช้ในการตรึงเซลล์ที่มีชีวิต นอกจากนี้การตรึงเซลล์ตรึงเซลล์ด้วยอัลจิเนตยังเป็นวิธีที่ปลอดภัย เนื่องจากอัลจิเนตได้รับการยอมรับให้ใช้เป็นวัตถุเจือปนในอาหารมานานแล้ว เช่น คาร์ราจีแนน เซลล์ที่ถูกตรึงสามารถเพิ่มจำนวนได้ภายในเจล ทำให้ใช้ได้เป็น

เวลานานและเจลที่ได้สามารถละลายในน้ำเกลือ (normal saline) จึงสามารถศึกษาการเจริญของจุลินทรีย์ภายในเจล หลังการตรึงเซลล์ได้ด้วย

Hang (1991) ได้ทำการศึกษาการเพาะเลี้ยงซ้ำของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* NRRL395 ในแคลเซียมอัลจิเนต เพื่อผลิตกรดแลกติกจากอาหารเลี้ยงเชื้อกลูโคส พบว่าสามารถนำกลับมาใช้หมักซ้ำได้ถึง 9 รอบการเพาะเลี้ยง ในระยะเวลาการหมัก 18 วัน ในขณะที่เซลล์อิสระเมื่อนำมาหมักซ้ำ พบว่าปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้ไม่คงที่ อัตราการผลิตกรดแลกติกจะสูงเฉพาะในช่วงการเพาะเลี้ยงรอบแรก และจะลดลงตามลำดับ

ตารางที่ 5 ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนตและผลผลิตที่ได้

จุลินทรีย์	สารผลิตภัณฑ์
Arthrobacter simplex	Prednisolone
Aspergillus niger	Citric acid
Aspergillus niger	Gluconic acid
Clostridium butyricum	Isopropanol
Clostridium butyricum	n - Butanol
Lactobacillus delbruekii	Lactic acid
Lactobacillus lactis	Lactic acid
Pachysolen tannophilus	Ethanol
Penicillium chrysogenum	Penicillin G
Propionibacterium sp.	Vitamin B12
Saccharomyces cerevisiae	Ethanol
Saccharomyces formosensis	Ethanol
Streptomyces tendae	Nikkomycin
Trigonopsis variabilis	α-Keto acid
Zymomonas mobilis	Ethanol

ที่มา: Demain and Solomon (1981)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. แก๊สโครมาโตกราฟ (gas chromatograph) รุ่น GC 6890 Agilent Technologies Model : G 1530A

สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ก๊าซ

ติดตั้ง Detector แบบ Thermal Conductivity Detector (TCD) ใช้ Gas column CTRT มี Inner Column เป็น Stainless Steel ขนาด 1.8 เมตร x 6.35 มิลลิเมตร บรรจุด้วย Activated Molecular Sieve และ Outer Column เป็น Stainless Steel ขนาด 1.8 เมตร x 12.7 มิลลิเมตร Packed with Porous Polymer Mixture มีอุณหภูมิ Injection 120 °ซ อุณหภูมิคอลัมน์ 35 °ซ และอุณหภูมิของ Detector เท่ากับ 180 °ซ Carrier Gas เป็นก๊าซฮีเลียม (He) ซึ่งมีอัตราการไหล 50 มิลลิลิตรต่อนาที ช่วงเวลาวิเคราะห์ (run time) 6 นาที

2. แก๊สโครมาโตกราฟ รุ่น GC 14 B Shimadzu

สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์เมทานอล

เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟยี่ห้อ Shimadzu รุ่น GC-14B ที่ใช้ Flame Ionization Detector (FID) ติดตั้งคอลัมน์ Stainless Steel ยาว 3 เมตร ภายในบรรจุด้วย Unibeads A (80/100) โดยตั้งอุณหภูมิของ Injector, Column และ Detector เท่ากับ 120, 150 และ 180 °ซ ตามลำดับและตั้งอัตราการไหลของก๊าซไนโตรเจน (N_2) เท่ากับ 28 มิลลิลิตรต่อนาที

3. เข็มเก็บตัวอย่างก๊าซ (gas tight syringe) ขนาด 0.5 มิลลิลิตร

4. ก๊าซมีเทนบริสุทธิ์ร้อยละ 99.9

5. ก๊าซผสมระหว่างมีเทนและคาร์บอนไดออกไซด์ในอัตราส่วนร้อยละ 60 ต่อ 40 ใช้เป็นก๊าซชีวภาพสังเคราะห์ (Synthetic Biogas) ของบริษัทไทยอินดัสเตรียลแก๊ส จำกัด (Thai Industrial Gases, TIG)

6. เครื่องเขย่า ยี่ห้อ New Brunswick Scientific

7. เครื่องชั่งน้ำหนักละเอียด (analytical balance) รุ่น B610 ยี่ห้อ Precisa 240A

8. ขวดซีรัม (serum) ขนาด 118 และ 25 มิลลิลิตร

9. โซเดียมอัลจิเนต ความหนืด 14,000 cps. ของบริษัทซิกมา (Sigma)

วิธีการ

1. การแยกเชื้อเมทาโนโทรฟ

นำดินจากแบบจำลองหน้าดินหลุมฝังกลบมูลฝอยจำลองมา 10 กรัม ถ่ายใส่ขวดซีรัมที่มีอาหารเหลวชนิดไนเตรทมิเนอร์รัลซอลท์หรือเอ็นเอ็มเอส (Nitrate Mineral Salt Medium, NMS Medium) ปิดฝาให้สนิทรัดด้วยอลูมิเนียมก่อนฉีดก๊าซมีเทนบริสุทธิ์ร้อยละ 99.9 ลงไปเพื่อให้ความเข้มข้นของบรรยากาศในขวดได้ร้อยละ 30 เขย่าด้วยความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 2 สัปดาห์ที่อุณหภูมิห้อง (พิชญา, 2550) ทิ้งให้ดินตกตะกอนแล้วถ่ายส่วนที่เป็นของเหลวเพื่อขยายพันธุ์ต่อในอาหารเหลวชนิดเอ็นเอ็มเอสอีกครั้ง เป็นเวลาประมาณ 2 สัปดาห์ จนสังเกตเห็นการเจริญเติบโตของเชื้อ เก็บรักษาเชื้อที่อุณหภูมิ 4 ^{o}ซ เพื่อเป็นหัวเชื้อเริ่มต้น (stock culture) ทดสอบเชื้อที่คัดแยกด้วยวิธีการฟิช ซึ่งได้อธิบายรายละเอียดในภาคผนวก ค

2. การศึกษาของความเข้มข้นมีเทนต่อกิจกรรมของเมทาโนโทรฟในการทดลองแบบกะ

ถ่ายเชื้อจุลินทรีย์เมทาโนโทรฟอายุ 2 สัปดาห์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 0.236 กรัมต่อมิลลิลิตร ลงสู่อาหารเลี้ยงเชื้อเอ็นเอ็มเอสปริมาตร 20 มิลลิลิตรในขวดซีรัมขนาด 118 มิลลิลิตร ปิดผนึกฝาและเติมก๊าซมีเทนบริสุทธิ์ร้อยละ 99.9 เข้าไปด้วยปริมาตรที่แตกต่างกันในแต่ละขวดซีรัมได้แก่ 10, 20, 30 และ 40 มิลลิลิตร โดยให้มีเทนเริ่มต้นประมาณร้อยละ 9.5, 19.9, 28.8

และ 38.8 ตามลำดับ เขย่าความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 สัปดาห์ วัดการเปลี่ยนแปลงของมีเทน คาร์บอนไดออกไซด์และออกซิเจนที่ระยะเวลาต่างๆ ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ

3. การศึกษาเพื่อคัดเลือกสภาวะที่มีความเหมาะสมในการผลิตเมทานอลจากเชื้อเมทาโนโทรฟแบบแขวนลอย (suspension) ในระบบการผลิตแบบเป็นกะ (batch experiment)

3.1 การศึกษาเบื้องต้นในการผลิตเมทานอลของเชื้อเมทาโนโทรฟที่คัดแยกได้

เพาะเลี้ยงเชื้อเมทาโนโทรฟโดยถ่ายเชื้อจากเชื้อเริ่มต้นที่แยกได้จากข้อ 1 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในอาหารเอ็นเอ็มเอส ปริมาตร 20 มิลลิลิตรในขวดซีรัมขนาด 118 มิลลิลิตร ปิดผนึก และบรรจุก๊าซมีเทนบริสุทธิ์ร้อยละ 99.9 เข้าไป 30 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องโดยมีการเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลาประมาณ 2 สัปดาห์ จนสังเกตเห็นการเจริญเติบโตของเชื้อ หลังจากนั้นนำไปเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทน้ำใสทิ้ง (supernatant) ล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 12.9 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7 จำนวน 3 ครั้ง ชั่งเซลล์ 10 กรัม (น้ำหนักเปียก) แล้วเติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 12.9 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7 ที่มี 20 มิลลิโมลาร์โซเดียมฟอร์เมต 5 ไมโครโมลาร์คอปเปอร์ซัลเฟตเป็นสารกระตุ้นพีเอ็มเอ็มโอและ 200 มิลลิโมลาร์โซเดียมคลอไรด์เป็นสารยับยั้งเอนไซม์เมทานอลดีไฮโดรจีเนส (Lee *et al.*, 2004) ปริมาตร 25 มิลลิลิตรในขวดซีรัมขนาด 118 มิลลิลิตร ปิดผนึกและบรรจุก๊าซมีเทนเริ่มต้นเข้าไป 30 มิลลิลิตร ซึ่งมีปริมาณมีเทนเริ่มต้นเท่ากับร้อยละ 28.9 เปรียบเทียบกับการใช้ก๊าซชีวภาพเป็นแหล่งมีเทน (มีเทนต่อคาร์บอนไดออกไซด์เท่ากับ 60:40) ปริมาตร 60 มิลลิลิตร ซึ่งมีปริมาณมีเทนเริ่มต้นเท่ากับร้อยละ 24.3 และเปรียบเทียบสภาวะที่ไม่มีคอปเปอร์ซัลเฟต โซเดียมฟอร์เมตและโซเดียมคลอไรด์ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ สภาวะที่ใช้ในการทดลองดังแสดงในตารางที่ 6 วิเคราะห์ปริมาณเมทานอลและการเปลี่ยนแปลงของมีเทนที่ระยะเวลาต่างๆ ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ

3.2 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสม

เตรียมเชื้อเช่นเดียวกับข้อ 3.1 นำไปเขย่าที่ตู้อบอุณหภูมิที่อุณหภูมิต่างๆ กัน ได้แก่ 40, 50 $^{\circ}$ซ และอุณหภูมิห้อง (25 ± 2 $^{\circ}$ซ) ทำการวิเคราะห์ปริมาณของเมทานอลและปริมาณของมีเทนที่เวลาต่างๆ ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ

ตารางที่ 6 สภาวะเริ่มต้นที่ใช้ในการศึกษาเบื้องต้นในการผลิตเมทานอลของเชื้อเมทาโนโทรฟ

ขวดที่	ชนิดของแหล่งมีเทน	ปริมาตรก๊าซเริ่มต้น (มิลลิลิตร)	ส่วนประกอบในตัวกลาง			
			12.9 mM. PHB	5 μM. $CuSO_4$	20 mM. HCOONa	200 mM. NaCl
1	มีเทนบริสุทธิ์	30	√	-	-	-
2	มีเทนบริสุทธิ์	30	√	√	√	√
3	ก๊าซชีวภาพ	60	√	-	-	-
4	ก๊าซชีวภาพ	60	√	√	√	√

หมายเหตุ √ มีการเติมสารเคมีดังกล่าวในตัวกลาง

3.3 การคัดเลือกสารละลายและขั้นตอนเพื่อปรับสภาพเมทาโนโทรฟให้มีความเหมาะสมต่อการผลิตเมทานอล

ศึกษาชนิดของสารละลายที่มีความเหมาะสมต่อการผลิตเมทานอลของเมทาโนโทรฟเพื่อลดระยะเวลาในการปรับสภาพของเมทาโนโทรฟเมื่อมีการเปลี่ยนชนิดของตัวกลางจากเอ็นเอ็ม-เอสเป็นฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ลดขั้นตอนการปั่นเหวี่ยงและล้างเซลล์ซึ่งเป็นกระบวนการที่ยุ่งยากและทำให้เซลล์กระทบกระเทือน เมื่อมีการโดยแบ่งสภาวะในการทดลองออกได้ดังนี้

3.3.1 สภาวะที่ 1

สภาวะเดิม (เตรียมเชื้อเช่นเดียวกับข้อ 3.1) ปิดผนึกและฉีดก๊าซมีเทนบริสุทธิ์ร้อยละ 99.9 เข้าไปเพื่อให้ความเข้มข้นของบรรยากาศในขวดได้ประมาณร้อยละ 30 เรียกสภาวะนี้ว่า $NMS/C/PHB^{+}$

3.3.2 สภาวะที่ 2

ถ่ายเชื้อเมทาโนโทรฟจากอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็นเอ็มเอสที่มีอายุ 2 สัปดาห์ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ใส่ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 12.9 มิลลิโมลาร์ ที่มีโซเดียมฟอร์เมต 20 มิลลิ-โมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ และคอปเปอร์ซัลเฟต 5 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 22.5 มิลลิลิตร ปิดผนึกและฉีดก๊าซมีเทนบริสุทธิ์ร้อยละ 99.9 เข้าไปเพื่อให้ความเข้มข้นของบรรยากาศในขวดได้ประมาณร้อยละ 30 เรียกสภาวะนี้ว่า NMS/PHB^{+}

3.3.3 สภาวะที่ 3

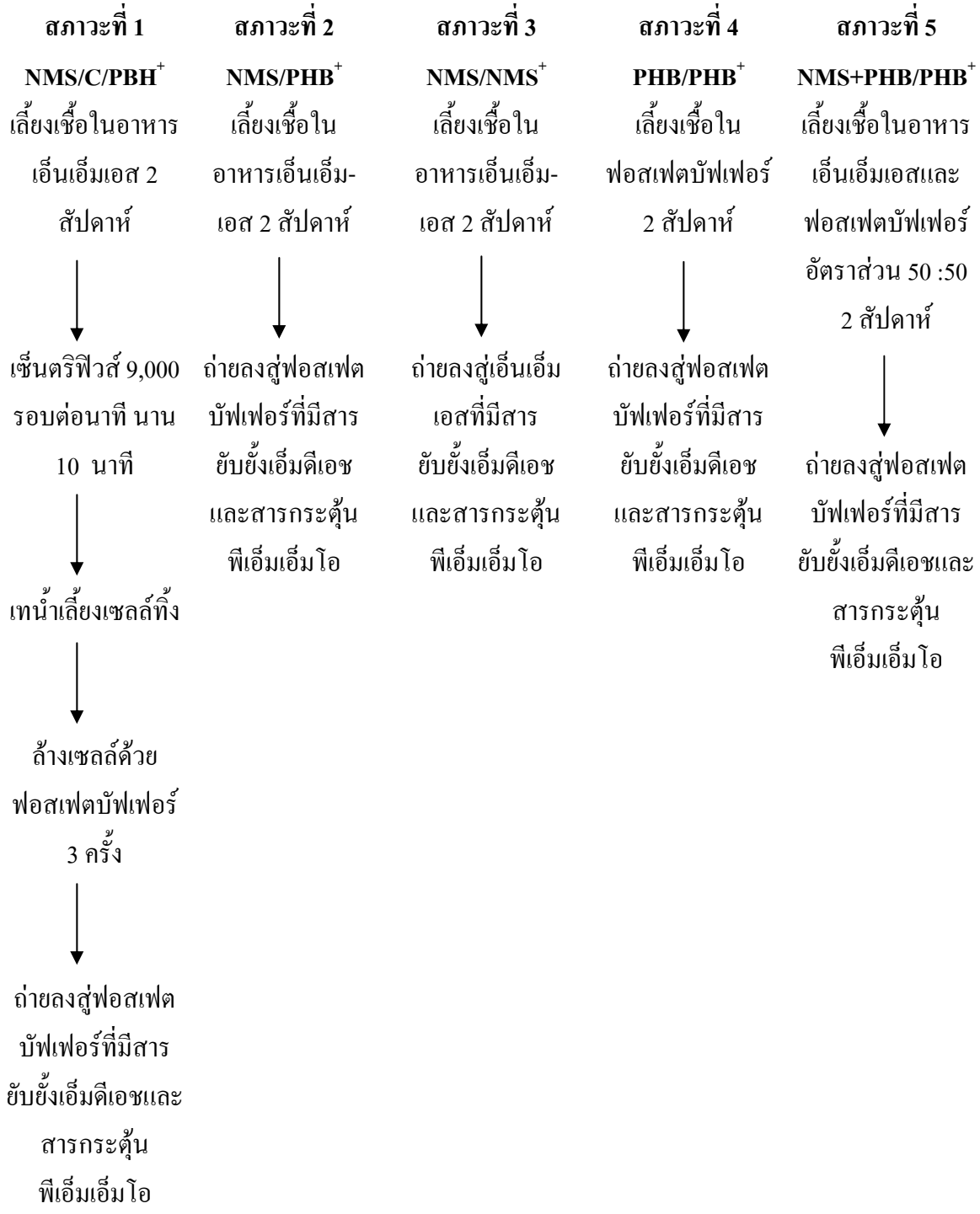
ถ่ายเชื้อเมทาโนโทรฟจากอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็นเอ็มเอสที่มีอายุ 2 สัปดาห์ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ลงสู่อาหารเอ็นเอ็มเอสซึ่งมีที่มีโซเดียมฟอร์เมต 20 มิลลิโมลาร์โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ กับคอปเปอร์ซัลเฟต 5 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 22.5 มิลลิลิตร ปิดผนึกและฉีดก๊าซมีเทนบริสุทธิ์ร้อยละ 99.9 เข้าไปเพื่อให้ความเข้มข้นของบรรยากาศในขวดได้ประมาณร้อยละ 30 เรียกสภาวะนี้ว่า NMS/NMS^{+}

3.3.4 สภาวะที่ 4

เลี้ยงเชื้อเมทาโนโทรฟด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 12.9 มิลลิโมลาร์เป็นเวลา 2 สัปดาห์ แล้วถ่ายเชื้อปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ลงสู่ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้นเท่าเดิมที่มีโซเดียมฟอร์เมต 20 มิลลิโมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ กับคอปเปอร์-ซัลเฟต 5 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 22.5 มิลลิลิตร ปิดผนึกและฉีดก๊าซมีเทนบริสุทธิ์ร้อยละ 99.9 เข้าไปเพื่อให้ความเข้มข้นของบรรยากาศในขวดได้ประมาณร้อยละ 30 เรียกสภาวะนี้ว่า PHB/PHB^{+}

3.3.5 สภาวะที่ 5

ถ่ายเชื้อเมทาโนโทรฟจากอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็นเอ็มเอสใส่ใน 12.9 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7 ที่มี 5 ไมโครโมลาร์คอปเปอร์ซัลเฟต และ 20 มิลลิโมลาร์โซเดียมฟอร์เมต ในอัตราส่วนหัวเชื้อต่อฟอสเฟตบัฟเฟอร์ร้อยละ 50 ต่อ 50 โดยปริมาตร เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ก่อนถ่ายเชื้อ 2.5 มิลลิลิตรลงสู่ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 12.9 มิลลิโมลาร์ที่มีโซเดียมฟอร์เมต 20 มิลลิโมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ กับคอปเปอร์ซัลเฟต 5 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 22.5 มิลลิลิตร ปิดผนึกและฉีดก๊าซมีเทนบริสุทธิ์ร้อยละ 99.9 เข้าไปเพื่อให้ความเข้มข้นของบรรยากาศในขวดได้ประมาณร้อยละ 30 เรียกสภาวะว่า NMS+PHB/PHB^{+}



ภาพที่ 8 แผนภาพแสดงขั้นตอนกระบวนการในการทดลองผลิตเมทานอลที่สภาวะต่างๆ

3.4 การศึกษาปริมาณมีเทนที่เหมาะสมต่อการผลิตเมทานอลของเมทาโนโทรฟ

เตรียมเชื้อเมทาโนโทรฟด้วยวิธีการที่เหมาะสมต่อการผลิตเมทานอลด้วยวิธีการข้อ 3.3.5 ลงสู่สารละลาย 22.5 มิลลิลิตรซึ่งประกอบด้วย 12.9 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มี 5 ไมโครโมลาร์คอปเปอร์ซัลเฟต 20 มิลลิโมลาร์โซเดียมฟอร์เมตและ 200 มิลลิโมลาร์โซเดียม-คลอไรด์เป็นสารยับยั้งเมทานอลดีไฮโดรจีเนส (Lee *et al*., 2004) ปิดผนึกและบรรจุก๊าซมีเทนบริสุทธิ์ร้อยละ 99.9 เข้าไปโดยให้มีความเข้มข้นของมีเทนในบรรยากาศแตกต่างกันในแต่ละขวด คือประมาณร้อยละ 10, 20 และ 30 เขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 7 วัน ตรวจวัดปริมาณเมทานอลและมีเทนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ วิเคราะห์ปริมาณเชื้อเมทาโนโทรฟเริ่มต้นและสิ้นสุดในระบบด้วยวิธีฟิชวิเคราะห์ปริมาณของแข็งแขวนลอยทั้งหมด วิเคราะห์ปริมาณมีเทนและเมทานอลในเวลาต่างๆ ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ

3.5 การศึกษาชนิดและสารยับยั้งเอนไซม์เมทานอลดีไฮโดรจีเนสที่เหมาะสม

กระบวนการเตรียมเชื้อที่ใช้ในการทดลอง นำมาจากคัดเลือกวิธีการที่เหมาะสมในข้อ 3.3.5 แต่ปรับเปลี่ยนชนิดและความเข้มข้นของสารยับยั้งเอนไซม์เมทานอลดีไฮโดรจีเนสจากโซเดียมคลอไรด์ 200 มิลลิโมลาร์เป็นโปแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) และโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) โดยความเข้มข้นที่ใช้ ได้แก่ 5, 10, 30, 50, 100, 200, 300, 400 มิลลิโมลาร์ ปิดผนึกและบรรจุก๊าซมีเทนเข้าไปโดยให้มีมีเทนบริสุทธิ์ร้อยละ 99.9 ในบรรยากาศประมาณร้อยละ 10 เขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 3 วัน ตรวจวัดปริมาณเมทานอลและมีเทนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ วิเคราะห์ปริมาณเชื้อเมทาโนโทรฟเริ่มต้นและสิ้นสุดในระบบด้วยวิธีฟิช (พิชญา, 2550)

3.6 การผลิตเมทานอลโดยใช้เกลือร่วมกับก๊าซชีวภาพ

ใช้เกลือชนิดและความเข้มข้นที่ได้รับการคัดเลือกจากขั้นตอนที่ 3.5 (300 มิลลิโมลาร์แมกนีเซียมคลอไรด์) โดยใช้ก๊าซชีวภาพสังเคราะห์เป็นแหล่งคาร์บอนเปรียบเทียบการให้มีเทนบริสุทธิ์เป็นแหล่งคาร์บอน โดยอัตราส่วนของก๊าซชีวภาพสังเคราะห์ประกอบด้วยมีเทนต่อคาร์บอนไดออกไซด์ในอัตราส่วน 60 ต่อ 40 บรรจุก๊าซชีวภาพสังเคราะห์เข้าไปเพื่อให้ได้ความเข้มข้นก๊าซชีวภาพในบรรยากาศร้อยละ 16.66 (มีเทนร้อยละ 10) เขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 5 วัน ตรวจวัดปริมาณเมทานอลและมีเทนด้วยเครื่องแก๊ส

โครมาโตกราฟ วิเคราะห์ปริมาณเชื้อเมทาโนโทรฟเริ่มต้นและสิ้นสุดในระบบด้วยวิธีฟีช (พิชญา, 2550)

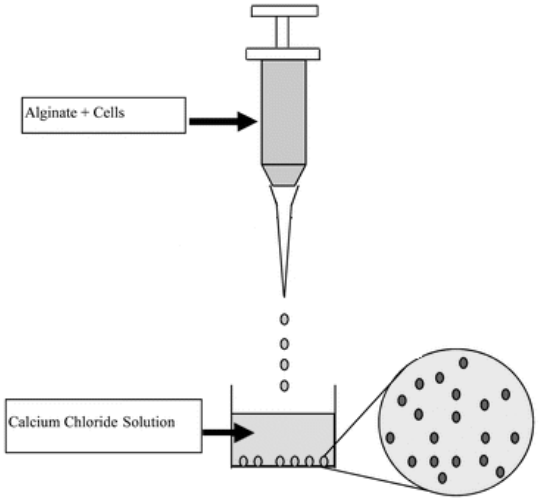
4. การผลิตเมทานอลโดยการตรึงเซลล์ด้วยแคลเซียมแอลจิเนต

4.1 การเตรียมสารละลายโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้นร้อยละ 20

ชั่งโซเดียมอัลจิเนต 4 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร ซึ่งได้ความเข้มข้นเริ่มต้นน้ำหนักโดยปริมาตรเท่ากับร้อยละ 20 ฆ่าเชื้อด้วยความร้อนชื้น 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น (อาบชัย, 2542)

4.2 การตรึงเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมอัลจิเนต

ผสมเชื้อที่ผ่านการปรับสภาพจากข้อ 2 ปริมาตร 2 มิลลิลิตรในสารละลายโซเดียม-อัลจิเนตเข้มข้นร้อยละ 20 ปริมาตร 18 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วค่อยๆ หยดใส่ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในบีกเกอร์ซึ่งวางบนฮอทเพลทที่มีการกวนด้วยแท่งแม่เหล็ก อัตราการกวน 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ดังแสดงในภาพที่ 9 หลังจากนั้นนำเม็ดเจลที่ได้ถ่ายใส่ 0.1โมลาร์แคลเซียมคลอไรด์ใหม่ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เพื่อเพิ่มความแข็งแรง ทำการกวนอีกครั้งที่ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที (อาบชัย, 2542)



ภาพที่ 9 การตรึงเซลล์ด้วยแคลเซียมอัลจิเนต

4.3 การศึกษาความคงตัวของเม็ดเจลในสารยับยั้งชนิดต่างๆ

นำเม็ดเจลที่ได้จากข้อ 4.2 ไปศึกษาความคงตัวของเม็ดเจลในสารยับยั้งชนิดต่างๆ ที่ได้รับการคัดเลือกแล้วจากการทดลองในข้อ 4 คือ แมกนีเซียมคลอไรด์และแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ คัดเลือกสารยับยั้งที่ทำให้เม็ดเจลมีความคงตัวในสารละลายมากที่สุด โดยดูจากจำนวนเม็ดเจลที่คงสภาพได้นาน 1 วัน

4.4 การศึกษาอัตราส่วนระหว่างเซลล์และสารละลายโซเดียมแอลจิเนทที่เหมาะสม

ศึกษาโดยใช้วิธีการข้างต้นโดยใช้สารยับยั้งที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 1 แต่ปรับเปลี่ยนอัตราส่วนโดยร้อยละโดยปริมาตรระหว่างเมทาโนโทรฟและโซเดียมอัลจิเนตดังตารางที่ 7

ใส่เม็ดเจลลงในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 12.9 มิลลิโมลาร์ ซึ่งมี 5 ไมโครโมลาร์คอปเปอร์ซัลเฟต 20 มิลลิโมลาร์โซเดียมฟอร์เมท และแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์เป็นสารยับยั้ง ซึ่งเป็นสารยับยั้งที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 4.3 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ปิดผนึกและบรรจุก๊าซชีวภาพสังเคราะห์ (อัตราส่วนมีเทนต่อคาร์บอนไดออกไซด์ เท่ากับ 60 ต่อ 40) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าที่ 120 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 ^{o}ซ เปรียบเทียบกับเชื้อที่ไม่ตรึงเซลล์ (cell suspension) ที่มีปริมาตรเชื้อเริ่มต้นเท่ากันคือ 2 มิลลิลิตร (ความเข้มข้น 1.1 กรัมต่อลิตร)

ศึกษาความคงตัวของเม็ดเจล ที่ช่วงเวลาต่างๆ คัดเลือกสภาวะที่ใช้สารละลายแคลเซียมอัลจิเนตน้อยที่สุดที่ทำให้เม็ดเจลมีความคงตัว

4.5 การศึกษาขนาดของเม็ดเจลที่มีความเหมาะสมในกระบวนการผลิตเมทานอล

ทำการตรึงเซลล์โดยใช้อัตราส่วนร้อยละของเชื้อเริ่มต้นต่อโซเดียมอัลจิเนตที่เหมาะสมจากการทดลองข้างต้นคือ ร้อยละ 50 ต่อ 50 ความเข้มข้นเชื้อเริ่มต้น 1.1 กรัมต่อลิตร แต่เปลี่ยนขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางเจลคือ 2, 3, 4 และ 5 มิลลิเมตร โดยใช้ขนาดของเข็มในการกำหนดขนาดของเม็ดเจล ใส่เม็ดเจลลงในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 12.9 มิลลิโมลาร์ ซึ่งมี 5 ไมโครโมลาร์คอปเปอร์ซัลเฟต 20 มิลลิโมลาร์โซเดียมฟอร์เมท และแคลเซียมคลอไรด์เป็นสารยับยั้ง

ปิดผนึกและบรรจุก๊าซชีวภาพสังเคราะห์เข้าไปเพื่อให้ได้ความเข้มข้นก๊าซชีวภาพในบรรยากาศร้อยละ 16.66 เขย่าที่ 120 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 3 วัน ตรวจวัดปริมาณของเมทานอลและมีเทนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ ทดสอบชนิดและปริมาณของเชื้อเริ่มต้นและสิ้นสุดด้วยวิธีการฟีช (พิชญา, 2550)

ตารางที่ 7 การทดสอบอัตราส่วนระหว่างเชื้อเมทาโนโทรฟต่ออัลจิเนตที่เหมาะสม

ปริมาตรเชื้อ (มิลลิลิตร)	ปริมาตรโซเดียม-อัลจิเนต (มิลลิลิตร)	ร้อยละโดยปริมาตรของเชื้อ	ร้อยละโดยปริมาตรของโซเดียมอัลจิเนต
2	18	10	90
2	8	20	80
2	1	40	60
2	2	50	50

5. สถานที่และระยะเวลาในการทำงานวิจัย

5.1 สถานที่ทำงานวิจัย

ห้องปฏิบัติการภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม 1 และ 2 คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพมหานคร

5.2 ระยะเวลาดำเนินการวิจัย

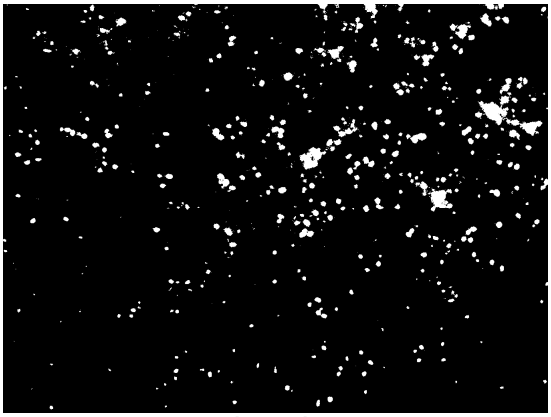
เริ่มดำเนินการวิจัยตั้งแต่เดือนพฤษภาคม 2549 – เดือนพฤษภาคม 2550

ผลและวิจารณ์

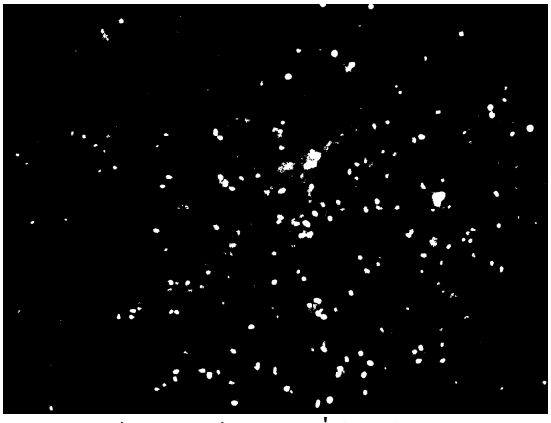
1. การวิเคราะห์ชนิด (Type) และปริมาณเชื้อเมทาโนโทรฟ

ทำการแยกเชื้อเมทาโนโทรฟจากดินหลุมฝังกลบจำลองที่มีการเจริญเติบโตของเชื้อชนิดนี้โดยการตรวจสอบมีเทนออกซิเดชันของดิน (พิชญา, 2550) โดยนำดินหลุมฝังกลบจำลองมาแยกเชื้อโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเอ็นเอ็มเอส และวิเคราะห์ปริมาณเชื้อเมทาโนโทรฟโดยวิธีการฟิช โดยโพรบที่ทำการศึกษาคือ Mγ84 และ Mγ705 สำหรับวิเคราะห์เมทาโนโทรฟ Type I และ Mα405 สำหรับวิเคราะห์เมทาโนโทรฟ Type II และ DAPI สำหรับวิเคราะห์จุลินทรีย์ทั่วไป สำหรับสกุล (genus) ที่อยู่ในขอบข่ายของวิธีฟิช ของการศึกษานี้ คือ เมทาโนโทรฟ Type I ได้แก่ *Methylococcus* spp., *Methylobacter* spp., *Methylomicrobium* spp., *Methylomanas* spp., *Methylosarcina* spp., *Methylosphaera* spp., *Methylocadum* spp. และสำหรับเมทาโนโทรฟ Type II ได้แก่ *Methylocystis* spp., *Methylosinus* spp. (Eller *et al.*, 2001) ภาพจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ดังแสดงในภาพที่ 10 เมื่อพิจารณาอัตราส่วนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดต่อเมทาโนโทรฟพบว่าเชื้อเมทาโนโทรฟทั้ง 2 ชนิดสามารถแยกได้ในตัวอย่างดินครั้งแรกในอัตราส่วนร้อยละ 46.5 $\pm$ 6.34 ของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด โดยในเชื้อจุลินทรีย์เมทาโนโทรฟ Type I ร้อยละ 12.8 $\pm$ 5.67 และ Type II ร้อยละ 33.7 $\pm$ 9.21

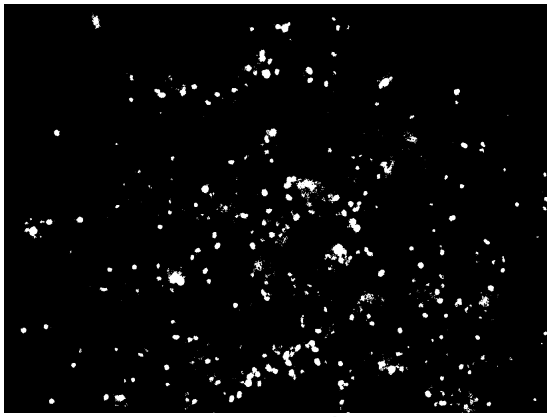
เมื่อนำเชื้อที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินข้างต้นมาถ่ายเชื้อลงสู่อาหารเอ็นเอ็มเอสอีกครั้ง เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้น (stock culture) สำหรับการผลิตเมทานอล พบว่ามีเมทาโนโทรฟเพิ่มขึ้นกว่าการคัดเชื้อครั้งแรกโดยมีอัตราส่วนประมาณร้อยละ 67.21$\pm$ 12.92 ของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดที่ย้อมด้วย DAPI ซึ่งมีปริมาณสัดส่วนเมทาโนโทรฟต่อจุลินทรีย์ทั่วไปที่สูงขึ้นเมื่อถ่ายเชื้อครั้งที่ 2 เนื่องจากการถ่ายเชื้อในอาหารเอ็นเอ็มเอสซึ่งเป็นอาหารที่จำเพาะ (selective) กับเชื้อเมทาโนโทรฟและให้มีเทนเป็นแหล่งคาร์บอนทำให้จุลินทรีย์ที่ไม่สามารถใช้มีเทนเป็นแหล่งคาร์บอนได้ไม่สามารถเจริญและตายไป (นงลักษณ์และปรีชา, 2547) โดยอัตราส่วนเมทาโนโทรฟ Type I ร้อยละ 18.62 $\pm$ 8.92 และ Type II ร้อยละ 48.59 $\pm$ 10.01 โดยนำเชื้อดังกล่าวมาใช้ในระบบการผลิตเมทานอลแบบเป็นครั้งทุกชุดการทดลอง ระยะเวลา 3-7 วัน การเปลี่ยนอัตราส่วนระหว่างเมทาโนโทรฟ Type I และ Type II ในทุกชุดการทดลองไม่เปลี่ยนแปลงเกินร้อยละ 10 ซึ่งอาจเกิดจากขั้นตอนการผลิตเมทานอลเพียง 3 ถึง 7 วัน ดังนั้นจึงไม่มีการเปลี่ยนแปลงของชนิดของเมทาโนโทรฟเท่าใดนัก และสำหรับจุลินทรีย์ที่ผ่านการตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนตก็ให้ผลเช่นเดียวกัน



(ก) เซลล์จุลินทรีย์ทั่วไปที่ย้อมด้วย DAPI



(ข) เซลล์จุลินทรีย์ Type I ที่ย้อมด้วยโพรบ Mγ84 + Mγ705



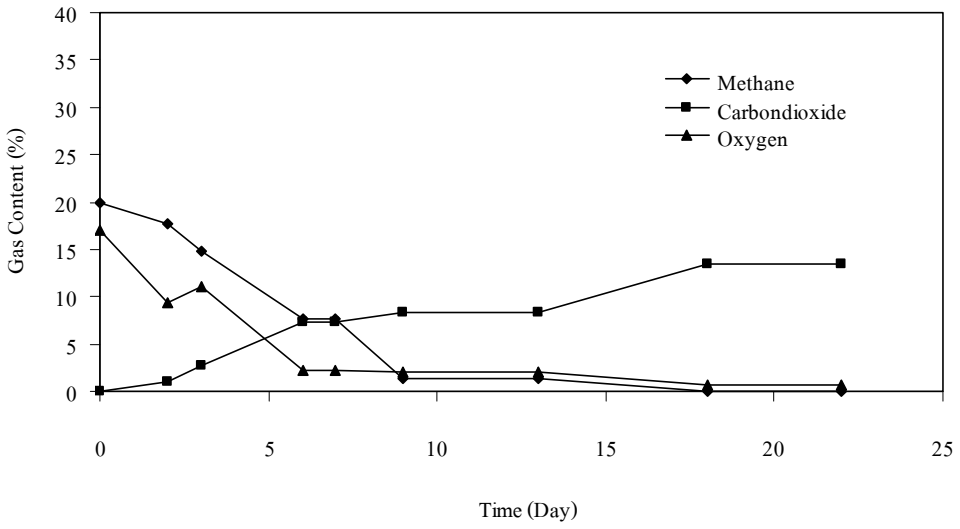
(ค) เซลล์จุลินทรีย์ Type II ที่ย้อมด้วยโพรบ Mα405

ภาพที่ 10 เซลล์จุลินทรีย์ที่ย้อมด้วยโพรบชนิดต่างๆ ในการวิเคราะห์ฟิช

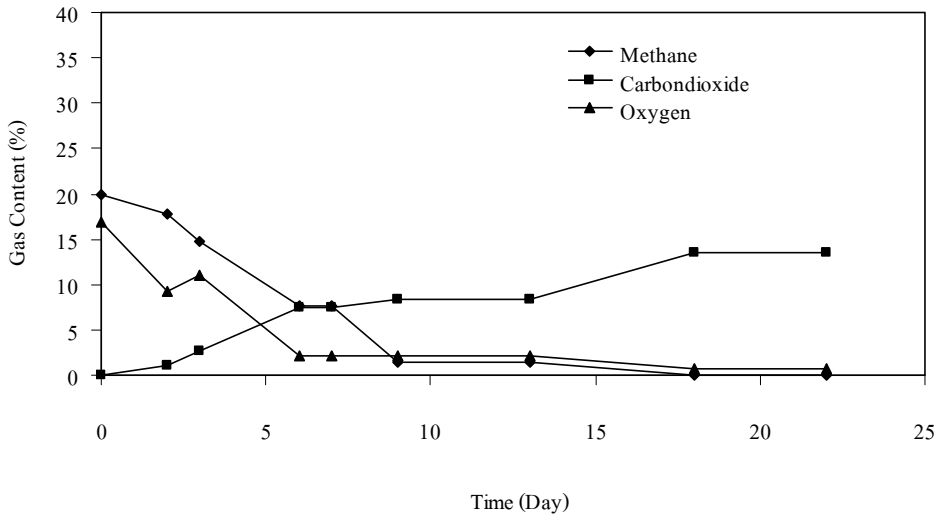
2. การศึกษาปริมาณมีเทนที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเมทาโนโทรฟในการทดลองแบบกะ

ในการทดสอบนี้เป็นการทดสอบเพื่อศึกษาปริมาณมีเทนที่เหมาะสมสำหรับกิจกรรมของเชื้อเมทาโนโทรฟในการทดลองแบบกะโดยใช้อาหารเอ็นเอ็มเอส ก่อนนำมาใช้ในกระบวนการผลิตเมทานอล โดยให้มีเทนบริสุทธิ์ร้อยละ 99.9 ในบรรยากาศของขวดซีรัมขนาด 118 มิลลิลิตร ซึ่งมีปริมาตรอากาศเท่ากับ 100 มิลลิลิตรที่ใช้ในการทดลอง โดยแปรผันปริมาณมีเทนเริ่มต้นความเข้มข้นประมาณร้อยละ 10 – 40 ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 0.236 กรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าการย่อยสลายมีเทนของเชื้อเมทาโนโทรฟที่ให้มีเทนเริ่มต้นร้อยละ 9.50 มีการย่อยสลายมีเทนรวดเร็วภายใน 2 วันแรกและสามารถย่อยสลายมีเทนจนหมดภายใน 3 วัน โดยมีปริมาณร้อยละของออกซิเจนลดลงจากออกซิเจนเริ่มต้นร้อยละ 18.60 เหลือร้อยละ 7.03 ในวันที่ 3 ของการทดลอง (ภาพที่ 11) แสดงว่าในสภาวะดังกล่าวมีปริมาณออกซิเจนในระบบอย่างเพียงพอ ดังนั้นจึงไม่มีการใช้ออกซิเจนในวันต่อมาของการทดลอง สำหรับสภาวะที่ให้ปริมาณมีเทนเริ่มต้นในบรรยากาศร้อยละ 19.99, 28.80 และ 38.81 (ภาพที่ 12, 13 และ 14) มีการย่อยสลายมีเทนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงระยะเวลา 7 วันแรก โดยมีปริมาณมีเทนลดลงเหลือร้อยละ 7.67, 15.11 และ 26.21 ตามลำดับ และมีแนวโน้มคงที่ในวันต่อมา ทั้งนี้การผลิตคาร์บอนไดออกไซด์มีแนวโน้มสอดคล้องกับการใช้มีเทน (ภาพที่ 13) ในขณะที่ปริมาณออกซิเจนลดลงจากร้อยละ 16.95, 15.31 และ 13.28 เหลือร้อยละ 2.15, 1.34 และ 1.88 ตามลำดับ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าปริมาณของออกซิเจนที่มีอย่างจำกัดทำให้การย่อยสลายมีเทนลดลง

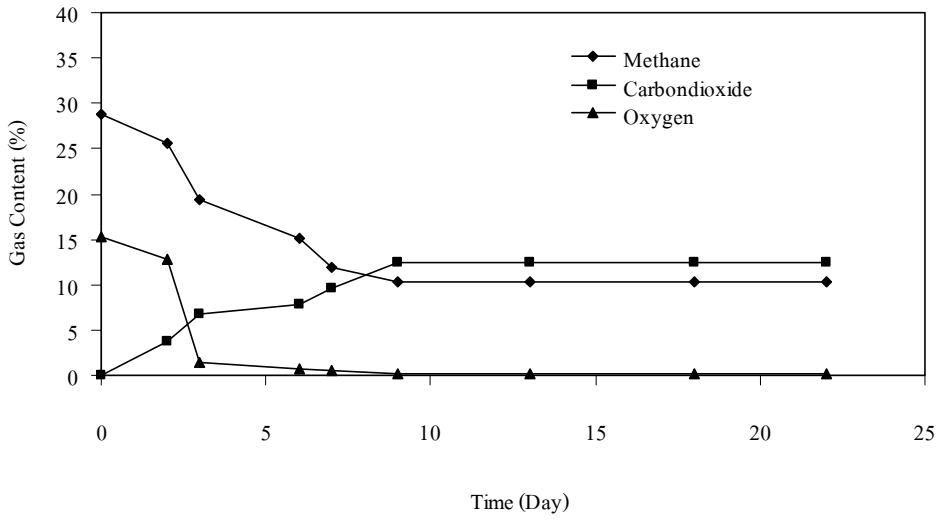
จากผลการทดลองจะเห็นว่าสัดส่วนระหว่างก๊าซมีเทนและก๊าซออกซิเจนในบรรยากาศมีความสัมพันธ์ต่อการย่อยสลายมีเทนของเมทาโนโทรฟ จึงสรุปได้ว่าปริมาณมีเทนที่ใช้ในการทดลองถัดไปจึงควรอยู่ในช่วงร้อยละ 20 เนื่องจากเป็นปริมาณที่มีเทนและออกซิเจนในระบบซึ่งถูกนำไปใช้ โดยเมทาโนโทรฟสมดุลกัน



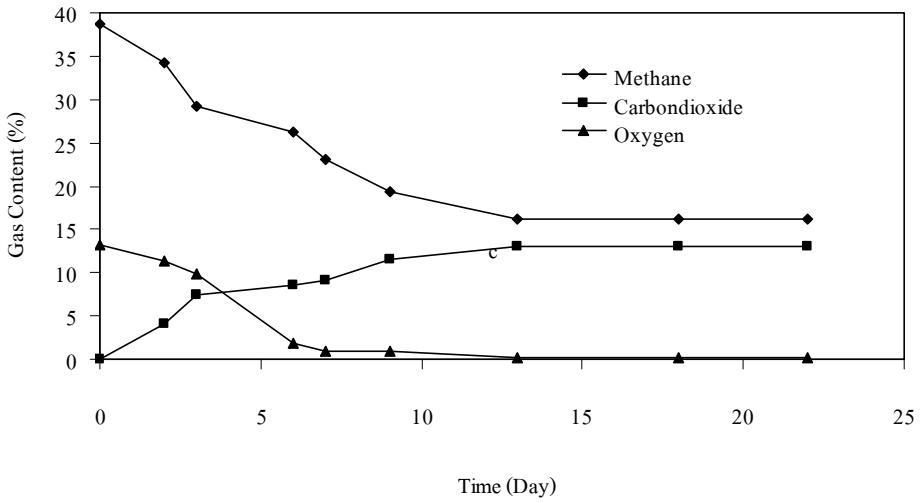
ภาพที่ 11 การเปลี่ยนแปลงของมีเทน คาร์บอนไดออกไซด์ และออกซิเจนในบรรยากาศมีเทนเริ่มต้นร้อยละ 10 ในการศึกษาผลของความเข้มข้นมีเทนต่อกิจกรรมเมทาโนโทรฟ



ภาพที่ 12 การเปลี่ยนแปลงของมีเทน คาร์บอนไดออกไซด์ และออกซิเจนในบรรยากาศมีเทนเริ่มต้นร้อยละ 20 ในการศึกษาผลของความเข้มข้นมีเทนต่อกิจกรรมเมทาโนโทรฟ



ภาพที่ 13 การเปลี่ยนแปลงของมีเทน คาร์บอนไดออกไซด์ และออกซิเจนในบรรยากาศมีเทนเริ่มต้นร้อยละ 30 ในการศึกษาผลของความเข้มข้นมีเทนต่อกิจกรรมเมทาโนโทรฟ



ภาพที่ 14 การเปลี่ยนแปลงของมีเทน คาร์บอนไดออกไซด์ และออกซิเจนในบรรยากาศมีเทนเริ่มต้นร้อยละ 40 ในการศึกษาผลของความเข้มข้นมีเทนต่อกิจกรรมเมทาโนโทรฟ

3. การศึกษาเพื่อคัดเลือกสภาวะที่มีความเหมาะสมในการผลิตเมทานอลจากเชื้อเมทาโนโทรฟผสมแบบแขวนลอย (suspension) ในระบบการผลิตแบบเป็นครั้ง (batch experiment)

3.1 การศึกษาเบื้องต้นในการผลิตเมทานอลของเชื้อเมทาโนโทรฟที่คัดแยกได้

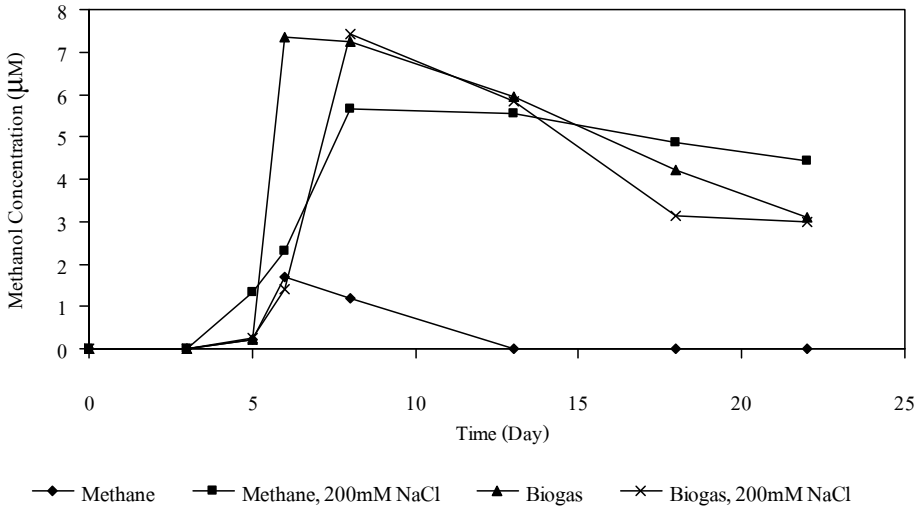
นำเชื้อเมทาโนโทรฟที่คัดแยกเชื้อเมทาโนโทรฟได้จากขั้นตอนที่ 1 มาทดสอบการผลิตเมทานอลเบื้องต้นโดยใช้วิธีของ Lee *et al*. (2004) ซึ่งใช้โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์เป็นสารยับยั้งเอนไซม์เมทานอลดีไฮโดรจีเนส 5 ไมโครโมลาร์คอปเปอร์ซัลเฟตเป็นสารกระตุ้นเอนไซม์พีเอ็มเอ็มโอใน 12.9 มิลลิโมลาร์ ซึ่งมี 20 มิลลิโมลาร์โซเดียมฟอร์เมตเพื่อป้องกันการลดลงของฟอร์มัลดีไฮด์ภายในเซลล์ของเมทาโนโทรฟ ในทุกสภาวะการทดสอบผลการทดลองแสดงในภาพที่ 15 โดยพบว่าการทดสอบทุกชุดเริ่มมีการผลิตเมทานอลเมื่อระยะเวลาผ่านไป 3 วัน โดยการใช้ก๊าซชีวภาพอย่างเดียวมีการผลิตเมทานอลอย่างรวดเร็วและสูงกว่าการใช้มีเทนบริสุทธิ์ทั้งสองกรณีของการใช้และไม่ใช้สารยับยั้งโซเดียมคลอไรด์ แต่การไม่ใช้สารยับยั้งให้เมทานอลสูงสุดเร็วกว่าการใช้สารยับยั้งซึ่งใช้เวลา 5 และ 8 วัน ตามลำดับ อย่างไรก็ตามปริมาณเมทานอลในกรณีก๊าซชีวภาพมีแนวโน้มลดลงตามเวลาของการทดลอง ส่วนในกรณีของก๊าซมีเทนบริสุทธิ์ การใช้สารยับยั้งให้ผลดีกว่าการไม่ใช้สารยับยั้งอย่างมีนัยสำคัญโดยให้เมทานอลสูงสุดที่ 8 วันของการบ่มและค่อนข้างคงที่ตลอดระยะเวลา 22 วันของการทดลอง

อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงอัตราการผลิตเมทานอลสูงสุดต่อมวลมีเทนที่ใช้ไป (ภาพที่ 16) พบว่าอัตราการผลิตเมทานอลสูงสุดในกรณีที่ใช้ก๊าซชีวภาพอย่างเดียว โดยอัตราการผลิตเมทานอลเท่ากับ 1,185 นาโนกรัมต่อกรัมมีเทน โดยการใช้สารยับยั้งเป็นโซเดียมคลอไรด์ให้ผลผลิตต่ำกว่าการไม่ใช้สารยับยั้งประมาณ 5 เท่า (239 นาโนกรัมต่อกรัมมีเทน) และการใช้ก๊าซมีเทนบริสุทธิ์ให้อัตราการผลิตเมทานอลเพียง 151 และ 218 นาโนกรัมต่อกรัมมีเทนในชุดที่ใช้และไม่ใช้สารยับยั้งตามลำดับ

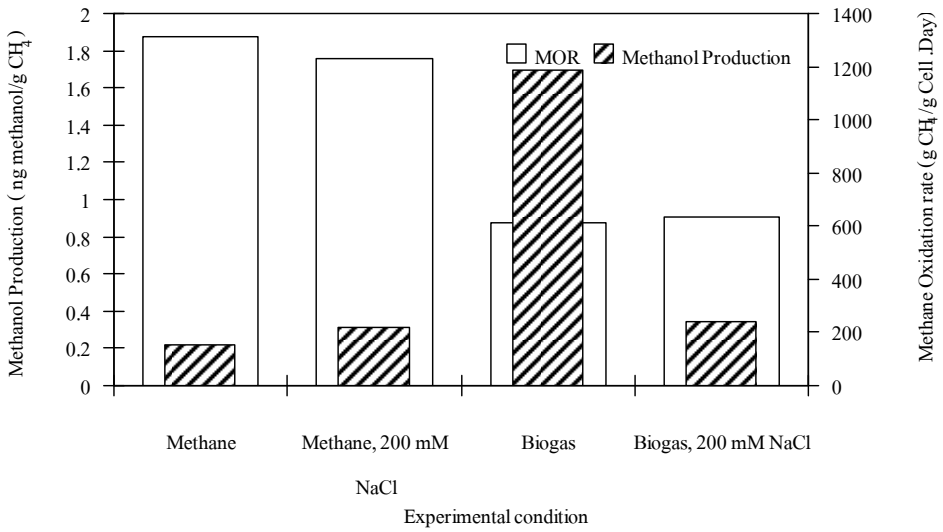
จากผลการทดลองพบว่าเชื้อเมทาโนโทรฟผสมที่คัดแยกได้สามารถผลิตเมทานอลได้มีประสิทธิภาพได้ดีในสภาพที่มีสารกระตุ้นคอปเปอร์ และใช้มีเทนจากก๊าซชีวภาพโดยไม่มีการเติมสารยับยั้งที่เป็นเกลือโซเดียมคลอไรด์ ทั้งนี้คาดว่าคาร์บอนไดออกไซด์สามารถช่วยทำให้เอนไซม์เมทานอลดีไฮโดรจีเนสทำงานช้าลงซึ่งเป็นธรรมชาติของปฏิกิริยาเคมีที่มีผลผลิตในกระบวนการเป็นสารยับยั้งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Xin *et al*. (2004) ที่รายงานว่าก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ สามารถเพิ่มผลผลิตของเมทานอลในระบบที่ใช้เชื้อเมทาโนโทรฟได้ อย่างไร

ก็ตามเกลือโซเดียมคลอไรด์สามารถทำให้เมทานอลในระบบเสถียรได้ดีกว่ากรณีอื่นๆ โดยสามารถรักษาปริมาณเมทานอลในระดับใกล้เคียงปริมาณสูงสุดได้ถึง 2 สัปดาห์

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณเมทานอลกับการทดลองของ Lee *et al*. (2004) ซึ่งใช้เชื้อบริสุทธิ์ของ *Methylosinus trichosporium* OB3b ความเข้มข้น 0.6 กรัมต่อลิตร โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์เป็นสารยับยั้ง โดยให้มีเทนบริสุทธิ์เป็นแหล่งคาร์บอนปริมาณมีเทนเริ่มต้นร้อยละ 25 พบว่าปริมาณเมทานอลสูงสุดจากการทดลองยังมีปริมาณที่ต่ำ (7.3 ไมโครโมลาร์) เมื่อเทียบกับค่าสูงสุดของการทดลองของ Lee *et al*. (2004) ซึ่งพบปริมาณเมทานอลสูงสุดที่ 7 มิลลิโมลาร์ ภายใน 2 วัน การที่ปริมาณของเมทานอลในการทดลองนี้ต่ำกว่าการทดลองของ Lee *et al*. (2004) ทั้งนี้เนื่องมาจากเชื้อที่ใช้ในการทดลองเป็นเชื้อเมทาโนโทรฟแบบผสม ดังนั้นจึงต้องทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเมทานอลโดยเชื้อเมทาโนโทรฟผสมที่ใช้ในงานวิจัยนี้ โดยทำการศึกษาอุณหภูมิ สารละลายและขั้นตอนเพื่อปรับสภาพเมทาโนโทรฟให้มีความเหมาะสมต่อการผลิตเมทานอล ปริมาณมีเทนที่เหมาะสมในการผลิตเมทานอลของเมทาโนโทรฟผสมการคัดเลือกชนิดของสารยับยั้งและความเข้มข้น ที่เหมาะสมต่อการยับยั้งเมทานอลดีไฮโดรจีเนส และการใช้ก๊าซชีวภาพในการผลิตเมทานอล



ภาพที่ 15 การผลิตเมทานอลตามเวลาเมื่อมีแหล่งมีเทนบริสุทธิ์และก๊าซชีวภาพภายใต้สภาวะการกระตุ้นด้วยคอปเปอร์และยับยั้งด้วยโซเดียมคลอไรด์



ภาพที่ 16 การผลิตเมทานอลต่อมวลมีเทนที่ใช้ไปเมื่อใช้มีเทนบริสุทธิ์และก๊าซชีวภาพเป็นสารอาหารภายใต้สภาวะการกระตุ้นด้วยคอปเปอร์และยับยั้งด้วยโซเดียมคลอไรด์ (หมายเหตุ MOR = Methane Oxidation Rate)

3.2 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสม

การทดลองในขั้นตอนนี้เป็นการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเมทานอลของแบคทีเรียเมทาโนโทรฟ โดยมีสภาวะในการทดลองเช่นเดียวกับการทดสอบการผลิตเมทานอลเบื้องต้นในข้อ 3.1 โดยให้มีเทนบริสุทธิ์ร้อยละ 99.9 ปริมาณมีเทนเริ่มต้นในบรรยากาศร้อยละ 30 โดยอุณหภูมิที่ทำการศึกษา ได้แก่ อุณหภูมิห้อง (25 ± 2 °ซ) อุณหภูมิ 40 และ 50 °ซ

จากการทดลองพบว่า ที่อุณหภูมิ 40 °ซ มีการย่อยสลายมีเทนต่ำมากและไม่มีการผลิตเมทานอล ส่วนที่อุณหภูมิ 50 °ซ ไม่เกิดการย่อยสลายมีเทนและการผลิตเมทานอลในทุกชุดการทดสอบ ทั้งนี้เป็นเพราะเชื้อที่แยกได้จากระบบหลุมฝังกลบจำลองเป็นระบบที่อยู่ภายใต้ภายใต้อุณหภูมิห้อง จึงอาจไม่มีเชื้อเมทาโนโทรฟกลุ่มเทอร์โมฟิลอยู่ สำหรับผลการทดลองการย่อยสลายของมีเทนที่อุณหภูมิห้องจะเป็นดังที่ได้กล่าวมาแล้วในข้อ 3.1

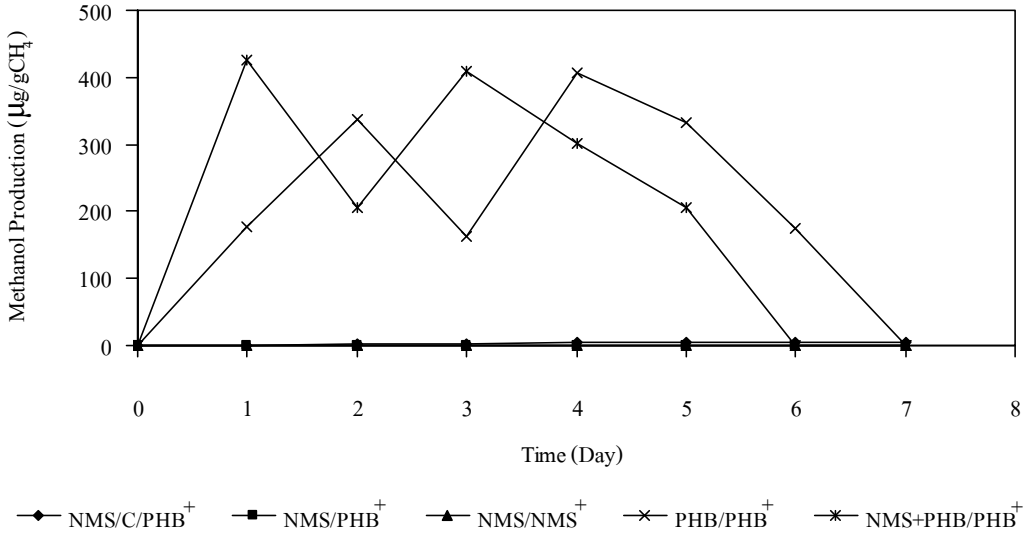
3.3 การคัดเลือกสารละลายและขั้นตอนเพื่อปรับสภาพเมทาโนโทรฟให้มีความเหมาะสมต่อการผลิตเมทานอลของเมทาโนโทรฟผสม

จากการทดลองที่ผ่านมาข้างต้นนั้นพบว่าเชื้อมีระยะเวลาค่อนข้างนานในการปรับสภาพ ก่อนมีการผลิตเมทานอล (ประมาณ 5 วัน) ซึ่งอาจเกิดเนื่องจากเชื้อได้รับความกระทบกระเทือนจากการตกตะกอนด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วสูง การล้างเซลล์ และผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงชนิดของสารตัวกลางจากอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็นเอ็มเอสเป็นฟอสเฟตบัฟเฟอร์ การทดลองในขั้นตอนนี้จึงเป็นการศึกษาคัดเลือกสารละลายและขั้นตอนที่ใช้ในขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเชื้อและการผลิตเมทานอลเพื่อลดระยะเวลาในช่วงการปรับสภาพของเชื้อจากการเปลี่ยนสารตัวกลางและลดขั้นตอนการปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเชื้อซึ่งเป็นขั้นตอนที่ยุ่งยากและมีผลกระทบต่อเซลล์

ผลการทดสอบดังแสดงในภาพที่ 17 พบว่าใน NMS/C/PHB^{+} ซึ่งเป็นสภาวะเดิมโดยปริมาณเชื้อเริ่มต้นในระบบ 10 กรัม มีการผลิตเมทานอลในวันที่ 2 เท่ากับ 0.644 ไมโครกรัมต่อกรัมมีเทน และปริมาณเมทานอลสูงสุดในวันที่ 4 เท่ากับ 2.69 ไมโครกรัมต่อกรัมมีเทน ซึ่งปริมาณเมทานอลที่ตรวจพบในสภาวะนี้มีปริมาณที่ต่ำมาก สำหรับในสภาวะที่ NMS/PHB^{+} คือ เลี้ยงเชื้อเมทาโนโทรฟในอาหารเอ็นเอ็มเอสแล้วถ่ายลงสู่ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซึ่งมีโซเดียมคลอไรด์เป็นสารยับยั้งเมทานอลดีไฮโดรจีเนสและคอปเปอร์ซัลเฟตซึ่งเป็นสารกระตุ้นพีเอ็มเอ็มโอพบว่าไม่มีการผลิตเมทานอลในระหว่างระยะเวลา 7 วัน ที่ทำการศึกษาทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงชนิดของสารตัวกลางทำให้เซลล์ต้องใช้ระยะเวลาในการปรับสภาพและปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่ต่ำกว่าสภาวะที่ 1 (0.0032 กรัม)

ในสภาวะที่ NMS/NMS^{+} คือ เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็นเอ็มเอสเป็นเวลา 2 สัปดาห์ก่อนถ่ายลงสู่อาหารเอ็นเอ็มเอสใหม่ซึ่งมีสารยับยั้งคือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ ไม่พบการผลิตเมทานอลในตลอดช่วงเวลาการผลิต คือ 7 วัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากอาหารเอ็นเอ็ม-เอสมีแหล่งของธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเมทาโนโทรฟซึ่งสารอาหารเหล่านั้นอาจถูกนำไปใช้เป็นส่วนประกอบของเซลล์ เอนไซม์ และอื่นๆ ทำให้เมทาโนโทรฟอาจนำมีเทนมาใช้เพื่อการสร้างเซลล์มากกว่าผลิตเมทานอล ประสิทธิภาพของสารยับยั้งเมทานอลดีไฮโดรจีเนสอาจทำงานได้ไม่เต็มที่ในสภาวะนี้ ซึ่งการสะสมของปริมาณเมทานอลให้สูงในระดับที่ตรวจวัดได้อาจต้องใช้ระยะเวลานาน

ในสภาวะที่ PHB/PHB^{+} คือ สภาวะที่มีการเลี้ยงเมทาโนโทรฟในฟอสเฟตบัฟเฟอร์แล้วจึงถ่ายลงสู่ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซึ่งมีโซเดียมคลอไรด์และคอปเปอร์ซัลเฟตพบว่ามีการผลิตเมทานอลภายในวันที่ 1 ปริมาณเมทานอลที่ตรวจพบเท่ากับ 177.94 ไมโครกรัมต่อกรัมมีเทน โดยมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นในระบบ 0.0019 กรัม และมีปริมาณเมทานอลสูงสุดในวันที่ 4 (406.72 ไมโครกรัมต่อกรัมมีเทน) สำหรับในสภาวะที่ NMS+ PHB/PHB^{+} คือ เลี้ยงเชื้อในเอ็นเอ็มเอสที่มีการผสมฟอสเฟสบัฟเฟอร์ในอัตราส่วน 50 ต่อ 50 เพื่อให้เชื้อปรับสภาพก่อนถ่ายลงสู่ฟอสเฟสบัฟเฟอร์ที่มีโซเดียมคลอไรด์และคอปเปอร์ซัลเฟตมีการตรวจพบเมทานอลในวันที่ 1 เช่นเดียวกับวิธีที่ 4 โดยมีปริมาณเมทานอลที่ตรวจพบเท่ากับ 425.78 ไมโครกรัมต่อกรัมมีเทน (ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 0.0022 กรัม) ซึ่งเป็นปริมาณเมทานอลที่ตรวจพบในวันที่ 1 เป็นปริมาณเมทานอลที่สูงสุดในช่วงเวลาการศึกษา จะเห็นว่าสภาวะที่ 5 ที่ใช้ในการทดลองศึกษาเป็นสภาวะที่มีความเหมาะสมมากที่สุดในการผลิตเมทานอลโดยเมทาโนโทรฟผสมจึงนำสภาวะที่ 5 ไปใช้ ในการเตรียมเชื้อเมทาโนโทรฟเพื่อผลิตเมทานอลในการทดลองต่อไป

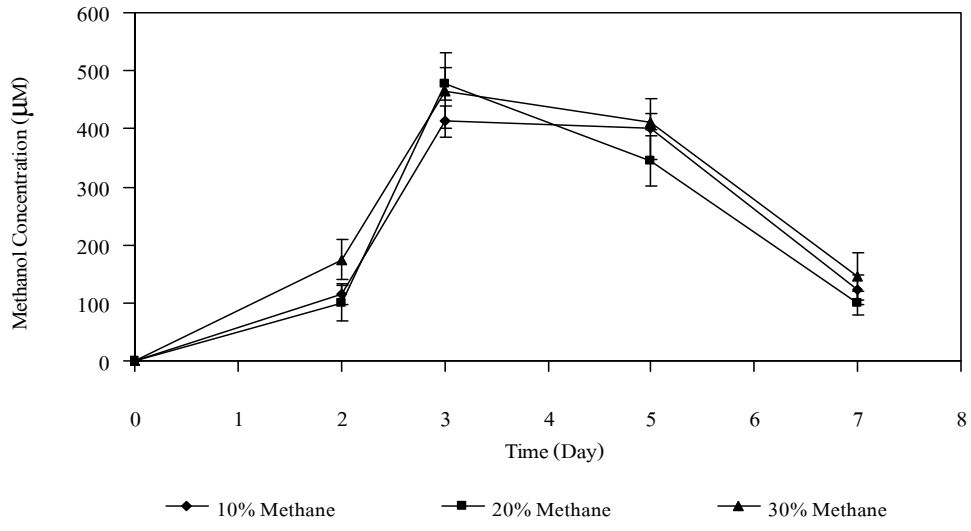


ภาพที่ 17 อัตราการผลิตเมทานอลของแต่ละสภาวะการทดลองในการคัดเลือกสารละลายและขั้นตอนในการปรับสภาพเมทาโนโทรฟ

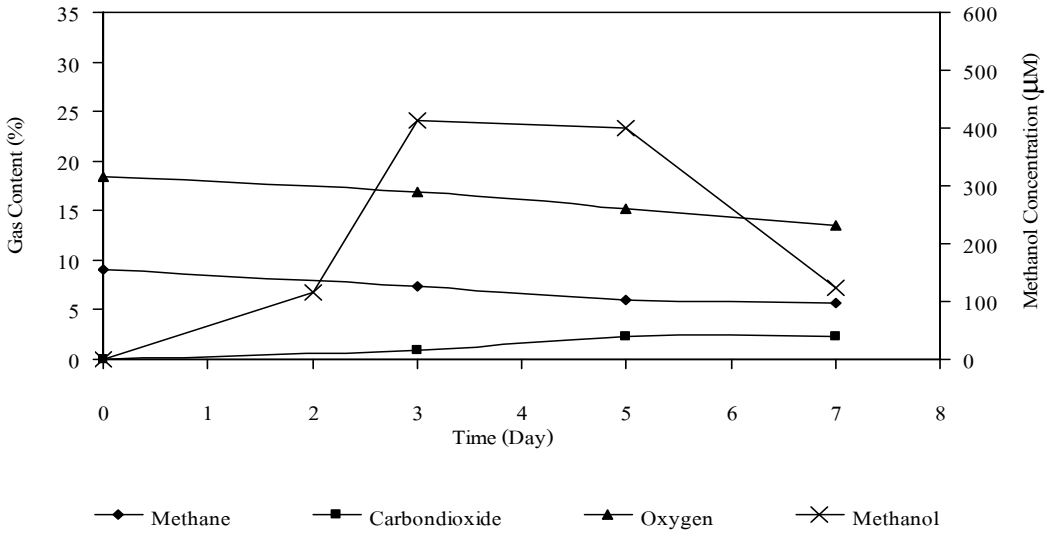
3.4 ปริมาณมีเทนที่เหมาะสมในการผลิตเมทานอลของเมทาโนโทรฟผสม

จากการศึกษาปริมาณมีเทนที่มีความเหมาะสมในการผลิตเมทานอลพบว่าเมื่อให้มีเทนในบรรยากาศประมาณร้อยละ 10, 20 และ 30 พบว่ามีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงคล้ายคลึงกันและปริมาณเมทานอลที่ผลิตไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 18) โดยปริมาณเมทานอลสูงสุดใน

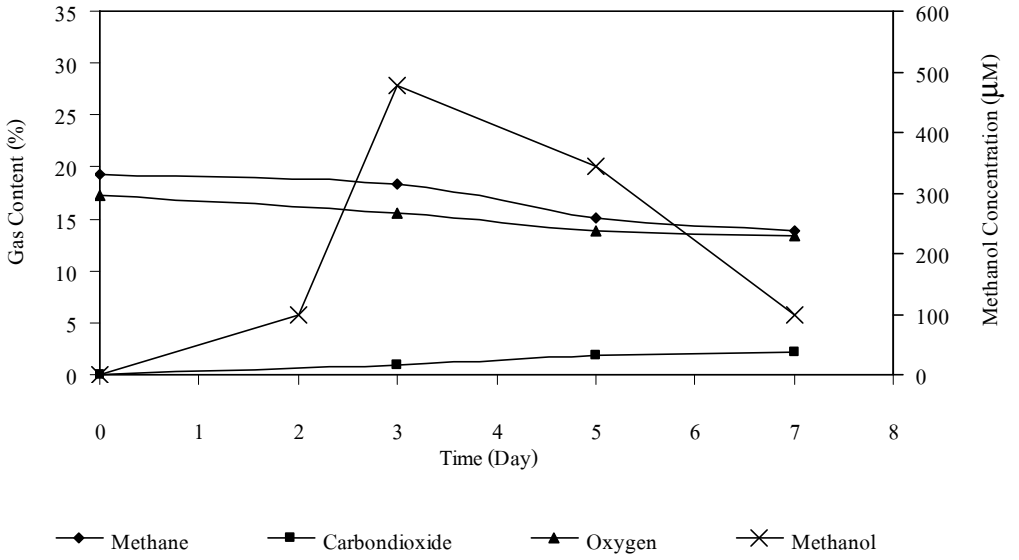
วันที่ 3 ของการทดลอง (ความเข้มข้นของเมทานอล 412.98, 477.80, 465.89 ไมโครโมลาร์) และปริมาณเมทานอลจะลดลงหลังจากนั้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสารที่มีแรงไอออนิคสูงสามารถยับยั้งการทำงานของเมทานอลดีไฮโดรจีเนสได้บางส่วนเท่านั้น และไม่ได้ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในส่วนอื่นๆ ได้แก่ ฟอร์มัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส ฟอร์เมตดีไฮโดรจีเนส ดังนั้นจึงมีการเปลี่ยนแปลงของเมทานอลเป็นฟอร์มัลดีไฮด์ ฟอร์เมตและคาร์บอนไดออกไซด์ ตามลำดับ ทำให้ปริมาณเมทานอลในระบบลดลง การเปลี่ยนแปลงของก๊าซและเมทานอลที่เวลาต่างๆในแต่ละระบบที่มีมีเทนเริ่มต้นประมาณร้อยละ 10, 20 และ 30 ดังแสดงในภาพที่ 18, 19 และ 20 ตามลำดับ โดยปริมาณมีเทนเริ่มต้นร้อยละ 9.05, 19.36 และ 29.48 ตามลำดับ จะลดลงเหลือร้อยละ 5.64, 13.79 และ 23.92 ในระยะเวลาการศึกษา 7 วัน การให้มีเทนในปริมาณมากไม่ส่งผลให้มีการผลิตเมทานอลเพิ่มขึ้นทั้งนี้คงเนื่องมาจากปริมาณเชื้อที่จำกัดหรืออีกนัยหนึ่งคือเอนไซม์เอ็มเอ็มโอมีจำกัด (พัชรา, 2543) อีกทั้งปริมาณของมีเทนซึ่งอยู่ในสถานะก๊าซทำให้ละลายลงสู่ตัวกลางที่เป็นของเหลวได้อย่างจำกัด นอกจากนี้การสะสมของเมทานอลซึ่งเป็นสารตัวกลางอีกชนิดในวิถีเมตะบอลิซึมของเมทาโนโทรฟทำให้เกิดการยับยั้งการนำมีเทนมาใช้ ซึ่งสอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์พบว่าก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จะเพิ่มประมาณร้อยละ 2 – 3 และปริมาณออกซิเจนจะลดลงจากออกซิเจนเริ่มต้น 18.40, 17.19 และ 15.41 ตามลำดับ ลดลงเหลือ 13.47, 13.37 และ 13.46 ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นว่าออกซิเจนลดลงประมาณร้อยละ 3 เท่านั้น ดังนั้นจึงไม่ใช่ข้อจำกัดของปริมาณออกซิเจนที่ไม่เพียงพอ สามารถสรุปได้ว่าปริมาณมีเทนเพียงร้อยละ 10 ก็เพียงพอสำหรับการนำไปใช้เพื่อผลิตเมทานอลของเมทาโนโทรฟในการทดลองนี้



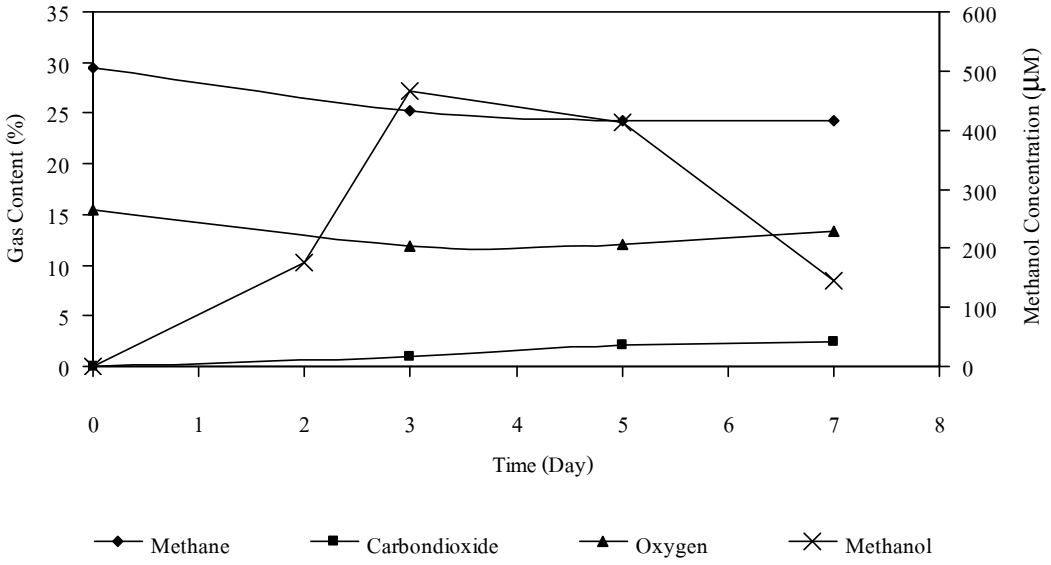
ภาพที่ 18 ปริมาณเมทานอลที่ตรวจวัดในเวลา 7 วัน โดยมีความเข้มข้นมีเทนในบรรยากาศแตกต่างกันโดยมี 200 มิลลิโมลาร์โซเดียมคลอไรด์เป็นสารยับยั้ง



ภาพที่ 19 การเปลี่ยนแปลงของเมทานอล มีเทน คาร์บอนไดออกไซด์และออกซิเจนในบรรยากาศ มีเทนเริ่มต้นร้อยละ 10 โดยมี 200 มิลลิโมลาร์โซเดียมคลอไรด์เป็นสารยับยั้ง



ภาพที่ 20 การเปลี่ยนแปลงของเมทานอล มีเทน คาร์บอนไดออกไซด์และออกซิเจนในบรรยากาศ มีเทนเริ่มต้นร้อยละ 20 โดยมี 200 มิลลิโมลาร์โซเดียมคลอไรด์เป็นสารยับยั้ง

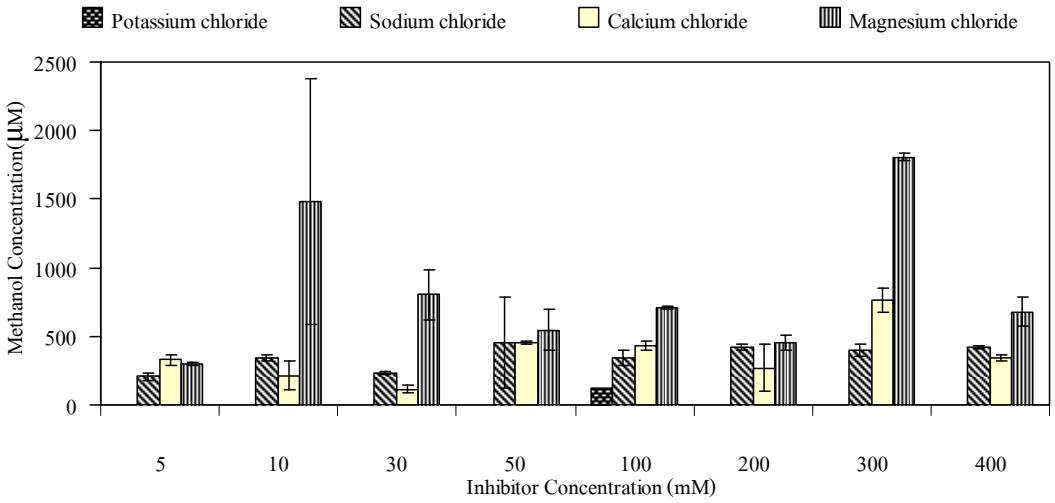


ภาพที่ 21 การเปลี่ยนแปลงของเมทานอล มีเทน คาร์บอนไดออกไซด์และออกซิเจนในบรรยากาศมีเทนเริ่มต้นร้อยละ 30 โดยมี 200 มิลลิโมลาร์โซเดียมคลอไรด์เป็นสารยับยั้ง

3.5 การคัดเลือกชนิดของสารยับยั้งและความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการยับยั้งเมทานอล-ดีไฮโดรจีเนส

การคัดเลือกชนิดของสารยับยั้งและความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการยับยั้งเมทานอล-ดีไฮโดรจีเนส พบว่าปริมาณเมทานอลสูงสุดในวันที่ 3 ของการทดลองในทุกๆ สภาวะ โดยปริมาณเมทานอลที่ผลิตในวันที่ 3 ดังแสดงในภาพที่ 22 โดยผลการทดสอบพบว่ามีการผลิตเมทานอลในทุกๆ ความเข้มข้นของสารละลายที่มีโซเดียมคลอไรด์ แมกนีเซียมคลอไรด์ และแคลเซียมคลอไรด์ ยกเว้นกรณีที่ใช้โปแทสเซียมคลอไรด์ที่พบเมทานอลเพียงที่ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ทั้งนี้เนื่องจากเซลล์มีความสามารถในการรักษาสมดุลของโปแทสเซียมไอออน (K^+) ได้ดี (Oren,1999) ทำให้ความสามารถในการยับยั้งเมทานอลดีไฮโดรจีเนสต่ำ ถึงแม้ว่าจะใช้ความเข้มข้นสูงมากเท่าไรก็ตามโดยเกลือแมกนีเซียมคลอไรด์และแคลเซียมคลอไรด์ให้เมทานอลสูงสุดเท่ากับ 1806 และ 765 ไมโครโมลาร์ที่ความเข้มข้นเกลือ 300 มิลลิโมลาร์ ในขณะที่โซเดียมคลอไรด์ให้เมทานอลสูงสุดเท่ากับ 421 ไมโครโมลาร์ที่ความเข้มข้นเกลือ 200 มิลลิโมลาร์ ซึ่งเป็นความเข้มข้นดังกล่าวที่สอดคล้องกับการทดลองของ Lee *et al*. (2004) ซึ่งศึกษาการผลิตเมทานอลโดยเชื้อ *Methylosinus trichosporium* OB3b ในสภาวะที่มีสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์เป็นสารยับยั้งเมทานอลดีไฮโดรจีเนส ใน 12.9 มิลลิโมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 5 ไมโครโมลาร์

คอปเปอร์ซัลเฟตและ 20 มิลลิโมลาร์โซเดียมฟอร์เมต โดยมีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 0.6 กรัมเซลล์แห้งต่อลิตร พบว่ามีการผลิตเมทานอล 7.7 มิลลิโมลาร์ที่เวลา 36 ชั่วโมง สำหรับ แมกนีเซียมคลอไรด์และแคลเซียมคลอไรด์มีความสามารถในการยับยั้งเมทานอลดีไฮโดรจีเนสสูงกว่าโซเดียมคลอไรด์ เนื่องมาจากบริเวณเร่ง (active site) ของเมทานอลดีไฮโดรจีเนส ประกอบด้วยแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) จับกับพีคิวคิว (PQQ: Pyrroloquinoline quinine) ซึ่งเป็นโปรตีนในเอนไซม์เมทานอล-ดีไฮโดรจีเนส (Anthony *et al,* 2002) การใช้สารยับยั้งซึ่งมีประจุ +2 จะมีความสามารถในการแย่งจับพีคิคิวกับแคลเซียมไอออนที่บริเวณเร่งได้สูงกว่าประจุ +1 และแคลเซียมไอออนอิสระในเซลล์ก็สามารถแย่งจับพีคิวคิวได้เช่นกัน

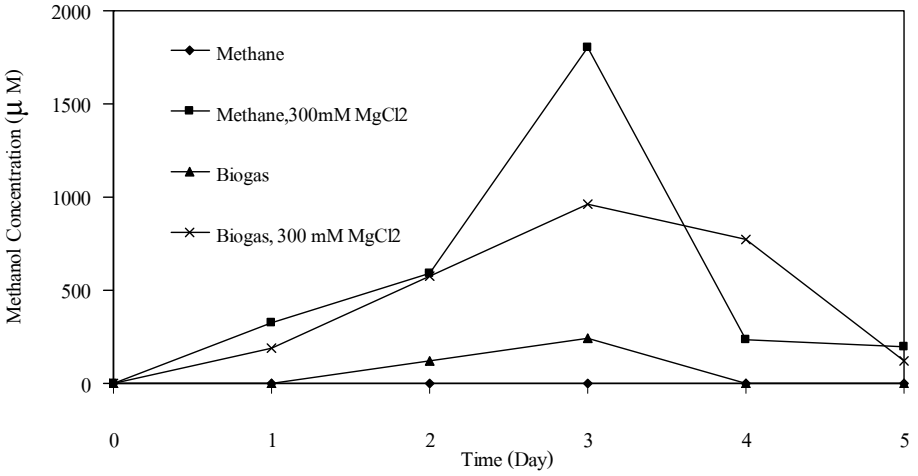


ภาพที่ 22 ผลของความเข้มข้นและชนิดของเกลือโปแทสเซียมคลอไรด์ โซเดียมคลอไรด์ แมกนีเซียมคลอไรด์ และแคลเซียมคลอไรด์ในการผลิตเมทานอลในวันที่ 3 ของการทดลอง

3.6 การศึกษาการผลิตเมทานอลด้วยก๊าซชีวภาพ

การทดลองใช้ก๊าซมีเทนหรือก๊าซชีวภาพเพียงอย่างเดียวโดยไม่มีเกลือแมกนีเซียม-คลอไรด์พบว่าไม่มีการผลิตเมทานอลในการใช้ก๊าซมีเทนอย่างเดียวแต่มีการผลิตเมทานอลเมื่อใช้ก๊าซชีวภาพซึ่งให้เมทานอลสูงสุดที่ระยะเวลา 3 วัน เท่ากับ 240 ไมโครโมลาร์ และเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งของ 300 มิลลิโมลาร์แมกนีเซียมคลอไรด์ ในสภาวะที่มีก๊าซชีวภาพกับก๊าซมีเทนบริสุทธิ์พบว่าปริมาณความเข้มข้นเมทานอลเมื่อใช้ก๊าซมีเทนบริสุทธิ์จะผลิตได้สูงกว่าก๊าซชีวภาพ (ภาพที่ 23) อาจสืบเนื่องจากปริมาณสารตั้งต้น (มีเทน) มีค่าสูงกว่า อย่างไรก็ตามการใช้ก๊าซมีเทนให้ความเสถียรในการผลิตเมทานอลที่ต่ำกว่า และเมื่อพิจารณาผลผลิตเมทานอลต่อปริมาณ

ก๊าซมีเทนที่ถูกใช้ไปกับอัตราการใช้มีเทนต่อเซลล์ต่อวัน (ภาพที่ 24) พบว่าในสภาวะที่ใช้ก๊าซชีวภาพเป็นแหล่งคาร์บอนจะมีอัตราการใช้มีเทนต่อเซลล์ต่อวันต่ำกว่าการใช้มีเทนบริสุทธิ์เป็นแหล่งคาร์บอน ในขณะที่มีอัตราการผลิตเมทานอลที่สูงกว่า ทั้งนี้เนื่องมาจากคาร์บอนไดออกไซด์ซึ่งเป็นสารผลิตภัณฑ์สุดท้ายของกระบวนการเมตะบอลิซึมสามารถทำให้ปฏิกิริยาการออกซิเดชันเมทานอลโดยเมทานอลดีไฮโดรจีเนสช้าลง

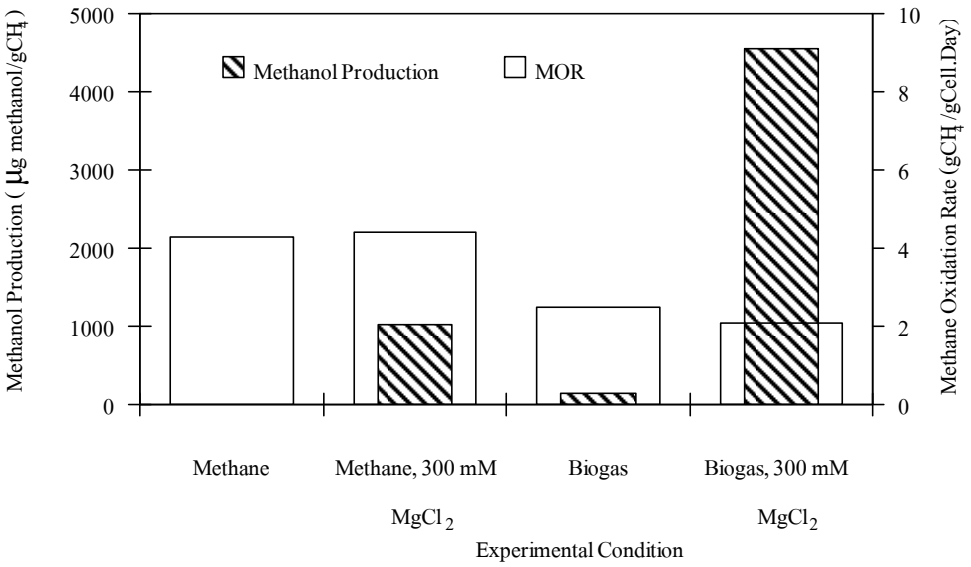


ภาพที่ 23 ปริมาณเมทานอลที่ตรวจพบโดยใช้ 300 มิลลิโมลาร์แมกนีเซียมคลอไรด์เป็นสารยับยั้งเมทานอลดีไฮโดรจีเนส เปรียบเทียบระหว่างสภาวะที่มีก๊าซมีเทนและก๊าซชีวภาพในบรรยากาศในการทดลอง

4. การศึกษากระบวนการผลิตเมทานอลด้วยเชื้อเมทาโนโทรฟผสมแบบตรึงเซลล์ด้วยระบบการผลิตแบบเป็นครั้ง

4.1 การศึกษาความคงตัวของเม็ดเจลในสารยับยั้งชนิดต่างๆ และความสามารถในการผลิตเมทานอล

ศึกษาการผลิตเมทานอลโดยการตรึงเซลล์เมทาโนโทรฟด้วยแคลเซียมอัลจิเนต เนื่องจากการตรึงเซลล์ด้วยแคลเซียมอัลจิเนตเป็นวิธีที่ปลอดภัยและได้รับการยอมรับให้ใช้เป็นวัตถุเจือปนในอาหารได้ (สมใจ, 2545; ดุษฎี, 2546) และเมทาโนโทรฟเป็นแบคทีเรียที่มีโปรตีนสูง (Hanson and Hanson, 1996) ดังนั้นการตรึงเซลล์ด้วยแคลเซียมอัลจิเนตจึงสามารถนำไปใช้เป็น



ภาพที่ 24 ผลผลิตเมทานอลต่อปริมาณมีเทนที่ใช้ไปและอัตราการออกซิเดชันมีเทนต่อเซลล์ต่อวันที่ตรวจพบโดยใช้ 300 มิลลิโมลาร์ แมกนีเซียมคลอไรด์เป็นสารยับยั้งเมทานอลดีไฮโดรจีเนสในการผลิตเมทานอล เปรียบเทียบสภาวะที่มีมีเทนบริสุทธิ์และก๊าซชีวภาพในการทดลอง

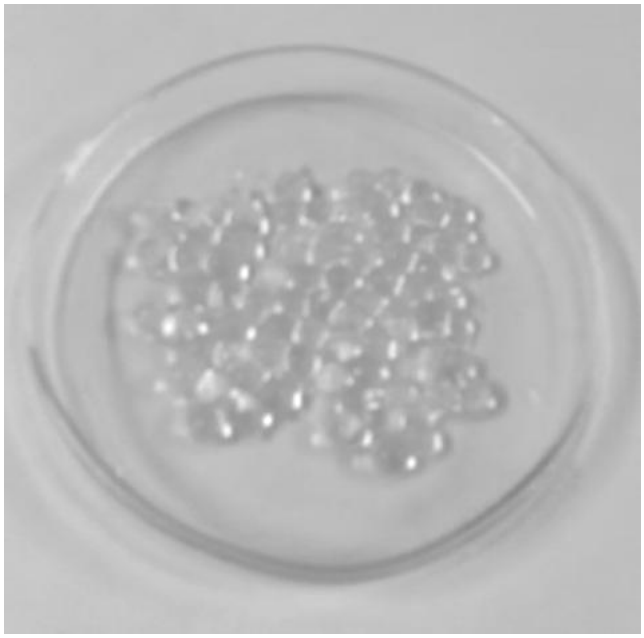
อาหารสัตว์ได้หลังจากสิ้นสุดกระบวนการ นอกจากนั้นยังรักษาสภาพแบคทีเรียได้นานสามารถนำมาใช้ต่อได้หลายครั้ง (สมใจ, 2545; ดุษฎี, 2546)

ในการตรึงเซลล์เมทาโทรฟผสมเจลที่ผ่านการตรึงเริ่มต้นมีลักษณะกลม ใส ไม่มีสี สามารถมองเห็นเซลล์ที่อยู่ในเม็ดเจลได้ การกระจายตัวของเซลล์ในเม็ดเจลมีความสม่ำเสมอ ดังแสดงในภาพที่ 25 จากผลการทดลองเพื่อคัดเลือกสารยับยั้งที่ใช้ในกระบวนการตรึงเซลล์พบว่าสารยับยั้งที่มีความเหมาะสมต่อการผลิตเมทานอลในระบบการผลิตแบบเซลล์แขวนลอยกับแบบตรึงเซลล์จะแตกต่างกัน โดยจากการทดลองก่อนหน้าพบว่าแมกนีเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์จะมีความเหมาะสมมากที่สุด แต่ในระบบการตรึงเซลล์จะต้องพิจารณาถึงความคงตัวของสารที่ใช้ในการตรึงเซลล์ซึ่งในที่นี้คืออัลจิเนตเพิ่มเข้ามาอีกด้วย ทั้งนี้เนื่องมาจากไอออนชนิดต่างๆ สามารถดึงหรือให้ประจุแก่เม็ดเจลทำให้เม็ดเจลมีความแข็งแรงมากน้อยต่างกันด้วย (สมใจ, 2545)

ผลการทดลองพบว่าเม็ดเจลที่อยู่ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ไม่มีสารยับยั้งใดๆ จะมีสภาพเจลที่ไม่แข็งแรงและเม็ดเจลจะแตกทำให้เซลล์รั่วออกมาภายใน 24 ชั่วโมง ทั้งนี้เนื่องจากฟอสเฟต-

เป็นตัวจับแคลเซียม (calcium – chelating agent) ทำให้สามารถดึงแคลเซียมไอออนออกจากเจลได้ (สมใจ, 2545)

จากการทดลองพบว่าโซเดียมคลอไรด์ไม่สามารถนำมาใช้เป็นสารยับยั้งในการผลิตเมทานอลด้วยกระบวนการตรึงเซลล์ได้เนื่องจากเม็ดเจลไม่มีความคงตัวเพราะโซเดียมไอออนสามารถเข้าไปแทนที่แคลเซียมไอออนทำให้เจลไม่คงตัว เกิดการละลายของเจลและเซลล์รั่วออกมา เช่นเดียวกับการใช้แมกนีเซียมคลอไรด์เป็นสารยับยั้ง แมกนีเซียมไอออนสามารถเข้าไปแทนที่แคลเซียมไอออนได้เช่นกัน แต่เม็ดเจลที่อยู่ในแมกนีเซียมไอออนจะมีความคงตัวมากกว่าเม็ดเจลที่อยู่ในโซเดียมไอออน เม็ดเจลที่อยู่ในแมกนีเซียมคลอไรด์จะมีลักษณะเป็นเม็ดกลมแต่เมื่อบีบจะแตกง่าย ซึ่งแตกต่างจากเม็ดเจลที่อยู่ในแคลเซียมคลอไรด์จะมีความแข็งแรง ไม่แตกง่าย สภาพแสดงลักษณะการจับกันของพื้นที่ผิวของเม็ดเจลเมื่ออยู่ในสารละลายที่มีเกลือชนิดต่างๆ ดังแสดงในภาพที่ 26



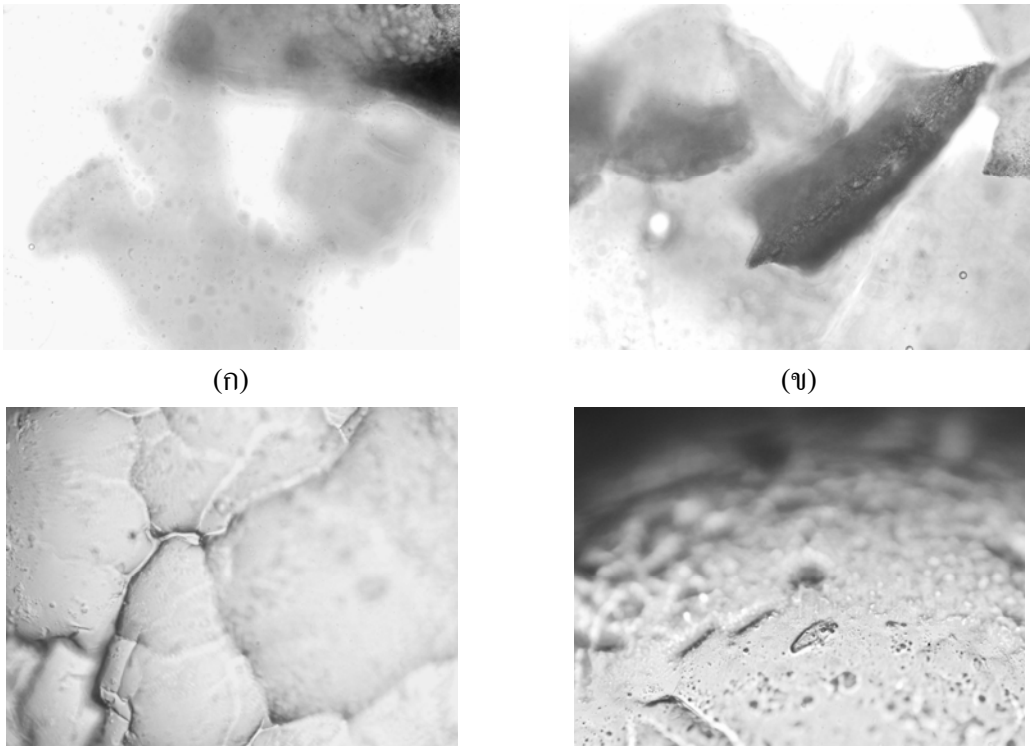
ภาพที่ 25 เม็ดเจลของแคลเซียมอัลจิเนตเริ่มต้นก่อนเข้าสู่ระบบ

4.2 การศึกษาอัตราส่วนระหว่างเซลล์และสารละลายโซเดียมอัลจิเนตที่เหมาะสม

การศึกษาในขั้นตอนนี้เป็นการศึกษาอัตราส่วนระหว่างเซลล์และสารละลายโซเดียมอัลจิเนตที่เหมาะสมต่อการผลิตเมทานอลของเมทาโนโทรฟ เมื่อเปรียบเทียบอัตราส่วน

ระหว่างเซลล์ต่อสารละลายโซเดียมอัลจิเนตที่ 100:0, 10:90, 20:80, 40:60 และ 50:50 แล้วพบว่าอัตราส่วน 100:10 และ 10:90 มีแนวโน้มการผลิตเมทานอลที่คล้ายคลึงกัน คือมีการผลิตเมทานอลสูงสุดในวันที่แรกของการทดลองและลดลงตามระยะเวลาของการทดลอง โดยอัตราส่วน 100:0, 10:90 ให้เมทานอลสูงสุดเท่ากับ 1509.16, 999.77 ไมโครโมลาร์ตามลำดับ ส่วนอัตราส่วนที่ 20:80, 40:60 และ 50:50 มีการผลิตเมทานอลไม่สม่ำเสมอ คือมีการผลิตเมทานอลสูงสุดในวันที่ 3 (715.88 ไมโครโมลาร์), วันที่ 2 (437.48 ไมโครโมลาร์) และวันที่ 1 (626.54 ไมโครโมลาร์) ตามลำดับ จากการทดลองพบว่าเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยอัลจิเนตมีความแปรปรวนของเมทานอลที่ผลิตสูงอาจเนื่องมาจากการกระจายตัวของเซลล์ในอัลจิเนต

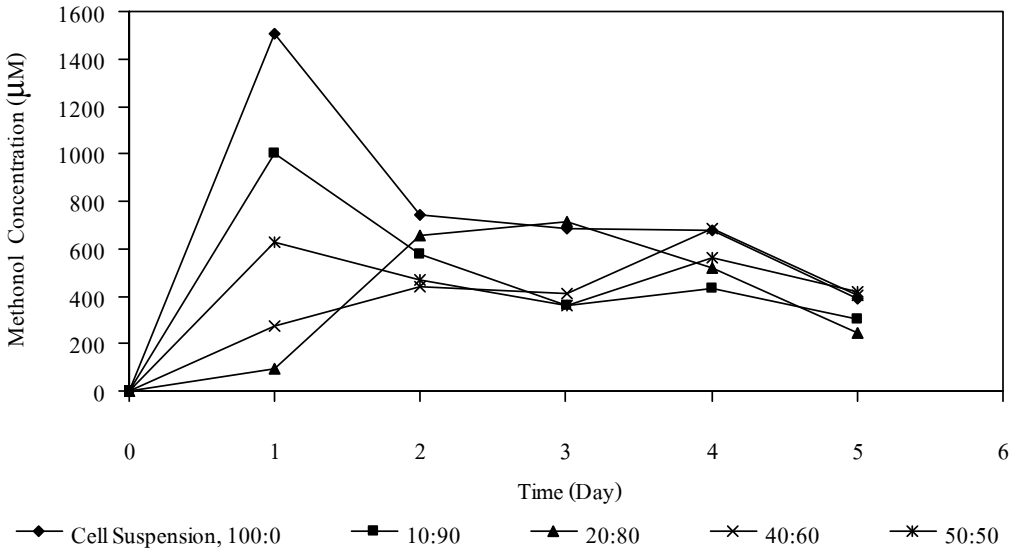
อย่างไรก็ตามพบว่าอัตราส่วนเท่ากับ 50:50 มีเม็ดเจลที่มีความคงตัวและเป็นอัตราส่วนที่ใช้อัลจิเนตน้อยที่สุดอีกด้วย จึงนำอัตราส่วนดังกล่าวมาใช้ในการทดลองต่อไป



(ก) (ข)

(ค) (ง)

ภาพที่ 26 ภาพเม็ดเจลที่อยู่ในตัวกลางสารยับยั้งชนิดต่างๆ จากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า โดย (ก) เม็ดเจลในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (ข) เม็ดเจลในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซึ่งมีโซเดียม-คลอไรด์ (ค) เม็ดเจลในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซึ่งมีแคลเซียมคลอไรด์ และ (ง) เม็ดเจลในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซึ่งมีแมกนีเซียมคลอไรด์

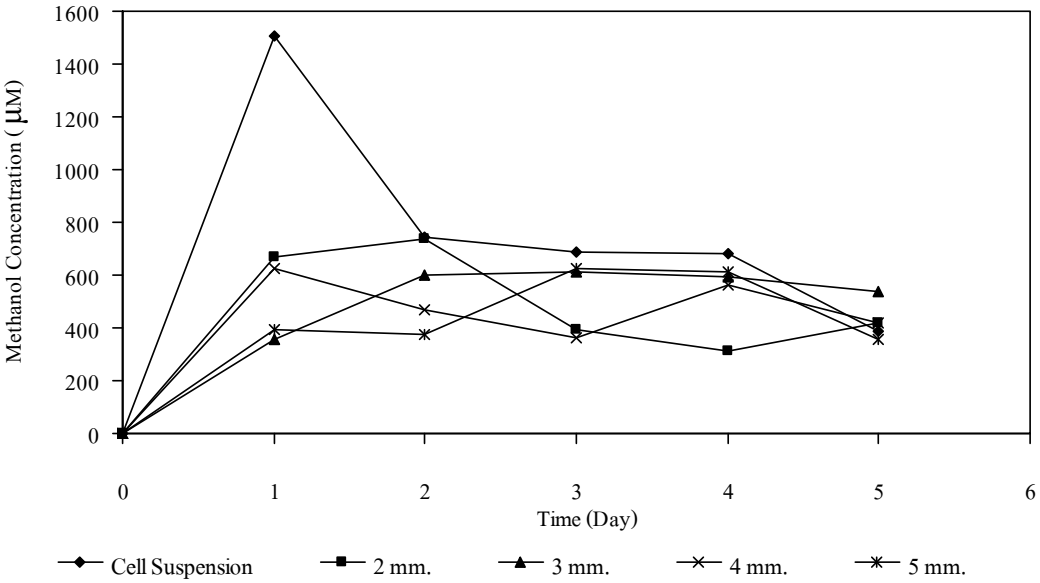


ภาพที่ 27 ปริมาณเมทานอลที่ตรวจวัดที่เวลาต่างๆ โดยมีอัตราส่วนเซลล์ต่ออัลจิเนทแตกต่างกัน เมื่อใช้แคลเซียมคลอไรด์เป็นสารยับยั้งเมทานอลดีไฮโดรจีเนส ที่ขนาดเม็ดเจล 3 มิลลิเมตร

4.3 การศึกษาขนาดของเม็ดเจลที่มีความเหมาะสมในกระบวนการผลิตเมทานอล

ทำการตรึงเซลล์โดยแปรผันขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของเจลคือ 2, 3, 4 และ 5 มิลลิเมตร ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 28 ผลการทดลองเมื่อเปรียบเทียบการผลิตเมทานอลของเชื้อเมทาโนโทรฟพบว่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเจลมีผลต่อการผลิตเมทานอล โดยให้การผลิตเมทานอลแตกต่างกัน คือ เม็ดเจล 2 มิลลิเมตรให้การผลิตเมทานอลสูงสุดวันที่ 2 (737.09 ไมโครโมลาร์) และลดลงในวันต่อมา ส่วนเม็ดเจล 3 มิลลิเมตรให้เมทานอลสูงสุดวันที่ 2 (602.63 ไมโครโมลาร์) และคงที่ตลอด 6 วัน เม็ดเจล 4 มิลลิเมตรให้เมทานอลสูงสุดวันที่ 1 (624.56 ไมโครโมลาร์) และลดลงในวันที่ 2, 3 และเพิ่มขึ้นอีกในวันที่ 4 ของการทดลอง ส่วนเม็ดเจลขนาด 5 มิลลิเมตรมีการผลิตเมทานอลช้าที่สุดคือในวันที่ 3 (623.07 ไมโครโมลาร์) ของการทดลอง อย่างไรก็ตามสรุปได้ว่าเม็ดเจลที่ 2 มิลลิเมตรเป็นเม็ดเจลที่เหมาะสมที่สุด เนื่องจากให้เมทานอลสูงสุดและใช้เวลาสั้นที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับเม็ดเจลขนาดอื่นๆ เนื่องจากการสัมผัสกับสารยับยั้งและอากาศเป็นไปได้ง่ายกว่าเม็ดเจลที่มีขนาดใหญ่ สำหรับการผลิตเมทานอลของเซลล์แขวนลอย พบว่าเซลล์แขวนลอยให้เมทานอลสูงสุดในวันที่แรกของการทดลอง (1,509 ไมโครโมลาร์) และลดลงในวันที่ 2 แล้วคงที่จนถึงวันที่ 4 จึงลดลงอีกในวันที่ 5

เมื่อเปรียบเทียบการผลิตเมทานอลระหว่างเซลล์ที่ถูกตรึงกับเซลล์แบบแขวนลอย พบว่าการผลิตเมทานอลโดยใช้เซลล์ที่ถูกตรึงจะต่ำกว่าอาจเนื่องจากการสัมผัสระหว่างเซลล์กับมีเทนและออกซิเจนเป็นไปได้ยากกว่า อีกทั้งแคลเซียมอัลจิเนตเองก็ดึงดูดไอออนของแคลเซียม-ไอออนซึ่งเป็นสารยับยั้งเมทานอลดีไฮโดรจีเนสดังนั้นจึงอาจส่งผลทำให้ประสิทธิภาพการยับยั้งเมทานอลดีไฮโดรจีเนสของแคลเซียมคลอไรด์ลดลง (สมใจ, 2545) ดังนั้นจึงไม่เหมาะสมที่จะใช้แคลเซียมอัลจิเนตในการตรึงเซลล์เมทาโนโทรฟโดยใช้โดยใช้เกลือเป็นสารยับยั้งเมทานอล-ดีไฮโดรจีเนสในการผลิตเมทานอล



ภาพที่ 28 ปริมาณเมทานอลที่ตรวจวัดที่เวลาต่างๆ โดยมีขนาดเม็ดเจลแตกต่างกัน เมื่อใช้แคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์เป็นสารยับยั้งเมทานอลดีไฮโดรจีเนส

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. เชื้อเมทาโนโทรฟผสมสามารถนำมาใช้ในการผลิตเมทานอลได้ดี โดยวิธีการเตรียมเชื้อเมทาโนโทรฟผสมที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการผลิตเมทานอลในระบบแบบเป็นครั้งคือถ่ายเชื้อเมทาโนโทรฟจากอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็นเอ็มเอสใส่ใน 12.9 มิลลิโมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7 ที่มี 5 ไมโครโมลาร์คอปเปอร์ซัลเฟต และ 20 มิลลิโมลาร์โซเดียมฟอร์เมต ในอัตราส่วนหัวเชื้อต่อฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ร้อยละ 50 ต่อ 50 โดยปริมาตร เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ก่อนถ่ายเชื้อ 2.5 มิลลิลิตรลงสู่ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 12.9 มิลลิโมลาร์ที่มีโซเดียมฟอร์เมต 20 มิลลิโมลาร์ กับคอปเปอร์ซัลเฟต 5 ไมโครโมลาร์ ซึ่งมีสารยับยั้งที่เหมาะสมคือแมกนีเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 300 มิลลิ-โมลาร์

2. เมื่อแปรผันปริมาณมีเทนเริ่มต้นในบรรยากาศที่ร้อยละ 10, 20 และ 30 ของปริมาตรบรรยากาศโดยใช้ใช้เกลือโซเดียมคลอไรด์เป็นสารยับยั้งเมทานอลดีไฮโดรจีเนสในสารละลาย 12.9 มิลลิโมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซึ่งมี 5 ไมโครโมลาร์คอปเปอร์ซัลเฟตเป็นสารกระตุ้นพีเอ็มเอ็มโอและ 20 มิลลิโมลาร์โซเดียมฟอร์เมต พบว่าการผลิตเมทานอลสูงสุดแตกต่างกันเล็กน้อย (413, 478 และ 466 ไมโครโมลาร์ตามลำดับ)

3. ชนิดของเกลือที่ใช้เป็นสารยับยั้งเมทานอลดีไฮโดรจีเนสซึ่งให้เมทานอลสูงสุด คือ แมกนีเซียมคลอไรด์ (300 มิลลิโมลาร์) โดยให้เมทานอลเท่ากับ 1,806 ไมโครโมลาร์ เมื่อเปรียบเทียบค่าสูงสุดของแคลเซียมคลอไรด์ (300 มิลลิโมลาร์) โซเดียมคลอไรด์ (200 มิลลิโมลาร์) และโปแทสเซียมคลอไรด์ (100 มิลลิโมลาร์) ให้เมทานอลเท่ากับ 765, 421 และ 123 ไมโครโมลาร์ตามลำดับ ในสารละลาย 12.9 มิลลิโมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซึ่งมี 5 ไมโครโมลาร์คอปเปอร์ซัลเฟตเป็นสารกระตุ้นพีเอ็มเอ็มโอและ 20 มิลลิโมลาร์โซเดียมฟอร์เมต

4. เมื่อใช้ก๊าซชีวภาพเป็นแหล่งคาร์บอนแทนก๊าซมีเทนบริสุทธิ์ในกรณีที่ไม่มีสารยับยั้งใน 12.9 มิลลิโมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซึ่งมี 5 ไมโครโมลาร์คอปเปอร์ซัลเฟตเป็นสารกระตุ้นพีเอ็มเอ็มโอและ 20 มิลลิโมลาร์โซเดียมฟอร์เมต พบว่าก๊าซชีวภาพให้เมทานอล 240 ไมโครโมลาร์ ในขณะที่ก๊าซมีเทนไม่สามารถให้เมทานอลได้ สำหรับกรณีที่ใช้แมกนีเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์เป็นสารยับยั้งใน 12.9 มิลลิโมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซึ่งมี 5 ไมโครโมลาร์คอปเปอร์ซัลเฟตเป็นสารกระตุ้นพีเอ็มเอ็มโอและ 20 มิลลิโมลาร์โซเดียมฟอร์เมต พบว่าก๊าซมีเทนให้

ปริมาณเมทานอลสูงกว่าก๊าซชีวภาพโดยให้เมทานอลสูงสุด 1,806 และ 964 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ แต่ก๊าซชีวภาพให้ความเสถียรและอัตราการผลิตเมทานอลต่อมีเทนที่ใช้ไปได้ดีกว่าก๊าซมีเทนโดยให้เมทานอลเท่ากับ 4,559 และ 1,029 ไมโครกรัม เมทานอลต่อกรัมมีเทนตามลำดับ

5. ในการทดลองใช้เซลล์เมทาโนโทรฟที่ตรึงในแคลเซียมอัลจิเนตพบว่าได้ปริมาณเมทานอลเท่ากับ 737.09 ไมโครโมลาร์เมื่อใช้เม็ดเจลเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 2 มิลลิเมตร ซึ่งต่ำกว่าเซลล์แบบแขวนลอย (1509.15 ไมโครไมโครโมลาร์) เมื่อใช้แคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์เป็นสารยับยั้งใน 12.9 มิลลิโมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซึ่งมี 5 ไมโครโมลาร์คอปเปอร์-ซัลเฟตเป็นสารกระตุ้นพีเอ็มเอ็มโอและ 20 มิลลิโมลาร์โซเดียมฟอร์เมต ดังนั้นแคลเซียมอัลจิเนตจึงเป็นสารที่ไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการตรึงเซลล์เมทาโนโทรฟเพื่อผลิตเมทานอลโดยใช้เกลือเป็นสารยับยั้งเมทานอลดีไฮโดรจีเนส

ข้อเสนอแนะ

แนวทางการนำผลไปใช้ในงานวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม

จากผลการทดลองสามารถสรุปแนวทางในการนำไปใช้ในการเปลี่ยนมีเทนเพื่อผลิตเมทานอลในระบบการผลิตแบบเป็นกะโดยใช้เมทาโนโทรฟผสมแบบเซลล์แขวนลอยได้ดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 แนวทางในการผลิตเมทานอลจากมีเทนโดยใช้เมทาโนโทรฟผสม

1. สภาวะที่เหมาะสมในขั้นตอนการปรับสภาพเชื้อก่อนนำเข้าสู่ระบบการผลิตเมทานอล	
สภาวะ	สภาพที่เหมาะสม
1.1 สารละลายที่ใช้ในการปรับสภาพเชื้อเมทาโนโทรฟ	สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7 ความเข้มข้น 12.9 มิลลิโมลาร์ ที่มี 5 ไมโครโมลาร์คอปเปอร์ซัลเฟต และ 20 มิลลิโมลาร์โซเดียมฟอร์เมตผสมกับหัวเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็นเอ็มเอส
1.2 ปริมาณเชื้อเริ่มต้น	อัตราส่วนโดยปริมาตรของหัวเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็นเอ็มเอสต่อสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เท่ากับร้อยละ 50 ต่อ 50
1.3 ปริมาณมีเทนในบรรยากาศในขั้นตอนการปรับสภาพ	ร้อยละ 20 ของปริมาตรอากาศ
1.4 ระยะเวลาในการปรับสภาพเชื้อเมทาโนโทรฟ	2 สัปดาห์
2. สภาวะที่เหมาะสมในขั้นตอนในการผลิตเมทานอล	
สภาวะ	สภาพที่เหมาะสม
2.1 สารละลายและชนิดของเกลือและความเข้มข้นที่ใช้	สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7 ความเข้มข้น 12.9 มิลลิโมลาร์ ที่มี 5 ไมโครโมลาร์คอปเปอร์ซัลเฟต และ 20 มิลลิโมลาร์โซเดียมฟอร์เมตซึ่งมีแมกนีเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์เป็นสารยับยั้ง
2.2 ปริมาณเชื้อเริ่มต้น	อัตราส่วนโดยปริมาตรของเชื้อที่ผ่านการปรับสภาพต่อปริมาตรของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีเกลือเป็นสารยับยั้งเท่ากับร้อยละ 10 ต่อ 90
2.3 ปริมาณก๊าซมีเทนในบรรยากาศในกระบวนการผลิตเมทานอล	ร้อยละ 10 ของปริมาตรอากาศ
2.4 ระยะเวลาในการกักเก็บก๊าซและสารละลายในระบบ	3 วัน
2.5 ปริมาณเมทานอลที่คาดว่าจะผลิตได้	1,800 – 2,000 ไมโครโมลาร์

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรมควบคุมมลพิษ. 2538. **คู่มือการจัดการน้ำเสียจากฟาร์มสุกรโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ**. กระทรวงวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม, กรุงเทพฯ.

_____. 2540. **โครงการการศึกษาความเหมาะสมในการจัดตั้งนิคมการเลี้ยงสุกร**. กระทรวงวิทยาศาสตร์วิทยาศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ดุษฎี ธนะบริพัฒน์. 2546. **จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม**. ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ. 2547. **จุลชีววิทยาทั่วไป**. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ.

ประเสริฐ สุดใจประภารัตน์. 2546. **การคัดเลือกและศึกษาเอนไซม์สำคัญในวิถีการเปลี่ยนแปลงเมธานอลของเมธิลโลโทรฟิกยีสต์ที่ทนอุณหภูมิสูง**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พัชริน ดำรงกิตติกุล. 2538. **เอกสารประกอบการสัมมนาเทคโนโลยีก๊าซชีวภาพเพื่อลดมลภาวะและผลิตพลังงานในฟาร์มสัตว์เลี้ยง "มลภาวะจากฟาร์มสัตว์".** หน่วยบริการก๊าซชีวภาพ สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

พัชรา วีระกะลัส. 2543. **เอนไซม์.** ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

พิชญา ส้มเกลี้ยง. 2550. **การจำแนกเชื้อเมทาโนโทรฟในดินกลบทับชั้นสุดท้ายของพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยที่มีผลต่อการเกิดมีเทนออกซิเดชัน.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

มงคล ดำรงค์ศรี, ปราโมทย์ ศิริโรจน์, เกสร ทวีเศษ และนุษรา สินบัวทอง. 2535. การศึกษาข้อมูลการผลิตก๊าซชีวภาพเพื่อกำจัดของเสียจากฟาร์มโคนมและสุกรโดยมีถังหมักชนิดตัวกลางและโดยขบวนการ UASB. **รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์รวบรวมงานประจำปี 2535 – 2536**. สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 58 น.

วีระพันธ์ เกียรติภักดี. 2538. **เอกสารประกอบการสัมมนา เทคโนโลยีก๊าซชีวภาพเพื่อลดมลภาวะและผลิตพลังงานในฟาร์มสัตว์เลี้ยง** “ระบบก๊าซชีวภาพสำหรับบำบัดน้ำเสียและผลิตพลังงานทดแทนในฟาร์มเลี้ยงสัตว์”. หน่วยบริการก๊าซชีวภาพสถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 108 น.

สมใจ ศิริโภค. 2545. **จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม.** ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ, กรุงเทพ.

สมพงษ์ ใจมา. 2549. แนวทางการนำก๊าซชีวภาพไปใช้ประโยชน์เป็นพลังงานทดแทน. **เกษตรกรรมธรรมชาติ**. ศูนย์สื่อเพื่อการพัฒนา. 9 : (2549) 55-58

อาบชัย ธัญญอุดร. 2542**. การผลิตกรดโปรปิโอนิคโดยการตรึงเซลล์จาก *Propionibacterium jensenii* KU 0001 ที่แยกจากอาหารหมักไทย**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Abbott, J.B. 1997**. Immobilization cell**, p.257. cited by D.Perlman. Annual reports on fermentation process, vol 1. Academic Press,Inc.,New York.

Anthony, C. 1982. **The biochemistry of methylotroph**. Academic Press Ltd., London.

_____. 1986. Bacterial oxidation of methane and methanol. **Advanced Microbiology and Physiology**. 27 : 113-210.

_____. 1991 Assimilation of carbon in methylotrophs. pp. 79 -109. In I. Goldberg and J. S. Rokem (ed.), **Biology of methylotrophs**. Butterworty-Heinemann, Stoneham, Mass.

Anthony C and P. Williams. 2003. The structure and mechanism of methanol dehydrogenase. **Biochemica et Biophysica Acta**. (1647): 18 – 23 .

Artikel, Ein. 2008. **Unkultivierte Mikroorganismen.** Astrobiologie Artikel. Available Source: http://home.arcor.de/mpaetzold2001/astrobio011109.html, April 25, 2008.

Bailey, Jr.P.S. and C.A. Bailey. 2000. **Organic Chemistry: A Brief Survey of Concepts and Applications**. 6th ed. Prentice Hall Upper Saddle River, New Jersey.

Bowman, J.P., L.I. Sly, P.D. Nichols, and A.C. Hayward. 1993. Revised taxonomy of the methanotrophs : Description of Methylobacter gen. nov., Emendaion of Methylococcus, Validation of Methylosinus and Methylocystis species, and a proposal that the Family Methylococcaceas Inludes only the group I methanotrophs. **Journal Systematic Bacteriology**. 43 : 735-753

Boeckx, P. and O.V. Cleemput. 1996. Methane oxidation in a neutral landfill cover soil : Influence of moisture content, temperature, and nitrogen-turnover. **Journal of Environmental Quality**. 25 : 178-183.

Bucke, C. 1982. **Immobilized Cells**. In UNESCO workshop on immobilization microbial enzyme and cells. 13 – 17 December 1982. Mahidol University, Bangkok, Thailand

Carver, M.A., K.M. Humphrey, R.A. Patchett and C.W. Jones. 1984. The effect of EDTA and related chelating agents on the oxidation of methanol by the methylotrophic bacterium, *Methylophilus methylotrophus*. **Eur.J.Biochem**. 138: 611 - 615.

Chibata, I., T. Tosa and T. Sato. 1974. Immobilized aspartase - containing microbial cell : preparation and enzymematic properties. **Appl. Microbial**. 27: 878 - 885.

Cox, JM, D.J. Day and C. Anthony. 1992. The interaction of methanol dehydrogenase and its electron acceptor, cytochrome c_L in methanotroph bacteria. **Biochim.Biophys.Acta**. (1119): 97-106.

Deles, S.L. and C. Anthony. 1995. The interaction of methanol dehydrogenase and its cytochrome electron acceptor. **Biochem**. 312: 261 - 265.

Dedysh, S. N., Panikov, N. S. and Tiedje, J. M. 1998. Acidophilic communities from Sphagnum peat bogs. **Appl. And Eviron. Microbiol**. 64: 922-929.

Demaiin, A.L. and N.A. Solomon. 1981. Industrial Microbiology. **Scientific American**. 245 (3): 43-50.

EMCON Associate.1980. **Methane Generation and Recovery From Landfills**. Ann Arbor Science,USA

Eller, G., Stubner, S. and Frenzel, P. 2001. Group-specific 16S rRNA targeted propes for the detection of type I and type II methanotrophs by fluorescence in situ hybridization. **FEMS microbial. Lett**. 198 : 91 – 97.

Frank, J.Jr., SH.V. Krimpen, P.E. Verwiel, J.A. Jongejan, A.C. Mulder and J.A. Duine. 1989. On the machanism of inhibition of methanol dehydrogenase by cyclopropanol-derived inhibitors. **Eur.J. Biochem** 184: 187 - 195.

Fox, B.G., W.A. Froland, Jollie D.R. and J.D. Lipscomb. 1990. Methane monooxygenase from *Methylosinustrichosporium* OB3b. **Meth. Enzymol**. 188 : 191 – 202.

Furuto, T., M. Takeguchi and I. Okura. 1999. Semicontinuous methanol biosynthesis by *Methylosinus trichosporium* OB3b. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical** 144: 257–261.

Ghisalba,O. and F. Heinzer. 1982. Methanol from methane-a hypothetical microbial conversion compared with the chemical process. **Experientia** 38: 218-223.

Hang, Y. D. 1991. Direct fermentation of corn to L(+)- lactic acid by *Rhizopus oryzae*. **Biotechnol. Lett**. 11: 299-300.

Hanson, R. S. and T. E. Hanson. 1996. Methanotrophic bacteria. **Microbiological Reviews**. 60 (2): 439 – 471

Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). 1992**. Climate change 1992: The supplementary report to the IPCC scientific assessment.** J.T. Houghton, B.A. Callender and S.K. Varny (ED). The Press Syndicate of the University of Cambridge, Melbourne, Australia.

Jordan, Jim. 2008. **World Methanol Expansion.** Methanol institute. Available Source: http://www.methanol.org, April 25, 2008.

Kreileman, G.JJ. and A.F. Bouwman. 1994. Computing land use emission of green house gases. **Water Air and Soil Pollution** 76 (2): 231 - 257.

Large, P. J., and C. W. Bamforth. 1988. **Methylotrophy and Biotechnology**. Longmann Group, Harlow, United Kingdom.

Lee, S.G., J.H. Goo, H.G. Kim, J.I Oh, Y.M. Kim and S.W. Kim. 2004. Optimization of methanol biosynthesis from methane using *Methylosinus trichosporium* OB3b. **Biotechnology Letters**. 26:947-950.

Murrell, J.C., I.R. McDonald and B. Gibert. 2000. Regulation of expression of methane monooxygenase by copper iron. **Trend In Microbiology**. 8(5): 221 – 225

Nozhevnikova, A. N., V. K. Nekrasova, V. S. Lebedev and A, B. Lifshits. 1993. Microbiological

processes in landfills. **Water Science and Technology**. 27(2): 243 – 252.

Olivira, E.A. and A.R. Costa. 1994. L-Malic acid production by entrapped *Saccharomyces cerevisiae* into polyacrylamind gel beads. **Appl. Biochem**. 47: 65 – 69

Oren, Aharon. 1999. Bioenergetic aspects of halophilism. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** 63 (2): 334-348.

Park,S., L. Hanna, R. T. Taylor and M. W. Droege. 2004. Batch cultivation of *Methylosinus trichosporium* OB3b. I: Production of soluble methane monooxygenase. **Biotechnology and Bioengineering**. 38(4): 423 – 433

Patel R. N., C. T. Hou, A. I. Laskin, A. Felix, and P. Derelanko. 1980. Microbial oxidation of gaseous hydrocarbons: Production of methylketones from corresponding n-Alkanes by methane-utilizing bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**. 39(4): 727-733

Reddy, S.Y. and T.C. Bruice. 2004. Determination of enzyme mechanisms by molecular dynamics: Studies on quinoproteins, methanol dehydrogenase, and soluble glucose dehydrogenase. **Protein Science**. 13: 1965 – 1978

Shimoda, M. and I. Okura. 1991. Selective inhibition of methanol dehydrogenase from *Methylosinus trichosporium*(OB3b) by cyclopropanol. **J.Mol.Catal.** 64: 23 - 25.

Xin, J.Y., J.R. Cui, J.Z. Niu, S.F. Hua, C.G. Xia, S.B. Li and L.M. Zhu. 2004. Biosynthesis of Methanol from CO2 and CH4 by Methanotrophic Bacteria. **Biotechnology**. 3 (1): 67 - 71.

Xing, X.H., Wu H., Luo M.F.and B.P., Wang. (2006). Effects of organic chemicals on growth of *Methylosinus trichosporium OB3b*. **Biochemical Engineering Journal**. 66(3): 219 – 226

Visvanathan, C., D. Pokhrel, W.Chiemchaisri, J.P.A. Hettiaratchi and J.S. Wu. 1999. Methanotrophic activities in tropical landfill Cover Soils: Effects of Temperature, Moisture Content and Methane Concentration. **Waste Management and Research.** 17: 313-323.

Weissermel, K. and H.J. Arpe. 1993. **Industrial organic chemistry.** 2nd ed. VHC Publishers, New York. pp. 27-34.

Whittenbury, R., and N. R. Krieg. 1984. **Methylococcus fam. Nov. In N. R. Krie, and J. G. Holt (ed.)**, Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 1. The Williams & Wilkins Co., Baltimore. : 256 – 262.

Whittenbury, R., K. C. Phillips, and J. G. Wilkinsin. 1970. Enrichment, isolation and some properties of methane utilizing bacteria. **Journal of General Microbiology**. 61(3) : 205 – 218.

Yu, C., S. Xia, R. Shen, C. Xia and S. Li.1998. Methanol Biosynthesis by Methanotrophic Bacterial Cells. Effects of Various Immobilization Methods on Biocatalytic Activity of Immobilized Cells. **Annals New York academy of sciences** : 609-615.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สารเคมี วัสดุและอุปกรณ์ต่างๆที่ใช้ในการทดลอง

ภาพผนวกที่ ก1 ขวดซีรัมขนาด 25 และ 118 มิลลิลิตรที่ใช้ในการทดลอง

ภาพผนวกที่ ก2 ขวดซีรัมขนาด 25 มิลลิลิตรที่ภายในบรรจุเชื้อเมทาโนโทรฟในอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็นอีมเอส

ภาพผนวกที่ ก3 สารเคมีโซเดียมอัลจิเนตของบริษัทซิกมาที่ใช้ในการทดลอง

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็นเอ็มเอส (Nitrate Mineral Salt, NMS)

ส่วนประกอบ

$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	1	กรัม
KNO_3	1	กรัม
$Na_2HPO_4 \cdot 7\ H_2O$	0.717	กรัม
KH_2PO_4	0.272	กรัม
$CaCl_2 \cdot 6\ H_2O$	0.2	กรัม
Ferric ammonium EDTA	0.004	กรัม
Trace element solution	0.5	มิลลิลิตร

Trace element solution

EDTA	0.5	กรัม
$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0.2	กรัม
$ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0.01	กรัม
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$	0.003	กรัม
HBO	0.03	กรัม
33 $CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$	0.02	กรัม
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	0.001	กรัม
$NiCl \cdot 6\ H_2O$	0.002	กรัม
22 $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.003	กรัม
Distilled water	1.0	ลิตร

ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น ปรับพีเอช (pH) เป็น 7.0 แล้วนำอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวไปฆ่าเชื้อด้วยความร้อนชื้น (Autoclave) ที่ความดัน 121 ^{o}ซ นาน 15 นาที

2. การเตรียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน (Phosphate Buffer Saline: PBS) สำหรับการตรวจหาเชื้อด้วยวิธีการฟิช (Fluorescent in Situ Hybridization: FISH)

การเตรียม 3X PBS

NaCl	24	กรัม
$Na_2HPO_4 \cdot 7\ H_2O$	3.45	กรัม
KCl	0.6	กรัม
$KH_2PO_4 \cdot 7\ H_2O$	0.6	กรัม
Milli-Q water	1,000	มิลลิลิตร

นำสารที่เตรียมไปฆ่าเชื้อด้วยความร้อนชื้น (Autoclave) ที่ความดัน 121 psi นาน 15 นาที สำหรับการเตรียม 1X PBS สามารถทำโดยเจือจาง 3X PBS

3. การเตรียม 12.9 มิลลิโมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์

เตรียมสารละลาย A และ B แล้วผสมกันตามอัตราส่วนในตารางผนวกที่ ก 1 โดย สารละลาย A คือ 12.9 มิลลิโมลาร์ $KH_2PO_4 \cdot H_2O$ ซึ่งเตรียมโดยละลาย $KH_2PO_4 \cdot H_2O$ 1.161 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1 ลิตร ส่วนสารละลาย B คือ 12.9 มิลลิโมลาร์ $K_2HPO_4 \cdot 7\ H_2O$ ซึ่งเตรียมโดยละลาย $K_2HPO_4 \cdot 7\ H_2O$ 2.580 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1 ลิตร

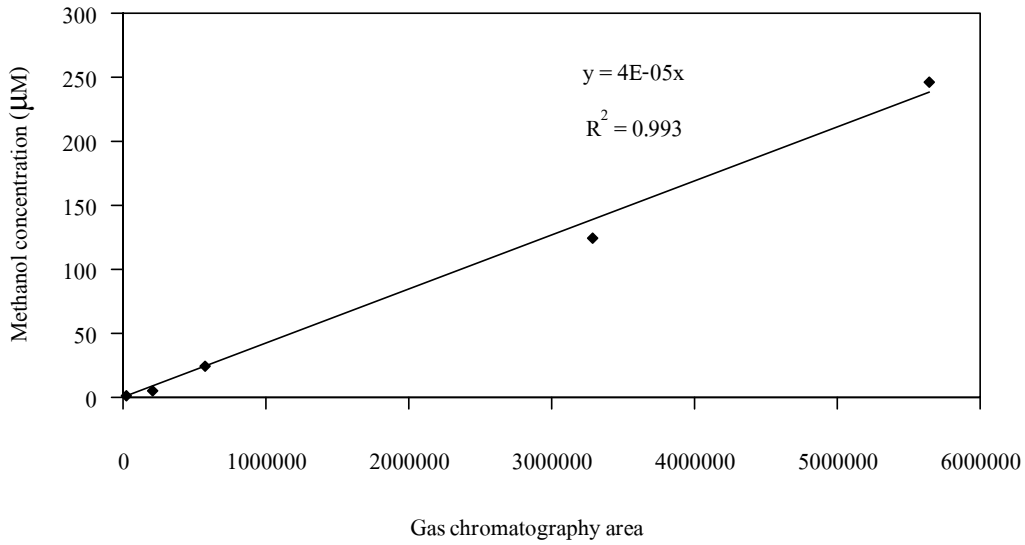
ตารางผนวกที่ ก1 อัตราส่วนระหว่างสารละลาย A และ B ที่ใช้ในการเตรียม 12.9 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์

สารละลาย A (มิลลิลิตร)	สารละลาย B (มิลลิลิตร)	พีเอช
93.5	6.5	5.7
92.0	8.0	5.8
90.0	10.0	5.9
87.7	12.3	6.0
85.0	15.0	6.1
81.5	18.5	6.2
77.5	22.5	6.3
73.5	26.5	6.4
68.5	31.5	6.5
62.5	37.5	6.6
56.5	43.5	6.7
51.1	49.0	6.8
45.0	55.0	6.9
39.0	61.0	7.0
33.0	67.0	7.1
28.0	72.0	7.2
23.0	77.0	7.3
19.0	81.0	7.4
16.0	84.0	7.5
13.0	87.0	7.6
10.5	90.5	7.7
8.5	91.5	7.8
7.0	93.0	7.9
5.3	94.7	8.0

ภาคผนวก ข

การคำนวณและผลการทดลอง

1. การคำนวณปริมาณเมทานอล



ภาพผนวกที่ ข1 กราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของเมทานอลกับพื้นที่ใต้กราฟโครมาโตกราฟ

ตัวอย่างการคำนวณปริมาณเมทานอล

พื้นที่ใต้กราฟโครมาโตกราฟ = 3,125,000

คิดเป็นความเข้มข้นของเมทานอล = สมการกราฟมาตรฐาน x พื้นที่ใต้กราฟ

= $(4*10^{-5})$ x 3,125,000

= 125 μM

ปริมาณเมทานอล = ความเข้มข้นของเมทานอล x ปริมาตรของของเหลวในขวด

= (125 μmol/L) x 25 ml

= 3.125 μmol CH_3OH

= 3.125 μmol CH_3OH x 32 g CH_3OH /mol CH_3OH

= 100 μg CH_3OH

2. ผลการทดลอง

ตารางผนวกที่ ข1 ค่าเฉลี่ยปริมาณเมทานอลในแต่ละสภาวะของการทดสอบเบื้องต้น (การทดลองที่ 3.1)

สภาวะในการทดสอบ	ความเข้มข้นของเมทานอล (μM)						
	วันที่ 3	5	6	8	13	18	22
มีเทน ร้อยละ 30	0	0.23	1.7	1.2	0	0	0
มีเทนร้อยละ 30 ร่วมกับ NaCl	0	1.35	2.31	5.64	5.54	4.87	4.45
ก๊าซชีวภาพ ร้อยละ 60	0	0.23	7.34	7.23	5.93	4.21	3.11
ก๊าซชีวภาพร้อยละ 60 ร่วมกับNaCl	0	0.24	1.4	7.43	5.83	3.12	2.99

ตารางผนวกที่ ข2 ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นเมทานอลที่สภาวะต่างๆในการคัดเลือกสารละลายเพื่อใช้ปรับสภาพเชื้อเมทาโนโทรฟ (การทดลองที่ 3.3)

สภาวะ	ความเข้มข้นของเมทานอล (μM)						
	วันที่ 1	2	3	4	5	6	7
NMS/C/PHB^+	0	1.35	2.31	5.64	5.54	4.87	4.45
NMS/PHB^+	0	0	0	0	0	0	0
NMS/NMS^+	0	0	0	0	0	0	0
PHB/PHB^+	112	212	102	256	210	110	0
NMS+PHB/PHB^+	439	213	421	312	211	0	0

ตารางผนวกที่ ข3 ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของเมทานอลในการทดสอบชนิดและความเข้มข้นของสารยับยั้ง (การทดลองที่ 3.5)

ความเข้มข้นของเกลือ (mM)	ความเข้มข้นของเมทานอล (μM)											
	โซเดียมคลอไรด์			แมกนีเซียมคลอไรด์			แคลเซียมคลอไรด์			โปแทสเซียมคลอไรด์		
	วันที่ 1	3	5	1	3	5	1	3	5	1	3	5
5	367	209	0	112	302	0	141	328	0	376	0	0
10	322	345	187	223	1486	455	281	213	0	0	0	204
30	412	234	0	119	807	529	362	115	0	0	0	352
50	346	456	0	280	545	506	329	456	457	0	0	0
100	312	342	1637	386	709	539	318	435	456	0	123	0
200	439	421	0	393	456	55	495	267	388	0	0	0
300	459	399	796	322	1806	772	545	765	0	0	0	0
400	334	421	602	524	678	706	729	342	0	0	0	0

ตารางผนวกที่ ข4 ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นเมทานอลในการทดสอบการผลิตเปรียบเทียบระหว่างมีเทนบริสุทธิ์กับก๊าซชีวภาพ (การทดลองที่ 3.6)

สภาวะในการทดสอบ	ความเข้มข้นของเมทานอล (μM)				
	วันที่ 1	2	3	4	5
มีเทน ร้อยละ 30	0	0	0	0	0
มีเทนร้อยละ 30 ร่วมกับ 300 mM $MgCl_2$	322	591	1806	234	199
ก๊าซชีวภาพ ร้อยละ 60	0	123	240	0	0
ก๊าซชีวภาพร้อยละ 60 ร่วมกับ 300 mM $MgCl_2$	186	577	964	776	123

ตารางผนวกที่ ข5 ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของเมทานอลจากเซลล์ที่ตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนตโดยมีอัตราส่วนระหว่างเซลล์กับอัลจิเนตต่างๆกัน (การทดลองที่ 4.4)

อัตราส่วนระหว่าง	ความเข้มข้นของเมทานอล (μM)				
เซลล์ต่ออัลจิเนต	วันที่ 1	2	3	4	5
เซลล์แขวนลอย	1509.155	742.325	686.795	679.645	387.020
10 : 90	999.775	575.410	359.510	435.090	304.185
20 : 80	95.050	654.330	715.885	521.030	242.700
40 : 60	270.660	437.480	413.450	686.145	405.745
50 : 50	626.540	471.610	362.780	564.160	416.785

ตารางผนวกที่ ข6 ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของเมทานอลที่ตรึงเซลล์ด้วยแคลเซียมอัลจิเนตโดยมีขนาดเม็ดเจลต่างๆกัน (การทดลองที่ 4.5)

ขนาดเม็ดเจล	ความเข้มข้นของเมทานอล (μM)				
(มิลลิเมตร)	1	2	3	4	5
Suspension	1509.155	742.325	686.795	679.645	387.020
2	666.800	737.095	392.575	310.040	416.615
3	354.240	602.635	610.925	591.165	540.280
4	626.540	471.610	362.780	564.160	416.785
5	391.240	377.415	623.075	612.180	357.560

ตารางผนวกที่ ข7 ผลการวิเคราะห์ก๊าซในการศึกษาความเข้มข้นของมีเทนต่อกิจกรรมเมทาโนโทรฟในการทดลองแบบเป็นกะ (การทดลองที่ 2)

สภาวะของการทดลอง	เวลา (วัน)	ร้อยละปริมาตรก๊าซ			
		CH_4	CO_2	O_2	N_2
มีเทนบริสุทธิ์ 10 มิลลิลิตร	0	9.5025	0.0932	18.6040	71.8002
	2	7.0565	0.9983	18.4209	73.5242
	3	0.1946	1.7660	7.0354	91.0038
	6	0	6.1603	6.6226	87.2170
มีเทนบริสุทธิ์ 20 มิลลิลิตร	0	19.9997	0.0273	16.9523	63.0206
	2	17.7305	1.0910	9.2774	71.9005
	3	14.7744	2.6887	11.0419	71.4948
	6	7.6726	7.4031	2.1539	82.7703
	7	7.6726	7.4031	2.1539	82.7703
	9	1.4029	8.2867	2.0600	88.2502
	13	1.4029	8.2867	2.0600	88.2502
มีเทนบริสุทธิ์ 30 มิลลิลิตร	0	28.8029	0.0497	15.3142	55.8330
	2	25.5516	3.6560	12.7907	58.0016
	3	19.2965	6.6834	1.3422	72.6777
	6	15.1112	7.7795	0.7291	76.3800
	7	11.9636	9.5546	0.5308	77.9508
	9	10.2387	12.4477	0.1300	77.1834
	13	10.2387	12.4477	0.1300	77.1834
มีเทนบริสุทธิ์ 40 มิลลิลิตร	0	38.7119	0.0316	13.2844	47.9718
	2	34.2372	4.0135	11.3577	50.3914
	3	29.1952	7.4704	9.7946	53.5395
	6	26.2106	8.6504	1.8872	63.2516
	7	23.0059	9.0587	0.9344	67.0008
	9	19.3822	11.4747	0.9241	68.2186
	13	16.1123	13.00658	0.0931	70.7879

ตารางผนวกที่ ข8 ผลการวิเคราะห์ก๊าซในการศึกษาเบื้องต้นในการผลิตเมทานอลของเมทาโนโทรฟที่คัดแยกได้ (การทดลองที่ 3.1)

สภาวะของการทดลอง	เวลา (วัน)	ร้อยละปริมาตรก๊าซ			
		CH_4	CO_2	O_2	N_2
มีเทนบริสุทธิ์ 30 มิลลิลิตร	0	28.8029	0.0497	15.3142	55.8330
	2	25.5515	3.6560	12.7907	58.0016
	3	19.2965	6.6834	1.3422	72.6777
	6	15.1112	7.7795	0.7291	76.3800
	7	11.9636	9.5546	0.5308	77.9508
	9	10.2387	12.4477	0.1300	77.1834
มีเทนบริสุทธิ์ 30 มิลลิลิตร ร่วมกับ 200 มิลลิโมลาร์ โซเดียมคลอไรด์	0	29.1763	0.0573	14.9032	55.8630
	2	26.2983	3.2747	12.1859	58.2409
	3	20.2692	5.8367	1.5465	72.3474
	6	16.2913	7.2606	0.8808	75.5672
	7	13.9717	8.6902	0.5875	76.7504
	9	11.6149	12.0025	0.2651	76.1174
ก๊าซชีวภาพ 60 มิลลิลิตร	0	24.3926	15.3723	12.8455	47.3894
	2	23.2781	15.2067	10.0320	51.4830
	3	22.9606	18.1808	9.9676	48.8908
	6	16.8519	17.5482	5.4316	60.1681
	7	16.8519	17.5482	5.4316	60.1681
	9	10.4690	23.4587	5.1362	60.9358
	13	7.6724	27.3046	0.7410	64.2818
ก๊าซชีวภาพ 60 มิลลิลิตร ร่วมกับ 200 มิลลิโมลาร์ โซเดียมคลอไรด์	0	25.8471	15.6560	12.7004	45.7963
	2	22.6404	15.4367	10.3973	51.5254
	3	21.8524	17.1316	10.0966	50.9191
	6	18.7237	19.3114	5.5842	56.3806
	7	17.1202	16.3746	5.7399	60.7650
	9	12.0264	22.9831	5.5563	59.4341
	13	7.7301	28.5037	0.8033	62.9627

ตารางผนวกที่ ข9 ผลการวิเคราะห์ก๊าซในการคัดเลือกสารละลายและขั้นตอนเพื่อใช้ในการปรับสภาพเมทาโนโทรฟให้มีความเหมาะสมต่อการผลิตเมทานอล (การทดลองที่ 3.3)

สภาวะของการทดลอง	เวลา (วัน)	ร้อยละปริมาตรก๊าซ			
		CH_4	CO_2	O_2	N_2
NMS/C/PHB$^+$	0	28.0737	0.0579	15.1811	56.6871
NMS/PHB$^+$	0	27.3405	0.0422	14.9612	57.6559
NMS/NMS$^+$	0	27.7203	0.0359	14.2107	58.0330
PHB/PHB$^+$	0	28.8241	0.0690	14.5315	56.5752
NMS+PHB/PHB$^+$	0	30.9112	0.0713	14.6904	54.3270
NMS/C/PHB$^+$	7	13.9065	11.1840	0.4703	74.4390
NMS/PHB$^+$	7	18.8068	4.4279	6.5242	70.2409
NMS/NMS$^+$	7	16.5825	9.0297	5.1734	69.2142
PHB/PHB$^+$	7	24.5671	8.1089	6.9911	60.3327
NMS+PHB/PHB$^+$	7	23.9378	5.3985	7.1299	63.5336

ตารางผนวกที่ ข10 ผลการวิเคราะห์ก๊าซในการศึกษาปริมาณมีเทนที่เหมาะสมต่อการผลิตเมทานอลของเมทาโนโทรฟ (การทดลองที่ 3.4)

สภาวะของการทดลอง	เวลา (วัน)	ร้อยละปริมาตรก๊าซ			
		CH_4	CO_2	O_2	N_2
มีเทนบริสุทธิ์	0	9.0561	0.0325	18.4048	72.5064
ร้อยละ 10	3	7.3071	0.9383	16.8669	74.8875
	5	5.9979	2.2469	15.1841	76.5709
	7	5.6497	2.2453	13.4730	78.6325
มีเทนบริสุทธิ์	0	19.3633	0.0345	17.1961	63.4059
ร้อยละ 20	3	17.1500	0.9859	15.7972	66.0667
	5	15.1007	1.8319	13.8991	69.1681
	7	13.7985	2.1494	13.3720	70.6799

ตารางผนวกที่ ข10 (ต่อ)

สภาวะของการทดลอง	เวลา (วัน)	ร้อยละปริมาตรก๊าซ			
		CH_4	CO_2	O_2	N_2
มีเทนบริสุทธิ์ ร้อยละ 30	0	29.4863	0.0514	15.4148	55.0473
	3	25.2592	0.9231	11.9544	61.8631
	5	24.2665	2.0349	12.1220	61.5764
	7	23.9227	2.3965	13.4618	60.2188

ตารางผนวกที่ ข11 ผลการวิเคราะห์ก๊าซในศึกษาการผลิตเมทานอลโดยใช้เกลือร่วมกับก๊าซชีวภาพ (การทดลองที่ 3.6)

สภาวะของการทดลอง	เวลา (วัน)	ร้อยละปริมาตรก๊าซ			
		CH_4	CO_2	O_2	N_2
มีเทนบริสุทธิ์	0	13.2480	0.2074	18.6647	67.8798
มีเทนบริสุทธิ์ร่วมกับ300 mM $MgCl_2$	0	14.3969	1.1084	17.6904	66.8041
ก๊าซชีวภาพ	0	8.9644	2.9951	17.583	70.4563
ก๊าซชีวภาพร่วมกับ300 mM $MgCl_2$	0	10.0049	4.0355	16.3594	69.6000
มีเทนบริสุทธิ์	5	11.31565	5.5586	17.9123	65.2134
มีเทนบริสุทธิ์ร่วมกับ300 mM $MgCl_2$	5	11.17724	5.6083	17.4291	65.7852
ก๊าซชีวภาพ	5	5.709592	6.3585	17.8200	70.1117
ก๊าซชีวภาพร่วมกับ300 mM $MgCl_2$	5	3.185972	5.0022	18.7092	73.1025

ตารางผนวกที่ ข12 ผลการวิเคราะห์ก๊าซในศึกษาการศึกษาอัตราส่วนระหว่างเซลล์เมทาโนโทรฟและสารละลายโซเดียมอัลจิเนตที่เหมาะสม (การทดลองที่ 4.4)

อัตราส่วนระหว่างเซลล์ต่ออัลจิเนต (ร้อยละโดยปริมาตร)	เวลา (วัน)	ร้อยละปริมาตรก๊าซ			
		CH_4	CO_2	O_2	N_2
100:0	0	14.8398	8.0250	15.9591	61.1759
10:90	0	15.2069	8.0518	15.6829	61.0582
20:80	0	14.9873	9.5105	14.4838	61.0182
40:60	0	13.4223	7.6768	16.4288	62.4723
50:50	0	13.1147	8.4642	15.1932	63.2277
100:0	5	11.2520	5.4147	15.8926	67.4406
10:90	5	14.2487	6.3889	14.4743	64.8879
20:80	5	10.7683	6.9901	13.7456	68.4958
40:60	5	10.6574	6.3436	17.4170	65.5817
50:50	5	12.4870	9.5173	13.0762	64.9194

ตารางผนวกที่ ข13 ผลการวิเคราะห์ก๊าซในศึกษาการศึกษาขนาดของเม็ดเจลที่มีความเหมาะสมในกระบวนการผลิตเมทานอล (การทดลองที่ 4.5)

ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเม็ดเจล (มิลลิเมตร)	เวลา (วัน)	ร้อยละปริมาตรก๊าซ			
		CH_4	CO_2	O_2	N_2
เซลล์แขวนลอย	0	14.8398	8.0250	15.9591	61.1759
2	0	12.8896	7.5687	16.1273	63.4143
3	0	15.4377	7.8420	16.6736	60.0464
4	0	13.1147	8.4642	15.1932	63.2277
5	0	12.4870	9.5173	13.0762	64.9194

ตารางผนวกที่ ข13 (ต่อ)

ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเม็ดเจล (มิลลิเมตร)	เวลา (วัน)	ร้อยละปริมาตรก๊าซ			
		CH_4	CO_2	O_2	N_2
เซลล์แขวนลอย	5	11.2520	5.4147	15.8926	67.4406
2	5	11.9450	7.6496	14.2301	66.1751
3	5	14.0728	8.9074	13.0455	63.9741
4	5	10.6574	6.3436	17.4170	65.5817
5	5	11.2286	5.7874	16.8387	66.1451

4. การคำนวณการเปลี่ยนหน่วยของก๊าซจากร้อยละ เป็นไมโครโมล (μmol)

สภาวะของการทดลอง

ปริมาตรของขวดที่ใช้ 118 มิลลิลิตร

ปริมาตรสารละลายในขวด 25 มิลลิลิตร

ปริมาตรของอากาศที่เหลือเท่ากับ 118 มิลลิลิตร – 25 มิลลิลิตร = 93 มิลลิลิตร หรือ 0.093 ลิตร

อุณหภูมิขณะทดลอง 25 ^{o}ซ

สมมุติความดันภายในขวดเท่ากับ 1 atm

ในระบบปิด สามารถคำนวณหน่วยของก๊าซเป็นโมล (mole) จากสมการ

$$PV = nRT$$

เมื่อ P = Partial pressure หรือ % ของก๊าซ

R = 82.06 atm.ml/g.mole.K

K = 273 + 25 = 293 K

n = โมลของก๊าซ หรือ n = มวล (g)/น้ำหนักโมเลกุล (MW)

การคำนวณ Partial pressure หรือ % ของก๊าซแต่ละชนิดสามารถคำนวณได้ดังนี้

การคำนวณ Partial pressure ของก๊าซมีเทน (CH_4%)

Correction Methane area = พื้นที่ใต้กราฟโครมาโตกราฟของมีเทน x Metane Factor

โดย Metane Factor = 1

CH_4% = (Correction Methane area x 100)/(Total Correction area)

หมายเหตุ Total Correction area = (Correction Methane area + Correction Carbondioxide area + Correction Oxygen area + Correction Nitrogen area)

การคำนวณ Partial pressure ของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2%)

Correction Carbondioxide area = พื้นที่ใต้กราฟโครมาโตกราฟของคาร์บอนไดออกไซด์ x Carbondioxide Factor

โดย Carbondioxide Factor = 0.66

CO_2% = (Correction Carbondioxide area x 100)/(Total Correction area)

การคำนวณ Partial pressure ของก๊าซออกซิเจน (O_2%)

Correction Oxygen area = พื้นที่ใต้กราฟโครมาโตกราฟของออกซิเจน x Oxygen Factor

โดย Oxygen Factor = 0.51

O_2% = (Correction Oxygen area x 100)/(Total Correction area)

การคำนวณ Partial pressure ของก๊าซไนโตรเจน (N_2%)

Correction Nitrogen area = พื้นที่ใต้กราฟโครมาโตกราฟของไนโตรเจน x Nitrogen Factor

โดย Nitrogen Factor = 0.49

N_2% = (Correction Nitrogen area x 100)/(Total Correction area)

ดังนั้น

จาก PV = nRT

มวลของก๊าซ (g) = (PV/RT)XMW

มวลของก๊าซ CH_4 (g) = (CH_4%)(0.093 L)(16 g/mol)/(8.31kPa•L /mole•K)(293 K)
= 0.00061(A%)

มวลของก๊าซ CO_2 (g) = (B%)(0.093 L)(44 g/mol)/(8.31kPa•L /mole•K)(293 K)
= 0.0139 (CO_2%)

มวลของก๊าซ O_2 (g) = (C%)(0.093 L)(32 g/mol)/(8.31kPa•L /mole•K)(293 K)
= 0.0012 (O_2%)

มวลของก๊าซ N_2 (g) = (D%)(0.093 L)(28 g/mol)/(8.31kPa•L /mole•K)(293 K)
= 0.0010 (N_2%)

ตัวอย่างการคำนวณ

พื้นที่ใต้กราฟโครมาโตกราฟของมีเทน = 2871.63

พื้นที่ใต้กราฟโครมาโตกราฟของคาร์บอนไดออกไซด์ = 7.51

พื้นที่ใต้กราฟโครมาโตกราฟของออกซิเจน = 2993.76

พื้นที่ใต้กราฟโครมาโตกราฟของไนโตรเจน = 11360.2

Correction Methane Area = 2871.63 (1)
= 2871.63

Correction Carbondioide Area = 7.51 (0.66)
= 4.956

Correction Oxygen Area = 2993.76 (0.51)
= 1526.8176

Correction Nitrogen Area = 11360.2 (0.49)
= 5566.498

Total Correction Area = 2871.63+4.9566+1526.8176
+5566.498
= 9969.9022

CH_4% = (2871.63 x 100)/ 9969.9022
= 28.8028

CO_2% = (4.956 x 100)/ 9969.9022
= 0.0497

O_2% = (1526.8176 x 100)/ 9969.9022
= 15.3142

N_2% = (1526.8176 x 100)/ 9969.9022

= 15.3142

มวลของก๊าซ CH_4 (g) = 28.8028 (0.00061)

= 0.01756

มวลของก๊าซ CO_2 (g) = 0.0497 (0.0139)

= 0.00069

มวลของก๊าซ O_2 (g) = 15.1342 (0.0012)

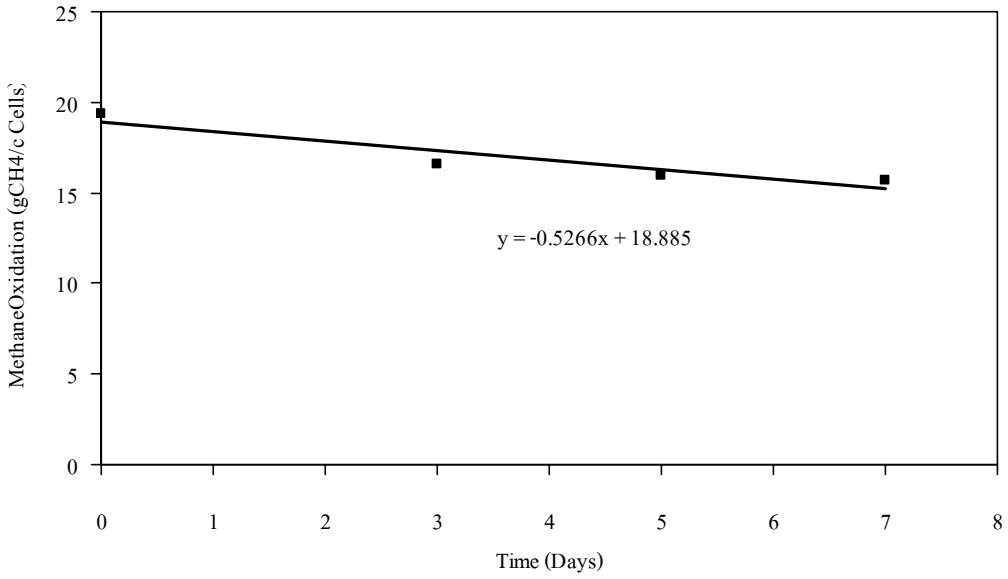
= 0.01816

มวลของก๊าซ N_2 (g) = 15.1342 (0.0010)

= 0.01816

5. การคำนวณอัตรามีเทนออกซิเดชัน

เริ่มจากการเปลี่ยนหน่วยของก๊าซจากร้อยละ (Partial Pressure) เป็นมวล (mg) และนำข้อมูลมาพล็อตกราฟเทียบกับเวลา จะได้ activity rate จากความชันของกราฟ ดังภาพผนวกที่ ข2



ภาพผนวกที่ ข2 กราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงมวลของก๊าซในขวดทดลองเมื่อเทียบกับเวลา

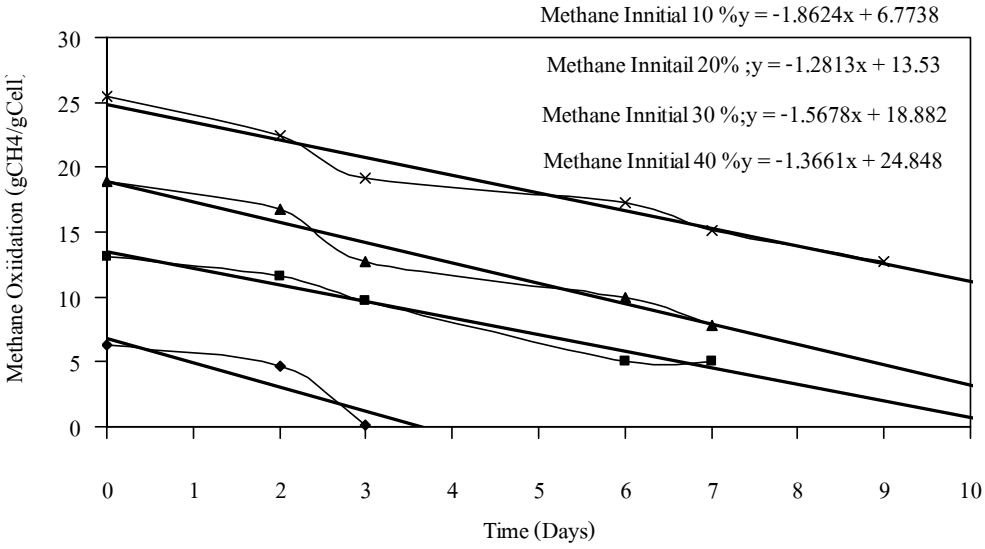
ตัวอย่างการคำนวณอัตรามีเทนออกซิเดชั่น

เมื่อน้ำหนักของเซลล์เท่ากับ 10 g

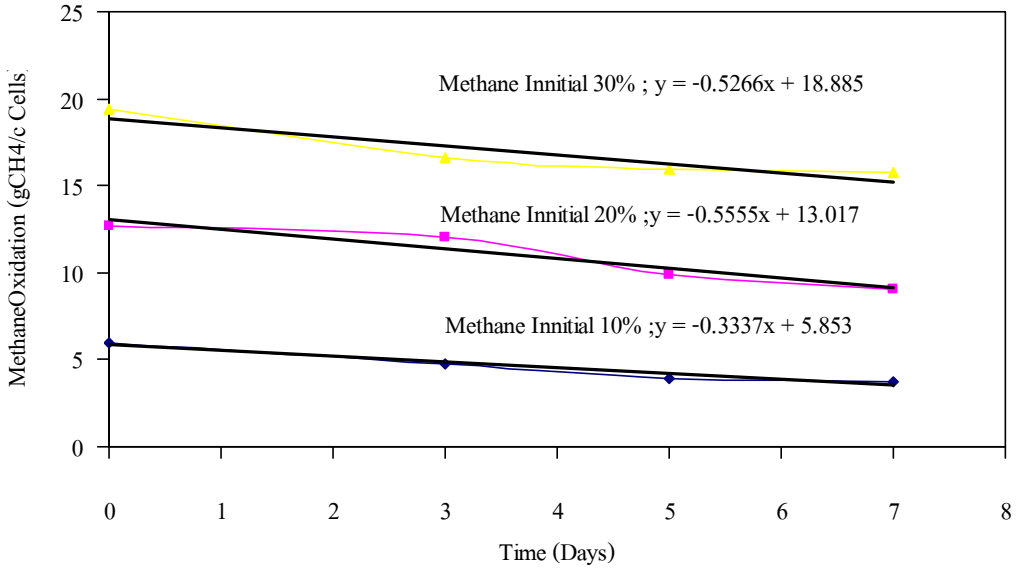
Methane Oxidation Rate = 0.5266 g/day

= (0.5266 g/day)/(10 g cell)

= 5.266 g/(g cell)(day)



ภาพภาคผนวกที่ ข3 ผลการศึกษาอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันในการทดสอบปริมาณมีเทนที่เหมาะสมกับกิจกรรมของเมทาโนโทรฟในการทดลองแบบกะ (การทดลองที่ 2)



ภาพภาคผนวก ข4 ผลการศึกษาอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันในการศึกษาปริมาณมีเทนที่มีความเหมาะสมต่อการผลิตเมทานอลของเมทาโนโทรฟผสม (การทดลองที่ 3.4)

ภาคผนวก ค

การศึกษาและวิเคราะห์จำนวนเชื้อเมทาโนโทรฟ Type I และ Type II ด้วยวิธีฟิช

1. ฟลูออเรสเซนต์อินซิตูไฮบริไดเซชัน

เทคนิคการทำฟลูออเรสเซนต์อินซิตูไฮบริไดเซชันหรือฟิช (Fluorescent In Situ Hybridization, FISH) นั้นเป็นวิธีการในการตรวจหาชนิดของจุลินทรีย์ที่ได้รับความนิยมและยังมีความแม่นยำจำเพาะต่อจุลินทรีย์นั้นๆ โดยการใช้โพรบ (probe) ซึ่งโพรบที่ใช้นี้คือลำดับเบสในสายนิวคลีโอไทด์ของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำการศึกษาดังกล่าวโดยโพรบนี้จะทำการติดฉลากด้วยสารเรืองแสงที่สามารถคายพลังงานออกมาในรูปของแสงเมื่อดูดซึมหรือกระทบเข้ากับพลังงานสูง เช่นแสงอุลตราไวโอเลต เพื่อใช้ในการทดสอบเชื้อดังกล่าวในเชิงปริมาณ

การใช้โพรบติดฉลากเข้าจับกับกรดนิวคลีอิกภายในเซลล์ เกิดขึ้นครั้งแรกเมื่อปี 1969 โดย Gall และ John ได้ใช้โพรบติดฉลากด้วยสารรังสี (Gall *et al.*,1969) ต่อมาปี 1980 Bauman ได้พัฒนาการติดฉลากด้วยสารเรืองแสงแทนการใช้สารรังสี เนื่องจากสารเรืองแสงจะช่วยให้ทำงานสะดวก รวดเร็วและมีความปลอดภัยมากยิ่งขึ้น สัญญาณมีความคมชัดมากขึ้นและมีความคงตัวมากกว่า (Bauman *et al.*,1980) ในปลายปี ค.ศ.1980 ได้มีการใช้โพรบหลายประเภทติดฉลากเรืองแสงแต่ที่นิยมในงานฟิชเป็นโพรบที่ติดฉลากด้วยไบโอติน (biotin) หรือ ไดออกซิจินิน (digoxigenin) แล้วใช้อะวิดิน (avidin) หรือแอนติไดออกซิจินิน (anti-avidin) มาเชื่อมต่อกับสารเรืองแสงหรือโรดามีน (rhodamine) เข้าจับอีกชั้นหนึ่งเมื่อโพรบที่ติดสารเรืองแสงเข้าสร้างพันธะกับกรดนิวคลีอิกเป้าหมายแล้วสามารถตรวจหาสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ได้ภายในกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงฟลูออเรสเซนต์

สำหรับการทำอินซิตูไฮบริไดเซชันนั้นสามารถทำได้โดยที่กรดนิวคลีอิกจะไม่ถูกแยกสกัดออกมาจากตัวอย่างตรวจโดยจะถูกรักษาให้อยู่สภาพเดิมมากที่สุดและนำมาปะติดบนสไลด์ ในขั้นตอนของการทำไฮบริไดเซชันจะทำบนแผ่นสไลด์ซึ่งปฏิกิริยาไฮบริไดเซชันจะเกิดขึ้นภายในเซลล์หรือเนื้อเยื่อจึงทำให้ทราบว่าในตัวอย่างดังกล่าวมีกรดนิวคลีอิคเป้าหมายหรือไม่พร้อมทั้งสามารถระบุตำแหน่งที่อยู่ของกรดนิวคลีอิคได้อีกด้วย หลังจากนั้นจึงนำตัวอย่างที่ต้องการตรวจมาทำการล้าง (washing) แล้วสามารตรวจหาสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ได้ภายในกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงฟลูออเรสเซนต์ได้ทันที

แต่ในปัจจุบันการตรวจหาสัญญาณฟลูออเรสเซนต์จากโพรบที่ได้รับการติดฉลากด้วยสารเรืองแสงโดยตรง ไม่เป็นปัญหาอีกต่อไปเนื่องจากมีอุปกรณ์ตรวจจับสัญญาณแสงที่มีความไวสูง

เช่น cooled CCD cameras ที่ต่อเข้ากับคอมพิวเตอร์ประสิทธิภาพสูงเพื่อช่วยในการขยายสัญญาณและประมวลผล การใช้โพรบติดฉลากสารเรืองแสงโดยตรงมีข้อที่ควรระวังคือ แสงอาจจะอ่อนหรือจางลงในช่วงการทำไฮบริไดเซชัน (hybridization) จึงควรหลีกลี่ยงไม่ให้กระทบกับแสงสว่างมากเกินไป

สำหรับโพรบที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อเมทาโนโทรฟที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้เป็นโพรบที่มีความจำเพาะต่อเมทาโนโทรฟ Type I ได้แก่ *Methylomonas* spp., *Methylobacter* spp., *Methylococcus* spp., *Methylomicrobium* spp. และ Type II ได้แก่ *Methylosinus* spp. และ *Methylocystis* spp. นอกจากนี้ยังมีเชื้อเมทาโนโทรฟ Type II อีกบางส่วนที่ไม่สามารถตรวจพบได้ด้วยโพรบดังกล่าว รายละเอียดของโพรบดังแสดงในตารางผนวกที่ ค1

ตารางผนวกที่ ค1 โพรบที่ใช้ในการศึกษาด้วยวิธีการฟลูออเรสเซนต์ไฮบริไดเซชัน

Probe	Target group	Target Site	Formamide in FISH (%)	Probe and Target sequence	Reference
Mγ 84	Type I Methanotroph	84-103	20	Probe:3'AGCCCGCGACTGCTCACC5' Target:5'UCGGGCGCUGACGAGUGG3'	Eller *et al*., 2001
Mγ705	Type I Methanotroph	705-724	20	Probe: 3' CTAGACTTCCTTGTGGTC5' Target:5'GAUCUGAAGGAACACCAG3'	Eller *et al*., 2001
Mα450	Type II Methanotroph	450-470	20	Probe: 3' CTATTACTGCCATGGACCTA5' Target:5'GAUAAUGACGGUACCUGGAU3'	Eller *et al*., 2001

2. วิธีการตรวจหาปริมาณและจำแนกเชื้อเมทาโนโทรฟ Type I และ Type II ด้วยวิธีฟิช

ในการศึกษาเชื้อเมทาโนโทรฟในเชิงปริมาณด้วยวิธีการฟลูออเรสเซนต์อินซิตูไฮบริไดเซชันหรือฟิช ทำโดยดูดสารละลายที่มีเชื้อจุลินทรีย์ 300 ไมโครลิตรลงใน 900 ไมโครลิตรของร้อยละ 4 paraformamide (เตรียมใน 3 PBS, พีเอช 7.2) เพื่อตรึงเซลล์แล้วจึงนำตัวอย่างดังกล่าวเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการล้าง 3 PBS ด้วย 1 PBS โดยทำการปั่นตกและดูดส่วนใสออกประมาณ 3 ครั้ง แล้วจึงเติมเอทานอลและ 1 PBS ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 จึงสามารถคงสภาพเซลล์เพื่อเก็บรักษาเซลล์ที่อุณหภูมิ -20 °ซ ไว้ได้นาน 3 เดือน

เมื่อต้องการวิเคราะห์นำสารละลายดังกล่าว 4 ไมโครลิตรหยดลงในสไลด์แบบหลุมที่ผ่านการเคลือบเจลาตินให้กระจายทั่วหลุมปล่อยให้แห้งแล้วจึงดึงน้ำออกจากเซลล์โดยการจุ่มสไลด์ลงในเอทานอลที่ความเข้มข้นร้อยละ 50, 80, 98 นานอย่างละ 3 นาที ตามลำดับ แล้วจึงทำการไฮบริดเซลล์ (สร้างพันธะอย่างจำเพาะของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างโพรบที่ทำการศึกษากับเชื้อจุลินทรีย์ที่อาศัยในตัวอย่างดิน) ด้วยการเติม Hybridization Buffer 8 ไมโครลิตรและโพรบที่ทำการศึกษา 1 มิลลิลิตรต่อ 1 หลุมของสไลด์โดยโพรบที่ทำการศึกษาคือ Mγ84 + Mγ705 สำหรับวิเคราะห์เมทาโนโทรฟ Type I และ Mα405 สำหรับวิเคราะห์เมทาโนโทรฟ Type II หลังจากนั้นจึงนำสไลด์ดังกล่าวใส่ใน 50 มิลลิลิตร plastic centrifuge tube ที่ภายในมีกระดาษที่ชุ่มไปด้วย Hybridization Buffer ที่มีความเหมาะสมต่อโพรบดังกล่าวแล้วจึงนำไปอบภายใต้อุณหภูมิ Hybridization เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

ภายหลังจากการทำไฮบริดด้วยโพรบที่ทำการศึกษาแล้วจึงล้างโพรบด้วย Washing buffer 1 มิลลิลิตร นำสไลด์ดังกล่าวจุ่มลงใน Washing buffer แล้วนำไปใส่ในอ่างต้มน้ำที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาทีเพื่อกำจัดโพรบส่วนเกินที่ไม่เกิดพันธะกับลำดับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ หลังจากนั้นจึงล้างอีกครั้งโดยใช้ Milli-Q Water (น้ำกลั่นที่ผ่านการกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตรและนึ่งภายใต้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที) ปล่อยให้แห้งก่อนหยด DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) 10 ไมโครลิตรเพื่อติดตามเชื้อททั้งหมดที่อาศัยอยู่ในตัวอย่าง (total microorganism) ย้อมทิ้งไว้ประมาณ 5 นาทีและล้างออกด้วย Milli-Q Water อีกครั้งก่อนปล่อยทิ้งไว้ที่แห้งที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นจึงหยด SlowFade-Light เพื่อป้องกันการหรี่ (Fade) ของแสงลงในแต่ละหลุมของสไลด์ก่อนปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ (Cover Slip) และนำไปตรวจวัดการเรืองแสงของเชื้อที่ทำการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่ใช้แสงฟลูออเรสเซนต์

ภาคผนวก ง

เอกสารประกอบการประชุมวิชาการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ ครั้งที่ 7

วันที่ 12 – 14 มีนาคม 2551

ณ.สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ ฯ กรุงเทพมหานคร

การผลิตเมทานอลจากมีเทนด้วยเชื้อเมทาโนโทรฟผสม

Methanol Production from Methane by Mixed Culture of Methanotrophs

Siammon Pimthong* and Wilai Chiemchaisri**

สยามมล พิมพ์ทอง* และ วิไล เจียมไชยศรี**

*นิสิตบัณฑิตวิทยาลัย ; **รองศาสตราจารย์ ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

โทรศัพท์ : 0-2942-8555, โทรสาร : 0-2579-0730, E-mail : g4865225@ku.ac.th, fengwlc@ku.ac.th

Received 24 January 2008 ; received in revised form 18 February 2008 ; accepted 19 February 2008

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาการผลิตเมทานอลจากก๊าซมีเทนด้วยเชื้อเมทาโนโทรฟผสมที่แยกได้จากดินฝังกลบมูลฝอยจำลอง โดยนำเชื้อผสมดังกล่าวมาศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเมทานอลด้วยการทดลองแบบกะที่ใช้เซลล์แบบแขวนลอย ดังนี้ 1) ปริมาณของมีเทนในช่วงร้อยละ 10-30; 2) ชนิดของเกลือและความเข้มข้นที่ใช้เป็นสารยับยั้งเอนไซม์เมทานอลดีไฮโดรจีเนส (MDH) ได้แก่ KCl, NaCl, $CaCl_2$, $MgCl_2$; 3) แหล่งของมีเทนได้แก่ มีเทนบริสุทธิ์และก๊าซชีวภาพ และ 4) เปรียบเทียบการผลิตเมทานอลในเซลล์แบบแขวนลอยกับการใช้เซลล์ที่ถูกตรึงในแคลเซียมอัลจิเนตที่แปรผันขนาดต่างๆของเม็ดเจล

ผลการทดลองพบว่าเชื้อเมทาโนโทรฟผสมมีปริมาณร้อยละ 67.21 $\pm$ 12.92 ของจุลินทรีย์ทั้งหมดสามารถนำมาใช้ในการผลิตเมทานอลได้ โดยการทดลองแปรผันปริมาณมีเทนที่ร้อยละ 10, 20 และ 30 เมื่อใช้เกลือ NaCl เป็นสารยับยั้ง MDH พบว่าการผลิตเมทานอลสูงสุดแตกต่างกันเล็กน้อย (413, 478 และ 466 ไมโครโมลาร์ตามลำดับ) และพบว่าชนิดของเกลือที่ให้เมทานอลสูงสุดคือ $MgCl_2$ (300 มิลลิโมลาร์) โดยให้เมทานอลเท่ากับ 1,806 ไมโครโมลาร์ เมื่อเปรียบเทียบกับค่าสูงสุดของ $CaCl_2$ NaCl และ KCl ให้เมทานอลเท่ากับ 765, 421 และ 123 ไมโครโมลาร์ตามลำดับ และเมื่อใช้ก๊าซชีวภาพแทนมีเทนบริสุทธิ์กรณีที่ไม่มีเกลือร่วมด้วยพบว่าก๊าซมีเทนไม่สามารถให้

เมทานอลได้ ในขณะที่ก๊าซชีวภาพให้เมทานอล 240 ไมโครโมลาร์ สำหรับกรณีที่ใช้ $MgCl_2$ ร่วมด้วยพบว่าก๊าซมีเทนให้ปริมาณเมทานอลสูงกว่าก๊าซชีวภาพโดยให้เมทานอลสูงสุด 1,806 และ 964 ไมโครโมลาร์ตามลำดับ แต่ก๊าซชีวภาพให้ความเสถียรและอัตราการผลิตเมทานอลต่อมีเทนที่ใช้ไปได้ดีกว่าก๊าซมีเทนโดยให้เมทานอลเท่ากับ 4,559 และ 1,029 ไมโครกรัมเมทานอลต่อกรัมมีเทนตามลำดับ ในการทดลองใช้เซลล์เมทาโนโทรฟที่ตรึงในแคลเซียมอัลจิเนตพบว่าได้ปริมาณเมทานอลเท่ากับ 1,760 ไมโครกรัมต่อกรัมมีเทนเมื่อใช้เม็ดเจลเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 2 มิลลิเมตร ซึ่งสูงกว่าเซลล์แบบแขวนลอยอย่างมาก (279 ไมโครกรัมต่อกรัมมีเทน) เมื่อใช้ $CaCl_2$ เป็นสารยับยั้ง

คำสำคัญ : กระบวนการทางชีวภาพ; ก๊าซชีวภาพ; มีเทน; เมทานอล; เมทาโนโทรฟ; เมทานอลดีไฮโดรจีเนส

Abstract

The objective of this study was to investigate potential of methanol production by the mixed culture of methanotrophs bacteria isolated from the simulated landfill cover soil. The cell suspensions were utilized in batch experiments to find the optimal conditions involving methanol production, which were 1) methane contents (10-30%), 2) type and concentrations of salts used as methanol dehydrogenase (MDH) inhibitor, 3) methane sources: pure methane and biogas and 4) comparing suspended cells and the immobilized cells in various sizes of calcium alginate.

The results showed the mixed culture had 67.21$\pm$ 12.92 % methanotrophs of total bacteria and could be used in methanol production. The variation of methane content (10-30%) gave slight differences in methanol products (413, 478 and 466 μM) when 200 mM NaCl utilized as MDH inhibitor. However, when 300 mM $MgCl_2$ was used, the methanol had more stability and reach the highest level (1,806 μM) as compared to other inhibitors of $CaCl_2$, NaCl and KCl (765, 421 and 123 μM respectively). Without any inhibitor, methanol was not found under available methane, and for biogas, 240 μM methanol was found. When $MgCl_2$ was added, methanol concentration had increased to 1,806 and 964 μM, respectively. However, considering for methanol produced to methane utilized ratio, methanol produced from biogas was higher than that from methane by giving 4,559 and 1,029 $\mu gCH_3OH/gCH_4$, respectively. In the immobilized-cells' study, $CaCl_2$ gave the most stable beads and methanol production of 1760 $\mu g/gCH_4$ in calcium alginate beads of 2 mm diameter which was large different as compared to the suspended cells (279 $\mu g/gCH_4$).

Keywords : Bioprocess; biogas; methane; methanol; methanotroph; methanol dehydrogenase

คำนำ

การใช้ก๊าซมีเทนจากกระบวนการบำบัดของเสียแบบไร้อากาศหรือจากหลุมฝังกลบมูลฝอยเป็นเชื้อเพลิงโดยตรงเป็นวิธีการหนึ่งที่ได้รับความนิยมแต่มีข้อจำกัดคืออัตราการผลิตก๊าซมีเทนไม่แน่นอนและมีความแปรปรวนค่อนข้างมาก และยังมีค่าใช้จ่ายสูงในการทำให้ก๊าซมีเทนมีความบริสุทธิ์ เชื้อเมทาโนโทรฟ (methanotroph) สามารถออกซิไดซ์มีเทนเป็นเมทานอลได้ตามสมการต่อไปนี้

$$CH_4 + \tfrac{1}{2}\, O_2 \xrightarrow{\text{MMO}} CH_3OH + H_2O \qquad (1)$$

$$CH_3OH \xrightarrow{\text{MDH}} HCHO \xrightarrow{\text{FADH}} HCOOH \xrightarrow{\text{FAD}} CO_2 \qquad (2)$$

(หมายเหตุ MMO: Methane monooxygenase MDH: Methanol dehydrogenase; FADH: Formaldehyde dehydrogenase; FAD: Formate dehydrogenase)

โดยปกติแล้วเมทานอลเป็นแอลกอฮอล์ที่ได้จากกระบวนการกลั่นไม้ใต้สภาวะไร้อากาศ และยังสามารถเตรียมได้จากกระบวนการแยกเมทานอลจากถ่านหิน กระบวนการหมักวัสดุอินทรีย์ต่างๆ สำหรับการเปลี่ยนรูปของมีเทนเป็นเมทานอลโดยกระบวนการทางเคมีต้องใช้พลังงานที่สูงมาก ซึ่งตรงกันข้ามกับกระบวนการทางชีวภาพที่ใช้พลังงานต่ำ[1] โดยการเปลี่ยนมีเทนเป็นเมทานอลมีข้อดีคือสามารถนำเมทานอลไปใช้ในกระบวนการต่างๆได้อย่างกว้างขวางมากขึ้น นอกจากนี้เมทานอลยังเก็บรักษาได้ง่ายและสะดวกในการขนส่งกว่าก๊าซมีเทนและสามารถใช้ในการผลิตไบโอดีเซลได้ [1,2,3,4,]

จากสมการข้างต้นจะเห็นว่าการผลิตเมทานอลโดยเมทาโนโทรฟต้องยับยั้งเอนไซม์ MDH ซึ่งโดยปกติจะเปลี่ยนรูปเมทานอลให้เป็นฟอร์มัลดีไฮด์ Cox *et al.* (1992) รายงานว่าสารที่มีแรงไอออนิค สูง เช่น สารละลายเกลือสามารถยับยั้งการเคลื่อนย้ายอิเล็คตรอนระหว่างระหว่าง MDH และ cytochrome c_L ทำให้ MDH ไม่สามารถทำงานได้ [5,6] โดยปัจจุบันยังมีการศึกษาไม่มากนักสำหรับการผลิตเมทานอลโดยเชื้อเมทาโนโทรฟ โดยมักใช้เชื้อเมทาโนโทรฟบริสุทธิ์ในการศึกษา [2,3,4] และใช้สารยับยั้ง MDH หลายชนิด เช่น ไซโคลโพรไพนอล [2] เกลือโซเดียมคลอไรด์ [4] ดังนั้นงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาการผลิตเมทานอลโดยเชื้อเมทาโนโทรฟผสมซึ่งมีข้อดีกว่าการใช้เชื้อบริสุทธิ์เนื่องจากสามารถนำไปใช้งานจริงได้สะดวกกว่า โดยนำเชื้อผสมมาศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเมทานอลด้วยการทดลองแบบกะที่ใช้เซลล์แบบแขวนลอยโดยศึกษา ปริมาณ

ของมีเทนในช่วงร้อยละ 10-30 แปรผันชนิดของเกลือและความเข้มข้นที่ใช้เป็นสารยับยั้งเอนไซม์เมทานอลดีไฮโดรจีเนส (MDH) ได้แก่ KCl, NaCl, $CaCl_2$, $MgCl_2$ และเปรียบเทียบแหล่งของมีเทนได้แก่มีเทนบริสุทธิ์และก๊าซชีวภาพ นอกจากนี้เนื่องจากการตรึงเซลล์ด้วยอัลจิเนตสามารถนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์ได้หลังจากสิ้นสุดกระบวนการและยังรักษาสภาพแบคทีเรียได้นานโดยนำมาใช้ต่อได้หลายครั้ง [7] ดังนั้นจึงศึกษาการใช้เซลล์แบบแขวนลอยกับการใช้เซลล์ที่ถูกตรึงในอัลจิเนตที่แปรผันขนาดต่างๆ เนื่องจากเมทาโนโทรฟจัดเป็นโปรตีนเซลล์เดี่ยวที่มีคุณค่าทางอาหารสูง [8]

อุปกรณ์และวิธีการ

การแยกเชื้อเมทาโนโทรฟ

นำดินจากแบบจำลองหน้าดินหลุมฝังกลบมูลฝอยจำลองมา 10 กรัมถ่ายใส่ขวดเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารเอ็นเอ็มเอส (Nitrate Mineral Salt:NMS) ปิดฝาให้สนิทรัดด้วยอลูมิเนียมก่อนฉีดก๊าซมีเทนความเข้มข้นร้อยละ 99.9 ลงไปเพื่อให้ความเข้มข้นของบรรยากาศในขวดได้ร้อยละ 30 เขย่าด้วยความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 2 สัปดาห์ที่อุณหภูมิห้อง [9] ทิ้งให้ดินตกตะกอนแล้วถ่ายส่วนที่เป็นของเหลวเพื่อขยายพันธุ์ต่อในอาหารเหลวชนิดเอ็นเอ็มเอสอีกครั้ง

การปรับสภาพเชื้อเพื่อใช้ในการผลิตเมทานอล

ถ่ายเชื้อเมทาโนโทรฟที่แยกได้จากหน้าดินหลุมฝังกลบจำลองจากอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็นเอ็มเอส ใส่ใน 12.9 มิลลิโมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7 ที่มี 5 ไมโครโมลาร์คอปเปอร์ซัลเฟต และ 20 มิลลิโมลาร์โซเดียมฟอร์เมต [4] ในอัตราส่วนหัวเชื้อต่อฟอสเฟตบัฟเฟอร์ร้อยละ 50 ต่อ 50 โดยปริมาตร ปิดผนึกและฉีดก๊าซมีเทนบริสุทธิ์ร้อยละ 99.9 เข้าไปเพื่อให้ความเข้มข้นของบรรยากาศในขวดได้ร้อยละ 30 เขย่าด้วยความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 2 สัปดาห์

การศึกษาปริมาณมีเทนที่มีความเหมาะสมในการผลิตเมทานอล

ถ่ายเชื้อเมทาโนโทรฟที่ผ่านการปรับสภาพเชื้อเพื่อผลิตเมทานอล ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ลงสู่สารละลาย 22.5 มิลลิลิตรซึ่งประกอบด้วย 12.9 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มี 5 ไมโครโมลาร์คอปเปอร์ซัลเฟต 20 มิลลิโมลาร์โซเดียมฟอร์เมตและ 200 มิลลิโมลาร์โซเดียมคลอไรด์เป็นสารยับยั้ง MDH [4] ปิดผนึกและบรรจุก๊าซมีเทนบริสุทธิ์ร้อยละ 99.9 เข้าไปโดยให้มีความเข้มข้นของมีเทนในบรรยากาศแตกต่างกันในแต่ละขวดคือร้อยละ 10, 20 และ 30 เขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 7 วัน ตรวจวัดปริมาณเมทานอลและมีเทนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ (gas chromatograph:GC) วิเคราะห์ปริมาณเชื้อเมทาโนโทรฟเริ่มต้นและสิ้นสุดในระบบด้วยวิธีฟิช โดยโพรบที่ทำการศึกษาคือ Mγ84 และ Mγ705 สำหรับวิเคราะห์เมทาโนโทรฟ Type I และ Mα405 สำหรับวิเคราะห์เมทาโนโทรฟ Type II และ DAPI สำหรับวิเคราะห์จุลินทรีย์ทั่วไป สำหรับสกุล (genus) ที่อยู่ในขอบข่ายของวิธีฟิช (Fluorescent In Situ Hybridization : FISH) ของ

การศึกษานี้ คือ เมทาโนโทรฟ Type I ได้แก่ *Methylococcus* spp., *Methylobacter* spp., *Methylomicrobium* spp., *Methylomanas* spp., *Methylosarcina* spp., *Methylosphaera* spp., *Methylocadum* spp. และสำหรับเมทาโนโทรฟ Type II ได้แก่ *Methylocystis* spp., *Methylosinus* spp. [9,10]

การทดสอบชนิดและความเข้มข้นของสารยับยั้ง MDH

ถ่ายเชื้อเมทาโนโทรฟที่ผ่านการปรับสภาพเชื้อก่อนผลิตเมทานอลลงสู่ 12.9 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มี 5 ไมโครโมลาร์คอปเปอร์ซัลเฟต, 20 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอร์เมตและเกลือชนิดและความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ เกลือโปแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) และแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) ความเข้มข้น 5, 50, 100, 200, 300 และ 400 มิลลิโมลาร์ ปิดผนึกและบรรจุก๊าซมีเทนเข้าไปโดยให้มีมีเทนในบรรยากาศร้อยละ 10 เขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 3 วัน ตรวจวัดปริมาณเมทานอลและมีเทนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ วิเคราะห์ปริมาณเชื้อเมทาโนโทรฟเริ่มต้นและสิ้นสุดในระบบด้วยวิธีฟีช [9]

การผลิตเมทานอลโดยใช้เกลือร่วมกับก๊าซชีวภาพ

ใช้เกลือชนิดและความเข้มข้นที่ได้รับการคัดเลือกจากขั้นตอนที่ 4 ($MgCl_2$ ความเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์) โดยใช้ก๊าซชีวภาพสังเคราะห์เป็นแหล่งคาร์บอนเปรียบเทียบการให้มีเทนบริสุทธิ์เป็นแหล่งคาร์บอน โดยอัตราส่วนของก๊าซชีวภาพสังเคราะห์ประกอบด้วยมีเทนต่อคาร์บอนไดออกไซด์ในอัตราส่วน 60 ต่อ 40 บรรจุก๊าซชีวภาพสังเคราะห์เข้าไปเพื่อให้ได้ความเข้มข้นก๊าซชีวภาพในบรรยากาศร้อยละ 16.66 (มีเทนร้อยละ 10) เขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 5 วัน ตรวจวัดปริมาณเมทานอลและมีเทนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ วิเคราะห์ปริมาณเชื้อเมทาโนโทรฟเริ่มต้นและสิ้นสุดในระบบด้วยวิธีฟีช [9]

การผลิตเมทานอลโดยการตรึงเซลล์ด้วยแคลเซียมแอลจิเนต

ทำการตรึงเซลล์เมทาโนโทรฟผสมด้วยแคลเซียมแอลจิเนต [11] จากนั้นนำเม็ดเจลที่ได้มาศึกษาหาความคงตัวของเม็ดเจลในสารยับยั้งชนิดต่างๆ ได้แก่ $MgCl_2$ และ $CaCl_2$ ความเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์ NaCl ความเข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ คัดเลือกสารยับยั้งที่ทำให้เม็ดเจลมีความคงตัวในสารละลายมากที่สุด ($CaCl_2$) จากนั้นทำการศึกษาอัตราส่วนระหว่างเซลล์และสารละลายโซเดียม-อัลจิเนตที่เหมาะสมโดยปรับเปลี่ยนอัตราส่วนระหว่างปริมาตรเซลล์ต่อปริมาตรของสารละลายโซเดียมอัลจิเนต ในอัตราส่วน ร้อยละ 10, 20, 40 และ 50 แล้วคัดเลือกสภาวะที่ใช้สารละลายแคลเซียมอัลจิเนตน้อยที่สุดที่ทำให้เม็ดเจลมีความคงตัว (50:50) ทำการตรึงเซลล์โดยใช้อัตราส่วนดังกล่าวกำหนดให้มีขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางเจล คือ 2, 3, 4 และ 5 มิลลิเมตร โดยใช้ขนาดของเข็มในการกำหนดขนาดของเม็ดเจล ใส่เม็ดเจลที่ได้ใส่ลงในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น

12.9 มิลลิโมลาร์ ซึ่งมี 5 ไมโครโมลาร์คอปเปอร์ซัลเฟต 20 มิลลิโมลาร์โซเดียมฟอร์เมท และ $CaCl_2$ ความเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์เป็นสารยับยั้ง ปิดผนึกและบรรจุก๊าซชีวภาพสังเคราะห์เข้าไปเพื่อให้ได้ความเข้มข้นก๊าซชีวภาพในบรรยากาศร้อยละ 17 เขย่าที่ 120 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 3 วัน ตรวจวัดปริมาณของเมทานอลและมีเทนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ

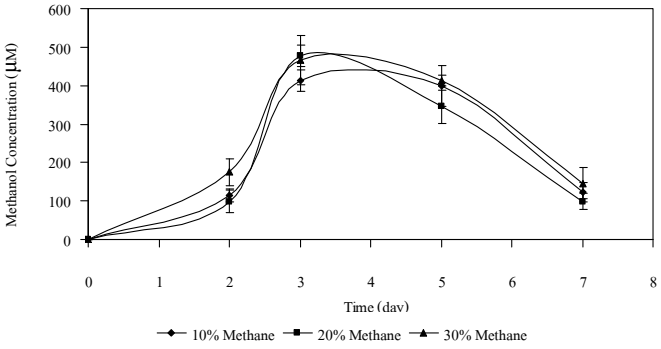
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การวิเคราะห์ Type และปริมาณเชื้อเมทาโนโทรฟผสม

สำหรับเชื้อเมทาโนโทรฟผสมที่ใช้การวิจัยนี้แยกได้จากดินฝังกลบมูลฝอยจำลองโดยมีเชื้อเมทาโนโทรฟในอัตราส่วนร้อยละ 67.21 $\pm$ 12.92 ของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดโดยมีเมทาโนโทรฟ Type I และ Type II เท่ากับร้อยละ 18.62 $\pm$ 8.92 และร้อยละ 48.59 $\pm$ 10.01 ตามลำดับ โดยนำเชื้อดังกล่าวมาใช้ในระบบการผลิตเมทานอลแบบเป็นครั้งทุกชุดการทดลอง ระยะเวลา 3-7 วัน

ผลของปริมาณมีเทนต่อการผลิตเมทานอล

จากแปรผันปริมาณมีเทนในบรรยากาศร้อยละ 10, 20 และ 30 เมื่อใช้เกลือ NaCl เป็นสารยับยั้งพบว่ามีแนวโน้มผลิตเมทานอลคล้ายคลึงกันและปริมาณไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 1) โดยปริมาณเมทานอลสูงสุดในวันที่ 3 ของการทดลอง (ความเข้มข้นของเมทานอล 412.98, 477.8, 465.89 ไมโครโมลาร์) และลดลงตามเวลา นอกจากนี้ปริมาณมีเทนที่ลดลงในบรรยากาศในระยะเวลาการศึกษาใน 7 วันจะลดลงเพียงร้อยละ 5 เท่านั้นในทุกๆ สภาวะ ทั้งนี้เนื่องจากการการยับยั้งการใช้เมทานอลในเซลล์เป็นการขัดขวางกระบวนเมตะบอลิซึมของเมทาโนโทรฟ ทำให้การนำมีเทนมาใช้เป็นไปอย่างจำกัด ดังนั้นปริมาณมีเทนที่ให้เพียงร้อยละ 10 ก็เพียงพอสำหรับการนำไปใช้เพื่อผลิตเมทานอลของเมทาโนโทรฟ



รูปที่ 1 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเมทานอลเมื่อมีความเข้มข้นมีเทนในบรรยากาศแตกต่างกัน

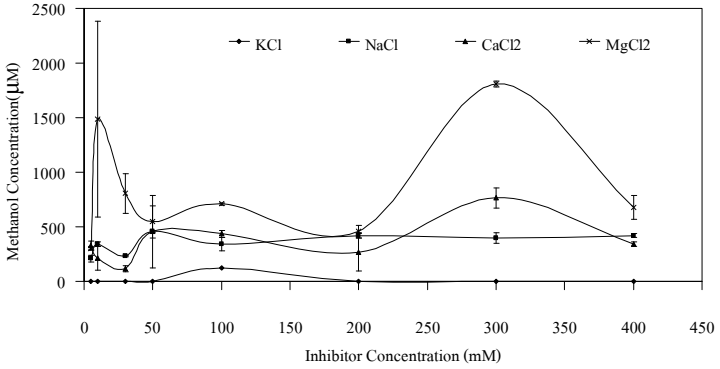
การคัดเลือกชนิดของสารยับยั้งและความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการยับยั้ง MDH

การคัดเลือกชนิดของสารยับยั้งและความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการยับยั้ง MDH พบว่าปริมาณเมทานอลสูงสุดในวันที่ 3 ของการทดลองในทุกๆ สภาวะ ซึ่งแสดงในรูปที่ 2 โดยผลการ

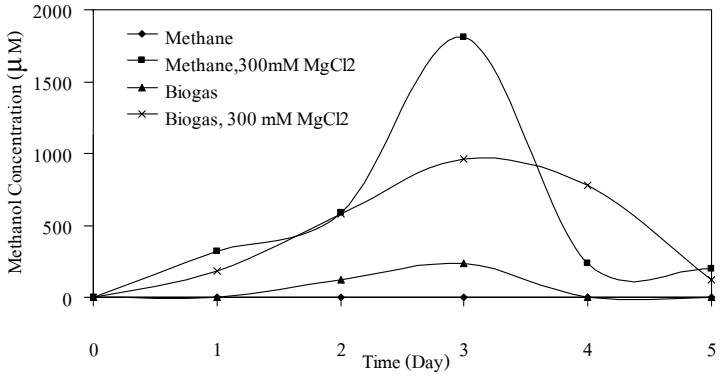
ทดสอบพบว่ามีการผลิตเมทานอลในทุกๆ ความเข้มข้นของสารละลายที่มี NaCl, $MgCl_2$ และ $CaCl_2$ ยกเว้นกรณีที่ใช้ KCl ที่พบเมทานอลเพียงที่ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ทั้งนี้เนื่องจากเซลล์มีความสามารถในการรักษาสมดุลของโปแทสเซียมไอออน (K^+) ได้ดี ทำให้ความสามารถในการยับยั้ง MDH ต่ำถึงแม้ว่าจะใช้ความเข้มข้นสูงมากเท่าไรก็ตาม [8] สำหรับ NaCl เข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ ให้เมทานอลสูงสุดเท่ากับ 421 ไมโครโมลาร์ซึ่งมีค่าต่ำกว่าการทดลองของ Lee *et al*. [4] ซึ่งศึกษาการผลิตเมทานอลโดยเชื้อ *Methylosinus trichosporium* OB3b ในสภาวะที่มี NaCl ความเข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ โดยมีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 0.6 กรัมเซลล์แห้งต่อลิตร พบว่ามีการผลิตเมทานอล 7.7 มิลลิโมลาร์ที่เวลา 36 ชั่วโมง อาจสืบเนื่องจากการทดลองนี้ใช้เชื้อผสมและมีน้ำหนักเซลล์ที่น้อยกว่า ในกรณีการใช้เกลือ $MgCl_2$ และ $CaCl_2$ เข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์ ให้เมทานอลสูงสุดเท่ากับ 1806 และ 765 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ ซึ่งเกลือทั้งสองชนิดนี้มีความสามารถในการยับยั้ง MDH ดีกว่า NaCl อาจเนื่องมาจากบริเวณเร่ง (active site) ของ MDH ประกอบด้วยแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) จับกับ PQQ (Pyrroloquinoline quinine) ซึ่งเป็นโปรตีนในเอนไซม์ MDH [5,6] การใช้สารยับยั้งซึ่งมีประจุ 2+ จะมีความสามารถในการแย่งจับ PQQ กับแคลเซียมไอออนที่บริเวณเร่งได้สูงกว่าประจุ 1+ และแคลเซียมไอออนอิสระในเซลล์ก็สามารถแย่งจับ PQQ ได้เช่นกัน

การศึกษาการผลิตเมทานอลด้วยก๊าซชีวภาพ

การทดลองใช้ก๊าซมีเทนหรือก๊าซชีวภาพเพียงอย่างเดียวโดยไม่มีเกลือ $MgCl_2$ พบว่าไม่มีการผลิตเมทานอลในการใช้ก๊าซมีเทนอย่างเดียวแต่มีการผลิตเมทานอลเมื่อใช้ก๊าซชีวภาพซึ่งให้เมทานอลสูงสุดเท่ากับ 240 ไมโครโมลาร์ที่ระยะเวลา 3 วัน และเมื่อใช้สารยับยั้ง $MgCl_2$ ความเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์ในสภาวะที่มีก๊าซชีวภาพกับก๊าซมีเทนบริสุทธิ์พบว่าปริมาณความเข้มข้นเมทานอลเมื่อใช้ก๊าซมีเทนบริสุทธิ์จะผลิตได้สูงกว่าก๊าซชีวภาพโดยให้เมทานอลเท่ากับ 1,806 และ 964 ไมโครโมลาร์ตามลำดับ (รูปที่ 3) อย่างไรก็ตามการใช้ก๊าซชีวภาพให้ความเสถียรในการผลิตเมทานอลดีที่กว่า และเมื่อพิจารณาผลผลิตเมทานอลต่อปริมาณก๊าซมีเทนที่ถูกใช้ไปกับปริมาณมีเทนที่ถูกใช้ไป (รูปที่ 4) พบว่าในสภาวะที่ใช้ก๊าซชีวภาพจะมีอัตราการใช้มีเทนต่อวันต่ำกว่าการใช้มีเทนบริสุทธิ์เป็นแหล่งคาร์บอน โดยอัตราการผลิตเมทานอลต่อมีเทนที่ใช้ไปได้ดีกว่าก๊าซมีเทนโดยให้เมทานอลเท่ากับ 4,559 และ 1,029 ไมโครกรัมเมทานอลต่อกรัมมีเทนตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องมาจากคาร์บอนไดออกไซด์ซึ่งเป็นสารผลิตภัณฑ์สุดท้ายของกระบวนการเมตะบอลิซึมสามารถทำให้ปฏิกิริยาการออกซิเดชันเมทานอลโดย MDH ช้าลง [3]

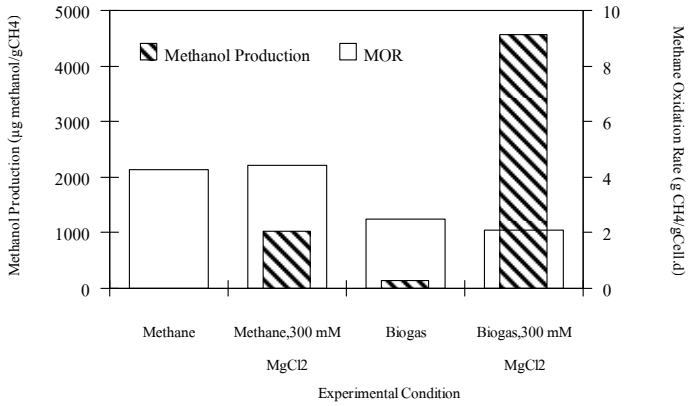


รูปที่ 2 ผลของความเข้มข้นและชนิดของเกลือในการผลิตเมทานอล



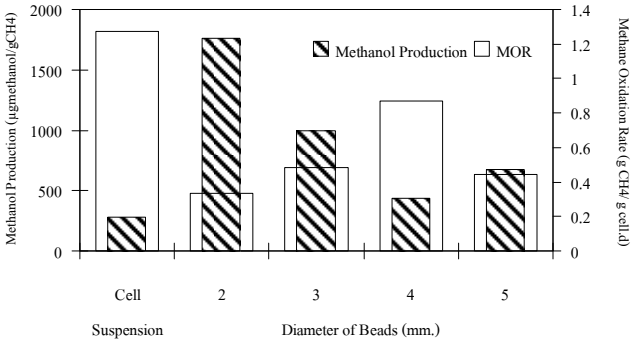
รูปที่ 3 ปริมาณเมทานอลที่ตรวจพบโดยใช้ 300 มิลลิโมลาร์ $MgCl_2$ เป็นสารยับยั้ง MDH เปรียบเทียบระหว่างสภาวะที่มีก๊าซมีเทนและก๊าซชีวภาพในบรรยากาศในการทดลอง

แทนที่แคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) ทำให้เจลไม่คงตัวและเกิดการละลายได้ [7] โดยเมื่อใช้เกลือแคลเซียมคลอไรด์เป็นสารยับยั้งสามารถใช้อัตราส่วนเซลล์ต่อแอลจิเนตได้ถึง 50:50 โดยปริมาตร และเมื่อเปรียบเทียบขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของเจลที่ขนาด 2, 3, 4 และ 5 มิลลิลิตร (รูปที่ 5) พบว่าเมื่อเจลที่มีขนาดเล็กจะมีอัตราการผลิตเมทานอลที่สูงกว่าเจลที่มีขนาดใหญ่เนื่องจากการสัมผัสกับอากาศเป็นไปได้ง่ายกว่าโดยปริมาณเมทานอลที่ผลิตเท่ากับ 1,760 ไมโครกรัมต่อกรัมมีเทนเมื่อใช้เม็ดเจลเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 2 มิลลิเมตร และเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์แบบแขวนลอย (279ไมโครกรัมต่อกรัมมีเทน) พบว่าอัตราการผลิตเมทานอลโดยใช้เซลล์ที่ถูกตรึงจะสูงกว่า อาจเนื่องจากเมทานอลซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์สัมผัส กับเซลล์ที่ถูกตรึงได้ต่ำกว่าเซลล์แบบแขวนลอย [7] การออกซิไดซ์โดย MDH จึงมีโอกาสต่ำกว่า



รูปที่ 4 ผลผลิตเมทานอลต่อปริมาณมีเทนที่ใช้ไปและอัตราการออกซิเดชันของมีเทนที่ 300 มิลลิ-โมลาร์ $MgCl_2$เปรียบเทียบมีเทนบริสุทธิ์และก๊าซชีวภาพ

(หมายเหตุ MOR = Methane Oxidation Rate)



รูปที่ 5 ผลผลิตเมทานอลและอัตราการออกซิเดชันมีเทนของเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต เมื่อใช้ $CaCl_2$ 300 มิลลิโมลาร์ แปรผันขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเม็ดเจล

สรุปผลการทดลอง

เชื้อเมทาโนโทรฟผสมสามารถนำมาใช้ในการผลิตเมทานอลได้ดี เมื่อแปรผันปริมาณมีเทนที่ ร้อยละ 10, 20 และ 30 เมื่อใช้เกลือ NaCl เป็นสารยับยั้ง MDH พบว่าการผลิตเมทานอลสูงสุดแตกต่างกันเล็กน้อย (413, 478 และ 466 ไมโครโมลาร์ตามลำดับ) และพบว่าชนิดของเกลือที่ให้เมทานอลสูงสุด คือ $MgCl_2$ (300 มิลลิโมลาร์) โดยให้เมทานอลเท่ากับ 1,806 ไมโครโมลาร์ เมื่อเปรียบเทียบค่าสูงสุดของ $CaCl_2$ NaCl และ KCl ให้เมทานอลเท่ากับ 765, 421 และ 123 ไมโคร-โมลาร์ตามลำดับ และเมื่อใช้ก๊าซชีวภาพแทนมีเทนบริสุทธิ์กรณีที่ไม่มีเกลือร่วมด้วยพบว่าก๊าซมีเทนไม่สามารถให้เมทานอลได้ ในขณะที่ก๊าซชีวภาพให้เมทานอล 240 ไมโครโมลาร์ สำหรับกรณีที่ใช้ $MgCl_2$ ร่วมด้วยพบว่าก๊าชมีเทนให้ปริมาณเมทานอลสูงกว่าก๊าซชีวภาพโดยให้เมทานอลสูงสุด 1,806 และ 964 ไมโครโมลาร์ตามลำดับ แต่ก๊าซชีวภาพให้ความเสถียรและอัตราการผลิตเมทานอลต่อมีเทนที่ใช้ไปได้ดีกว่าก๊าซมีเทนโดยให้เมทานอลเท่ากับ 4,559 และ 1,029 ไมโครกรัมเมทานอล

ต่อกรัมมีเทนตามลำดับ ในการทดลองใช้เซลล์เมทาโนโทรฟที่ตรึงในแคลเซียมอัลจิเนตพบว่าได้ปริมาณเมทานอลเท่ากับ 1,760 ไมโครกรัมต่อกรัมมีเทน เมื่อใช้เม็ดเจลเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 2 มิลลิเมตร ซึ่งสูงกว่าเซลล์แบบแขวนลอย (279 ไมโครกรัมต่อกรัมมีเทน) เมื่อใช้ $CaCl_2$ เป็นสารยับยั้ง

เอกสารอ้างอิง

[1] Grisalba O. and Heinzer F. 1982. Methanol from methane-a hypothetical microbial conversion compared with the chemical process. Experientia 38, 218 – 223.

[2] Furuto T., Takeguki M. and Okura I.1998. Semicontinuous methanol biosynthesis by *Methylosinus trichosporium* OB3b. Journal of Molecular Catalysis A : Chemical 144, 257-261.

[3] Xin J.Y., Cui J.R., Niu J.Z., Hua S.F., Xia C.G.., Li S.B. and ZHU L.M. 2004. Production of methanol from methane by methanotrophic bacteria. Biocatalysis and Biotransformation 22(3), 225-229

[4] Lee S.G., Goo J.H., Kim H.G, Oh J.I., Kim Y.M and Kim W.S. 2004. Optimization of methanol biosynthesis from methane using *Methylosinus trichosporium* OB3b. Biotechnology Letters 26, 947-950

[5] Cox J.M., Day D.J. and Anthony C.1992. The interaction of methanol dehydrogenase and its electron acceptor, cytochrome c_L in methylotrophic bacteria. Biochim.Biophys.Acta 1119, 97-106

[6] Anthony C. and Williams P. 2002. The structure and methanism of methanol dehydrogenase. Biochimica et Biophysica Acta 1647, 18-23

[7] สมใจ ศิริโภค. 2545. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ, กรุงเทพ. 228-229

[8] Hanson R. S. and Hanson T. E. 1996. Methanotrophic bacteria. Microbiological reviews 60 (2), 439–471

[9] พิชญา ส้มเกลี้ยง. 2550. การจำแนกเชื้อเมทาโนโทรฟในดินกลบทับชั้นสุดท้ายของพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยที่มีผลต่อการเกิดมีเทนออกซิเดชัน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

[10] Eller, G., Stubner, S. and Frenzel, P. 2001. Group-specific 16S rRNA targeted propes for the detection of type I and type II methanotrophs by fluorescence in situ hybridization. FEMS microbial. Lett. 198 : 91 – 97

[11] อาบชัย ธัญญอุดร. 2542. การผลิตกรดโปรปิโอนิคโดยการตรึงเซลล์จาก *Propionibacterium jensenii* KU 0001 ที่แยกจากอาหารหมักไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวสยามมล พิมพ์ทอง
วัน เดือน ปี ที่เกิด	20 กันยายน 2526
สถานที่เกิด	อำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี
ประวัติการศึกษา	วท.บ.(จุลชีววิทยา) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี (พ.ศ.2548)
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	-