

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ได้ด้วยดีด้วยความร่วมมือและความอนุเคราะห์จากหลายฝ่าย ผู้วิจัยขอขอบพระคุณสำนักบริหารโครงการวิจัยในอุดมศึกษาสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัยในครั้งนี้ ขอขอบคุณคณาจารย์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีทุกๆ ท่าน ที่ให้ความอุปการะในการเข้าใช้ห้องปฏิบัติการต่างๆ ที่เกี่ยวข้อง ตลอดจนการดำเนินการวิจัย ขอขอบคุณ อ.ดร.กันต์ ปานประยูร จากมหาวิทยาลัยมหิดล ในการตรวจสอบและเสนอแนะในตัวเล่มงานวิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ศูนย์สิ่งแวดล้อมที่อำนวยความสะดวกในการใช้อุปกรณ์เครื่องมือในการวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และเพื่อนๆ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต ทุกท่านที่คอยให้กำลังใจและให้ความสนับสนุนงานวิจัยด้วยดีมาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณ มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิตและผู้บริหารมหาวิทยาลัยที่มีนโยบายอำนวยความสะดวกในการลงเวลาทำงานที่สะดวก ทำให้การวิจัยเป็นไปด้วยความเรียบร้อยและขอขอบพระคุณสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต ที่ให้ความสะดวกในการดำเนินการวิจัยในครั้งนี้

ประโยชน์อันเนื่องมาจากการงานวิจัยเล่มนี้จะพึงมีเพียงใด ขอมอบแต่คุณพ่อ คุณแม่ และคณาจารย์ทุกท่าน ที่ได้เมตตาอบรมสั่งสอนให้มีความรู้จนถึงปัจจุบัน

คณะผู้วิจัย

มีนาคม 2555

หัวข้อวิจัย	การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ Methanol ในMethanotrophic Bacteriaโดยใช้ถึงปฏิกิริยาชีวภาพจำเพาะ
ผู้ดำเนินการวิจัย	อ.ดร. ณัฐบดี วิริยาวัฒน์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรชาติ สินวรรณ นายกิตติศักดิ์ พฤษภานนท์
หน่วยงาน	มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต
ปี พ.ศ.	2556

เมทานอลเป็นสารที่ใช้ในอุตสาหกรรมเคมีในหลายด้าน เช่น building block, anti freeze และ precursor โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ใช้เป็นพลังงานทดแทน ในปัจจุบัน กระบวนการผลิตเมทานอลใช้การสังเคราะห์ syngas ซึ่งเป็นวิธีการทางเคมี ที่มีกระบวนการที่ซับซ้อนและยุ่งยาก และมีค่าใช้จ่ายในการผลิตสูง ผู้วิจัยจึงหาแนวทางในการสังเคราะห์เมทานอลโดยใช้กระบวนการทางชีวภาพ จากแบคทีเรียกลุ่ม Methanotroph ดังนั้นจึงทำการคัดเลือกแบคทีเรีย Methanotroph จากดินหลุมฝังกลบขยะที่มีความสามารถในการผลิตเมทานอล ได้แก่ *Methylosinus trichosporium* strain NT85 (KC353469) ด้วยเทคนิคทางอนุชีววิทยาและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียในถึงปฏิกิริยาชีวภาพ โดยศึกษาผลของปัจจัยต่างๆ ได้แก่ สัดส่วนเปอร์เซ็นต์ของ CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> และ N<sub>2</sub> การเติมไอออนโลหะ ความเข้มข้นของเกลือและอุณหภูมิที่เหมาะสม จากการศึกษาพบว่า แบคทีเรีย *Methylosinus trichosporium* strain NT85 สามารถนำมาใช้ในการผลิตเมทานอลได้ดี โดยเมื่อให้สัดส่วนเปอร์เซ็นต์ของ CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> และ N<sub>2</sub> ร้อยละ 30, 40, 20 และ 10 ตามลำดับ พบว่าให้ปริมาณเมทานอลสูงสุดที่ 19.4  $\mu\text{mol}^{-1}$  เมื่อเติมคอปเปอร์ความเข้มข้น 0.5  $\mu\text{M}$  พบว่า ช่วยกระตุ้นการผลิตเมทานอลให้สูงขึ้น โดยให้เมทานอลสูงสุดที่ 21.4  $\mu\text{mol}^{-1}$  และเมื่อใช้เกลือ MgCl<sub>2</sub> 250 mM พบว่า ให้การผลิตเมทานอลสูงสุดที่ 7,345  $\mu\text{mol}^{-1}$  นอกจากนี้ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อที่ให้การผลิตเมทานอลสูงสุดได้แก่ อุณหภูมิ 25°C โดยให้ปริมาณเมทานอลสูงสุดที่ 19.4  $\mu\text{mol}^{-1}$  จากผลการวิจัยนี้ สามารถนำไปเป็นข้อมูลพื้นฐานในการเพิ่มศักยภาพการผลิต เมทานอลโดยใช้กระบวนการทางชีวภาพ ในเชิงอุตสาหกรรมและพาณิชย์ ตลอดจนช่วยลดปัญหาก๊าซเรือนกระจก เช่น CH<sub>4</sub> และ CO<sub>2</sub> ได้อีกด้วย

<b>Research Title</b>	Study of the Optimal Condition for Biosynthesis of Methanol in Methanotrophic Bacteria by Specific Reactor
<b>Researcher</b>	Mrs. NuttabodeeViriyawattana Asst. Prof. SurachatSinworn Mr. Kittisakphukanon
<b>Organization</b>	SuanDusitRajabhat University
<b>Year</b>	2013

Methanol is used in the chemical industry in a variety of ways such as the building block, anti freeze and precursor. Especially, it can use as an alternative fuel source. Currently, methanol can be produced chemically by synthesis of syngas, which is complicated and high cost process. We studied the biosynthesis of methanol from biotechnology by methanotrophic bacteria. Then we selected and identified methanotrophic bacteria from landfill cover soil that ability to produce methanol by molecular technique. As results, *Methylosinus trichosporium* strain NT85 (KC353469) was identified in this study. The aim of this work was to examine the optimal conditions for biosynthesis of methanol in bioreactor. We studied the effect of several factors such as percent CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> ratio, metal ion concentration, salt concentration and optimal temperature. In this study, we found that *Methylosinus trichosporium* strain NT85 could be used to methanol production. When 30%CH<sub>4</sub>, 40%CO<sub>2</sub>, 20%O<sub>2</sub>, 10%N<sub>2</sub> was used, the methanol concentration had reach the highest level at 19.4 μmol<sup>-1</sup>. The copper concentration at 0.5 μM was added, the methanol concentration was the highest at 21.4 μmol<sup>-1</sup>. Moreover, when 250 mM MgCl<sub>2</sub> was added, the methanol concentration was the highest at 7,345 μmol<sup>-1</sup>. In addition, the optimum temperature that promotes the highest concentration at 19.4 μmol<sup>-1</sup> was 25°C. The results use as basic information for increased the potential of methanol production for industry and commerce. Also, it could reduce the greenhouse gases CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub>.

## สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ซ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	ฎ
<b>บทที่ 1 บทนำ</b>	<b>1</b>
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.3 กรอบแนวคิดการวิจัย	2
1.4 ขอบเขตการวิจัย	3
1.5 คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย	4
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
<b>บทที่ 2 แนวคิดทฤษฎีและเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง</b>	<b>5</b>
2.1 เมทาโนโทรฟิคแบคทีเรีย	5
2.2 เมทานอล	9
2.3 การใช้ประโยชน์เมทานอล	11
2.4 การผลิตเมทานอลจากมีเทนโดยเมทาโนโทรฟ	11
2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเมทานอลของเมทาโนโทรฟ	11
2.6 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ	14
2.7 คุณสมบัติพื้นฐานของถังปฏิกรณ์ชีวภาพ	15
2.8 การสร้างตัวถังปฏิกรณ์ชีวภาพ	17
2.9 การให้อากาศและการกวน	18
2.10 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอื่น	24
2.11 ทฤษฎีการส่งผ่านออกซิเจน	27
2.12 การเก็บเกี่ยวผลผลิต	27

	หน้า
2.13 การสกัดโดยใช้ตัวทำละลายที่เป็นของเหลว	31
2.14 การเก็บเกี่ยวตัวทำละลาย	32
2.15 โครมาโตกราฟี	34
2.16 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	35
<b>บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย</b>	<b>37</b>
3.1 อุปกรณ์	37
3.2 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ	37
3.3 เครื่องมือ	38
3.4 การลงพื้นที่สำรวจข้อมูลและเก็บตัวอย่าง	45
3.5 วิธีการดำเนินการวิจัยและสถานที่ทำการทดลอง	47
3.5.1 วิธีการดำเนินการวิจัย	47
3.5.2 สถานที่ทำการทดลอง	48
<b>บทที่ 4 ผลการการวิจัย</b>	<b>50</b>
4.1 การคัดเลือกแบคทีเรีย Methanotroph จากดินหลุมฝังกลบขยะ	50
4.2 การจัดจำแนกแบคทีเรีย Methanotroph โดยการเปรียบเทียบลำดับเบส	51
4.3 การศึกษาความสามารถในการผลิตเมทานอลของ <i>Methylosinus trichosporium strain NT 85</i>	54
4.4 การศึกษาสัดส่วนเปอร์เซ็นต์ของปริมาณก๊าซ CH <sub>4</sub> , CO <sub>2</sub> , O <sub>2</sub> และ N <sub>2</sub> ที่เหมาะสมต่อการผลิตเมทานอลของ <i>Methylosinustrichosporium strain NT85</i>	55
4.5 การศึกษาปริมาณไอออนโลหะที่เหมาะสมต่อการผลิตเมทานอลของ <i>Methylosinustrichosporium strain NT 85</i>	56
4.6 การศึกษาความเข้มข้นของเกลือที่เหมาะสมต่อการผลิตเมทานอลของ <i>Methylosinustrichosporium strain NT 85</i>	57
4.7 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเมทานอลของ <i>Methylosinus trichosporium strain NT 85</i>	58
4.8 การศึกษาสมบัติของเมทานอล	59
<b>บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยอภิปรายผล และข้อเสนอแนะ</b>	<b>60</b>
5.1 สรุปผลการวิจัย	60

	หน้า
5.2 อภิปรายผล	61
5.3 ข้อเสนอแนะ	64
<b>ผลผลิต</b>	65
การนำไปใช้ประโยชน์สาธารณะ	65
<b>รายงานสรุปการเงิน</b>	67
<b>บรรณานุกรม</b>	68
<b>ประวัติผู้วิจัย</b>	73

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 สัญลักษณ์สำคัญของ Methanotroph type I, type II และ type x	8
2.2 ตัวทำละลายที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมและค่า dielectric constant ของตัวทำละลายชนิดต่างๆที่อุณหภูมิ 25°C	32

## สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1.1 กรอบแนวคิดในการวิจัยการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์เมทานอลใน Methanotrophic Bacteria โดยใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพจำเพาะ	3
2.1 เซลล์แบคทีเรีย	5
2.2 Pathway ของการสังเคราะห์และการสลายเมทานอลในแบคทีเรียกลุ่ม Methanotrophs, FDH: Formate dehydrogenase; FADH: Formaldehyde dehydrogenase; MDH: Methanol dehydrogenase; MMO: Methane monooxygenase	6
2.3 RuMP pathway สำหรับการตรึงฟอร์มัลดีไฮด์ โดยเอนไซม์ที่ใช้เร่งปฏิกิริยาใน pathway นี้ได้แก่ hexulose-6-phosphate synthase และ hexulose-phosphate isomerase	6
2.4 Serine pathway สำหรับการตรึงฟอร์มัลดีไฮด์ โดยเอนไซม์ที่ใช้เร่งปฏิกิริยาใน pathway นี้ได้แก่ serine hydroxymethyltransferase (STHM), hydroxypyruvate reductase (HPR), malate thiokinase (MTK) และ malyl coenzyme A lyase (MCL)	7
2.5 โครงสร้างของโมเลกุล	9
2.6 การสังเคราะห์เมทานอล	10
2.7 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ประกอบด้วยใบพัดชุดเดียว	16
2.8 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ประกอบไปด้วยใบพัด 3 ชุด	16
2.9 รูปแบบของใบพัดชนิดต่างๆ (a) disc turbine (b) vaned disc (c) open turbine (d) marine propeller	19
2.10 Packed – gland stirrer seal	21
2.11 Simple bush seal	21
2.12 Mechanical seal assembly	22
2.13 Driving magnet และ Driven magnet เข้ากับถังปฏิกรณ์ชีวภาพ	22
2.14 Combined sparger-agitator	24
2.15 ลักษณะของ self – priming aerator	26
2.16 ลักษณะของ cavitator และการหมุนเวียนของอากาศใน cavitator	26
2.17 วิธีการแยกสารโดยใช้ฟอง	29
2.18 ลักษณะและส่วนประกอบของเครื่องกรองแบบง่าย	30

ภาพที่	หน้า
2.19 เครื่องกลั่นและควบแน่นตัวทำละลายแบบ batch	33
2.20 เครื่องกลั่นและควบแน่นตัวทำละลายแบบต่อเนื่อง	33
3.1 pH Meter	38
3.2 เทอร์โมมิเตอร์	39
3.3 water manometer	40
3.4 เครื่องเก็บตัวอย่างอากาศแบบติดตามตัว (personal pump)	41
3.5 ถุงเก็บตัวอย่างอากาศ (air bag)	41
3.6 เครื่องวิเคราะห์ปริมาณความเข้มข้นของก๊าซมีเทนแบบทันที	42
3.7 เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ	43
3.8 เครื่อง Tpersonal Thermocycler	43
3.9 การแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าโดยใช้เครื่อง Electrophoresis	44
3.10 การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย โดยใช้เครื่องเขย่า	44
3.11 การสุ่มพื้นที่ออกเป็นจุดย่อย แปลงละ 15 จุด	45
3.12 การคลุกเคล้าดินตัวอย่างและการ Quartering ดินออกเป็น 4 ส่วนโดยกองดินเป็นรูปฝาชีแล้วใช้มือขีดเป็นกากบาท (+) บนยอดฝาชีเพื่อแบ่งกองดินเป็น 4 ส่วน	46
3.13 ตัวอย่างดินที่เก็บมาจากแหล่งฝังกลบขยะ ในเขตอำเภอไทรน้อย จังหวัดนนทบุรี	46
3.14 การเลี้ยงเชื้อในถังปฏิกรณ์ชีวภาพจำเพาะ	48
3.15 สถานที่ฝังกลบขยะในเขตอำเภอไทรน้อย จังหวัดนนทบุรี	49
4.1 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วน 16S rRNA ด้วยวิธี PCR ได้ PCR product ขนาด 1,500 bp	51
4.2 การเปรียบเทียบลำดับเบส 16S rRNA ยีนของเชื้อจากตัวอย่างดิน รหัสตัวอย่าง NT85 และ <i>Methylosinus trichosporium</i> OB3b strain OB3b โดยใช้โปรแกรม BioEdit เครื่องหมายดอกจัน (*) แสดงถึงลำดับเบสที่เหมือนกัน	52
4.3 ปริมาณเมทานอลที่ผลิตโดย <i>Methylosinus trichosporium</i> strain NT85 ซึ่งตรวจวัดได้ในช่วงเวลาต่างๆ เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีก๊าซมีเทนบริสุทธิ์ ร้อยละ 99.9 ในปริมาณร้อยละ 20 ที่อุณหภูมิห้อง	55
4.4 ปริมาณเมทานอลที่ผลิตโดย <i>Methylosinus trichosporium</i> strain NT85 ซึ่งตรวจวัดได้ในช่วงเวลาต่างๆ เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีสัดส่วนเปอร์เซ็นต์ของปริมาณก๊าซ CH <sub>4</sub> , CO <sub>2</sub> , O <sub>2</sub> และ N <sub>2</sub> ที่แตกต่างกัน	56

ภาพที่	หน้า
4.5 ปริมาณเมทานอลที่ผลิตโดย <i>Methylosinus trichosporium</i> strainNT85 ซึ่งตรวจวัดได้ในช่วงเวลาต่างๆ เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีการกระตุ้นด้วย คอปเปอร์	57
4.6 ปริมาณเมทานอลที่ผลิตโดย <i>Methylosinus trichosporium</i> strainNT85 ซึ่งตรวจวัดได้ในช่วงเวลาต่างๆ เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีการสารยับยั้ง $MgCl_2$	58
4.7 ปริมาณเมทานอลที่ผลิตโดย <i>Methylosinus trichosporium</i> strainNT85 ซึ่งตรวจวัดได้ในช่วงเวลาต่างๆ เมื่อเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 25, 35 และ 40 °C ตามลำดับ	59

## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

pH	=	ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง
°C	=	องศาเซลเซียส
CH <sub>4</sub>	=	มีเทน
O <sub>2</sub>	=	ออกซิเจน
CO <sub>2</sub>	=	คาร์บอนไดออกไซด์
N <sub>2</sub>	=	ไนโตรเจน