บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การศึกษาครั้งนี้ เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียในกลุ่ม Methanotroph สายพันธุ์ในประเทศไทย จากตัวอย่างดินที่เก็บจากแหล่งฝังกลบขยะที่ อ. ไทรน้อย จ. นนทบุรี ที่มีความสามารถในการผลิตเมทานอล โดยอาศัยปฏิกิริยาเมทาบอลิสมภายในเซลล์ของแบคทีเรียในการออกซิไดซ์มีเทนไปเป็นเมทานอลและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรีย Methanotroph ในปฏิกิริยาการผลิตเมทานอล โดยใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ โดยศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา ได้แก่ สัดส่วนเปอร์เซ็นต์ของ CH_4, CO_2, O_2 และ N_2 การเติมไอออนโลหะ การเติมเกลือ และอุณหภูมิ ตลอดจนวิเคราะห์คุณสมบัติของเมทานอลที่ได้ จากผลการวิจัยคณะผู้วิจัยสามารถคัดเลือกแบคทีเรีย Methanotroph สายพันธุ์ของประเทศไทยที่มีความสามารถในการผลิตเมทานอลด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา ได้แก่ *Methylosinus trichosporium* strain NT85 (KC353469) ซึ่งแบคทีเรีย Methanotroph ที่แยกได้ เมื่อนำไปทดสอบความสามารถผลิตเมทานอลเบื้องต้น พบว่าสามารถนำมาใช้ในการผลิตเมทานอลได้ดี โดยเมื่อให้สัดส่วนเปอร์เซ็นต์ของ CH_4, CO_2, O_2 และ N_2 ร้อยละ 30, 40, 20 และ 10 ตามลำดับ พบว่าให้ปริมาณเมทานอลสูงสุดที่ 19.4 μmol^{-1} เมื่อเติมคอปเปอร์ความเข้มข้น 0.5 μM พบว่า ช่วยกระตุ้นการผลิตเมทานอลให้สูงขึ้น โดยให้เมทานอลสูงสุดที่ 21.4 μmol^{-1} และสภาวะที่ไม่มีกระตุ้นด้วยคอปเปอร์ให้การผลิตเมทานอลต่ำสุด เมื่อใช้เกลือ $MgCl_2$ ความเข้มข้น 250 mM พบว่า ให้การผลิตเมทานอลสูงสุดที่ 7,345 μmol^{-1} ส่วนสภาวะที่มีความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ที่ 225 และ 200 mM ให้การผลิตเมทานอลต่ำลงตามลำดับ นอกจากนี้ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อที่ให้การผลิตเมทานอลสูงสุดได้แก่ อุณหภูมิ 25 $^{\circ}C$ โดยให้ปริมาณเมทานอลสูงสุดที่ 19.4 μmol^{-1} เมื่อนำเมทานอลที่ได้มาวิเคราะห์คุณสมบัติ พบว่ามีคุณสมบัติใกล้เคียงกับคุณสมบัติของเมทานอลที่ใช้ในอุตสาหกรรม จากผลการวิจัยนี้ สามารถนำไปเป็นข้อมูลพื้นฐานในการเพิ่มศักยภาพการผลิตเมทานอลในเชิงอุตสาหกรรมและพาณิชย์ ทดแทนการสังเคราะห์ด้วยกระบวนการทางเคมี ซึ่งมีราคาแพงในท้องตลาด และส่งผลกระทบต่อโครงสร้างและหน้าที่ของระบบนิเวศ โดยนำเมทานอลที่ได้มาใช้ในการผลิตสี อุตสาหกรรมเรซินและพลาสติก และใช้เป็นพลังงานทดแทน เป็นต้น

5.2 อภิปรายผล

5.2.1 การคัดเลือกแบคทีเรียและจัดจำแนกแบคทีเรีย Methanotroph

งานวิจัยที่มีการศึกษาก่อนหน้านี้ เกี่ยวกับแบคทีเรีย Methanotroph ในธรรมชาติที่สามารถเปลี่ยนมีเทนเป็นเมทานอลในสภาพที่มีออกซิเจน พบว่า สามารถพบแบคทีเรีย Methanotrophในบริเวณต่างๆ ได้แก่ พื้นที่ฝังกลบมูลฝอย นาข้าว และทะเลสาบ เป็นต้น ในการศึกษาครั้งนี้ จึงทำการคัดเลือกแบคทีเรีย Methanotroph จากดินหลุมฝังกลบขยะ บริเวณพื้นที่กำจัดขยะมูลฝอยตำบลคลองขวาง อำเภอไทรน้อย จังหวัดนนทบุรี จากผลการคัดเลือกและการจัดจำแนกแบคทีเรีย Methanotroph พบว่า แบคทีเรีย Methanotroph ที่แยกได้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ *Methylosinus trichosporium* strain NT85 (GenBank accession number KC353469) ซึ่งเป็นแบคทีเรีย Methanotroph Type II นับเป็นครั้งแรกที่มีรายงานการพบเชื้อนี้ในประเทศไทย เนื่องจากในการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า แบคทีเรีย Methanotroph จีนัสที่พบในประเทศไทย ได้แก่ จีนัส *Methylocystis* และ *Methylobacter* ซึ่งจากการศึกษาของ Bowman และ Sayler (1994) พบว่า *Methylosinus trichosporium* OB3b เป็นสายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์มีเทนมอนอออกซิจีเนส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่พบในแบคทีเรีย Methanotroph บางสายพันธุ์เท่านั้น โดยเอนไซม์นี้จะละลายอยู่ในไซโตพลาสซึม และมีบทบาทในการเปลี่ยนรูปของมีเทนไปเป็นเมทานอล นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าแบคทีเรีย Methanotroph สายพันธุ์นี้สามารถผลิตเมทานอลได้สูงสุดเมื่อเทียบกับสายพันธุ์อื่น (Murell *et al.*, 2000) นอกจากนี้ ในการศึกษาครั้งนี้ใช้เชื้อบริสุทธิ์เพียงชนิดเดียวในการผลิตเมทานอล ซึ่งมีข้อดีคือ สามารถควบคุมกระบวนการเมตาบอลิซึมของเชื้อได้ง่ายและผลผลิตที่ได้มีความแปรปรวนต่ำ

5.2.2 การศึกษาความสามารถในการผลิตเมทานอลของ *Methylosinus trichosporium* strain NT85

จากผลการศึกษาความสามารถในการผลิตเมทานอลของ *Methylosinus trichosporium* strain NT85 สายพันธุ์ที่แยกได้ในการศึกษาครั้งนี้ ที่พบว่า แบคทีเรียมีความสามารถในการผลิตเมทานอลและเริ่มผลิตเมทานอลหลังจากเลี้ยงเชื้อได้ 4 วัน โดยปริมาณเมทานอลสูงสุดที่ตรวจวัดได้ในชั่วโมงที่ 45 ของการเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 19.4 μmol^{-1}

5.2.3 การศึกษาสัดส่วนเปอร์เซ็นต์ของปริมาณก๊าซ CH_4, CO_2, O_2 และ N_2 ที่เหมาะสมต่อการผลิตเมทานอลของ *Methylosinus trichosporium* strain NT85

จากผลการศึกษาเปรียบเทียบสัดส่วนเปอร์เซ็นต์ที่เหมาะสมของปริมาณก๊าซ CH_4, CO_2, O_2 และ N_2 ที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ พบว่าสัดส่วนเปอร์เซ็นต์ของปริมาณก๊าซที่ให้ปริมาณเมทานอลสูงสุดที่ 19.4 μmol^{-1} ซึ่งตรวจวัดได้ในชั่วโมงที่ 45 ของการ

เลี้ยงเชื้อ ได้แก่ 30% CH_4, 40% CO_2, 10% N_2 และ 20% O_2 จากการวิจัยของ Xin และคณะ (2004) รายงานปริมาณอัตราส่วนของก๊าซแต่ละชนิดที่เหมาะสมต่อการผลิตเมทานอลในระบบการผลิตอย่างต่อเนื่อง โดยเชื้อ *Methylosinus trichosporium* OB3b ดังนี้ CH_4 20%, CO_2, 40%, N_2 20%, และ O_2 20% ให้ปริมาณเมทานอลสูงสุดที่ 8.22 μmol^{-1} ซึ่งตรวจวัดได้ในชั่วโมงที่ 198 ของการเลี้ยงเชื้อ เมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์ของแต่ละก๊าซในการศึกษาครั้งนี้ ปริมาณ CH_4 ที่เหมาะสมได้แก่ 30% และเมื่อให้ปริมาณ CH_4 ลดลงเป็น 20% และ 10% พบว่า ปริมาณการผลิตเมทานอลลดลง จากรายงานของ Yu et al., 1998 Lee et al., 2004 ปริมาณมีเทนเริ่มต้นในการผลิตเมทานอลแบบเป็นครั้งอยู่ระหว่าง 10 – 30 % ส่วนผลการศึกษาความเข้มข้นของ CO_2 ที่มีผลต่อการผลิตเมทานอล พบว่า ปริมาณก๊าซ CO_2 40% ในถังปฏิกรณ์ เป็นปริมาณที่เหมาะสมที่สุดที่ให้การผลิตเมทานอลสูงสุด ส่วนปริมาณก๊าซ CO_2 50% ในถังปฏิกรณ์ พบว่า ให้ปริมาณการผลิตเมทานอลต่ำกว่าเมื่อให้ปริมาณก๊าซ CO_2 40% และเมื่อไม่ให้ปริมาณก๊าซ CO_2 เลย พบว่าไม่มีการผลิตเมทานอล ดังนั้นอัตราส่วนของการให้ก๊าซ CO_2 จึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งต่อปริมาณเมทานอลที่แบคทีเรียผลิต เนื่องจากก๊าซ CO_2 มีความจำเป็นสำหรับการเจริญรวดเร็วของเซลล์ การให้ CO_2 ในถังปฏิกรณ์ (ในรูปก๊าซหรือรูปไบคาร์บอเนต) ช่วยลดระยะ Lag phase ให้สั้นลง และเข้าสู่ระยะ Log phase ซึ่งเป็นระยะที่แบคทีเรียมีอัตราการเจริญแบ่งตัวอย่างรวดเร็ว (Park *et al.*, 1991) ทำให้สามารถผลิตเมทานอลได้ในปริมาณมาก อย่างไรก็ตาม ปริมาณก๊าซ CO_2 ที่มากเกิน อาจส่งผลให้การผลิตเมทานอลลดลง เนื่องมาจากเมทานอลถูกนำไปใช้ต่อในเซลล์ โดยเปลี่ยนเป็นฟอร์มัลดีไฮด์ ซึ่งแบคทีเรีย *Methylosinus trichosporium* จะนำฟอร์มัลดีไฮด์ไปใช้ในการเจริญเติบโตของเซลล์ ซึ่งทุกๆ 1 โมเลกุลของ CO_2 จะทำปฏิกิริยากับฟอร์มัลดีไฮด์ 2 โมเลกุล เพื่อเปลี่ยนฟอสโฟฟีนอลไพรูเวต ไปเป็นออกซาโลอะซีเตตในวิถีซีรีน (Serine pathway) ส่วนอัตราส่วนที่เหมาะสมของก๊าซ N_2 และ O_2 ที่ให้ปริมาณเมทานอลสูงสุดในการศึกษาครั้งนี้ ได้แก่ 10% และ 20% ตามลำดับ ก๊าซ N_2 ช่วยให้เกิดภาวะสมดุลของก๊าซผสม

5.2.4 การศึกษาปริมาณไอออนโลหะที่เหมาะสมต่อการผลิตเมทานอลของ *Methylosinus trichosporium* strain NT85

จากการศึกษาปริมาณคอปเปอร์ไอออนที่เหมาะสมต่อการผลิตเมทานอลของ *Methylosinus trichosporium* strain NT85 เนื่องจากมีรายงานว่าคอปเปอร์ไอออนกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์มีเทนมอนอออกซิจีเนส (Furoto *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2004) พบว่าสภาวะที่มีความเข้มข้นของคอปเปอร์ไอออน 0.5 μM ให้การผลิตเมทานอลสูงสุดที่ 21.4 μmol^{-1} ส่วนสภาวะที่มีความเข้มข้นของคอปเปอร์ไอออน 1 และ 1.5 μM ให้การผลิตเมทานอลที่ต่ำกว่าสภาวะที่มีความเข้มข้นของคอปเปอร์ไอออน 0.5 μM ตลอดจนสภาวะที่ไม่มีกระตุ้นด้วยคอปเปอร์ไอออน นั้นให้การผลิตเมทานอลต่ำสุด ที่เป็นเช่นนี้ เนื่องมาจาก คอปเปอร์ไอออน ช่วยให้

เซลล์มีการเจริญที่สูงขึ้น โดยการเติมคอปเปอร์ไอออน 1 และ 10 μM ลงในถังปฏิกรณ์ ช่วยให้เซลล์มีการเจริญเพิ่มขึ้น 25% และ 30% ตามลำดับ แต่เมื่อความเข้มข้นของคอปเปอร์ที่สูงกว่านี้กลับทำให้อัตราการเจริญของเซลล์ลดลง (Shah et al 1992) มีรายงานว่า คอปเปอร์สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์มีเทนมอนอออกซิจีเนสได้ด้วย (Davis *et al*.,1987; Park *et al*., 1992; Stanley *et al*., 1983) ในสภาวะที่มีความหนาแน่นของเซลล์แบคทีเรียต่ำ ปริมาณคอปเปอร์ไอออน 1 μM เพียงพอที่จะยับยั้งการทำงาน ของเอนไซม์มีเทนมอนอออกซิจีเนส (Park *et al*., 1992)

5.2.5 การศึกษาความเข้มข้นของเกลือที่เหมาะสมต่อการผลิตเมทานอลของ *Methylosinus trichosporium* strain NT85

จากการศึกษาเปรียบเทียบความเข้มข้นของเกลือ $MgCl_2$ ที่เหมาะสมต่อการผลิตเมทานอล ซึ่งพบว่า ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของ $MgCl_2$ 250 mM ให้การผลิตเมทานอลสูงสุดที่ 7,345 μmol^{-1} และเมื่อให้ความเข้มข้นของ $MgCl_2$ เท่ากับ 225 และ 200 mM ตามลำดับ พบว่าปริมาณการผลิตเมทานอลต่ำลงด้วย ตามลำดับ เนื่องมาจากเกลือ อาทิเช่น $MgCl_2$ เป็นสารยับยั้งเอนไซม์เมทานอลดีไฮโดรจีเนส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่นำเมทานอลไปใช้ต่อในเซลล์โดยเปลี่ยนเป็นฟอร์มัลดีไฮด์ (Lee *et al*., 2004) ดังนั้นความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ที่มากเพียงพอในถังปฏิกรณ์ จึงส่งผลให้ผลผลิตเมทานอลในระบบสูงขึ้น โดย Lee และคณะ (2004) รายงานว่าความเข้มข้นเกลือ NaCl 200 มิลลิโมลาร์ เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการยับยั้งเมทานอลดีไฮโดรจีเนส

5.2.6 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเมทานอลของ *Methylosinus trichosporium* strain NT85

จากผลศึกษาเปรียบเทียบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเมทานอล พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อที่ให้การผลิตเมทานอลสูงสุดที่ 19.4 μmol^{-1} ได้แก่ อุณหภูมิ 25 $^{\circ}C$ ส่วนอุณหภูมิ 35 $^{\circ}C$ และ 40 $^{\circ}C$ ให้ผลผลิตเมทานอลให้ผลผลิตเมทานอลในระบบต่ำกว่า ตามลำดับ สอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Boeckx และ Cleemput (1996) ได้รายงานอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเกิดมีเทนออกซิเดชัน คือ 25 – 30 $^{\circ}C$

5.2.7 การศึกษาสมบัติของเมทานอล

จากผลการวิเคราะห์คุณสมบัติของเมทานอลที่ได้ พบว่า มีจุดเดือดที่ 64.5 $^{\circ}C$ ความหนาแน่นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร และความหนืดเท่ากับ 0.9 เซ็นติพอยด์ ซึ่งคุณสมบัติของเมทานอลที่ได้จากการศึกษานี้ มีคุณสมบัติใกล้คียงกับคุณสมบัติของเมทานอล

ที่ใช้ในอุตสาหกรรม หากมีการพัฒนาในเชิงพาณิชย์ จะสามารถนำเมทานอลมาใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ ได้

5.3 ข้อเสนอแนะ

เมทานอลที่ผลิตได้หากมีการพัฒนาในเชิงพาณิชย์ จะสามารถนำเมทานอลมาใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ ได้ นอกจากนี้ควรมีการวิจัยในเรื่องของศักยภาพของถังปฏิกิริยาชีวภาพจำเพาะที่มีขนาดใหญ่ เนื่องจากในการวิจัยครั้งนี้เป็นเพียงแค่การทดลองในห้องปฏิบัติการเท่านั้น ซึ่งจะสามารถทำให้สามารถขยายปริมาณเมทานอลในเชิงอุตสาหกรรม