

การคัดกรอง *Clostridium* sp. ที่มีความสามารถใช้คาร์บอนไดออกไซด์เพื่อผลิตเอทานอล
บิวทานอล และ 2, 3 บิวเทนไดออลโดยการวิเคราะห์ยีน *acsA* และ *acsE*

นางสาวสุพัตรา เลิศศรีวงษ์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2557
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

SCREENING OF *Clostridium* sp. WITH ABILITY TO UTILIZE CARBON DIOXIDE FOR
PRODUCING ETHANOL, BUTANOL AND 2, 3-BUTANDIOL BY *acsA* AND *acsE*
GENE ANALYSIS

Miss Supattra Lertsriwong



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Genetics
Department of Botany
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2014
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การคัดกรอง <i>Clostridium</i> sp. ที่มีความสามารถใช้คาร์บอนไดออกไซด์เพื่อผลิตเอทานอล บิวทานอล และ 2, 3 บิวเทนไดออลโดยการวิเคราะห์ยีน <i>acsA</i> และ <i>acsE</i>
โดย	นางสาวสุพัตรา เลิศศรีวงษ์
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชมภูษุช กลิ่นวงษ์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ต่อศักดิ์ สีลานันท์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชมภูษุช กลิ่นวงษ์)

.....กรรมการ
(ดร.ธีรดา หวังสมบูรณ์ดี)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.วรวิทย์ จุฬาลักษณ์านุกูล)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร.ณษพัฒน์ บุญวิทยา)

สุพัตรา เลิศศรีวงษ์ : การคัดกรอง *Clostridium* sp. ที่มีความสามารถใช้คาร์บอนไดออกไซด์เพื่อผลิตเอทานอล บิวทานอล และ 2, 3 บิวเทนไดออลโดยการวิเคราะห์ยีน *acsA* และ *acsE* (SCREENING OF *Clostridium* sp. WITH ABILITY TO UTILIZE CARBON DIOXIDE FOR PRODUCING ETHANOL, BUTANOL AND 2, 3-BUTANDIOL BY *acsA* AND *acsE* GENE ANALYSIS) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร.ชมภูณช กลิ่นวงษ์, 86 หน้า.

Clostridium spp. เป็นแบคทีเรียรูปท่อนเจริญในสภาวะไร้ออกซิเจน สามารถสร้างสปอร์ได้ มักพบกระจายทั่วไปตามธรรมชาติในรูปของสปอร์ มีความสามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลากหลาย รวมถึงสามารถใช้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้โดยวิธี Wood-Ljungdahl ด้วยการทำงานของเอนไซม์คาร์บอนมอนอกไซด์ดีไฮโดรจีเนสที่ถูกควบคุมโดยยีน *acsA* ร่วมกับยีน *acsE* เพื่อสร้างแอสिटิลโคเอนไซม์เอที่เป็นสารตั้งต้นในการผลิตตัวละลายต่างๆ ได้แก่ กรดแอสिटิก เอทานอล บิวทานอล และ 2, 3 บิวเทนไดออล แต่มีแบคทีเรียในสกุลคลอสทริเดียมเพียงไม่กี่ชนิดที่สามารถใช้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์และผลิตตัวทำละลายได้ ด้วยเหตุนี้การคัดเลือกและการคัดแยกสายพันธุ์ใหม่ที่มีความสามารถในการผลิตเอทานอล บิวทานอลจึงได้รับความสนใจเพิ่มขึ้น ในงานวิจัยนี้จึงสนใจการคัดเลือก *Clostridium* sp. ที่มีความสามารถใช้คาร์บอนไดออกไซด์ในการผลิตตัวทำละลาย โดยเทคนิคการคัดแยกเชื้อแบบไร้ออกซิเจนซึ่งถูกแทนที่ด้วยแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 20 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารสูตร DSMZ640 จากแหล่งตัวอย่างใหม่ๆ ได้แก่ ท่อส่งแก๊สในโรงงานอุตสาหกรรม และท่อไอเสียรถยนต์ต่างๆ โดยอาศัยความรู้ทางพันธุศาสตร์โมเลกุล เพื่อใช้สืบหาและวิเคราะห์ยีนที่เกี่ยวข้องกับการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ในแบคทีเรียที่คัดแยกได้ จากการวิเคราะห์ลำดับเบสที่บริเวณ 16S rDNA พบว่าเชื้อที่คัดแยกได้เป็นแบคทีเรียในสกุลคลอสทริเดียม 14 ไอโซเลท ซึ่งไอโซเลทที่มีศักยภาพในการผลิตเอทานอล บิวทานอล และ 2, 3 บิวเทนไดออลได้ดีที่สุดคือ *Clostridium* sp. CUi ที่คัดแยกได้จากท่อส่งแก๊สในโรงงานอุตสาหกรรม สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุด 0.94 กรัมต่อลิตร บิวทานอล 1.11 กรัมต่อลิตร และ 2, 3 บิวเทนไดออล 0.28 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังพบยีนบางส่วนของ *acsA* ขนาด 1500 เบส ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการตรึงแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์

ภาควิชา พฤษศาสตร์

ลายมือชื่อนิสิต

สาขาวิชา พันธุศาสตร์

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ปีการศึกษา 2557

5472138623 : MAJOR GENETICS

KEYWORDS: CLOSTRIDIUM/ETHANOL/BUTANOL/2, 3-BUTANEDIOL/GAS FERMENTATION

SUPATTRA LERTSRIWONG: SCREENING OF *Clostridium* sp. WITH ABILITY TO UTILIZE CARBON DIOXIDE FOR PRODUCING ETHANOL, BUTANOL AND 2, 3-BUTANDIOL BY *acsA* AND *acsE* GENE ANALYSIS. ADVISOR: ASST. PROF.CHOMPUNUCH GLINWONG, Ph.D., 86 pp.

Clostridium spp. is a strictly anaerobic, rod-shaped, gram-positive and spore-forming bacteria that can utilize a large variety of substrates to producing solvents such as acetate, ethanol, butanol, and butyrate. This anaerobic bacteria can also consume carbon dioxide via Wood-ljungdahl pathway to reduced CO₂ to acetyl CoA by carbon monoxide dehydrogenase (CODH)/Acetyl CoA synthase (ACS). The *acsA* gene has been reported to encode the catalytic domain of the key enzyme and *acsE* encode methyltransferase, which transfers the methyl group to CODH/ACS for generating Acetyl-CoA that serves as key intermediate for synthesis of cell mass and solvents. In this study, the carbon dioxide utilization of *Clostridium* species was isolated by specific screening condition from the industrial gas pipeline and exhaust pipe. The modified DSMZ640 media were used to isolate under anaerobic condition with 20% carbon dioxide. Morphological and genetical 16S rDNA identification were performed. There are 14 isolates showing the characteristics of *Clostridium* sp. From all isolates, isolate CUi from industrial gas pipeline showed the highest concentrations of ethanol, butanol and 2, 3-butanediol reaches 0.94, 1.11 and 0.28 g/L respectively. Partial 1500 bp *acsA* gene was detected in genomics DNA of *Clostridium* sp. CUi.

Department: Botany

Student's Signature

Field of Study: Genetics

Advisor's Signature

Academic Year: 2014

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีด้วยความสนับสนุนและช่วยเหลือจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชมพูนุช กลิ่นวงษ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็น ตลอดจนให้ความช่วยเหลือ และตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์นี้จนสมบูรณ์

กราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ต่อศักดิ์ สีลานันท์ ที่กรุณามาเป็นประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

กราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.วรวิมล จุฬาลักษณ์นกุล อาจารย์ ดร.ธีรดา หวังสมบูรณ์ดี และ ดร.ณษพัฒน์ บุญวิทยา ที่กรุณาสละเวลามาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ พร้อมทั้งให้คำแนะนำ และข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงวิทยานิพนธ์นี้ให้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ ดร.ณษพัฒน์ บุญวิทยา และสถาบันวิจัยและเทคโนโลยี บริษัท ปตท. จำกัด (มหาชน) สำหรับเงินทุนสนับสนุนตลอดงานวิจัย

ขอขอบคุณ คณาจารย์ นักวิทยาศาสตร์ และเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาพฤกษศาสตร์ สำหรับความช่วยเหลือ และสิ่งอำนวยความสะดวกในด้านต่างๆ

ขอขอบคุณ หน่วยปฏิบัติการวิจัยการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพด้วยตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพ ที่เอื้ออำนวยความสะดวกในด้านสถานที่ อุปกรณ์ และสารเคมีต่างๆ ในการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณ สมาชิกทุกท่านในหน่วยปฏิบัติการวิจัยการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพด้วยตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพ ที่ให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำ และกำลังใจตลอดการวิจัย

ท้ายสุดขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัว ที่คอยให้ความรัก กำลังใจ และให้การสนับสนุนตลอดจนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ	ฉ
บทที่ 1	1
บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	3
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
บทที่ 2	5
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
2.1 เชื้อเพลิงชีวภาพ.....	5
2.1.1 เอทานอล.....	6
2.1.2 บิวทานอล	8
2.2 การผลิตไบโอแอลกอฮอล์.....	10
2.2.1 การผลิตไบโอแอลกอฮอล์ด้วยการหมัก	10
2.2.2 วิวัฒนาการในการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ (Generation of biofuel).....	11
2.3 การใช้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เป็นสารตั้งต้นของกระบวนการหมัก	13
2.4 จุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการหมักแก๊ส.....	14

2.5 วิธี Wood-Ljungdahl และยีนที่เกี่ยวข้องกับการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์	17
2.5.1 เอนไซม์ในสาขาอีสเทิร์นหรือเมอริล (Eastern branch)	19
2.5.2 เอนไซม์ในสาขาเวสเทิร์นหรือคาร์บอนิล (Western branch).....	19
2.5.3 การสร้างอะซิติลโคเอ.....	21
2.5.4 การจัดเรียงตัวของกลุ่มยีนในวิธี Wood-Ljungdahl.....	21
2.6 การผลิตไบโอแอลกอฮอล์ด้วยกระบวนการหมักแก๊สด้วยคลอสทริเดียม	24
2.6.1 คุณลักษณะของคลอสทริเดียม.....	24
2.6.2 การผลิตไบโอแอลกอฮอล์ด้วยคลอสทริเดียม	25
2.6.3 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการหมักและการใช้ประโยชน์	28
บทที่ 3	30
วิธีดำเนินงานวิจัย	30
3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย.....	30
3.2 สารเคมี.....	31
3.3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	34
3.3.1 เก็บตัวอย่าง	34
3.3.2 คัดแยกเชื้อแบคทีเรียให้บริสุทธิ์	34
3.3.3 ศึกษาทางสัณฐานวิทยาคุณลักษณะทางกายภาพและคุณสมบัติทางชีวเคมีของ แบคทีเรียที่คัดแยกได้	35
3.3.4 ระบุชนิดของแบคทีเรียที่แยกได้ โดยการวิเคราะห์ลำดับเบส 16S rDNA และ วิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree).....	36
3.3.5 ตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องกับการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ <i>acsA</i> และ <i>acsE</i>	37
3.3.6 ศึกษาความสามารถในการหมักโดยใช้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์แบบไร้ออกซิเจนจาก <i>Clostridium</i> sp. ที่คัดแยกได้ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร.....	38

3.3.7 วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของการเติบโต กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอนมอนนอกไซด์ดีไฮโดรจีเนสและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมัก.....	38
บทที่ 4	40
ผลการทดลอง	40
4.1 ตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัย	40
4.2 การคัดแยกเชื้อให้บริสุทธิ์	42
4.3 ศึกษาทางสัณฐานวิทยาคุณลักษณะทางกายภาพและคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียที่คัดแยกได้	44
4.3.1 การศึกษาทางสัณฐานวิทยา และคุณลักษณะทางกายภาพของแบคทีเรีย.....	44
4.3.2 การสร้างสปอร์	45
4.3.3 การศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมี	46
4.4 ระบุชนิดของแบคทีเรียที่แยกได้ โดยการวิเคราะห์ลำดับเบส 16S rDNA และวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree).....	48
4.5 ตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องกับการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ <i>acsA</i> และ <i>acsE</i>	50
4.6 ศึกษาความสามารถในการหมักโดยใช้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์แบบไร้ออกซิเจนจากคลอสทริเดียมที่คัดแยกได้ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร.....	52
4.7 วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของการเติบโต กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอนมอนนอกไซด์ดีไฮโดรจีเนสและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมัก.....	54
บทที่ 5	56
การอภิปรายผล	56
5.1 การคัดแยกเชื้อ	56
5.2 คุณลักษณะของแบคทีเรียในสกุลคลอสทริเดียมที่คัดแยกได้.....	58
5.3 การตรวจหายีนที่สร้างเอนไซม์คาร์บอนไดออกไซด์ดีไฮโดรจีเนส	61
5.4 ความสามารถในการใช้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์.....	62

บทที่ 6	65
สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ	65
6.1 สรุปผลการวิจัย	65
6.2 ข้อเสนอแนะ	66
รายการอ้างอิง	67
ภาคผนวก ก	78
ภาคผนวก ข	80
ภาคผนวก ค	81
ภาคผนวก ง	85
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	86



สารบัญตาราง

ตารางที่ 2.1	คุณสมบัติต่างๆ ของน้ำมันเบนซินเปรียบเทียบกับบิวทานอลและเอทานอล (Dürre, 2007)	6
ตารางที่ 2.2	ส่วนผสมของน้ำมันแก๊สโซฮอล์ที่นิยมใช้ทั่วโลก (Gravalos และคณะ, 2011)	7
ตารางที่ 2.3	คุณสมบัติทางฟิสิกส์และเคมีของบิวทานอล (Lee และคณะ, 2008).....	9
ตารางที่ 2.4	แบคทีเรียกลุ่มอะซิโตเจนนิคที่มีรายงานว่ามีความสามารถในการตรึงแก๊สเข้าสู่เซลล์..	16
ตารางที่ 2.5	กลุ่มของโคแฟกเตอร์ในเอนไซม์ CODH/ACS (Doukov และคณะ, 2002)	21
ตารางที่ 2.6	ยีนและเอนไซม์ในวิถี Wood-Ljungdahl (Bruant และคณะ, 2010)	23
ตารางที่ 3.1	ส่วนผสมสารและความเข้มข้นในการทำปฏิกิริยาปลูกโซ่พอลิเมอร์ส ที่ปริมาณ 50 ไมโครลิตร.....	36
ตารางที่ 4.1	ตัวอย่างจากบริเวณท่อส่งแก๊สในโรงงานอุตสาหกรรมจังหวัดระยอง	41
ตารางที่ 4.2	ตัวอย่างจากท่อไอเสียรถยนต์ชนิดต่างๆ	41
ตารางที่ 4.3	ชื่อและจำนวนไอโซเลตที่คัดแยกได้จาก 38 ตัวอย่าง.....	43
ตารางที่ 4.4	ลักษณะรูปร่าง สี ความหนืด ขอบของโคโลนี รูปร่างเซลล์ และการติดสีแกรมทั้ง 21 ไอโซเลต.....	44
ตารางที่ 4.5	แสดงการเปรียบเทียบการใช้น้ำตาลต่างๆและสารผลิตภัณฑ์ของแต่ละไอโซเลต.....	47
ตารางที่ 4.6	การระบุชนิดของแบคทีเรียที่คัดแยกได้โดยการวิเคราะห์ลำดับเบส 16S rDNA.....	49
ตารางที่ 4.7	แสดงผลการตรวจหายีน <i>acsA</i> และ <i>acsE</i> ถูกออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ <i>Clostridium spp.</i> 3 สายพันธุ์ <i>C. autoethanogenum</i> , <i>C. carboxidivorans</i> และ <i>C. ljungdahlii</i>	51
ตารางที่ 5.1	เปรียบเทียบผลผลิตสารละลาย ABE ที่ได้จากเชื้อ <i>C. autoethanogenum</i> <i>C. ljungdahlii</i> และ <i>Clostridium sp.</i> CUi	63

สารบัญภาพ

ภาพที่ 2.1	โครงสร้างบิวทานอล	9
ภาพที่ 2.2	แสดงเมแทบอลิซึมคาร์บอน 1 อะตอมของวิธี Wood-Ljungdahl ที่มี 2 สาขา คือ สาขาอีสเทิร์นหรือเมธิล (เส้นสีแดง) และสาขาเวสเทิร์นหรือคาร์บอนิล (เส้นสีน้ำเงิน) (ดัดแปลงจาก Liew และคณะ, 2013).....	18
ภาพที่ 2.3	เอนไซม์คาร์บอนมอนอกไซด์ดีไฮโดรจีเนส/อะซิติกโคเอซิงเทส A B C และ D แสดงตำแหน่งกลุ่มของเหล็กและนิเกิลในโมเลกุลของ CODH/ACS (Doukov และคณะ, 2002).....	20
ภาพที่ 2.4	กลุ่มของยีนในวิธี Wood-Ljungdahl ที่ถูกจัดออกเป็น 5 กลุ่มโดย Pierce และคณะ (2008).....	22
ภาพที่ 2.5	ลักษณะตำแหน่งสปอร์ของคลอสทริเดียม (a) central spore (b) terminal spore และ (c) subterminal spore.....	25
ภาพที่ 3.1	ลักษณะของรูปร่าง ขอบและการยกตัวของผิวโคโลนีบนอาหารแข็ง	35
ภาพที่ 4. 1	ตัวอย่างคราบเขม่า ฝุ่น และดิน จากท่อลำเรียงแก๊สบริเวณต่างของโรงอุตสาหกรรม จังหวัดระยองและท่อไอเสียรถ (ก) ตัวอย่างที่เก็บด้วยไม้พันสำลี (ข) ตัวอย่างน้ำและตะกอนดินจากบ่อดักตะกอน (ค) ดินบริเวณท่อส่งแก๊ส.....	40
ภาพที่ 4. 2	ลักษณะสี ความขุ่น และการเกิดฟองของอาหารที่เปลี่ยนไป (ก) อาหารเหลว DSMZ 640 ปราศจากเชื้อ ซึ่งใช้เป็นชุดควบคุมการทดลอง (Negative control) (ข) ลักษณะอาหารที่ไม่มีเชื้อเจริญเติบโต (ค) ลักษณะอาหารที่มีเชื้อเติบโตได้เล็กน้อย และ (ง) ลักษณะอาหารในขวดที่มีเชื้อ	42
ภาพที่ 4. 3	การติดสีเขียวจาก Malachite green ของสปอร์ Clostridium carboxydvorans (ก) ไอโซเลต CUi (ข) ไอโซเลต CUSL2 (ค) ไอโซเลต CPN (ง) ไอโซเลต CHC1 (จ) ไอโซเลต CHC2 (ฉ) ไอโซเลต CNC (ช) ไอโซเลต CTV (ซ) ไอโซเลต CVI (ณ).....	46
ภาพที่ 4. 4	แผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ โดยวิธีการสร้าง Neighbour-joining (NJ) tree ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของ 24 ไอโซเลต.....	50

- ภาพที่ 4. 5 การตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ของยีน *acsA* โดยเจลอิเล็กโตรโพลีซิส ช่องที่ 1 ladder 1kb ช่องที่ 2 *C. carboxidivoeans* ช่องที่ 3 ไอโซเลต CNC ช่องที่ 4 ไอโซเลต CTV ช่องที่ 5 ไอโซเลต CVI ช่องที่ 6 ไอโซเลต CUi และช่องที่ 7 ไอโซเลต CCI.... 52
- ภาพที่ 4. 6 กราฟแสดงการเปรียบเทียบระหว่างเวลากับการเจริญ (◆) และค่าความเป็นกรด-ด่าง (●) ระหว่างกระบวนการหมักแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ด้วย *Clostridium* sp. CUi ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีอาหารเหลวดัดแปลง DSMZ640 เป็นเวลา 168 ชั่วโมง..... 53
- ภาพที่ 4. 7 การเปรียบเทียบการผลิตสารละลาย 2, 3 บิวเทนไดออล (▨) เอทานอล (■) บิวทานอล (⊘) กรดแอสติค (■) และกรดบิวทริก (⊘) ที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการหมักคาร์บอนไดออกไซด์ร่วมกับน้ำตาลเซลโลไบโอส 1 กรัมต่อลิตร ด้วย *Clostridium* sp. CUi ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่ช่วงเวลาต่างๆ..... 54
- ภาพที่ 4. 8 เปรียบเทียบสีของสาร nitroblue tetrazolium ที่เกิดขึ้นหลังจากรับอิเล็กตรอนจากปฏิกิริยาการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ โดยคิวเวตต์ที่ 1 เป็น control ไม่เติมสารละลายเซลล์; คิวเวตต์ที่ 2 เป็น Negative control (*E. coli*); คิวเวตต์ที่ 3 เป็น *Clostridium* sp. CUi และคิวเวตต์ที่ 4 เป็น *C. carboxidivorans*..... 55

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

ปัจจุบันปัญหาภาวะโลกร้อนอันเกิดจากการปลดปล่อยแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) สู่ชั้นบรรยากาศที่เพิ่มมากขึ้น ทั้งราคาน้ำมันที่ผันผวน และความต้องการพลังงานเชื้อเพลิงที่เพิ่มมากขึ้นทุกวัน ในขณะที่วัตถุดิบหลักอย่างฟอสซิลที่เป็นแหล่งปิโตรเลียมนั้นมีอยู่อย่างจำกัดและกำลังลดน้อยลง จึงมีความจำเป็นต้องเร่งหาพลังงานทดแทนที่สามารถใช้แทนเชื้อเพลิงฟอสซิลได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้เชื้อเพลิงชีวภาพ (biofuels) อย่างเอทานอลและบิวทานอลก้าวมามีบทบาทสำคัญในด้านเชื้อเพลิงทดแทนที่ใช้ในการขนส่ง ด้วยคุณสมบัติต่างๆที่ใกล้เคียงกับเบนซิน ได้แก่ ค่าออกเทน (octane number) ปริมาณพลังงาน (energy content) และความหนาแน่นของพลังงาน (energy density) โดยเฉพาะบิวทานอลซึ่งเป็นไบโอแอลกอฮอล์ที่กำลังเป็นที่สนใจในปัจจุบัน เนื่องจากมีคุณสมบัติที่คล้ายกับน้ำมันเบนซินที่ใช้กับเครื่องยนต์มากกว่าไบโอแอลกอฮอล์ตัวอื่นๆ นอกจากนี้เอทานอลและบิวทานอลยังใช้เป็นตัวทำละลายในอุตสาหกรรมเคมี การผลิตสี และน้ำมันเคลือบเงา (Lacquers) เช่นเดียวกับ 2, 3 บิวเทนไดออล ที่นิยมใช้เป็นสารตั้งต้นในอุตสาหกรรมสังเคราะห์ยาง สารละลายและอุตสาหกรรมยา โดยเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สาร เช่น สารละลายเมทิลเอทิลคีโตน (MEK) แกมมาบิวทีโรแลคโตน (GBL) และ 1, 3 บิวทาไดอิน ซึ่งมีการผลิตและใช้มาตั้งแต่ช่วงสงครามโลกครั้งที่ 2 (Celińska และคณะ, 2009)

การผลิตสารละลายเอทานอล บิวทานอล และ 2, 3 บิวเทนไดออล สามารถผลิตได้จากกระบวนการหมักโดยแบคทีเรียที่ได้ แอซีโตน (acetone) บิวทานอล (butanol) เอทานอล (ethanol) เป็นผลิตภัณฑ์ หรือที่เรียกว่า ABE fermentation แบคทีเรียที่ใช้ในกระบวนการ ABE กันมาช้านานเป็นแบคทีเรียในสกุลคลอสทริเดียม (*Clostridium* spp.) โดยเฉพาะ *Clostridium acetobutylicum* และ *C. beijerinckii* ซึ่งมีการศึกษาข้อมูลทางพันธุกรรมในจีโนมอย่างครบถ้วน แบคทีเรีย 2 ชนิดนี้เป็นที่สนใจเนื่องจากให้ปริมาณผลิตภัณฑ์ตัวทำละลายสูงในระยะเวลาอันสั้น (Jones และ Woods, 1986) และมีประวัติการใช้งานอย่างยาวนาน ตั้งแต่ในช่วงสงครามโลกครั้งที่

1 แบคทีเรียในตระกูลนี้ถูกใช้เพื่อผลิตแอสีโตน ก่อนจะกลายเป็นที่สนใจในด้านการผลิตไบโอแอลกอฮอล์ที่มีศักยภาพ ด้วยคุณสมบัติที่สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้อย่างหลากหลาย โดยในยุคแรกของการผลิตเอทานอลนิยมผลิตจากการหมักแป้งหรือน้ำตาลจากพืชที่เป็นแหล่งอาหารของมนุษย์และสัตว์ เช่น ข้าวโพด อ้อย หรือหัวบีท แต่ต่อมาประสบกับปัญหาการแย่งพื้นที่ปลูกพืชเพื่อเป็นแหล่งอาหารกับพื้นที่สำหรับปลูกพืชผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ จึงได้หันมาสนใจการใช้ลิกโนเซลลูโลส (lignocellulose) เป็นสารตั้งต้นในการผลิตไบโอแอลกอฮอล์ แต่ด้วยปัญหาทางด้านค่าใช้จ่ายที่ค่อนข้างสูงในการทำ pre-treatment ในกระบวนการย่อยโครงสร้างลิกโนเซลลูโลสด้วยสารเคมีและเอนไซม์เพื่อเปลี่ยนเซลลูโลสให้อยู่ในรูปที่ต้องการใช้งานได้ เพื่อเป็นการหลีกเลี่ยงปัญหาดังกล่าวจึงนำไปสู่การหาแหล่งคาร์บอนอื่นที่ไม่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจ เช่น แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งถูกปลดปล่อยอย่างมากมาจากโรงงานอุตสาหกรรมต่างๆ เป็นวัตถุดิบในการสังเคราะห์สารละลายต่างๆ แทน (Lee และคณะ, 2008)

แบคทีเรียที่สามารถใช้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์มีอยู่หลายสกุล แต่ที่สามารถผลิตเอทานอล บิวทานอล และ 2, 3 บิวเทนไดออล ได้มีอยู่ไม่กี่ชนิด ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียในสกุลคลอสทริเดียม ได้แก่ *C. thermoaceticum* (Wood, 1991), *C. autoethanogenum* (Köpke, Mihalcea, Liew, และคณะ, 2011), *C. ljungdahlii* (Köpke และคณะ, 2010) และ *C. carboxidivorans* (Liou และคณะ, 2005) เป็นต้น แบคทีเรียเหล่านี้สามารถใช้แก๊สคาร์บอนมอนอกไซด์ หรือแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอนโดยผ่านวิถี Wood-Ljungdahl (Daniell และคณะ, 2012) ซึ่งค้นพบครั้งแรกในกลุ่มแบคทีเรียที่ผลิตกรด (acetogen) ใน *Moorella thermoacetica* (เดิมชื่อ *C. thermoaceticum*) ลักษณะของวิถีนี้มีรูปแบบแบ่งเป็น 2 สาขา เรียกว่า สาขาอีสเทิร์น (Eastern branch) และสาขาเวสเทิร์น (Western branch) เมื่อแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ถูกตรึงเข้าไปในวิถีนี้ สาขาอีสเทิร์นจะทำหน้าที่สร้างหมู่เมทิล (CH_3) และสาขาเวสเทิร์นทำหน้าที่สร้างหมู่คาร์บอนิล (CO) จากแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ โดยการทำงานของเอนไซม์คาร์บอนมอนอกไซด์ดีไฮโดรจีเนส (CODH) ซึ่งจัดเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในวิถี Wood-Ljungdahl หมู่เมทิลที่ได้จากสาขาอีสเทิร์นจะถูกขนส่งโดยเมธิลทรานเฟอร์เรสที่จับอยู่กับโปรตีนคอร์ริโนยด์เพื่อไปรวมกับหมู่คาร์บอนิลของสาขาเวสเทิร์น และรวมเข้ากับโคเอนไซม์เอ ได้เป็นแอสิติลโคเอนไซม์เอ ซึ่งจะเป็นสารตั้งต้นที่จะเข้าไปในวิถีอื่นๆ

เพื่อสร้างองค์ประกอบต่างๆภายในเซลล์ และสังเคราะห์สารผลิตภัณฑ์ตัวอื่นๆต่อไป ได้แก่ เอทานอล บิวทานอล บิวทิเรท แอซิเตตและ 2, 3 บิวเทนไดออล เป็นต้น (Ragsdale และคณะ, 2008)

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถใช้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอนได้ โดยสนใจแบคทีเรียที่มีความสามารถใช้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ในการผลิตเอทานอล บิวทานอล และ 2, 3 บิวเทนไดออล และอาศัยความรู้ทางพันธุศาสตร์โมเลกุลเพื่อใช้สืบหาและวิเคราะห์ยีนที่เกี่ยวข้องกับการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ในแบคทีเรียที่คัดแยกได้ เพื่อการประยุกต์ใช้ในกระบวนการผลิตและสิ่งแวดล้อมต่อไปในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อคัดกรอง *Clostridium* spp. ที่มีศักยภาพในการผลิตเอทานอล บิวทานอล และ 2, 3 บิวเทนไดออล
2. เพื่อวิเคราะห์ยีน *acsA* และ *acsE* ร่วมกับกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้และมีความสามารถในการผลิตตัวทำละลาย

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1. ค้นคว้าเอกสารและข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย
2. เก็บตัวอย่างและคัดแยกเชื้อแบคทีเรียให้บริสุทธิ์
3. ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียที่คัดแยกได้
4. ระบุชนิดของแบคทีเรียที่คัดแยกได้โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสยีน 16S rDNA และจัดทำแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) เพื่อดูความสัมพันธ์ของเชื้อที่คัดแยกได้
5. วิเคราะห์ห้ายีน *acsA* และ *acsE* ที่เกี่ยวข้องกับการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ของแบคทีเรียในสกุลคลอสทริเดียมที่คัดแยกได้
6. ศึกษาความสามารถในการหมักโดยใช้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ของ *Clostridium* sp. ที่คัดแยกได้

7. วิเคราะห์สารผลิตภัณฑ์จากการหมัก การเจริญ และวัฏจักรกรรมของเอนไซม์คาร์บอนมอนอกไซด์ดีไฮโดรจีเนส

8. สรุปผลและเขียนวิทยานิพนธ์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ไอโซเลตที่มีศักยภาพในการผลิตเอทานอล บิวทานอล และ 2, 3 บิวเทนไดออล โดยสามารถใช้คาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอนได้

2. ได้ข้อมูลทางพันธุกรรมของไอโซเลตในส่วนของยีนที่เกี่ยวข้องกับการใช้คาร์บอนไดออกไซด์ พร้อมทั้งกระบวนการที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล บิวทานอล และ 2, 3 บิวเทนไดออล *Clostridium* spp. ที่คัดแยกได้



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เชื้อเพลิงชีวภาพ

เชื้อเพลิงชีวภาพ (Biofuels) เป็นเชื้อเพลิงที่ได้จากชีวมวล (biomass) ซึ่งเป็นผลผลิตจากพืชและสัตว์ นอกจากนี้ยังได้จากสารอินทรีย์ เช่น วัสดุเหลือใช้จากทางการเกษตรและจากอุตสาหกรรม เชื้อเพลิงชีวภาพมีทั้งในรูปของแข็ง (ถ่านชีวภาพ) ของเหลว (เอทานอล บิวทานอล และไบโอดีเซล) และแก๊ส (แก๊สชีวภาพ แก๊สสังเคราะห์ แก๊สไฮโดรเจน) ซึ่งจัดเป็นพลังงานหมุนเวียน (renewable energy) และเป็นพลังงานสะอาด (clean energy) ที่สามารถฟื้นฟูหมุนเวียนมาใช้ใหม่ได้ ช่วยลดปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดจากการเผาไหม้ รวมถึงลดปริมาณแก๊สอื่น ๆ ที่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม ซึ่งแตกต่างจากเชื้อเพลิงฟอสซิลอย่างถ่านหินและปิโตรเลียมที่เป็นพลังงานไม่หมุนเวียน (non-renewable energy) และเป็นแหล่งปลดปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์ที่เป็นสาเหตุของภาวะโลกร้อน (Demirbas, 2009)

เอทานอลและบิวทานอล จัดเป็นเชื้อเพลิงชีวภาพในอนาคตที่กำลังเป็นที่สนใจอย่างมาก เนื่องจากคุณสมบัติต่างๆ เช่น ค่าออกเทน (octane number) ปริมาณพลังงาน (energy content) และความหนาแน่นของพลังงาน (energy density) มีความคล้ายคลึงกับน้ำมันเบนซิน (ตารางที่ 2.1) ทำให้สามารถนำมาผสมกับน้ำมันเบนซินใช้เป็นน้ำมันเชื้อเพลิงได้ ส่งผลให้ลดการใช้ น้ำมันจากฟอสซิลที่ใกล้จะหมดไปได้ ปัจจุบันเชื้อเพลิงชีวภาพที่ถูกใช้และผลิตมากที่สุดทั่วโลก คือ เอทานอล โดยผู้ผลิตรายใหญ่ของโลกคือ บราซิล รองลงมาคือ สหรัฐอเมริกา (Demirbas และคณะ, 2006) และมีแนวโน้มที่เชื้อเพลิงชีวภาพจะถูกใช้สูงขึ้นในอนาคต ตัวอย่างเช่น ในสหภาพยุโรปมีเป้าหมายให้ประเทศสมาชิกผลิตเชื้อเพลิงจากแหล่งพลังงานทดแทน (renewable source) เพิ่มขึ้น 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำมันเชื้อเพลิงที่ใช้ทั้งหมดภายในปี 2020 ซึ่งนอกจากยุโรปแล้ว จีนเป็นอีกประเทศที่มีแผนเพิ่มการใช้เชื้อเพลิงชีวภาพรวมถึงพลังงานทดแทนด้านอื่นให้ได้ 10 เปอร์เซ็นต์ของพลังงานทั้งหมดในอีก 10 ปีข้างหน้า (Luo และคณะ, 2009) รวมถึงในประเทศไทยมีแผนส่งเสริมให้มีการใช้และผลิตเอทานอลเพิ่มมากขึ้นเพื่อให้เป็นเชื้อเพลิงทดแทนการนำเข้าน้ำมันจากต่างประเทศ โดยมี

แผนการผลิตเอทานอลระหว่างปี 2012-2016 เป็นปริมาตร 6.2 ล้านลิตรต่อวัน และคาดว่าในปี 2017-2022 จะผลิตได้สูงถึง 9.0 ล้านลิตรต่อวัน (กาญจนา แสงลัมสุวรรณ, 2553)

ตารางที่ 2.1 คุณสมบัติต่างๆ ของน้ำมันเบนซินเปรียบเทียบกับบิวทานอลและเอทานอล (Dürre, 2007)

คุณสมบัติ	บิวทานอล	น้ำมันเบนซิน	เอทานอล
ความหนาแน่นพลังงาน (Energy density, MJ/L)	27-29.2	32	19.6
ปริมาณพลังงาน (Energy content/value, BTU/gal)	110000	115000	84000
อัตราส่วนผสมระหว่างน้ำมันและอากาศ (Air-fuel ratio)	11.2	14.6	9
ค่าออกเทนโดยวิธีวิจัย (Research octane number, RON)	96	91-99	129
ค่าออกเทนโดยวิธีมอเตอร์ (Motor octane number, MON)	78	81-89	102

2.1.1 เอทานอล

เอทานอล หรือ เอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) มีสูตรเคมี C_2H_5OH มีน้ำหนักโมเลกุล 46.07 กรัมต่อโมล ลักษณะทางกายภาพเป็นของเหลวใส ไม่มีสี ระเหยได้ง่าย และมีความไวไฟ สามารถผลิตได้ 2 วิธี คือ กระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี โดยมีเอธิลีน (C_2H_4) เป็นสารตั้งต้น และกระบวนการหมักด้วยจุลินทรีย์ โดยใช้แป้งและน้ำตาล หรือวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่ประกอบด้วยลิกโนเซลลูโลสเป็นสารตั้งต้น โดยกระบวนการผลิตทางชีวภาพนี้เป็นที่นิยมอย่างกว้างขวาง และวัตถุดิบที่นำมาใช้เป็นสารตั้งต้นขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของแต่ละประเทศผู้ผลิต ได้แก่ อ้อย ข้าวโพด ฟางข้าว มันสำปะหลัง และกากน้ำตาล เป็นต้น (Goldemberg, 2007) การนำมาใช้ประโยชน์นิยมนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตสารเคมีชนิดอื่นๆ หรือนำมาใช้ประโยชน์โดยตรง เช่น ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องดื่ม ใช้เป็นตัวทำละลาย และเชื้อเพลิง เป็นต้น

การใช้เอทานอลเป็นเชื้อเพลิงสามารถใช้ได้ 3 รูปแบบ คือ

1. ใช้เป็นเชื้อเพลิงโดยตรง โดยใช้เอทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ แทนน้ำมันเบนซินหรือน้ำมันดีเซล ซึ่งรถยนต์ที่สามารถใช้งานแบบนี้ได้ต้องเป็นรถที่ถูกออกแบบมาเป็นพิเศษ โดยขึ้นส่วนต่างๆ ของเครื่องยนต์ เช่น ถังน้ำมัน ท่อน้ำมัน ท่อยาง หัวฉีดและแหวนยางต่างๆ ถูกออกแบบและใช้วัสดุที่สามารถทนทานการกัดกร่อนต่อเอทานอล เนื่องจากเอทานอลสามารถกัดกร่อนโลหะ ยาง และพลาสติกบางชนิดได้ (Sheehan และคณะ, 2003)

2. นำไปผสมกับน้ำมันเบนซินในอัตราส่วนระหว่างน้ำมันเบนซิน 90 เปอร์เซ็นต์กับแอลกอฮอล์ 10 เปอร์เซ็นต์ เรียกว่า แก๊สโซฮอล์ (Gasohol) น้ำมันผสมนี้ใช้กันในหลายประเทศ และมีอัตราส่วนการผสมที่แตกต่างกันของแต่ละประเทศ (ตารางที่ 2.2) ซึ่งมีชื่อเรียกแตกต่างกันตามอัตราส่วนการผสม น้ำมัน E5 E10 และ E15 สามารถใช้ได้กับรถปกติทั่วไป แต่น้ำมัน E25 และ E85 จะใช้ได้กับเครื่องยนต์ที่มีการออกแบบมาโดยเฉพาะเท่านั้นหรือใช้กับรถยนต์ที่เรียกว่า Flexible Fuel Vehicle (FFV) (Graham และคณะ, 2008)

ตารางที่ 2.2 ส่วนผสมของน้ำมันแก๊สโซฮอล์ที่นิยมใช้ทั่วโลก (Gravalos และคณะ, 2011)

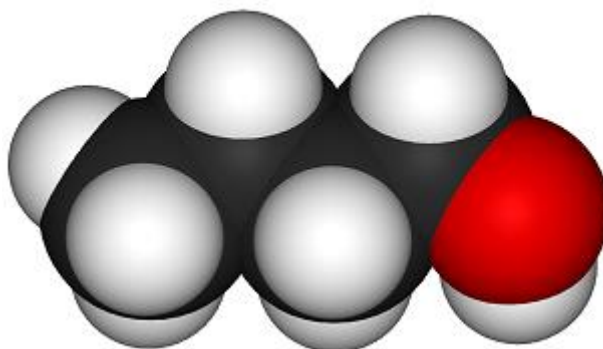
ชื่อน้ำมัน	เอทานอล (%)	น้ำมันเบนซิน	ประเทศผู้ใช้
E5	5	95	ยุโรปตะวันตก
E10	10	90	สหรัฐอเมริกา
E15	15	85	สหรัฐอเมริกา
E20	20	80	ไทย
E25	25	75	บราซิล
E85	85	15	สหรัฐอเมริกา

3. ใช้เป็นสารเพิ่มค่าออกเทนในน้ำมันเบนซิน ด้วยคุณสมบัติของเอทานอลที่มีค่าออกเทนสูง (สูงได้มากกว่า 100) ทดแทนการใช้สาร Methyl Tertiary Butyl Ether (MTBE) ที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนในน้ำใต้ดินและน้ำดื่ม โดยค่าออกเทนจะเพิ่มขึ้นตามสัดส่วนของเอทานอลที่ใช้ผสมในน้ำมันเบนซิน

การผลิตแอลกอฮอล์ในประเทศไทย รัฐบาลได้มีนโยบายส่งเสริมให้ใช้ผลผลิตทางการเกษตร เช่น อ้อย มันสำปะหลัง กากน้ำตาลซึ่งเป็นของเสียจากโรงงานน้ำตาล รวมถึงผลผลิตทางการเกษตรอย่าง ข้าว ข้าวโพด และข้าวฟ่าง ที่ผลิตมากในไทยมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอแอลกอฮอล์ กระทรวงพลังงานได้กำหนดแผนแม่บทพลังงานทดแทน 15 ปี หรือ Renewable Energy Development Plan (REDP) ปี 2552 มีเป้าหมายส่งเสริมด้านพลังงานทดแทนให้เพิ่มขึ้น 20 เปอร์เซ็นต์ในปี พ.ศ. 2565 ทำให้น้ำมันแก๊สโซฮอล์ที่จัดเป็นพลังงานทดแทนชนิดหนึ่งที่มีบทบาทในด้านพลังงานในประเทศไทย เพราะช่วยลดการนำเข้าน้ำมันเบนซินและสารเพิ่มค่าออกแทน MTBE ทั้งเป็นการเพิ่มมูลค่าให้ผลผลิตทางการเกษตรและช่วยลดปริมาณมลพิษทางอากาศ เพราะแก๊สโซฮอล์ลดปริมาณแก๊สคาร์บอนมอนอกไซด์ได้ถึง 30 เปอร์เซ็นต์ ปัจจุบันน้ำมันแก๊สโซฮอล์ E10 E20 เป็นที่นิยมใช้อย่างแพร่หลายในไทย ส่วนน้ำมันแก๊สโซฮอล์ E85 กำลังมีการส่งเสริมและเดินทางหน้าอย่างต่อเนื่อง (กระทรวงพลังงาน, 2557)

2.1.2 บิวทานอล

บิวทานอล หรือ บิวทิลแอลกอฮอล์ (butyl alcohol) มีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบ 4 คาร์บอน มีสูตรโครงสร้างเป็น C_4H_9OH (ภาพที่ 2.1) มีน้ำหนักโมเลกุล 74.12 กรัมต่อโมล ลักษณะทางกายภาพเป็นของเหลวใส ไม่มีสี ติดไฟได้ง่าย มีกลิ่นแอลกอฮอล์คล้ายกล้วย ระคายเคืองต่อตาและผิวหนัง สามารถผลิตได้สองวิธีคือ ด้วยกระบวนการทางเคมีที่ได้จากน้ำมันหรือไฮโดรคาร์บอน และจากกระบวนการทางชีวภาพโดยการหมักด้วยจุลินทรีย์ จากวัตถุดิบที่มีความหลากหลาย ได้แก่ แป้ง น้ำตาล และวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่ประกอบไปด้วยเซลลูโลสและลิกโนเซลลูโลส จุลินทรีย์ที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมบิวทานอล คือ แบคทีเรียในสกุลคลอสทริเดียม (*Clostridium* spp.) ผ่านกระบวนการที่เรียกว่า กระบวนการหมักเพื่อผลิต แอซีโตน-บิวทานอล-เอทานอล (Acetone-Butanol-Ethanol fermentation) บิวทานอลนิยมใช้เป็นตัวทำละลายในอุตสาหกรรมเคมีและสิ่งทอ นอกจากนี้ยังใช้เป็นสารสกัดในอุตสาหกรรมยาและอาหารอีกด้วย (Lee และคณะ, 2008)



ภาพที่ 2.1 โครงสร้างบิวทานอล

ตารางที่ 2.3 คุณสมบัติทางฟิสิกส์และเคมีของบิวทานอล (Lee และคณะ, 2008)

คุณสมบัติ	บิวทานอล
จุดหลอมเหลว (Melting point, °C)	-89.3
ความถ่วงจำเพาะ (Specific gravity)	0.810-0.812
อุณหภูมิการจุดติดไฟ (Ignition temperature, °C)	35-37
อุณหภูมิการติดไฟเอง (Auto-ignition, °C)	343-345
จุดวาบไฟ (Flash point, °C)	25-29
ความหนาแน่นสัมพัทธ์ (Relative density, น้ำ: 1.0)	0.81
ความดันวิกฤต (Critical pressure, hPa)	48.4
อุณหภูมิวิกฤต (Critical temperature, °C)	287
การระเบิด (Explosive limits, vol.% in air)	1.4-11.3
การละลายน้ำ (Water solubility, 9.0 mL/ 100mL), ที่ 20 °C	7.7 กรัม/น้ำ 100 มล.
ความหนาแน่นสัมพัทธ์ของไอน้ำ (Relative vapor density, อากาศ: 1.0)	2.6
ความดันไอ (Vapor pressure, kPa ที่ 20 °C)	0.58

การใช้บิวทานอลเป็นเชื้อเพลิง ด้วยคุณสมบัติของบิวทานอลที่มีข้อดีกว่าเอทานอล ในการใช้เป็นพลังงานเชื้อเพลิงหลายประการ (ตารางที่ 2.3) ได้แก่ บิวทานอลมีการกัดกร่อนน้อยกว่า เอทานอล จึงไม่จำเป็นต้องปรับเปลี่ยนเครื่องยนต์สำหรับการใช้บิวทานอล การมีความเป็นขี้ด่า สามารถผสมกับน้ำมันเบนซินได้ในอัตราส่วนต่างๆ ได้อย่างสมบูรณ์ ในด้านความปลอดภัย บิวทานอล มีการระเหยต่ำกว่าจึงมีความพิษน้อยกว่าเอทานอล มีความดันไอต่ำและมีอุณหภูมิการติดไฟสูงทำให้อันตรายน้อยกว่าเอทานอลที่ติดไฟง่าย นอกจากนี้บิวทานอลให้ค่าพลังงานสูงกว่าเอทานอลและมีค่าใกล้เคียงกับน้ำมันเบนซิน ทำให้เครื่องยนต์ทำงานได้ประสิทธิภาพเท่ากับการใช้น้ำมันเบนซิน ในด้านสิ่งแวดล้อมบิวทานอลมีความเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมมากกว่า เนื่องจากมีการปลดปล่อยแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ไฮโดรคาร์บอน และสารพิษอื่นๆ น้อยกว่าเมื่อเทียบกับการใช้เอทานอลและน้ำมันเบนซิน (Jin และคณะ, 2011)

2.2 การผลิตไบโอแอลกอฮอล์

การผลิตและการใช้เชื้อเพลิงชีวภาพมีประวัติมายาวนาน โดยการผลิตเอทานอลนั้นถูกคิดค้นขึ้นตั้งแต่สมัยก่อนคริสตกาล โดยกระบวนการหมักน้ำตาลและแป้งด้วยจุลินทรีย์ได้สารผลิตภัณฑ์เป็นเอทานอล และกระบวนการนี้ถูกใช้มาเป็นเวลานานหลายพันปี แต่ยังไม่มีการใช้กับเครื่องยนต์กระทั่งนักประดิษฐ์ที่มีชื่อเสียงชาวเยอรมันคือ นิโคลัส ออตโต และรูดอล์ฟ ดีเซล ผู้คิดค้นระบบเครื่องยนต์ที่สามารถใช้กับเอทานอลและน้ำมันสกัดจากพืช (natural oils) จึงเป็นจุดเริ่มต้นใช้เอทานอลเป็นพลังงานเชื้อเพลิง (Köpke, Mihalcea, Bromley, และคณะ, 2011) ต่อมาภายหลังได้มีการใช้ลิกโนเซลลูโลส กลีเซอรอล และแก๊สสังเคราะห์เป็นวัตถุดิบในการผลิต เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาการแย่งพืชอาหารและพื้นที่เพาะปลูก (Demirbas, 2009) โดยนำมาใช้ในกระบวนการหมักเพื่อผลิตเอทานอล บิวทานอล และแอสिटอน หรือเรียกว่า ABE fermentation

2.2.1 การผลิตไบโอแอลกอฮอล์ด้วยการหมัก

เอทานอลและบิวทานอลสามารถผลิตได้ด้วยกระบวนการหมักที่เรียกว่า ABE fermentation (Acetone-Butanol-Ethanol) ที่ประสบความสำเร็จในการผลิตแอสिटอนระดับอุตสาหกรรม เพื่อนำมาใช้เป็นเชื้อเพลิงระเบิดในช่วงสงครามโลกครั้งที่ 1 โดยไคม์ ไวซ์แมนน์ สามารถคัดแยกแบคทีเรียชนิดคลอสทริเดียม การผลิตแอสिटอนจากการหมักวัสดุประเภทแป้งด้วยเชื้อแบคทีเรีย *C. acetobutylicum* (Dürre, 2007; Köpke, Noack, และคณะ, 2011) ซึ่งในขณะนั้นบิว

ทานอลที่ถูกผลิตขึ้นจำนวนมากไม่ได้รับความสนใจและได้ถูกเก็บรักษาไว้ในคลัง ภายหลังสงครามโลกครั้งที่ 1 ความต้องการของแอสิตอนเริ่มลดลง ทำให้โรงงานที่เป็นแหล่งผลิต ABE ปิดตัวลง (Dürre, 2007) และกลับมาเปิดตัวอีกครั้งช่วงสั้นๆในสงครามโลกครั้งที่ 2 ก่อนจะถูกปิดอย่างยาวนาน เนื่องจากราคาของวัตถุดิบที่สูงขึ้น และไม่สามารถแข่งขันกับการผลิตจากน้ำมันดิบของตะวันออกกลางที่มีราคาถูกกว่าได้ เป็นเหตุให้เทคโนโลยี ABE fermentation ยุติลงในสถานการณ์นั้น ปัจจุบันมีการฟื้นฟูเทคโนโลยีนี้ขึ้น มีการเปิดโรงงานการผลิตอีกครั้งและมีแผนสร้างโรงงานใหม่ในประเทศจีน อเมริกา อังกฤษ บราซิล ฝรั่งเศส และออสเตรเลีย เนื่องมาจากภาวะราคาน้ำมันโลกมีแนวโน้มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง (Dürre, 2007; Köpke, Mihalcea, Bromley, และคณะ, 2011)

กระบวนการหมักเพื่อผลิต ABE แบคทีเรียในสกุลคลอสทริเดียมจัดเป็นแบคทีเรียที่สร้างตัวทำละลาย (solventogenic bacteria) ที่มีศักยภาพ โดยในกระบวนการหมักขนาดใหญ่นิยมใช้ *C. acetobutylicum* และ *C. beijerinckii* ซึ่งแบคทีเรียทั้งสองชนิดได้มีการศึกษาข้อมูลทางสรีรวิทยาและข้อมูลทางพันธุกรรมในจีโนมครบสมบูรณ์และมีผู้ศึกษาทำงานวิจัยอย่างกว้างขวาง เนื่องจากแบคทีเรียชนิดนี้สามารถใช้คาร์โบไฮเดรตได้อย่างหลากหลายเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตแอลกอฮอล์ โดยวัตถุดิบที่นิยมอย่างมากในการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพได้จากพืชอาหาร เช่น อ้อย ข้าวโพด และหัวบีท เป็นต้น

2.2.2 วิวัฒนาการในการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ (Generation of biofuel)

การผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพได้มีการวิวัฒนาการตามแหล่งวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเชื้อเพลิงจากการประสบปัญหาต่างๆ ในกระบวนการผลิต ได้แก่ ราคาของวัตถุดิบที่ไม่คงที่ ปริมาณที่ไม่เพียงพอต่อการผลิตในระดับอุตสาหกรรมและกระบวนการแปรรูปของวัตถุดิบที่มีค่าใช้จ่ายสูง นำไปสู่การสรรหาแหล่งวัตถุดิบใหม่ๆ ที่ยั่งยืนต่อการผลิตในระดับอุตสาหกรรม โดยแบ่งออกเป็น 4 ยุค ได้แก่

- เชื้อเพลิงชีวภาพยุคที่ 1 (First generation biofuel) การผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพในรุ่นแรกๆขึ้นอยู่กับพืชอาหาร เช่น หัวบีท อ้อย ข้าวโพด ข้าวสาลี และมันสำปะหลัง เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล และน้ำมันพืชและไขมันสัตว์สำหรับการผลิตไบโอดีเซล แม้ว่าจะมีการคิดค้นและพัฒนาวิธีในการผลิตเอทานอลจนประสบความสำเร็จ โดยการใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* แต่พบว่ายีสต์ไม่สามารถใช้น้ำตาล C5 และไม่สามารถผลิตบิวทานอลได้ (Sims และคณะ, 2008) และ

ปัญหาการใช้พืชที่เป็นอาหารของมนุษย์มาเป็นวัตถุดิบของคาร์โบไฮเดรต หากผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพในระดับอุตสาหกรรม จะต้องการพื้นที่ทางการเกษตรจำนวนมาก ซึ่งจะนำไปสู่ปัญหาความขัดแย้งในพื้นที่ในการเพาะปลูกที่เพิ่มขึ้นมากกว่าพื้นที่เพาะปลูกพืชเพื่อเป็นอาหาร และเมื่อความต้องการพืชเพื่อผลิตเชื้อเพลิงเพิ่มมากขึ้นจะส่งผลกระทบต่อราคาพืชอาหารทั่วโลกพุ่งสูงขึ้น (Naik และคณะ, 2010)

- เชื้อเพลิงชีวภาพรุ่นที่ 2 (Second generation biofuel) เป็นการใชชีวมวลลิกโนเซลลูโลส ได้แก่ ไม้ โดยเฉพาะพืชพลังงาน และวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรมาเป็นวัตถุดิบ เพื่อลดปัญหาการแย่งแหล่งอาหารของมนุษย์ ชีวมวลลิกโนเซลลูโลสประกอบด้วย เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ซึ่งลิกนินเป็นส่วนที่ทนทานต่อการย่อยสลายอย่างมาก ดังนั้นในการนำลิกโนเซลลูโลสมาใช้ต้องทำการแยกลิกนินออกจากคาร์โบไฮเดรต เรียกขั้นตอนนี้ว่า pre-treatment ได้แก่ การระเบิดด้วยไอน้ำ (steam explosion) หรือการปรับสภาพด้วยกรดหรือด่างความเข้มข้นสูง เพื่อให้ได้ส่วนโครงสร้างของคาร์โบไฮเดรตที่สามารถย่อยเป็นน้ำตาลอย่างง่ายด้วยเอนไซม์ จากนั้นจะเข้าสู่กระบวนการหมัก ซึ่งวิธีการดังกล่าวนี้มีค่าใช้จ่ายสูงและมีข้อจำกัด อีกวิธีคือการใช้จุลินทรีย์ที่ย่อยเซลลูโลส (cellulolytic microorganism) เช่น *C. cellulolyticum*, *C. thermocellum* และ *C. phytofermentans* ในการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสและการหมักน้ำตาลในขั้นตอนเดียวเรียกกระบวนการนี้ว่า Consolidated Bioprocessing Process (CBP) อย่างไรก็ตามกระบวนการเหล่านี้ยังมีอัตราการผลิตค่อนข้างต่ำและอยู่ระหว่างการดำเนินการวิจัยและพัฒนา ซึ่งได้ผลใกล้เคียงกับเชื้อเพลิงชีวภาพรุ่นที่ 1 (Datar และคณะ, 2004)

- เชื้อเพลิงชีวภาพรุ่นที่ 3 (Third generation biofuel) เป็นการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพจากสาหร่ายที่ให้น้ำมัน (algae fuel) โดยระบบการเลี้ยงสาหร่ายจะใช้เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ (bioreactor) ไม่จำเป็นต้องใช้ที่ดินการเกษตรสำหรับเพาะปลูก มีผลผลิตต่อพื้นที่สูงมาก และสาหร่ายบางชนิดสามารถเพาะเลี้ยงได้ในน้ำเค็ม ทำให้ช่วยลดค่าใช้จ่ายในการผลิต เชื้อเพลิงที่ผลิตจากสาหร่ายสามารถนำไปผลิตเป็นเชื้อเพลิงได้หลากหลาย เช่น น้ำมันดีเซล น้ำมันเบนซิน และน้ำมันอากาศยาน เป็นต้น (Nigam และคณะ, 2011)

- เชื้อเพลิงชีวภาพรุ่นที่ 4 (Fourth generation biofuel) เน้นการใช้วัตถุดิบราคาถูกและไม่เป็นที่ต้องการของตลาด จึงมีความสนใจไปที่แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ นอกจากจะมีราคาถูกและยังมีจำนวนมาก การใช้แก๊สในกระบวนการหมักมีข้อดีกว่าเทคโนโลยีการผลิตเชื้อเพลิงในรุ่นแรกหลายประการ ได้แก่ เป็นการใช้ชีวมวลที่ไม่ใช่แหล่งอาหาร เป็นแหล่งวัตถุดิบที่มีมากอย่างเพียงพอต่อการผลิตน้ำมันเชื้อเพลิง นอกจากนี้กระบวนการหมักแก๊สมีข้อดีกว่าเทคโนโลยีใน 2 รุ่นแรก ตรงที่มีความยืดหยุ่นของวัตถุดิบและเศรษฐศาสตร์การผลิต (Liew และคณะ, 2013)

2.3 การใช้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เป็นสารตั้งต้นของกระบวนการหมัก

ในภาวะที่ราคาน้ำมันผันผวนและราคาแพงขึ้นอย่างต่อเนื่อง ทำให้มีการเริ่มต้นพัฒนาหาแหล่งพลังงานที่ยั่งยืนทดแทนพลังงานทางปิโตรเคมี และเนื่องจากเทคโนโลยีการผลิตพลังงานเชื้อเพลิงในรุ่นที่ 1 และ 2 ยังขาดความยืดหยุ่นของวัตถุดิบและเศรษฐศาสตร์การผลิต ด้วยราคาน้ำมันที่แพงโลกมีความผันผวนสูงในช่วง 10 ปีที่ผ่านมา สร้างความไม่แน่นอนให้กับการใช้วัตถุดิบสำหรับการการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพในระดับอุตสาหกรรม ส่งผลให้นักวิจัยในหลายประเทศหันมาสนใจการใช้แก๊สสังเคราะห์ (syngas) และแก๊สเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมมาเป็นวัตถุดิบ นอกจากเป็นการใช้แก๊สเสียจากโรงงานให้เกิดประโยชน์เพื่อผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพแล้ว ยังเป็นการเปลี่ยนสารมูลค่าต่ำเป็นผลิตภัณฑ์อื่นที่มีมูลค่าสูง (Klasson และคณะ, 1991)

การผลิตเชื้อเพลิงจากแก๊สสามารถทำได้ 2 วิธี คือ การใช้ความร้อนทางเคมี เช่น กระบวนการฟิชเชอร์-โทรปช์ (Fischer-Tropsch) ที่เปลี่ยนแก๊สสังเคราะห์เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอน และกระบวนการหมักด้วยจุลินทรีย์ที่สามารถใช้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์และแก๊สอื่นๆ ที่เป็นส่วนประกอบของแก๊สเสียจากโรงงาน (syngas) เช่น แก๊สคาร์บอนมอนอกไซด์ และแก๊สไฮโดรเจน เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานสำหรับการเจริญเติบโตได้ รวมถึงผลิตไบโอแอลกอฮอล์ และสารผลิตภัณฑ์อื่นที่มีมูลค่าได้อีกด้วย แม้ว่ากระบวนการทางชีวภาพจะเกิดช้ากว่ากระบวนการทางเคมี แต่การใช้จุลินทรีย์ในการหมักแก๊สมีข้อดีกว่าดังนี้ (Klasson และคณะ, 1992)

- การใช้จุลินทรีย์ในการผลิต สามารถทำได้ที่อุณหภูมิแวดล้อมและความดันต่ำ จึงมีผลดีทางด้านความปลอดภัยพลังงานและประหยัดค่าใช้จ่าย

- กระบวนการทางชีวภาพเกิดที่สภาวะปกติ ไม่มีการผันกลับของปฏิกิริยาทางชีวภาพ ช่วยให้มีประสิทธิภาพในการทำปฏิกิริยาได้สมบูรณ์ และยังหลีกเลี่ยงเรื่องสมดุลความร้อนอีกด้วย
- การเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพมีความเฉพาะเจาะจงสูง เนื่องจากเอนไซม์ที่มีความเฉพาะเจาะจงสูง ส่งผลให้ได้ผลผลิตที่ต้องการสูงพร้อมกับมีผลิตภัณฑ์พลอยได้เพียงเล็กน้อย ซึ่งทำให้ง่ายต่อการแยกเอาสารผลิตภัณฑ์ที่ต้องการออกจากสารปนเปื้อนอื่น เป็นการลดความซับซ้อนและลดค่าใช้จ่ายในกระบวนการผลิต
- ความแตกต่างอีกประการระหว่างการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาเคมีแบบดั้งเดิมที่ต้องมีการสร้างแก๊สสังเคราะห์ที่มีอัตราส่วนองค์ประกอบเหมาะสม เพื่อให้ได้สัดส่วนในการผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ ขณะที่การทำงานของจุลินทรีย์สามารถสร้างผลิตภัณฑ์ได้ แม้มีอัตราส่วน CO ต่อ H₂ ที่แตกต่างกันในแก๊สสังเคราะห์ที่ใช้ในกระบวนการผลิต (Mohammadi และคณะ, 2011) ตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพบางชนิดมีความทนทานสูงต่อน้ำมัน กำมะถัน และคลอรีน และทนทานได้ดีกว่าตัวเร่งอนินทรีย์ (Abubackar และคณะ, 2011)

2.4 จุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการหมักแก๊ส

ในยุคที่ชั้นบรรยากาศโลกไม่มีออกซิเจน แบคทีเรียออโตทรอฟ (autotroph bacteria) เป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ในสภาวะไร้ออกซิเจน (anaerobe) ดำรงชีวิตด้วยการใช้สารอนินทรีย์ เช่น แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ คาร์บอนมอนอกไซด์ และไฮโดรเจน เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน เพื่อสร้างอะซิติลโคเอนไซม์เอ (acetyl-coenzyme A) ที่เป็นสารตัวกลางในการสร้างสารให้พลังงาน องค์ประกอบของเซลล์และผลิตภัณฑ์อื่นๆ ด้วยวิถีอะซิติลโคเอ (acetyl-CoA pathway) หรือที่รู้จักในชื่อวิถี Wood-Ljungdahl ซึ่งเรียกตามชื่อผู้คิดค้น 2 คน คือ Lars G. Ljungdahl และ Harland G. Wood ที่ทำการศึกษาด้านเคมีและเอนไซม์ในวิถี Wood-Ljungdahl ของ *Moorella thermoacetica* (ชื่อเดิมว่า *C. thermoaceticum*) ที่เป็นแบคทีเรียกลุ่มอะซิโตเจนนิค (acetogenic bacteria) สามารถสร้างอะซิติลโคเอ องค์ประกอบของเซลล์และสารละลายกรดจากแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ได้ (Drake และคณะ, 2006)

แบคทีเรียกลุ่มอะซิโตเจนนิคทั้งประเภทแบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง (mesophilic acetogen) และแบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิสูง (thermophilic acetogen) ที่สามารถใช้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ คาร์บอนมอนอกไซด์ และไฮโดรเจนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้มีอย่างน้อย 23 สกุล ได้แก่ *Acetitomaculum*, *Acetoanaerobium*, *Acetobacterium*, *Acetohalobium*, *Acetonema*, *Alkalibaculum*, *Bryantella*, *Butyribacterium*, *Caloramator*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Holophaga*, *Moorella*, *Natroniella*, *Natronincola*, *Oxobacter*, *Ruminococcus*, *Sporomusa*, *Syntrophococcus*, *Tindallia*, *Thermoacetogenium*, *Thermoanaerobacter* และ *Treponema* (Drake และคณะ, 2008) แสดงอยู่ในตารางที่ 2.4 และการใช้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ไฮโดรเจน และ/หรือ คาร์บอนมอนอกไซด์ เพื่อผลิตกรดแอสिटิกและเอทานอลของแบคทีเรียกลุ่มนี้เป็นดังสมการ (1) (2) (3) และ (4)



แบคทีเรียส่วนใหญ่เมื่อเข้าสู่สภาวะหมักแบบอลิซิซึมแล้วจะได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายส่วนใหญ่เป็นแอสिटิก มีไม่กี่ชนิดที่สามารถผลิตตัวทำละลายได้ (เอทานอล และบิวทานอล) ได้แก่ *C. ljungdahlii*, *C. ragsdalei* or “P11” *C. carboxidivorans* หรือ “P7” และ *C. autoethanogenum*

ตารางที่ 2.4 แบคทีเรียกลุ่มอะซิโตเจนนิคที่มีรายงานว่ามีความสามารถในการตรึงแก๊สเข้าสู่เซลล์

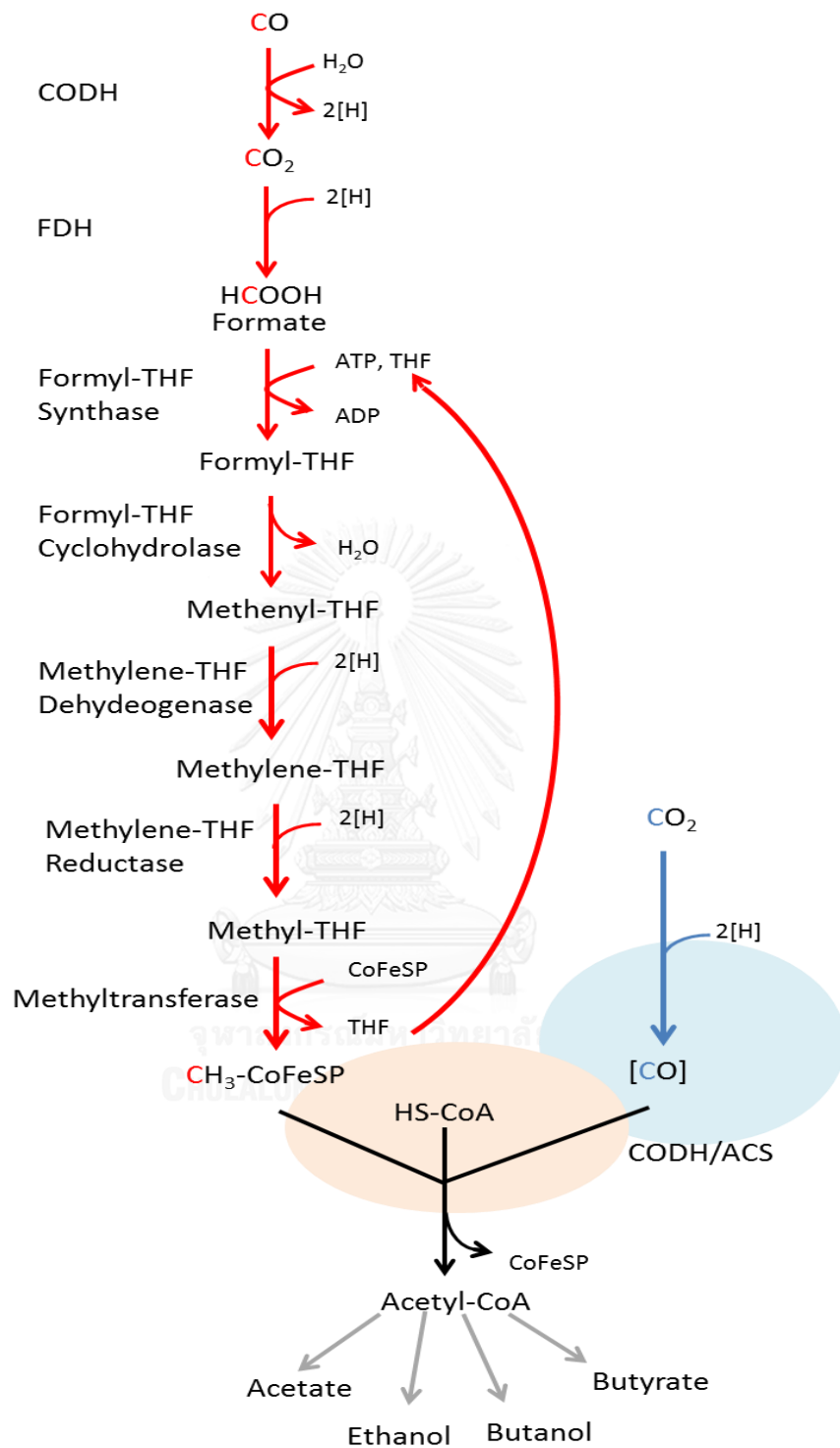
จุลินทรีย์	สารตั้งต้น	ผลิตภัณฑ์	อ้างอิง
จุลินทรีย์ที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง (Mesophilic Microorganisms)			
<i>Acetobacterium woodii</i>	H ₂ /CO ₂ , CO	แอสซีเตต	(Poehlein และคณะ, 2012)
<i>Acetonema longum</i>	H ₂ /CO ₂	แอสซีเตต, บิวทิเรต	(Kane และคณะ, 1991)
<i>Alkalibaculum bacchi</i>	H ₂ /CO ₂ , CO	แอสซีเตต, เอทานอล	(Allen และคณะ, 2010; Liu และคณะ, 2012)
<i>Blautia producta</i>	H ₂ /CO ₂ , CO	แอสซีเตต	(Lorowitz และคณะ, 1984)
<i>Butyribacterium methylotrophicum</i>	H ₂ /CO ₂ , CO	แอสซีเตต, เอทานอล, บิวทิเรต, บิวทานอล	(Lynd และคณะ, 1982) (Zeikus และคณะ, 1980)
<i>C. aceticum</i>	H ₂ /CO ₂ , CO	แอสซีเตต	(Lux และคณะ, 1992)
<i>C. autoethanogenum</i>	H ₂ /CO ₂ , CO	แอสซีเตต, เอทานอล, 2, 3 บิวเทนไดออล	(Abrini และคณะ, 1994) (Köpke, Mihalcea, Bromley, และคณะ, 2011)
<i>C. carboxidivorans</i> or “P7”	H ₂ /CO ₂ , CO	แอสซีเตต, เอทานอล, บิวทานอล, แลคเตต	(Bruant และคณะ, 2010) (Liou และคณะ, 2005)
<i>C. drakei</i>	H ₂ /CO ₂ , CO	แอสซีเตต, เอทานอล, บิวทิเรต	(Küsel และคณะ, 2000) (Gossner และคณะ, 2008)
<i>C. formicoaceticum</i>	CO	แอสซีเตต, ฟอิร์เมต	(Diekert และคณะ, 1978)
<i>C. glycolicum</i>	H ₂ /CO ₂	แอสซีเตต	(Küsel และคณะ, 2001)
<i>C. ljungdahlii</i>	H ₂ /CO ₂ , CO	แอสซีเตต, เอทานอล, 2, 3 บิวเทนไดออล, แลคเตต	(Köpke และคณะ, 2010) (Tanner และคณะ, 1993) (Abrini และคณะ, 1994)
<i>C. magnum</i>	H ₂ /CO ₂	แอสซีเตต	(Bomar และคณะ, 1991)
<i>C. mayombeii</i>	H ₂ /CO ₂	แอสซีเตต	(Kane และคณะ, 1991)
“ <i>C. ragsdalei</i> ” or “P11”	H ₂ /CO ₂ , CO	แอสซีเตต, เอทานอล, 2, 3 บิวเทนไดออล, แลคเตต	(Huhnke และคณะ, 2010)

ตารางที่ 2.4 แบคทีเรียกลุ่มอะซิโตเจนนิคที่มีรายงานว่ามีความสามารถในการตรึงแก๊สเข้าสู่เซลล์ (ต่อ)

จุลินทรีย์	สารตั้งต้น	ผลิตภัณฑ์	อ้างอิง
จุลินทรีย์ที่ชอบอุณหภูมิสูง (Thermophilic Microorganisms)			
<i>M. thermoacetica</i>	H ₂ /CO ₂ , CO	แอสซีเตต	(Pierce และคณะ, 2008)
<i>M. thermoautotrophica</i>	H ₂ /CO ₂ , CO	แอสซีเตต	(Savage และคณะ, 1987)
<i>Thermoanaerobacter kiuvi</i>	H ₂ /CO ₂	แอสซีเตต	(Daniel และคณะ, 1990)

2.5 วิธี Wood-Ljungdahl และยีนที่เกี่ยวข้องกับการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์

วิธี Wood-Ljungdahl ถูกค้นพบครั้งแรกใน *C. acetatum* ที่สามารถใช้แก๊สไฮโดรเจนและคาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้ สารผลิตภัณฑ์เป็นแอสซีเตต แต่ต่อมาแบคทีเรียนี้ได้สูญหายไปก่อนการศึกษาจะเสร็จสิ้น จึงได้มีการศึกษาวิธี Wood-Ljungdahl ใน *M. thermoacetica* หรือชื่อเดิมว่า *C. thermoacetatum* ทำให้ *M. thermoacetica* กลายเป็นแบคทีเรียต้นแบบของวิธี Wood-Ljungdahl (Fontaine และคณะ, 1942) ในแบคทีเรียกลุ่มอะซิโตเจนนิค ที่ตรึงแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เข้าสู่มวลชีวภาพผ่านสารตัวกลางไรรูปของอะซิติลโคเอ โดยวิธีนี้แบ่งออกเป็น 2 สาขา คือ สาขาอีสเทิร์น (Eastern หรือ Methyl branch) และสาขาเวสเทิร์น (Western หรือ Carbonyl branch) ดังแสดงในภาพที่ 2.2 สาขาอีสเทิร์นหรือเมธิลจะทำการเปลี่ยนคาร์บอนไดออกไซด์ 1 โมเลกุลเป็นหมู่เมธิลของอะซิติลโคเอ โดยการทำงานของซูดเอนไซม์เตตระไฮโดรโฟเลต (tetrahydrofolate-dependent enzymes) ในขณะที่สาขาเวสเทิร์นมีเอนไซม์คาร์บอนมอนอกไซด์ดีไฮโดรจีเนส (carbon monoxide dehydrogenase; CODH) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนคาร์บอนไดออกไซด์ 1 โมเลกุลไปเป็นคาร์บอนมอนอกไซด์ที่ถูกใช้เป็นหมู่คาร์บอนิลของอะซิติลโคเอ และในขั้นตอนสุดท้ายหมู่เมธิลจากสาขาเวสเทิร์น และหมู่คาร์บอนิลจากสาขาอีสเทิร์นจะรวมตัวกับโคเอนไซม์เอ (coenzyme A; CoA) ได้เป็นอะซิติลโคเอ โดยการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคเอซินเทส (acetyl-CoA synthase; ACS) (Ragsdale, 2004) โดยทั้ง 2 สาขา มียีนและเอนไซม์ทำงานร่วมกันหลายชนิดด้วยกันดังนี้



ภาพที่ 2.2 แสดงเมแทบอลิซึมคาร์บอน 1 อะตอมของวิถี Wood-Ljungdahl ที่มี 2 สาขา คือ สาขาอีสเทิร์นหรือเมธิล (เส้นสีแดง) และสาขาเวสเทิร์นหรือคาร์บอนิล (เส้นสีน้ำเงิน) (ดัดแปลงจาก Liew และคณะ, 2013)

2.5.1 เอนไซม์ในสาขาอีสเทิร์นหรือเมธิล (Eastern branch)

สาขาอีสเทิร์นทำหน้าที่ในการสร้างหมู่เมธิลของอะซีติลโคเอ โดยมีฟอร์มेटดีไฮโดรจีเนส (formate dehydrogenase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ตัวแรกของสาขาอีสเทิร์นทำหน้าที่เปลี่ยนคาร์บอนไดออกไซด์เป็นฟอร์มेट (Andreesen และคณะ, 1973) จากนั้นชุดเอนไซม์เตตระไฮโดรโฟเลต (tetrahydrofolate-dependent enzymes) จะทำหน้าที่ในการเปลี่ยนฟอร์มेटไปเป็นสารประกอบเมธิลเตตระไฮโดรโฟเลต ประกอบด้วย 4 ขั้นตอน คือ

- การรวมตัวของฟอร์มेटกับเตตระไฮโดรโฟเลตเป็นฟอร์มิลเตตระไฮโดรโฟเลต (formyl-tetrahydrofolate) จากการทำงานของเอนไซม์ฟอร์มิลเตตระไฮโดรโฟเลตซินเทส (formyl-tetrahydrofolate synthase)

- การเปลี่ยนฟอร์มิลเตตระไฮโดรโฟเลตไปเป็นเมธินิลเตตระไฮโดรโฟเลต (methenyl-tetrahydrofolate) ด้วยการดึงน้ำออกจากฟอร์มิลเตตระไฮโดรโฟเลตจากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ฟอร์มิลเตตระไฮโดรโฟเลตไซโคลไฮโดรเลส (formyl-tetrahydrofolate cyclohydrolase)

- การปฏิกิริยารีดักชันของเมธินิลเตตระไฮโดรโฟเลตไปเป็นเมธิลีนเตตระไฮโดรโฟเลต (methylene tetrahydrofolate) ด้วยเอนไซม์เมธิลีนเตตระไฮโดรโฟเลตดีไฮโดรจีเนส (formyl-tetrahydrofolate dehydrogenase)

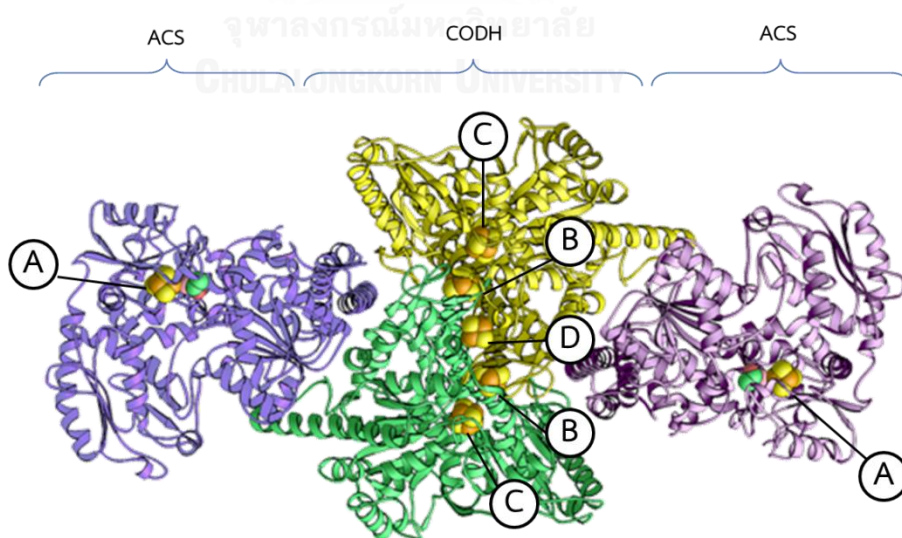
- ในขั้นตอนสุดท้ายของสาขาอีสเทิร์น เมธิลีนเตตระไฮโดรโฟเลตถูกเปลี่ยนเป็นเมธิลเตตระไฮโดรโฟเลต (methyl-tetrahydrofolate) ด้วยเอนไซม์เมธิลีนเตตระไฮโดรโฟเลตรีดักเทส (methylene-tetrahydrofolate reductase) ซึ่งหมู่เมธิลของเมธิลเตตระไฮโดรโฟเลตนี้จะถูกนำไปสร้างอะซีติลโคเอ (Ragsdale และคณะ, 2008)

2.5.2 เอนไซม์ในสาขาเวสเทิร์นหรือคาร์บอนิล (Western branch)

สาขาเวสเทิร์นมีเอนไซม์คาร์บอนมอนอกไซด์ดีไฮโดรจีเนส/อะซีติลโคเอซินเทส (CODH/ACS) ซึ่งจัดเป็นเอนไซม์สำคัญของวิถี Wood-Ljungdahl ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาได้ 2 ปฏิกิริยา คือ เร่งปฏิกิริยารีดักชันของคาร์บอนไดออกไซด์ไปเป็นคาร์บอนมอนอกไซด์ด้วยการทำงาน

ของเอนไซม์คาร์บอนมอนอกไซด์ดีไฮโดรจีเนส (CODH) และเร่งปฏิกิริยาการรวมหมู่เมธิล คาร์บอนิล และโคเอนไซม์เอ ได้เป็นอะซิติลโคเอดด้วยการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคเอซินเทส (ACS)

เอนไซม์ CODH/ACS มีขนาด 310 kDa ประกอบด้วยโปรตีน 4 สาย ($\alpha_2\beta_2$ tetramer) คือ สายแอลฟา 2 สาย หรือ ACS ที่ถูกสร้างโดยยีน *acsB* และสายเบต้า 2 สาย หรือ CODH ถูกสร้างโดยยีน *acsA* (Parkin และคณะ, 2007) ในแบคทีเรียอะซิโตเจนเอนไซม์ CODH/ACS มีกลุ่มโมเลกุลของเหล็กและนิกเกิลอยู่ในโมเลกุล 7 คลัสเตอร์ (ภาพที่ 2.3) คือ คลัสเตอร์ A จำนวน 2 คลัสเตอร์ พบในเอนไซม์ ACS และอีก 5 คลัสเตอร์พบในเอนไซม์ CODH ได้แก่ คลัสเตอร์ B C และ D (ตารางที่ 2.5) โดยปฏิกิริยาการเปลี่ยนคาร์บอนไดออกไซด์เป็นคาร์บอนมอนอกไซด์จะเกิดที่บริเวณคลัสเตอร์ C เท่านั้น ส่วนบริเวณคลัสเตอร์ B และ D หน้าที่ส่งถ่ายอิเล็กตรอน (Ragsdale, 2007) ซึ่งแบคทีเรียอะซิโตเจนสามารถใช้แก๊สคาร์บอนมอนอกไซด์ได้เร็วกว่าแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ โดย Kumar และคณะ (1994) ได้รายงานว่เอนไซม์ CODH มีความสามารถในการใช้คาร์บอนมอนอกไซด์ได้เร็วและมีประสิทธิภาพ (ประมาณ 4,000 – 40,000 โมเลกุลต่อวินาที) ในขณะที่การรีดิวซ์คาร์บอนไดออกไซด์ได้ 11 โมเลกุลต่อวินาที และเมื่อแบคทีเรียอะซิโตเจนเจริญในสภาวะอโตทรอปจะมีการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการทำงานของเอนไซม์เชิงซ้อน CODH/ACS สูงขึ้น (Mörsdorf และคณะ, 1992)



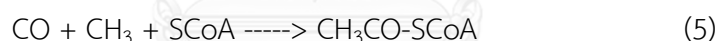
ภาพที่ 2.3 เอนไซม์คาร์บอนมอนอกไซด์ดีไฮโดรจีเนส/อะซิติลโคเอซินเทส A B C และ D แสดงตำแหน่งกลุ่มของเหล็กและนิกเกิลในโมเลกุลของ CODH/ACS (Doukov และคณะ, 2002)

ตารางที่ 2.5 กลุ่มของโคแฟกเตอร์ในเอนไซม์ CODH/ACS (Doukov และคณะ, 2002)

คลัสเตอร์	จำนวน	องค์ประกอบ	บริเวณที่พบ
A	2	Ni-[4Fe-4S]	ACS
B	2	[4Fe-4S]	CODH
C	2	[3Fe-4S]	CODH
D	1	[4Fe-4S]	CODH

2.5.3 การสร้างอะซิติลโคเอ

ในแบคทีเรียอะซิโตเจนจะมียีน *acsB* ทำหน้าที่ในการสร้างอะซิติลโคเอซินเทส เพื่อเร่งปฏิกิริยาการสร้างอะซิติลโคเอ โดยทำงานร่วมกับโปรตีนคอร์ริโนยด์ (ที่สร้างโดยยีน *acsCD*) และเอนไซม์เมทิลทรานเฟอร์เรส (methyltransferase) ที่สร้างโดยยีน *acsE* โดยเมทิลทรานเฟอร์เรสจะทำหน้าที่ในการขนย้ายหมู่เมทิล จากเมทิลเตตระไฮโดรโฟเลตในสาขาอีสเทิร์นไปยังโปรตีนคอร์ริโนยด์ (corrinoid iron-sulfur protein) ก่อนจะถูกนำไปรวมกับหมู่คาร์บอนิลจากสาขาเวสเทิร์นและโคเอนไซม์เอ ดังสมการที่ (5) เป็นอะซิติลโคเอ

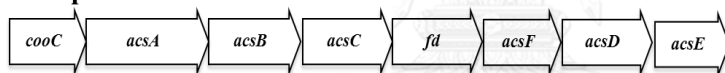


2.5.4 การจัดเรียงตัวของกลุ่มยีนในวิถี Wood-Ljungdahl

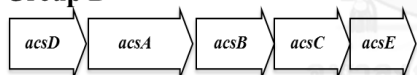
ยีนในสาขาเมทิล ของวิถี Wood-Ljungdahl พบได้ทั่วไปและกระจายอยู่บนจีโนมในขณะยีนในสาขาคาร์บอนิล มีลักษณะเป็นเอกลักษณ์ในแบคทีเรียที่ใช้วิถี Wood-Ljungdahl และอยู่รวมกับกลุ่มยีน *acs* (*acs* gene cluster) (Roberts และคณะ, 1989) การจัดเรียงตัวของยีนในวิถีนี้ที่ประกอบด้วยยีนที่สร้างเอนไซม์คาร์บอนมอนอกไซด์ดีไฮโดรจีเนส (*acsA*) /อะซิติลโคเอซินเทส (*acsB*) โปรตีนคอร์ริโนยด์ (*acsCD*) และ methyltransferase (*acsE*) โดยการทำงานของยีนที่สร้างโปรตีนคอร์ริโนยด์นี้ยังไม่ทราบหน้าที่แน่นอน นอกจากนี้ยังมียีนอื่นๆ ที่ทำงานเกี่ยวข้องกับ CODH/ACS ในสาขาคาร์บอนิล คือ *cooC* และ *acsF* ที่ทำหน้าที่สำคัญในการแทรกนิกเกิลเข้าไปในเอนไซม์ CODH/ACS (Jeon และคณะ, 2001)

Pierce และคณะ (2008) ได้ทำการจัดกลุ่มของยีนในวิถี Wood-Ljungdahl ออกเป็น 5 กลุ่ม (ภาพที่ 2.4) โดยกลุ่ม A พบได้ใน *M. thermoacetica* *Carboxydothemus hydrogenoformans* *Desulfotobacterium hafniense* และ *Kuenenia* กลุ่ม B พบใน *Syntrophobacter fumaroxidans* และ *Candidatus Desulfococcus oleovorans* กลุ่ม C พบใน *Alkaliphilus metalliredigens* *C. difficile* และ *C. carboxidivorans* กลุ่ม D พบใน *Dehalococcoides* sp. และกลุ่ม E พบใน *Deltaproteobacterium* MLMS-1 ซึ่งในแต่ละกลุ่มมีการจัดเรียงตัวของยีนที่แตกต่างกัน ประกอบด้วยการทำงานของยีน 16 ชนิด (ตารางที่ 2.6) ในการเปลี่ยนแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เป็นอะซิติกโคเอ วิถี Wood-Ljungdahl มีความแตกต่างกัน ในกลุ่ม A B และ C พบยีน *acs* ทั้งหมด ในขณะที่กลุ่ม D ไม่เป็นกลุ่มของแบคทีเรียที่ไม่มียีน *acsA* และในกลุ่ม E ไม่พบยีน *acsE* ซึ่งสันนิษฐานว่าทั้ง 2 กลุ่มอาจมีวิถีสังเคราะห์รวมในการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์มาใช้ หรืออาจมีการเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์เชิงซ้อนที่ทำงานร่วมกับวิถีนี้ (Pierce และคณะ, 2008)

Group A



Group B



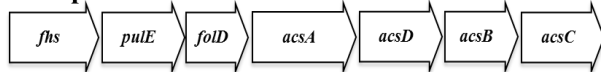
Group C



Group D



Group E



ภาพที่ 2.4 กลุ่มของยีนในวิถี Wood-Ljungdahl ที่ถูกจัดออกเป็น 5 กลุ่มโดย Pierce และคณะ (2008)

จากงานวิจัยของ Bruant และคณะ (2010) พบว่าแบคทีเรียในสกุลคลอสทริเดียมมีการจัดเรียงตัวของยีนในวิถี Wood-Ljungdahl คล้ายกับยีนในกลุ่ม C โดยโปรตีนทั้ง 17 ชนิดในวิถี Wood-Ljungdahl ของ *C. difficile*, *C. carboxidivorans* และ *C. ljungdahlii* มีความคล้ายคลึงกัน 47-91 เปอร์เซ็นต์ โดยยีน *acsA* ของ *C. carboxidivorans* และ *C. ljungdahlii* มีความคล้ายคลึงกันค่อนข้างสูง 77-86 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 2.6 ยีนและเอนไซม์ในวิถี Wood-Ljungdahl (Bruant และคณะ, 2010)

ยีน	เอนไซม์และโปรตีน
<i>acsA</i>	CODH/ACS complex, CODH subunit
<i>acsB</i>	CODH/ACS complex, ACS subunit
<i>acsC</i>	corrinoide iron-sulfur protein large subunit
<i>acsD</i>	corrinoide iron-sulfur protein small subunit
<i>acsE</i>	CODH/ACS complex, methyltransferase subunit
<i>acsF</i>	CODH accessory protein similar to CooC
<i>cooC</i>	CODH accessory protein
<i>fd</i>	ferredoxin
<i>fhs</i>	formyltetrahydrofolate synthase
<i>fchA</i>	formimido-tetrahydrofolate cyclodeaminase
<i>folD</i>	bifunctional methylene-tetrahydrofolate dehydrogenase/ formyltetrahydrofolate cyclohydrolase
<i>hyp</i>	hypothetical protein
<i>metF</i>	methylene-tetrahydrofolate reductase
<i>acoL</i>	CODH/ACS complex, dihydrolipoamide dehydrogenase subunit
<i>gcvH</i>	glycine cleavage system H protein
<i>pulE</i>	ATPase

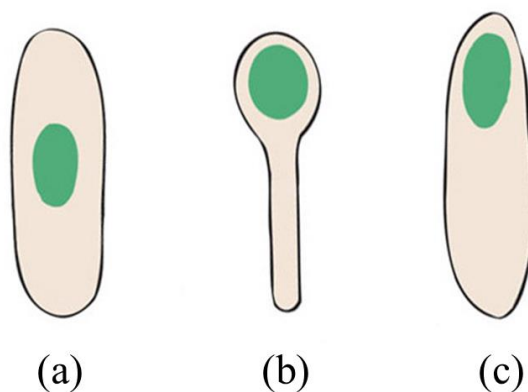
2.6 การผลิตไบโอแอลกอฮอล์ด้วยกระบวนการหมักแก๊สด้วยคลอสทริเดียม

2.6.1 คุณลักษณะของคลอสทริเดียม

คลอสทริเดียมเป็นแบคทีเรียแกรมบวก (Gram positive bacteria) เจริญได้ในสภาวะไร้ออกซิเจน (anaerobic bacteria) มีรูปร่างเป็นท่อน (rod shape) โดยมีความยาวและขนาดของเซลล์แตกต่างกันไปตามแหล่งอาหาร สามารถสร้างสปอร์ได้ (spore forming bacteria) พบได้ทั่วไปในดิน น้ำ ฝุ่นละออง และบางชนิดพบในลำไส้ของสิ่งมีชีวิต คลอสทริเดียมมีความสามารถในการหมักและย่อยสลายประกอบอินทรีย์ได้หลากหลายชนิด ได้แก่ แป้ง น้ำตาล และเซลลูโลส สารผลิตภัณฑ์ที่ได้หลังจากเกิดกระบวนการหมักคือ เอทานอล บิวทานอล 2, 3 บิวเทนไดออล กรดแอสติค และกรดบิวทริก ทำให้คลอสทริเดียมถูกจัดเป็น solventogenic bacteria

คุณสมบัติที่โดดเด่นของคลอสทริเดียมคือการสร้างสปอร์ พบเมื่ออยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสม เช่น เมื่อมีออกซิเจน การขาดแคลนอาหารหรือเมื่อมีการสะสมสารที่เป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งมีคุณสมบัติของสปอร์ทนต่ออุณหภูมิได้สูง และสามารถดำรงชีวิตได้ในสิ่งแวดล้อมถึงแม้ในที่มีออกซิเจนได้นานหลายปี เมื่ออยู่ในดินสปอร์จะพักตัวจนกระทั่งอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่เหมาะสมในสภาวะไร้ออกซิเจนก็จะเริ่มมีการเจริญของโคโลนี สปอร์ของคลอสทริเดียมมีความแตกต่างกันทั้งรูปร่าง บางชนิดมีสปอร์รูปร่างกลม เช่น *C. tetani* บางชนิดมีรูปร่างรี เช่น *C. beijerinckii* และ *C. botullinum* และบางชนิดอาจมีรูปร่างกลมบวม (swollen spore) นอกจากนี้ตำแหน่งของสปอร์ในเซลล์ยังมีความแตกต่างกัน (ภาพที่ 2.2) ได้แก่ อยู่ตรงกลางเซลล์ (central spore) อยู่ปลายเซลล์ (terminal spore) และอยู่ใกล้ปลายเซลล์ (subterminal spore) ซึ่งขนาดรูปร่างและตำแหน่งของสปอร์ของคลอสทริเดียมมีประโยชน์ในการพิสูจน์ถึงชนิดของแบคทีเรียในสกุลนี้ (MacLennan, 1962) มีบางชนิดเป็นแบคทีเรียที่ผลิตสารพิษถึงแก่ชีวิต เช่น *C. botullinum* ดังที่เป็นข่าวถึงพิษต่อผู้บริโภคในประเทศไทย อย่างไรก็ตามแบคทีเรียประเภทที่นำมาใช้ในอุตสาหกรรมต้องมีความปลอดภัย และสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ตรงตามวัตถุประสงค์ ซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้ต้องไม่มีผลกระทบต่อชีวิตมนุษย์และสิ่งแวดล้อม ดังนั้นความแม่นยำในการจัดจำแนกของแบคทีเรียที่แยกได้จึงเป็นเรื่องสำคัญที่สุด เพื่อให้ได้แบคทีเรียที่สามารถนำมาใช้เป็นประโยชน์ในอุตสาหกรรมการผลิตสารละลายอินทรีย์ต่างๆ อย่างปลอดภัยไม่เป็นพิษ และเป็นโรคต่อคน สัตว์ และพืช โดยการจัดจำแนกด้วยวิธีทางชีวเคมีในการหมักย่อยน้ำตาลและโปรตีนชนิดต่างๆ หรือการตรวจผลผลิตของเมแทบอลิซึมด้วยแก๊สโคร

มาโทกราฟี ร่วมการใช้เทคนิคทางพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล ซึ่งเป็นช่วยในการจัดจำแนกชนิดเชื้อเหล่านี้ที่มีความสำคัญอย่างยิ่งและเป็นเทคนิคที่ใช้ในการจัดจำแนกแบคทีเรียที่เป็นระบบสากลมากที่สุดในปัจจุบัน (อัญชลี ตันท์ศุภศิริ, 2548)



ภาพที่ 2.5 ลักษณะตำแหน่งสปอร์ของคลอสทริเดียม (a) central spore (b) terminal spore และ (c) subterminal spore

2.6.2 การผลิตไอโอบแอลกอฮอล์ด้วยคลอสทริเดียม

การนำเป็นแบคทีเรียมาใช้ในกระบวนการผลิตไอโอบแอลกอฮอล์จากแก๊สต้องคำนึงถึงความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนเป็นสารตั้งต้นได้หลากหลาย และประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในการในการแปรสภาพคาร์บอนไปเป็นสารผลิตภัณฑ์ แบคทีเรียส่วนใหญ่ที่ใช้แก๊สในกระบวนการหมักมักให้ผลผลิตหลักเป็นกรด ในขณะที่แบคทีเรียในสกุลคลอสทริเดียมสามารถผลิตเอทานอล และบิวทานอลได้จึงจัดเป็นแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิตตัวทำละลายและกำลังเป็นที่สนใจอย่างมาก ซึ่งในปัจจุบันนักวิจัยพยายามพัฒนากระบวนการผลิตสารละลายจากการหมักแก๊สด้วยแบคทีเรีย เนื่องจากสารละลายที่ได้นั้นยังคงมีปริมาณน้อย เพราะการเลี้ยงแบคทีเรียด้วยแก๊สค่อนข้างมีผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย ทั้งการขาดแร่ธาตุและวิตามินที่เป็นปัจจัยในการเพิ่มปริมาณเซลล์ และค่าความเป็นกรดต่างที่เปลี่ยนแปลงเมื่อมีการให้แก๊ส

Barik และคณะ (1988) ได้ศึกษาผลของสารอาหารที่เป็นแหล่งไนโตรเจนของ *C. ljungdahlii* ที่คัดแยกได้จากมูลไก่ เป็นแบคทีเรียรูปพ่อน สร้างสปอร์ภายในเซลล์ มีความสามารถในการใช้สารตั้งต้นได้หลากหลาย ได้แก่ น้ำตาล C5 และ C6 แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ และคาร์บอนมอนอกไซด์ เป็นสารตั้งต้น ได้สารผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นเอทานอลและแอสีเตต โดยเลี้ยงบน

อาหารที่เติมวิตามินรวม สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งอาหารไนโตรเจน ที่สภาวะความเป็นกรดต่าง 5-7 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าแหล่งอาหารที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบมีความจำเป็นต่อวิถีเมแทบอลิซึมในการเปลี่ยนสารตั้งต้นที่เป็นมวลชีวภาพหรือของเหลว และ *C. ljungdahlii* สามารถเจริญได้ในอาหารที่ปราศจากสารสกัดจากยีสต์แต่มีอัตราการเจริญและสารผลิตภัณฑ์ลดลง (0.005%) ต่อมาได้มีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนของสารสกัดจากยีสต์ในอาหารกับอัตราการผลิตไบโอแอลกอฮอล์และแอสิตเตต พบว่าการเปลี่ยนสารสกัดจากยีสต์ไปเป็นกรดอะมิโนของแบคทีเรียเพื่อช่วยในการเจริญเติบโตนั้นมีความสัมพันธ์น้อย แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียต้องการแหล่งไนโตรเจนในปริมาณที่น้อยสำหรับการเจริญเติบโตของเซลล์ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาเกี่ยวกับตัวชี้วัดอัตราการผลิตเอทานอลและกรดแอสิตเตตในแบคทีเรียชนิดนี้ พบว่าการผลิตของเหลวมีความสัมพันธ์โดยตรงกับการเจริญเติบโตของเซลล์ (Vega และคณะ, 1989)

การทดลองเมื่อเลี้ยง *C. ljungdahlii* ร่วมกับแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ คาร์บอนมอนอกไซด์ และไฮโดรเจน พบว่ามีผลิตภัณฑ์ที่เป็นเอทานอลในปริมาณที่ต่ำ คือ 0.5 กรัมต่อลิตร ซึ่งความเข้มข้นเอทานอลสุทธิน้อยกว่า 1 กรัมต่อลิตร (Klasson และคณะ, 1992) แต่อย่างไรก็ตามก็ยังมีเลี้ยง *C. ljungdahlii* ในอัตราส่วนแก๊สทั้งสามที่แตกต่างกัน พบว่าสัดส่วนแก๊สที่เหมาะสมที่สุดคือ 65% CO: 24% H₂: 11% CO₂ ซึ่งเมื่อเลี้ยงในอัตราส่วนนี้เชื้อ *C. ljungdahlii* จะสามารถผลิตเอทานอลได้ถึง 7 กรัมต่อลิตร แอสิตเตต 1 กรัมต่อลิตร โดยระยะของเชื้อที่มีการผลิตเอทานอลคือช่วงระยะที่เซลล์คงที่ (stationary phase) ที่ค่าความเป็นกรดต่าง 4.0 และ 4.5 ในขณะที่ช่วงสร้างแอสิตเตตจะเป็นช่วงการเจริญ (log phase) (Klasson และคณะ, 1992) แม้ปริมาณเอทานอลที่ได้มีปริมาณเพิ่มขึ้นก็ตาม ก็ยังคงมีการศึกษาการเพิ่มผลผลิตเอทานอลให้มีความเข้มข้นที่สูงขึ้นต่อไป โดย Köpke และคณะ (2010) ได้ศึกษาถึงวิถีเมแทบอลิซึมของ Wood-Ljungdahl พบว่ายีนที่มีความสำคัญในการตรึงแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์คือ ยีนกลุ่ม *acs* รวมถึงข้อมูลทางด้านชีวสารสนเทศอื่นๆของแบคทีเรียชนิดนี้และมีทำการตัดต่อยีนเพื่อให้มีความสามารถในการผลิตเอทานอลได้ แต่พบว่าเมื่อทำการตัดแปลงพันธุกรรมแล้ว *C. ljungdahlii* มีความสามารถในการผลิตเอทานอลเพียง 0.2 กรัมต่อลิตรซึ่งถือว่ามีความเข้มข้นที่ต่ำมาก (Köpke และคณะ, 2010)

Abrini และคณะ (1994) ได้ทำการศึกษาผลิตเอทานอลในแบคทีเรียกลุ่มอะซิโตนิกที่เป็นออโตโทรฟ คือ *C. autoethanogenum* ที่คัดแยกได้จากมูลกระต่าย แบคทีเรียชนิดนี้มี

ความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนได้หลากหลาย ได้แก่ แก๊สคาร์บอนมอนอกไซด์ แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ แก๊สไฮโดรเจน ไพรูเวต น้ำตาลไซโลส น้ำตาลอะราบิโนส น้ำตาลฟรุกโทส น้ำตาลแรมโนส (rhamnose) และ แอล-กลูตามีน (L-glytamine) สามารถผลิตเอทานอล แอซีเตต และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายได้ พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของแก๊สคาร์บอนมอนอกไซด์จาก 33 เปอร์เซ็นต์ เป็น 60 เปอร์เซ็นต์ สามารถเพิ่มอัตราส่วนการผลิตของเอทานอล : แอซีเตต เพิ่มขึ้นจาก 0.27 มิลลิโมล เป็น 0.97 มิลลิโมล โดยสภาวะที่ดีที่สุดสำหรับการผลิตคือ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในช่วงพีเอชระหว่าง 4.5–6.5 ในปี 2008 Cotter และคณะ ได้ทำการเลี้ยง *C. autoethanogenum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร DSMZ640 ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนที่ถูกแทนที่ด้วยแก๊สผสมที่ประกอบด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ 20 เปอร์เซ็นต์ ไฮโดรเจน 10 เปอร์เซ็นต์ คาร์บอนมอนอกไซด์ 20 เปอร์เซ็นต์ และไนโตรเจน 5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าสามารถผลิตเอทานอลได้ 0.66 กรัมต่อลิตร และแอซีเตต 1.40 กรัมต่อลิตร ต่อมาในปี 2009 Cotter และคณะ ได้ทำการศึกษาผลกระทบของแหล่งไนโตรเจนและคาร์บอนที่มีอยู่อย่างจำกัดในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าแบคทีเรียชนิดนี้ไม่สามารถเจริญได้เมื่อไม่มีสารสกัดจากยีสต์ หรือกรดคาซามิโน (casamino acids) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งแตกต่างจาก *C. ljungdahlii* ที่เจริญได้แต่น้อยลงอย่างเห็นได้ชัด และในการวิเคราะห์ข้อมูลทางด้านพันธุศาสตร์ของ *C. autoethanogenum* เมื่อนำลำดับเบสอนุกรมของแบคทีเรียชนิดนี้มาเปรียบเทียบกับความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับแบคทีเรียชนิดอื่นในฐานข้อมูล พบว่ามีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับ *C. ljungdahlii* มากที่สุด (Cotter และคณะ, 2009)

C. carboxidivorans P7 เป็นแบคทีเรียสกุลคลอสทริเดียมสายพันธุ์ใหม่ ที่คัดแยกได้จากตะกอนดิน เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีสปอร์รูปท่อน สามารถใช้สารตั้งต้นได้หลากหลาย ได้แก่ กลูโคส ฟรุคโตส ไซโลส แมนโนส เซลโลไบโอส กาแลคโตส แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ คาร์บอนมอนอกไซด์ และไฮโดรเจน เป็นแบคทีเรียที่สามารถผลิต แอซีเตต เอทานอล บิวทิเรต และบิวทานอล (Liou และคณะ, 2005) Phillips และคณะ (2015) ได้ทำการทดลองเลี้ยง *C. carboxidivorans* ในแก๊สผสมที่มี CO: H₂: CO₂ ในอัตราส่วน 70: 20: 10 ในอาหารที่มีไนโตรเจน ฟอสเฟส และแร่ธาตุที่มีความเข้มข้นเหมาะสมต่อประสิทธิภาพในการผลิตแอลกอฮอล์ของแบคทีเรีย

ชนิดนี้ พบว่า *C. carboxidivorans* สามารถเจริญได้แม้ไม่มีการเติมสารสกัดจากยีสต์ และผลิตเอทานอลได้สูงสุด 3 กรัมต่อลิตร และบิวทานอล มากกว่า 1 กรัมต่อลิตร

ปัจจุบันแบคทีเรียในสกุลคลอสทริเดียมที่มีศักยภาพในการใช้แก๊สที่มีคาร์บอนไดออกไซด์และคาร์บอนมอนอกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานมีเพียง 3 สายพันธุ์ คือ *C. autoethanogenum* *C. ljungdahlii* และ *C. carboxidivorans* แต่ยังคงมีการผลิตสารละลายค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับการใช้น้ำตาลความเข้มข้นสูงมาเป็นสารตั้งต้น การนำไปใช้ในในระดับอุตสาหกรรมการผลิตไบโอแอลกอฮอล์ เช่น เอทานอลและบิวทานอลในอนาคต จึงยังคงต้องการการพัฒนากระบวนการผลิตเพื่อให้ได้สารผลิตภัณฑ์ความเข้มข้นสูง รวมถึงการคัดเลือกหาแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ที่มีศักยภาพในการใช้แก๊สคาร์บอน 1 อะตอมเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการผลิตสารมูลค่าสูงเหล่านี้ได้

2.6.3 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการหมักและการใช้ประโยชน์

เอทานอล นิยมใช้ในอุตสาหกรรมผลิตอาหารและเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ใช้ตัวทำละลายในอุตสาหกรรมเคมีต่างๆ เช่น น้ำยาฆ่าเชื้อ และที่สำคัญที่สุดคือการใช้เป็นพลังงานทดแทนการใช้น้ำมันเชื้อเพลิงจากฟอสซิล และยังใช้เป็นสารเพิ่มค่าออกเทนในน้ำมันเบนซิน ลดการนำเข้าสาร MTBE ที่มีราคาสูงและเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม (Köpke และคณะ, 2010)

บิวทานอล นิยมใช้เป็นสารเจือจางหรือตัวทำละลายในอุตสาหกรรมสารเคมี สิ่งทอ และอุตสาหกรรมน้ำหอม นอกจากนี้ยังถูกใช้เป็นสารตัวกลางในกระบวนการสังเคราะห์สารเคมีเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหารและยา วิตามินและฮอร์โมน ใช้เป็นสารสกัดในอุตสาหกรรมอาหารและกลิ่น และที่สำคัญการใช้ประโยชน์ด้านพลังงานด้วยคุณสมบัติของบิวทานอลที่ใกล้เคียงกับน้ำมันเบนซิน สามารถใช้แทนน้ำมันได้โดยไม่ต้องดัดแปลงเครื่องยนต์ จึงทำให้บิวทานอลเป็นที่สนใจอย่างมาก (Köpke, Noack, และคณะ, 2011)

2, 3 บิวเทนไดออล เป็นสารเคมีที่มีมูลค่าสูง ซึ่งใช้เป็นสารตั้งต้นสารเคมีที่นำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์เมธิลคีโตน (MEK) ที่ใช้ในอุตสาหกรรมกาว สี และสิ่งพิมพ์ หรือเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ 1, 3 บิวทาไดอิน ที่ใช้ในอุตสาหกรรมยางยนต์และพลาสติก สารตัวนี้มีมูลค่าอยู่ที่ 43 พันล้านดอลลาร์ต่อปี (Köpke, Noack, และคณะ, 2011)

กรดบิวทริก สามารถใช้ประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม และใช้ในรูปของกรดสำหรับการปรับปรุงกลิ่น รส และลักษณะของอาหารในอุตสาหกรรมประเภทเนยและนม ใช้ในรูปของเอสเทอร์เพื่อเพิ่มกลิ่นผลไม้ และอนุพันธ์ของกรดบิวทริกสามารถใช้ในอุตสาหกรรมพลาสติกและสิ่งทอได้ (Wagner, 2002)

กรดแอซิติกหรือที่รู้จักกันในชื่อกรดน้ำส้ม นิยมใช้ในปรุงแต่งกลิ่นและรสในอุตสาหกรรมอาหาร ถูกใช้เป็นตัวทำละลายในอุตสาหกรรม และใช้ในการสังเคราะห์สารเคมีภัณฑ์ เช่น เซลลูลอสแอซิเตต ที่ใช้ในอุตสาหกรรมไหมเทียม และฟิล์มถ่านรูป (Wagner, 2002)



บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

กระบอกฉีดยา (Syringe, 3 ml และ 5 ml)	(Nipro, Thailand)
กล้องจุลทรรศน์ (Microscope)	(Olympus, Japan)
ขวดซีรัม (Serum bottle)	(Amani, Thailand)
เข็มฉีดยา (Needle, 18Gx1)	(Nipro, Thailand)
เครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก (Magnetic stirrer)	(Barnstead, USA)
เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas chromatography)	(GC-2010A Shimadzu, Japan)
เครื่องเขย่าผสมสาร (Vortex mixer)	(Vision Scientific, Korea)
เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง (pH meter)	(Sartorius, Germany)
เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge)	(Hettich, Germany)
เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น BJ 1000C	(Precisa, Switzerland)
เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น AG285	(Mettler Toledo, USA)
เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อความดันสูง (Autoclave)	(Sturdy Industrial, Taiwan)
เครื่องควบคุมอุณหภูมิน้ำ (Waterbath)	(Mettler, Germany)
เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Microplate Spectrophotometer)	(ANTHOS Zenyth 200, USA)
จุกยาง (Gray butyl rubber stopper)	(Amani, Thailand)

ตู้เพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์แบบไร้ออกซิเจน (Anaerobic Chamber) รุ่น Bactron(Shellab, USA)	
ตู้อบเชื้อ (Incubator)	(EHRET, Germany)
ตู้อบฆ่าเชื้อ (Hot air oven)	(Mettler, Germany)
ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow)	(Clean model, Lab service Ltd)
โถบ่มเพาะเชื้อชนิดไร้ออกซิเจน (Anaerobic jar)	(Merck, Germany)
กล่องแก๊สผสม (Genbox)	(VRbioscience, Thailand)
ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (Bioreactor)	(Gibthai, Thailand)
ฝาอลูมิเนียม (Aluminium crimp seal)	(Amani, Thailand)
ไม้พันสำลี (Cotton swab)	(CTchemical, Thailand)

3.2 สารเคมี

กรดบอริก (H_3BO_3)	(Merck, Germany)
กรดบิวทริก (Butyric acid)	(Sigma Aldrich, USA)
กรดแอสติก (Acetic acid)	(Labscan, Thailand)
กรดไฮโดรคลอริก (HCl)	(Merck, Germany)
คริสตัล ไวโอเลต (crystal violate)	(Hopkin and Williams, UK)
คอปเปอร์คลอไรด์ ($CuCl_2 \cdot 2H_2O$)	(Univar, Australia)
โคบอลท์คลอไรด์ ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	(Univar, Australia)
ไดโพลแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	(Scharlau, Thailand)
ซาฟรานิน-โอ (Safranin O)	(Hopkin and Williams, UK)

ซิงค์คลอไรด์ ($ZnCl_2$)	(Univar, Australia)
ซิสเทอีนไฮโดรคลอไรด์ (L-cysteine-HCl)	(Hi media, India)
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	(Univar, Australia)
โซเดียมโมลิบเดต ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	(Sigma Aldrich, USA)
ทริปติเคส (Trypticase)	(Hi media, India)
นิกเกิลคลอไรด์ ($NiCl_2 \cdot 6H_2O$)	(Sigma Aldrich, USA)
น้ำตาลกลูโคส (Glucose)	(Univar, Australia)
น้ำตาลไซโลส (Xylose)	(Univar, Australia)
น้ำตาลเซลโลไบโอส (Cellobiose)	(Sigma Aldrich, USA)
น้ำตาลฟรักโทส (Fructose)	(Univar, Australia)
น้ำตาลแมนโนส (Mannose)	(Univar, Australia)
น้ำตาลอะราบินอส (Arabinose)	(Univar, Australia)
บิวทานอล (Butanol)	(Labscan, Thailand)
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	(Univar, Australia)
โพแทสเซียมไอโอไดด์ (KI)	(Univar, Australia)
เฟอร์รัสคลอไรด์ ($FeCl_2 \cdot 4H_2O$)	(Univar, Australia)
เฟอร์ริกคลอไรด์ ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$)	(Sigma Aldrich, USA)
รีซาซูรีน (Resazurin)	(Acros, USA)
มาลาไคท์กรีน (Malachite green)	(Loba Chemie, India)

เมธิล ไวโอเลต	(Sigma Aldrich, USA)
แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	(Univar, Australia)
แมงกานีสคลอไรด์ ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	(Univar, Australia)
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	(Bio Basic Inc., Canada)
เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ (C_2H_5OH)	(CT chemical, Thailand)
เอทานอล 99.9 เปอร์เซ็นต์ (Absolute ethanol)	(Merck, Germany)
แอซีโตน (Acetone)	(Merck, Germany)
แอมโมเนีย (Ammonia)	(Merck, Germany)
แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl)	(Univar, Australia)
แอมโมเนียม ออกซาเลต (ammonium oxalate)	(Univar, Australia)
ไอโอดีน (iodine)	(Univar, Australia)
2, 3 บิวเทนไดออล	(TCI, USA)
Nitroblue tetrazolium chloride	(Sigma Aldrich, USA)
Phenazine methosulfate	(Sigma Aldrich, USA)

3.3 วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.3.1 เก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างคราบเขม่า ฟูน และดิน จากแหล่งที่มีการปลดปล่อยแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์โดยการทำงานของเครื่องยนต์หรือเครื่องจักร ด้วยการใช้ไม้พินสำลีย้ายบนผิววัตถุ และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนทำการคัดแยกแบคทีเรีย ตัวอย่างแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ

1. ตัวอย่างจากท่อไอเสียรถยนต์ชนิดต่างๆ ที่รถที่ใช้ น้ำมันเบนซิน ดีเซล แก๊สโซฮอล์ และแก๊ส จำนวน 30 คัน
2. ตัวอย่างจากท่อส่งแก๊สในโรงงานอุตสาหกรรม จังหวัดระยอง คือ บริเวณท่อส่งแก๊สขาเข้าและขาออก ดิน และตะกอนดินจากบ่อตกตะกอน จำนวน 8 จุด

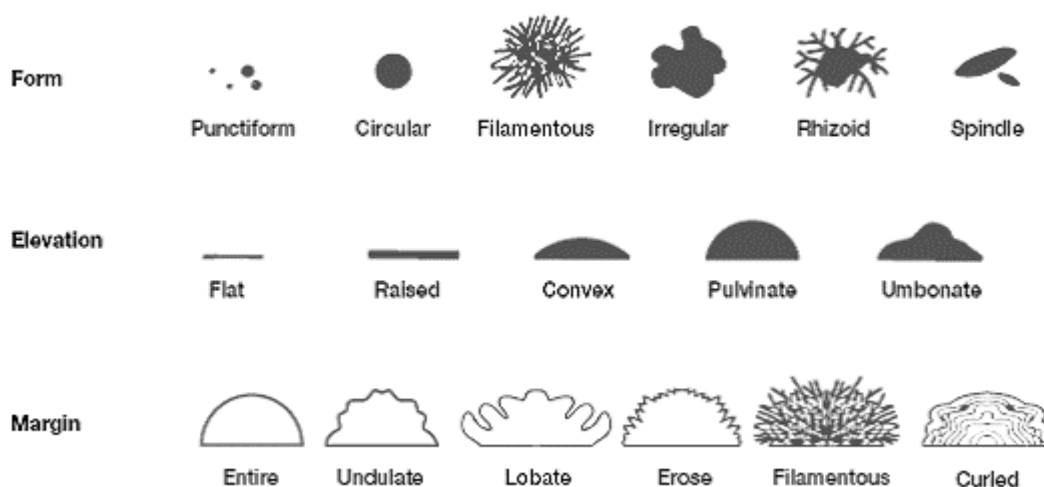
3.3.2 คัดแยกเชื้อแบคทีเรียให้บริสุทธิ์

3.3.2.1 การคัดแยกเชื้อ นำสำลีย้ายเก็บตัวอย่างจากไม้พินสำลียิ่งในอาหารเหลว สูตร DSMZ640 ที่มีแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 20 เปอร์เซ็นต์กับแก๊สไนโตรเจน 80 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหาร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 และ 45 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนที่มีแก๊สไนโตรเจน 80 เปอร์เซ็นต์และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 7 วัน สังเกตการเจริญของเชื้อจากความขุ่นและการเกิดฟองแก๊ส จากนั้นถ่ายเชื้อลงอาหารใหม่ทำอย่างน้อย 3 ซ้ำ เพื่อให้ได้เชื้อที่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอนได้อย่างแท้จริง

3.3.2.2 การแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ ทำการดูดสารละลายเชื้อในข้อ 3.3.2.1 จำนวน 100 ไมโครลิตรลงบนอาหารแข็ง DSMZ640 ที่มีน้ำตาลเซลโลโบไอส 5 กรัมต่อลิตร ใช้แท่งแก้วรูปตัวแอล เกลี่ยจนผิวหน้าอาหารแห้ง บ่มในตู้เพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในสภาพไร้ออกซิเจน (Bactron anaerobic chamber, Sheldon, USA) ที่อุณหภูมิ 37 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เลือกโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกันไปแยกเป็นโคโลนีเดี่ยว โดยใช้ลูปเขี่ยโคโลนีของเชื้อ 1 โคโลนี มาขีดลาก (cross streak) บนอาหารแข็ง DSMZ640 ทำซ้ำจนได้โคโลนีเดี่ยวอย่างน้อย 20 ไอโซเลต

3.3.3 ศึกษาทางสัณฐานวิทยาคุณลักษณะทางกายภาพและคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

3.3.3.1 ศึกษาลักษณะรูปร่างเซลล์ การจัดเรียงตัว และการติดสีแกรมของแบคทีเรียนำไอโซเลตที่คัดแยกได้จากข้อ 3.3.2.2 มาศึกษาลักษณะสี (color) ขนาด (size) รูปร่าง (form) ขอบ (margin) และการยกตัวของผิวโคโลนี (elevation) พร้อมทั้งทดสอบการติดสีย้อมและส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์



ภาพที่ 3.1 ลักษณะของรูปร่าง ขอบและการยกตัวของผิวโคโลนีบนอาหารแข็ง

3.3.3.2 ความสามารถในการสร้างสปอร์ (Petitdemange และคณะ, 1984) นำไอโซเลตที่แยกได้จากข้อ 3.3.2.2 มาป้ายบนสไลด์ทำการเกลี่ยเชื้อให้บางด้วยลูกปัด จากนั้นนำมาย้อมสีด้วยมาลาไคท์กรีนความเข้มข้น 5% โดยหยดสีให้ท่วมรอยเชื้อที่เกลี่ยไว้ วางสไลด์บนไอน้ำเดือดนาน 10 นาที คอยระวังไม่ให้สไลด์แห้ง จากนั้นล้างด้วยน้ำ ทิ้งไว้ให้แห้งแล้วย้อมสีด้วยซาฟรานิน-โอโนาน 1 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำ ชับให้แห้ง นำไปส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์ สปอร์จะติดสีเขียวของมาลาไคท์กรีนและตัวเซลล์จะติดสีแดงของซาฟรานิน-โอ

3.3.3.3 การศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีโดยการศึกษาการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ ได้แก่ กลูโคส เซลโลโบโอส แมนโนส อะราบิโนส ไซโลส และฟรุคโตส เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร โดยดัดแปลงจากอาหารเหลวสูตร DSMZ 640 ที่มีแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหาร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 และ 45 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนที่มีแก๊สไนโตรเจน 80 เปอร์เซ็นต์และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 20 เปอร์เซ็นต์ (Abrini และคณะ, 1994) เป็น

เวลา 7 วัน เก็บตัวอย่างเพื่อนำไปวิเคราะห์หาความสามารถการใช้สารตั้งต้นและผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี

3.3.4 ระบุชนิดของแบคทีเรียที่แยกได้ โดยการวิเคราะห์ลำดับเบส 16S rDNA และวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree)

3.3.4.1 การเตรียมดีเอ็นเอแม่แบบ นำไอโซเลตที่ได้จากข้อ 3.3.2.2 มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร DSMZ640 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน เก็บตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4000 rpm นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติมน้ำละลายบัฟเฟอร์ 1X TE ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าผสมสาร จากนั้นนำมาสกัดดีเอ็นเอโดยชุดสกัด Bacterial DNA kit (OMEGA Bio-Tek, USA)

3.3.4.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อตำแหน่ง 27F (5'AGAGTTTGATCATGGCTCAG 3') และ 1492R (5' GGTACCTTGTTACGACTT 3') (Gillan และคณะ, 1998) ทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส (polymerase chain reaction: PCR) โดยมีส่วนผสมของสารต่างๆตามตารางที่ 3.1 ทำปฏิกิริยาทั้งหมด 30 รอบ ประกอบด้วย initial-denature ที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที denature ที่ 98 องศาเซลเซียส นาน 10 วินาที annealing ที่ 55 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และ final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 วินาที จากนั้นตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาด 1600 คู่เบส โดยทำเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

ตารางที่ 3.1 ส่วนผสมสารและความเข้มข้นในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส ที่ปริมาณ 50 ไมโครลิตร

สาร	ความเข้มข้นสุดท้าย
Phusion HF buffer	1X
dNTPs	0.2 mM
ไพรเมอร์ 27F	1.0 uM
ไพรเมอร์ 1492R	1.0 uM
ดีเอ็นเอแม่แบบ	1.0 ug
Phusion DNA polymerase	1.25 U

3.3.4.3 วิเคราะห์หาลำดับเบส (sequencing) นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ข้อ 3.3.4.2 ส่งวิเคราะห์หาลำดับเบส (PacificSci, Thailand) และนำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank โดยใช้ Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) เลือกโปรแกรม nucleotide-nucleotide BLAST (blastn) (Altschul และคณะ, 1990) เพื่อเป็นข้อมูลประกอบในการระบุชนิดของ *Clostridium* spp. และนำข้อมูลมาเปรียบเทียบวิเคราะห์ลำดับเบสโดยโปรแกรม ClustalW2 เวอร์ชัน 2.0 (Thompson และคณะ, 1994) เลือกโปรแกรมการทำ multiple sequence alignment เพื่อเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของแต่ละไอโซเลต

3.3.4.4 การสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ข้อ 3.3.4.3 มาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยโปรแกรม Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) version 4.0 (Tamura และคณะ, 2007) เพื่อสร้าง Neighbour-joining (NJ) tree ที่มีค่า bootstrap จำนวน 1000 ซ้ำ

3.3.5 ตรวจสอบที่เกี่ยวข้องกับการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ *acsA* และ *acsE*

3.3.5.1 ออกแบบไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบยีน *acsA* และ *acsE* จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Clostridium* spp. 3 สายพันธุ์ได้แก่ *C. autoethanogenum* (GenBank HQ876031), *C. carboxidivorans* (GenBank HM590563) และ *C. ljungdahlii* (GenBank NC_014328) ที่มีรายงานว่ามีความสามารถในการใช้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอนได้ โดยการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *acsA* และ *acsE* โดยโปรแกรม clustalW เลือกโปรแกรมการทำ multiple sequence alignment ร่วมกับโปรแกรม Primer3 (Rozen และคณะ, 1999) เพื่อเลือกบริเวณอนุรักษ์ที่เหมาะสมต่อการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน

3.3.5.2 สกัดดีเอ็นเอจากเชื้อ *Clostridium* sp. ที่คัดแยกได้ โดยชุดสกัด Bacterial DNA kit และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *acsA* และ *acsE* ด้วยไพรเมอร์จำเพาะจากข้อ 3.3.5.1 โดยทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน ตรวจสอบขั้นดีเอ็นเอโดยทำเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส และส่งวิเคราะห์หาลำดับเบส

3.3.5.3 วิเคราะห์ความแตกต่างของยีน *acsA* และ *acsE* จำนวนเบส ปริมาณ GC content และวิเคราะห์หาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยโปรแกรม MEGA4 เพื่อสร้าง Neighbour-joining (NJ) tree ที่มีค่า bootstrap จำนวน 1000 ซ้ำ

3.3.6 ศึกษาความสามารถในการหมักโดยใช้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์แบบไร้ออกซิเจนจาก *Clostridium* sp. ที่คัดแยกได้ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร

คัดเลือกเชื้อ *Clostridium* sp. ที่มีสามารถผลิตเอทานอล บิวทานอล และ 2, 3 บิวเทนไดออล ได้สูงสุดในระดับ 30 มิลลิลิตร (small scale) มาทำการหมักในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร ในอาหารเหลวสูตร DSMZ 640 ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนที่มีแก๊สไนโตรเจน 80 เปอร์เซ็นต์ และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 20 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส pH เริ่มต้น 6.8 ปั่นกวนด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที (พารามิเตอร์ ส่งเสริมพานิช, 2553) ทำการเก็บตัวอย่างปริมาณ 25 มิลลิลิตรทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 5 วัน

3.3.7 วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของการเติบโต กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอนมอนอกไซด์ดีไฮโดรจีเนสและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมัก

3.3.7.1 วิเคราะห์หาปริมาณเอทานอล บิวทานอล 2, 3 บิวเทนไดออล ที่เกิดจากกระบวนการหมัก โดยนำตัวอย่างจากข้อ 3.3.6 จำนวน 1 มิลลิลิตร มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาทีนาน 10 นาที ดูดส่วนใส 700 ไมโครลิตรบรรจุลงในหลอดแก้วขนาดเล็ก นำไปวิเคราะห์หาผลิตภัณฑ์จากกระบวนการหมักด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (GC-2010A Shimadzu, Japan) ด้วยคอลัมน์ DB-WAX (Agilent Technologies, USA) และตัวตรวจจับ (Detector) แบบ flame ionization detector (FID) โดยใช้อุณหภูมิคอลัมน์ 45 องศาเซลเซียส หัวฉีด (Injector) 250 องศาเซลเซียส และตัวตรวจจับ 260 องศาเซลเซียส มีแก๊สฮีเลียมเป็นตัวนำ (Carrier gas) ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารได้จากการนำพื้นที่ใต้กราฟของสารไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นของสาร

3.3.7.2 วัดการเติบโตของแบคทีเรีย โดยนำตัวอย่างข้อ 3.3.6 มาวัดความขุ่นของเชื้อด้วยเครื่อง Zenyth 200rt spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตร

คำนวณหาจำนวนเซลล์จากกราฟมาตรฐาน (standard curve) ระหว่างความสัมพันธ์ของความขุ่นกับจำนวนเซลล์

3.3.7.3 วัดน้ำหนักเซลล์แห้ง กรองสารละลายเชื้อผ่านกระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.2 นาโนเมตร อบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และชั่งน้ำหนักหาความแตกต่างของน้ำหนักกระดาษกรองก่อนกรองเซลล์และหลังกรองเซลล์

3.3.7.4 วัดปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ในอาหารเลี้ยง โดยวิเคราะห์ด้วยชุด HI3818 Carbon Dioxide Test kit (HANNA Instrument, Romania) โดยส่วนใสจากตัวอย่างในข้อ 3.3.6 ปริมาณ 5 มิลลิลิตร หยดฟีนอล์ฟทาลีน จากนั้นไทเทรตด้วย HI 3818-0 solution จนอาหารเลี้ยงเปลี่ยนเป็นสีชมพู บันทึกปริมาณสารละลายที่ไทเทรต คำนวณหาปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์โดยคูณด้วย 100 จะได้ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ (มิลลิกรัมต่อลิตร)

3.3.7.5 วัดกิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอนมอนอกไซด์ดีไฮโดรจีเนส โดยดัดแปลงจากวิธีของ Lorite และคณะ (2000) นำตัวอย่างจากข้อ 3.3.6 จำนวน 20 มิลลิลิตร มาด้วยการปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเก็บเกี่ยวเซลล์ออกจากส่วนใสที่ความเร็ว 4,000 rpm ล้างเซลล์ด้วย potassium phosphate เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส กิจกรรมของเอนไซม์วัดจากปฏิกิริยารีดักชันของ nitroblue tetrazolium chloride (NBT) ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร เตรียมสารผสมที่ใช้ในการวัดปฏิกิริยา ซึ่งประกอบด้วย NBT ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมล PMS ความเข้มข้น 1 มิลลิโมล และ Tris-HCl buffer pH 7.5 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมล สารละลายที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาจะถูกไล่ออกซิเจนด้วยแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์อย่างน้อย 20 นาที เติมสารละลายเซลล์แล้วนำไปปั่นที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และให้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ตลอดการทดลอง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร บันทึกผลและคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ โดยใช้กฎของเบียร์และแลมเบิร์ต

3.3.7.6 วัดปริมาณโปรตีนทั้งหมด วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford นำสารละลายเซลล์ในข้อ 3.3.7.5 20 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย 1X Dye Reagent 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับกราฟโปรตีนมาตรฐาน Bovine serum albumin (BSA) เพื่อดูปริมาณโปรตีนที่ใช้ในการทดลองแต่ละครั้ง

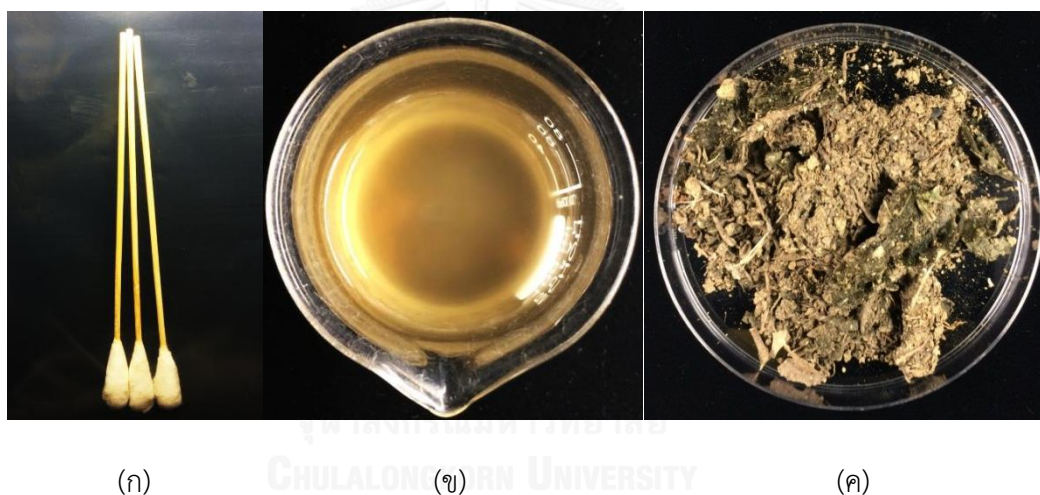
บทที่ 4

ผลการทดลอง

ผลการวิเคราะห์

4.1 ตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัย

การเก็บตัวอย่างคราบเขม่า ฝุ่น และดิน จากบริเวณที่มีแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (ภาพที่ 4.1) จำนวน 38 ตัวอย่าง โดยแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ ตัวอย่างจากห้องส่งแก๊สโรงงานอุตสาหกรรม จังหวัดระยอง 8 ตัวอย่าง (ตารางที่ 4.1) และตัวอย่างจากท่อไอเสียรถ 30 ตัวอย่าง (ตารางที่ 4.2)



ภาพที่ 4. 1 ตัวอย่างคราบเขม่า ฝุ่น และดิน จากท่อลำเรียงแก๊สบริเวณต่างของโรงอุตสาหกรรม จังหวัดระยองและท่อไอเสียรถ (ก) ตัวอย่างที่เก็บด้วยไม้พันสำลี (ข) ตัวอย่างน้ำและตะกอนดินจาก บ่อตกตะกอน (ค) ดินบริเวณท่อส่งแก๊ส

พื้นที่ในการเก็บตัวอย่างที่โรงงานอุตสาหกรรมแบ่งออกเป็น 2 บริเวณ คือ พื้นที่สำหรับการ แยกแก๊ส ได้แก่ พื้นที่ผลิตไอน้ำและหล่อเย็น ซึ่งมีอุณหภูมิสูง (40-60 องศาเซลเซียส) และพื้นที่ถึงเก็บ ผลิตภัณฑ์เพื่อเตรียมจัดส่ง ซึ่งมีอุณหภูมิต่ำ (35-40 องศาเซลเซียส) ในบริเวณดังกล่าวประกอบด้วย แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ แก๊สไนโตรเจน แก๊สไฮโดรเจนซัลไฟด์ และแก๊สอื่นๆ

ตารางที่ 4.1 ตัวอย่างจากบริเวณท่อส่งแก๊สในโรงงานอุตสาหกรรมจังหวัดระยอง

ลำดับ	รหัส	แหล่งที่เก็บตัวอย่าง	แก๊ส	อุณหภูมิ
1	CUBi	ท่อบริเวณเหนือท่อแยกแก๊ส 01	แก๊สผสม	40-45°C
2	CUBo	ท่อบริเวณใต้ท่อแยกแก๊ส 01	แก๊สผสม	40-45°C
3	CUQ	ตะกอนดินจากบ่อดักตะกอน	แก๊สผสม	40-60°C
4	CUK	ท่อส่งแก๊สผสม TK	แก๊สผสม	40-45°C
5	CUW	ท่อส่งแก๊สผสม TW	แก๊สผสม	35-40°C
6	CUi	ท่อส่งแก๊ส ขาเข้า	CO ₂ และ H ₂	35-40°C
7	CUo	ท่อส่งแก๊ส ขาออก	CO ₂	35-40°C
8	CUSL	ดินบริเวณรอบท่อส่งแก๊ส	-	35-40°C

ตัวอย่างจากท่อไอเสยรถยนต์ ได้จากคราบเขม่าของไอเสยที่ออกมาจากเครื่องยนต์ระหว่างการเผาไหม้ของน้ำมันกับอากาศ ก่อให้เกิดแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ คาร์บอนมอนอกไซด์ ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ไนโตรเจนออกไซด์ ฟอสฟอรัส และโลหะบางชนิด ซึ่งจะถูกลดปล่อยสู่ชั้นบรรยากาศ

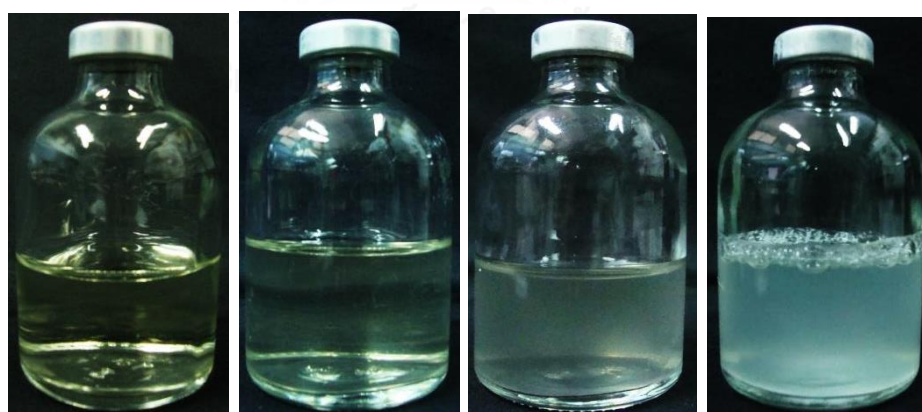
ตารางที่ 4.2 ตัวอย่างจากท่อไอเสยรถยนต์ชนิดต่างๆ

ลำดับ	รหัส	แหล่งที่มา	ลำดับ	รหัส	แหล่งที่มา	ลำดับ	รหัส	แหล่งที่มา
1	CPN	Nissan	11	CPF	Toyota	21	CMK	Nissan
2	CVW	Honda	12	CPK	Toyota	22	CYK	Toyota
3	CRK	Toyota	13	CTW	Toyota	23	CCI	Toyota
4	CVA	Van	14	CNC	Nissan	24	CVI	Toyota
5	CUN	Pick up	15	CSC	Suzuki	25	CMC	Chevrolet
6	CLI	Toyota	16	CTV	Toyota	26	CMP	Nissan
7	CLL	ISUZU	17	CTA	Toyota	27	CAI	Toyota
8	CAO	ISUZU	18	CHC	Honda	28	CCW	Toyota
9	CMY	ISUZU	19	CBE	Benz	29	CPA	Toyota
10	CPH	Chevrolet	20	CBP	Benz	30	CMZ	ISUZU

4.2 การคัดแยกเชื้อให้บริสุทธิ์

จากการคัดแยกเชื้อในอาหารเหลวสูตร DSMZ640 ที่มีแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 37 และ 45 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนที่ถูกแทนที่ด้วยแก๊สไนโตรเจน 80 เปอร์เซ็นต์และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 7 วัน และถ่ายเชื้อลงอาหารใหม่อย่างน้อย 3 ชั่วโมง เพื่อให้ได้เชื้อที่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ โดยสังเกตจากความขุ่นของอาหารและการสร้างฟองแก๊สของเชื้อ (ภาพที่ 4.2) พบว่าผลจากการถ่ายเชื้อ 3 ชั่วโมงก่อนการคัดแยกบนอาหารแข็ง ซึ่งขั้นตอนดังกล่าวเป็นกระบวนการที่สามารถคัดเลือกเชื้อที่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่กำหนดได้เบื้องต้น เมื่อนำสารละลายเชื้อมาคัดแยกบนอาหารแข็ง จึงได้เชื้อที่มีลักษณะของโคโลนีที่แตกต่างกันน้อยมาก จากการคัดแยกเชื้อในครั้งนี้ได้เชื้อทั้งหมด 21 ไอโซเลตจาก 19 ตัวอย่าง (ตารางที่ 4.3)

เชื้อที่คัดแยกได้จากท่อส่งแก๊สในโรงงานอุตสาหกรรมส่วนใหญ่เจริญได้ดีที่ 37 และ 45 องศาเซลเซียส ยกเว้นไอโซเลต CUW ที่สามารถเจริญได้เพียงเล็กน้อยที่อุณหภูมิ 37 และไม่พบการเจริญของเชื้อที่ 45 องศาเซลเซียส ในขณะที่เชื้อที่คัดแยกได้จากท่อไอเสียส่วนใหญ่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แต่เจริญได้เพียงเล็กน้อยที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ยกเว้นไอโซเลต CPN ที่สามารถเจริญได้ดีทั้งอุณหภูมิ 37 และ 45 องศาเซลเซียส



(ก)

(ข)

(ค)

(ง)

ภาพที่ 4. 2 ลักษณะสี ความขุ่น และการเกิดฟองของอาหารที่เปลี่ยนไป (ก) อาหารเหลว DSMZ 640 ปราศจากเชื้อ ซึ่งใช้เป็นชุดควบคุมการทดลอง (Negative control) (ข) ลักษณะอาหารที่ไม่มีเชื้อเจริญเติบโต (ค) ลักษณะอาหารที่มีเชื้อเติบโตได้เล็กน้อย และ (ง) ลักษณะอาหารในขวดที่มีเชื้อ

ตารางที่ 4.3 ชื่อและจำนวนไอโซเลตที่คัดแยกได้จาก 38 ตัวอย่าง

ลำดับ	ชื่อ	จำนวนไอโซเลตที่คัดแยกได้	อุณหภูมิ (°C)	
			37	45
1	CUi	1	+++	+++
2	CUo	1	+++	+++
3	CUK	1	+++	+++
4	CUW	1	+	-
5	CUSL	2	+++	+++
6	CAI	1	+++	+
7	CBP	1	+++	+
8	CCI	1	+++	+
9	CCW	1	+++	+
10	CHC	2	+++	+
11	CMC	1	+++	+
12	CMK	1	+++	+
13	CMZ	1	+	+
14	CNC	1	+++	+
15	CPA	1	+++	+
16	CPK	1	+++	+
17	CPN	1	+++	+++
18	CTV	1	+++	+
19	CVI	1	+++	+

หมายเหตุ +++ คือ เจริญได้ดี; + เจริญได้แต่ไม่ค่อยดี และ - ไม่เจริญ

4.3 ศึกษาทางสัณฐานวิทยาคุณลักษณะทางกายภาพและคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

4.3.1 การศึกษาทางสัณฐานวิทยา และคุณลักษณะทางกายภาพของแบคทีเรีย

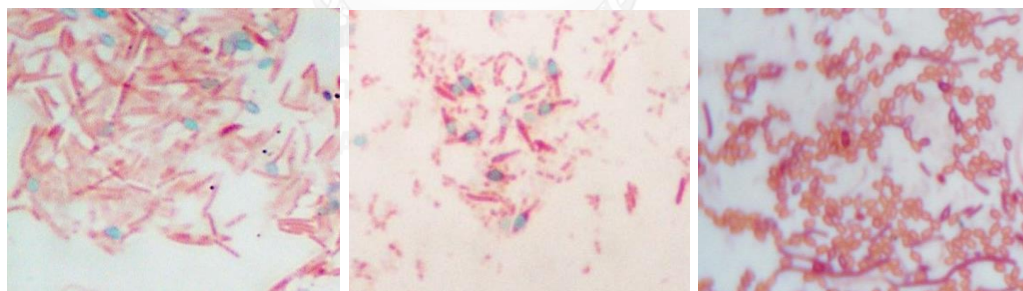
ตารางที่ 4.4 ลักษณะรูปร่าง สี ความหนูน ขอบของโคโลนี รูปร่างเซลล์ และการติดสีแกรมทั้ง 21 ไอโซเลต

No.	Name	Size (mm)	Color	Form	Elevation	Margin	Shape	G
1	CUi	2.0-3.0	cream	irregular	umbonate	undulate	rod	+
2	CUo	2.0	cream	circular	umbonate	undulate	rod	-
3	CUK	2.0	cream	irregular	convex	undulate	rod	-
4	CUW	2.0	cream	circular	raised	entire	rod	-
5	CUSL1	2.0	cream	irregular	convex	undulate	rod	-
6	CUSL2	2.0	cream	circular	convex	entire	rod	+
7	CAI	2.0	cream	circular	umbonate	undulate	rod	+
8	CBP	2.0	cream	circular	convex	entire	rod	+
9	CCI	2.0	cream	circular	raised	entire	rod	+
10	CCW	2.0	cream	circular	convex	entire	rod	+
11	CHC1	1.0-2.0	cream	circular	umbonate	undulate	rod	+
12	CHC2	2.0	cream	irregular	umbonate	lobate	rod	+
13	CMC	2.0	cream	circular	convex	entire	rod	+
14	CMK	2.0	cream	circular	convex	entire	rod	+
15	CMZ	2.0	cream	circular	convex	entire	rod	+
16	CNC	2.0-3.0	cream	irregular	convex	undulate	rod	+
17	CPA	1.0-1.5	cream	circular	convex	entire	rod	+
18	CPK	1.0-1.5	cream	circular	convex	erose	cocci	+
19	CPN	2.0-3.0	cream	irregular	convex	undulate	rod	+
20	CTV	2.0-3.0	cream	irregular	convex	entire	rod	+
21	CVI	2.0-3.0	cream	irregular	convex	undulate	rod	+

จากการศึกษาลักษณะโคโลนี รูปร่างเซลล์ และการติดสีแกรมของไอโซเลตที่คัดแยกได้ (ตารางที่ 4.4) พบว่าทุกไอโซเลตมีโคโลนีมีสีครีม ลักษณะของโคโลนีกลม (circular) บางไอโซเลตมีรูปร่างไม่แน่นอน (irregular) การยกตัวสูงมีทั้งแบบยกตัวจากผิวอาหารไม่มากนัก (raised) ยกตัวสูงเพียงเล็กน้อย (convex) และแบบยกตัวสูงมีปุ่มอยู่กลางโคโลนี (umbonate) ลักษณะของขอบของโคโลนีมีความแตกต่างกันไป แบคทีเรียที่คัดแยกได้ส่วนใหญ่มีรูปร่างท่อน (rod) ยกเว้นไอโซเลต CPK มีรูปร่างกลมอยู่กันเป็นคู่และเป็นกลุ่ม การติดสีแกรม พบว่ามี 17 ไอโซเลตที่เป็นแกรมบวกและอีก 4 ไอโซเลตเป็นแกรมลบ (ตารางที่ 4.4)

4.3.2 การสร้างสปอร์

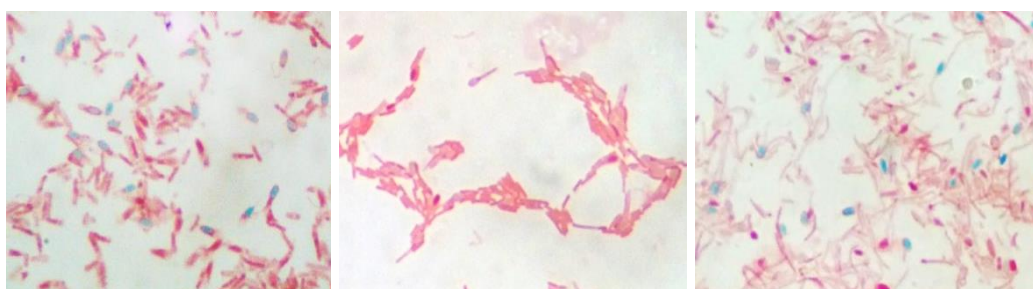
จากการทดสอบความสามารถการสร้างสปอร์ของเชื้อที่คัดแยกได้ พบว่ามี 8 ไอโซเลตจากทั้งหมด 21 ไอโซเลต (ภาพที่ 4.3) สามารถการสร้างเอนโดสปอร์สปอร์ได้ โดย 7 ไอโซเลต (CUI, CPN, CHC1, CHC2, CNC, CTV และ CVI) สปอร์มีรูปร่างคล้ายกับ *C. carboxydivorans* (ภาพที่ 4.3 ก) คือมีสปอร์อยู่บริเวณปลายเซลล์ (terminal spore) มีรูปร่างรี และตัวเซลล์มีรูปร่างท่อน ยกเว้นไอโซเลต CUSL2 สปอร์มีลักษณะกลมบวมจนทำให้ตัวเซลล์มีขนาดใหญ่ ตัวเซลล์ที่ไม่พบการสร้างสปอร์มีลักษณะเป็นสายยาว



(ก)

(ข)

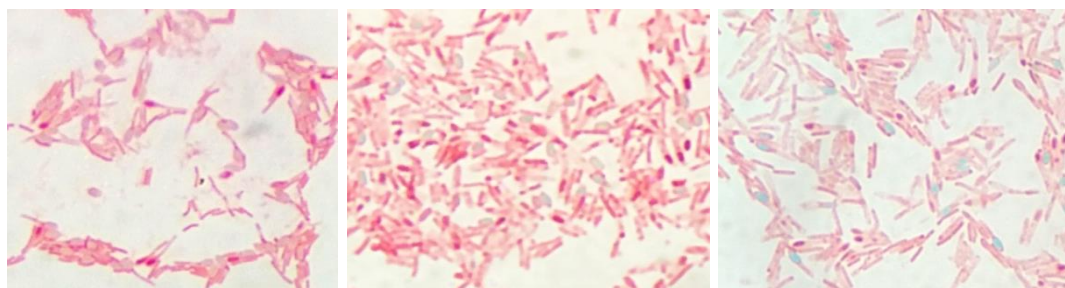
(ค)



(ด)

(ง)

(จ)



(ข)

(ค)

(ง)

ภาพที่ 4.3 การติดสีเขียวจาก Malachite green ของสปอร์ Clostridium carboxydvorans (ก) ไอโซเลต CUi (ข) ไอโซเลต CUSL2 (ค) ไอโซเลต CPN (ง) ไอโซเลต CHC1 (จ) ไอโซเลต CHC2 (ฉ) ไอโซเลต CNC (ช) ไอโซเลต CTV (ซ) ไอโซเลต CVI (ฅ)

4.3.3 การศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมี

ศึกษาการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ได้แก่ กลูโคส เซลโลไบโอส แมนโนส อะราบิโนส ไซโลส และฟรุคโตส (ตารางที่ 4.5) ร่วมกับแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ที่ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร พบว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้ส่วนใหญ่สามารถใช้น้ำตาล C6 (กลูโคส แมนโนส และฟรุคโตส) ได้ดีกว่าน้ำตาล C5 (อะราบิโนส และไซโลส) และน้ำตาลโมเลกุลคู่ (เซลโลไบโอส) มี 2 ไอโซเลตที่สามารถใช้น้ำตาลทั้ง 6 ชนิดได้ คือ ไอโซเลต CUi และ CUK สารผลิตภัณฑ์จากกระบวนการหมักแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ร่วมกับน้ำตาล 1 กรัมต่อลิตร ส่วนใหญ่เป็นกรด ได้แก่ กรดแอสติก และกรดบิวทริก รองลงมาคือ เอทานอล และสารผลิตภัณฑ์ที่พบได้น้อยคือ บิวทานอล และ 2, 3 บิวเทนไดออล ไอโซเลตที่สามารถผลิตได้ทั้งเอทานอล บิวทานอล และ 2, 3 บิวเทนไดออล คือ CUi

ตารางที่ 4.5 แสดงการเปรียบเทียบการใช้น้ำตาลต่างๆและสารผลิตภัณฑ์ของแต่ละไอโซเลต

ลำดับ	ไอโซเลต	การใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ						สารผลิตภัณฑ์*				
		A	C	F	G	M	X	Et	Bu	BD	Ac	Br
1	CUi	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	CUo	W	+	+	+	W	-	-	-	-	+	+
3	CUK	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	W
4	CUW	W	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+
5	CUSL1	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+
6	CUSL2	-	+	W	+	-	-	+	+	W	+	+
7	CAI	-	W	+	+	+	-	+	-	-	+	+
8	CBP	-	W	+	+	+	-	+	-	-	+	+
9	CCI	-	W	+	+	+	-	+	W	W	+	+
10	CCW	-	W	+	+	+	-	+	-	-	+	+
11	CHC1	-	+	+	+	+	W	+	-	+	+	+
12	CHC2	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	W
13	CMC	-	W	+	+	+	-	+	-	-	+	+
14	CMK	-	W	+	+	+	-	+	-	-	+	+
15	CMZ	-	W	+	+	+	-	+	-	-	+	+
16	CNC	+	+	+	+	W	-	W	+	-	+	+
17	CPA	-	W	+	+	+	-	+	-	-	+	+
18	CPK	-	W	+	+	+	-	+	-	-	W	+
19	CPN	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+
20	CTV	+	+	+	+	W	-	+	-	-	+	+
21	CVI	+	+	+	+	W	-	W	+	-	W	+

*หมักด้วยน้ำตาล 1 กรัมและแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 20 เปอร์เซ็นต์

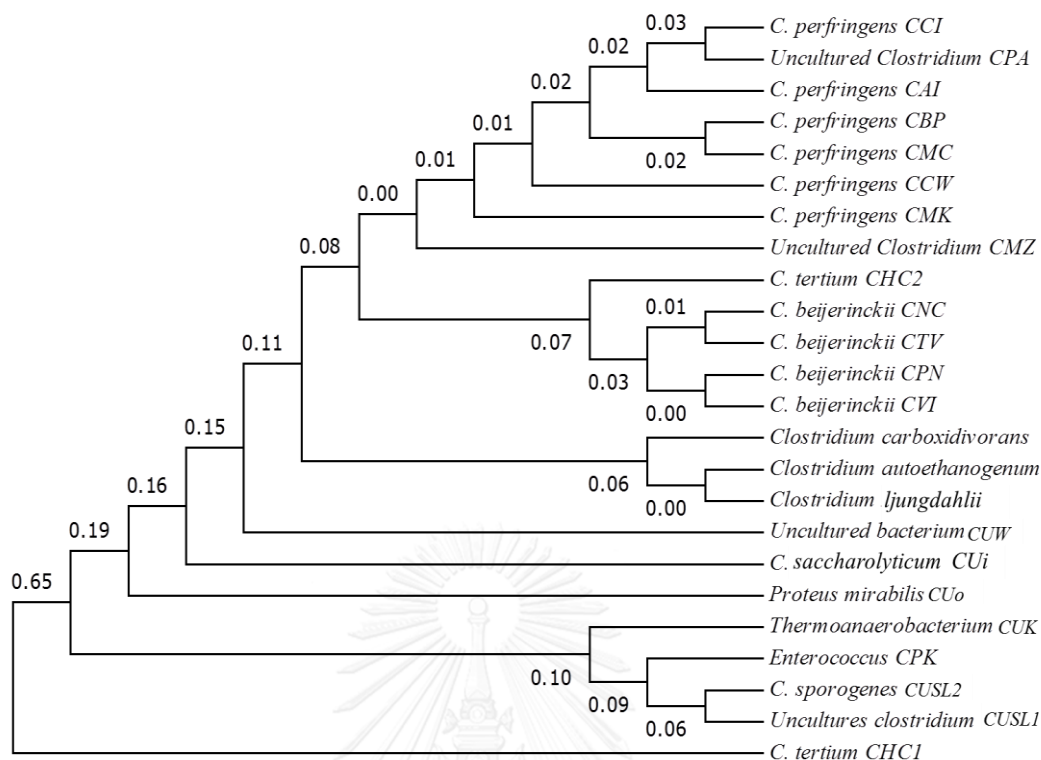
+ เจริญได้ดีหรือพบการผลิต, - ไม่เจริญหรือไม่พบการผลิต, W เจริญได้แต่ไม่ค่อยดีหรือผลิตได้น้อยกว่า 0.2 กรัมต่อลิตร, A อะราบิโนส, C เซลโลโบไอส, F ฟรุคโตส, G กลูโคส, M แมนโนส และ X ไซโลส, Et เอทานอล, Bu บิวทานอล, BD 2, 3 -บิวเทนไดออล, Ac กรดแอสซิติค และ Br กรดบิวทริก

4.4 ระบุชนิดของแบคทีเรียที่แยกได้ โดยการวิเคราะห์ลำดับเบส 16S rDNA และวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree)

จากการวิเคราะห์ลำดับเบสที่บริเวณ 16S rDNA โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อตำแหน่ง 27F และ 1492R พบว่าเป็นแบคทีเรียในสกุลคลอสทริเดียม 14 ไอโซเลต เป็นแบคทีเรียสกุลอื่นๆ 3 ไอโซเลต และไม่สามารถระบุชนิดได้ 4 ไอโซเลต จากตารางที่ 4.6 กลุ่มที่เป็นคลอสทริเดียม ได้แก่ *C. saccharolyticum*, *C. sporogenes*, *C. beijerinckii*, *C. perfringens* และ *C. tertium* ซึ่งค่าความเหมือนของลำดับเบสของยีน 16S rDNA ประมาณ 93-100 เปอร์เซ็นต์ กลุ่มที่ไม่ใช่คลอสทริเดียม ได้แก่ *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, *Proteus mirabilis* และ *Enterococcus hirae* มีค่าความเหมือนของลำดับเบสของยีน 16S rDNA 83 79 และ 96 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และกลุ่มที่ไม่สามารถระบุได้ (Uncultured bacterium และ Uncultured *Clostridium*) จากนั้นนำลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของทั้ง 21 ไอโซเลตมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (ภาพที่ 4.4) ร่วมกับแบคทีเรียในสกุลคลอสทริเดียมที่มีข้อมูลการใช้คาร์บอนไดออกไซด์ ได้แก่ *C. autoethanogenum*, *C. carboxidivorans*, และ *C. ljungdahlii* พบว่าไอโซเลตที่คัดแยกได้จากท่อไอเสียของรถจะอยู่ในกลุ่มเดียวกัน แบ่งออกเป็นกลุ่มของ *C. perfringens* และ *C. beijerinckii* ส่วนแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากท่อส่งแก๊สในโรงงานอุตสาหกรรม ถูกจัดอยู่ในอีกกลุ่ม

ตารางที่ 4.6 การระบุชนิดของแบคทีเรียที่แยกได้โดยการวิเคราะห์ลำดับเบส 16S rDNA

ลำดับ	ไอโซเลต	Clostridium spp.	% ความเหมือน	Accession No.
1	CUI	<i>C. saccharolyticum</i>	93%	CP002109.1
2	CUSL2	<i>C. sporogenes</i>	99%	HG813109.1
3	CNC	<i>C. beijerinckii</i>	96%	CP006777.1
4	CPN	<i>C. beijerinckii</i>	100%	KC915012.1
5	CTV	<i>C. beijerinckii</i>	96%	CP006777.1
6	CVI	<i>C. beijerinckii</i>	99%	KC851824.1
7	CAI	<i>C. perfringens</i>	99%	JF764801.1
8	CBP	<i>C. perfringens</i>	95%	FN356962.1
9	CCI	<i>C. perfringens</i>	97%	BA000016.3
10	CCW	<i>C. perfringens</i>	99%	JF764804.1
11	CMC	<i>C. perfringens</i>	98%	NR121697.1
12	CMK	<i>C. perfringens</i>	98%	JX267106.1
13	CHC1	<i>C. tertium</i>	96%	JX267105.1
14	CHC2	<i>C. tertium</i>	96%	JX267105.1
15	CPA	Uncultured <i>Clostridium</i>	96%	JN792371.1
16	CMZ	Uncultured <i>Clostridium</i>	96%	JQ940553.1
17	CPK	<i>Enterococcus hirae</i>	96%	JQ411243.1
18	CUo	<i>Proteus mirabilis</i>	79%	LN558623.1
19	CUK	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	83%	KM036188.1
20	CUW	Uncultured bacterium	98%	KF105272.1
21	CUSL1	Uncultured bacterium	98%	JF185885.1



ภาพที่ 4. 4 แผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ โดยวิธีการสร้าง Neighbour-joining (NJ) tree ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของ 24 ไอโซเลต

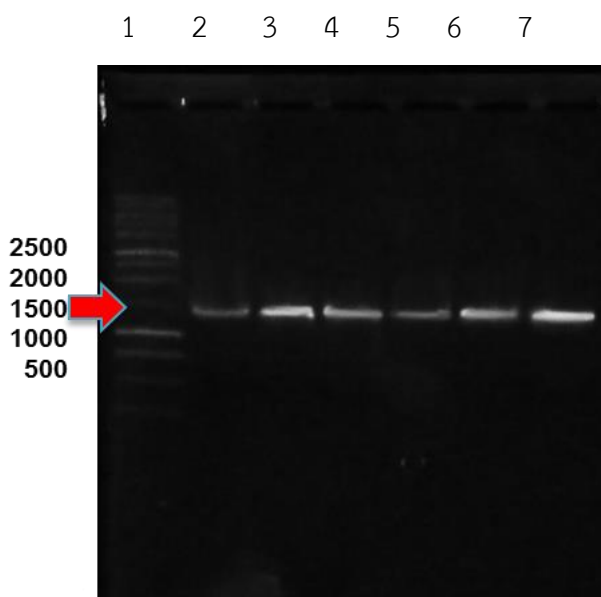
4.5 ตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ *acsA* และ *acsE*

ไพรเมอร์สำหรับตรวจหายีน *acsA* และ *acsE* ถูกออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Clostridium* spp. 3 สายพันธุ์ได้แก่ *C. autoethanogenum* (GenBank HQ876031), *C. carboxidivorans* (GenBank HM590563) และ *C. ljungdahlii* (GenBank NC_014328) พบว่าไพรเมอร์ของยีน *acsA* สามารถตรวจหายีนสำหรับสร้างเอนไซม์คาร์บอนมอนอกไซด์ดีไฮโดรจีเนส (CODH) ในคลอสทริเดียมได้ (ภาพที่ 4.4) โดยพบยีน *acsA* ในไอโซเลต *Clostridium* sp. CUi ไอโซเลต *C. beijerinckii* CNC ไอโซเลต *C. beijerinckii* CPN ไอโซเลต *C. beijerinckii* CTV ไอโซเลต *C. beijerinckii* CVI และไอโซเลต *C. perfringens* CCI แต่ไม่พบยีน *acsE* ในทุกไอโซเลตที่คัดแยกได้ (ตารางที่ 4.7)

ตารางที่ 4.7 แสดงผลการตรวจหายีน *acsA* และ *acsE* ถูกออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Clostridium* spp. 3 สายพันธุ์ *C. autoethanogenum*, *C. carboxidivorans* และ *C. ljungdahlii*

ลำดับ	ไอโซเลต	<i>Clostridium</i> sp.	<i>acsA</i>	<i>acsE</i>
1	CUI	<i>C. saccharolyticum</i>	+	-
2	CUSL2	<i>C. sporogenes</i>	-	-
3	CNC	<i>C. beijerinckii</i>	+	-
4	CPN	<i>C. beijerinckii</i>	+	-
5	CTV	<i>C. beijerinckii</i>	+	-
6	CVI	<i>C. beijerinckii</i>	+	-
7	CAI	<i>C. perfringens</i>	-	-
8	CBP	<i>C. perfringens</i>	-	-
9	CCI	<i>C. perfringens</i>	+	-
10	CCW	<i>C. perfringens</i>	-	-
11	CMC	<i>C. perfringens</i>	-	-
12	CMK	<i>C. perfringens</i>	-	-
13	CHC1	<i>C. tertium</i>	-	-
14	CHC2	<i>C. tertium</i>	-	-

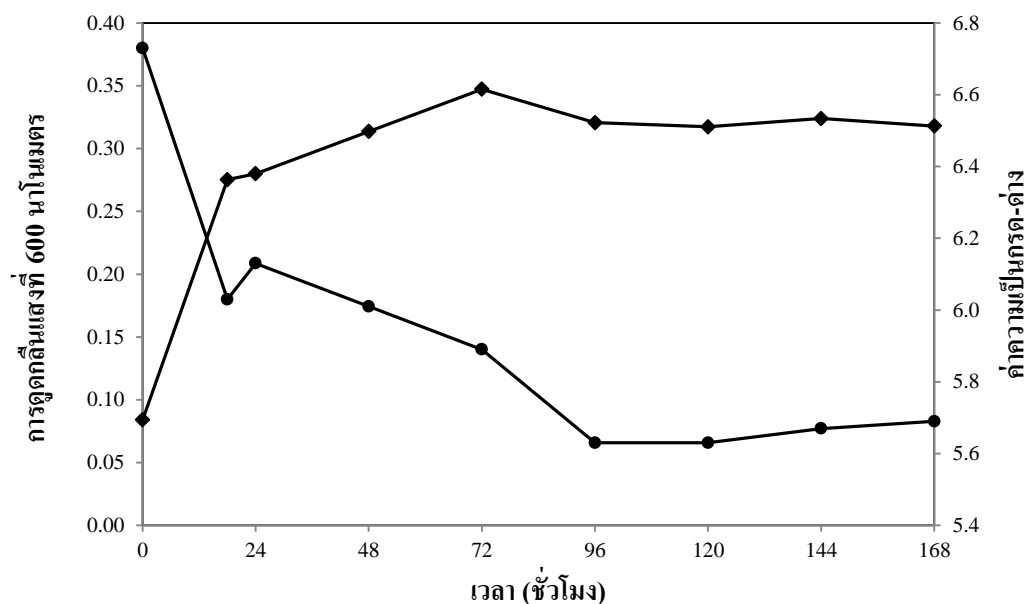
+ พบยีน - ไม่พบยีน



ภาพที่ 4. 5 การตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ของยีน *acsA* โดยเจลอิเล็กโตรโพลีซิส ช่องที่ 1 ladder 1kb ช่องที่ 2 *C. carboxidivoeans* ช่องที่ 3 ไอโซเลต CNC ช่องที่ 4 ไอโซเลต CTV ช่องที่ 5 ไอโซเลต CVI ช่องที่ 6 ไอโซเลต CUI และช่องที่ 7 ไอโซเลต CCI

4.6 ศึกษาความสามารถในการหมักโดยใช้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์แบบไร้ออกซิเจนจากคลอสทริเดียมที่คัดแยกได้ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร

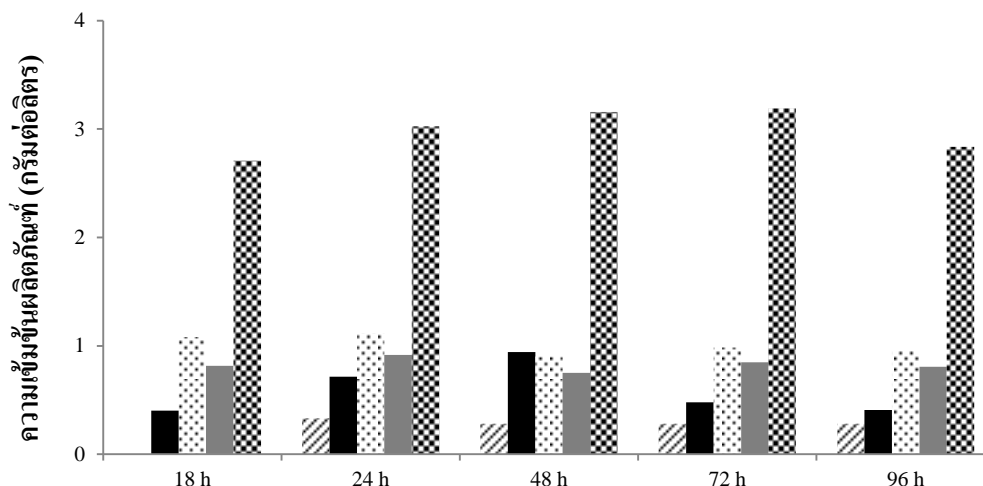
จากคุณสมบัติของ *Clostridium* sp. CUI ที่คัดแยกได้จากท่อส่งแก๊สในโรงงานอุตสาหกรรมจังหวัดระยองสามารถใช้น้ำตาลได้ทั้ง C5 C6 และโมเลกุลคู่ ร่วมกับแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ได้ ทั้งยังสามารถผลิตสารที่ต้องการได้ทั้ง 3 ชนิด คือ เอทานอล บิวทานอล และ 2, 3 บิวเทนไดออล นอกจากนี้ยังพบยีน *acsA* ที่ควบคุมการทำงานของเอนไซม์คาร์บอนมอนอกไซด์ดีไฮโดรจีเนส จึงถูกคัดเลือกมาผลิตตัวทำละลายในถังหมักขนาด 5 ลิตร ด้วยอาหารเหลว DSMZ640 พบว่าไอโซเลต CUI มีช่วง Log phase ที่นานถึง 48 ชั่วโมง และเข้าสู่ช่วง Stationary phase หลังจากชั่วโมงที่ 72 (ภาพที่ 4.6) การใช้น้ำตาลเซลโลไบโอสในกระบวนการหมักพบว่าไอโซเลต CUI ใช้น้ำตาลหมดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 และมีน้ำหนักเซลล์แห้ง 955 มิลลิกรัมต่อลิตร



ภาพที่ 4. 6 กราฟแสดงการเปรียบเทียบระหว่างเวลากับการเจริญ (◆) และค่าความเป็นกรด-ด่าง (●) ระหว่างกระบวนการหมักแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ด้วย *Clostridium* sp. CUi ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีอาหารเหลวตัดแปลง DSMZ640 เป็นเวลา 168 ชั่วโมง

การสร้างกรดในกระบวนการหมักของ *Clostridium* sp. CUi พบว่าสารผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่เป็นกรดบิวทริก มีการผลิตสูงสุดที่ชั่วโมง 72 (3.12 กรัมต่อลิตร) และลดลงหลังจากชั่วโมงที่ 72 ซึ่งสอดคล้องกับค่าความเป็นกรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 24 ชั่วโมงแรก และค่อยๆลดลงจนกระทั่งชั่วโมงที่ 96 (ภาพที่ 4.6) ในขณะที่ความเข้มข้นของกรดแอสติกสูงสุด 0.92 กรัมต่อลิตร

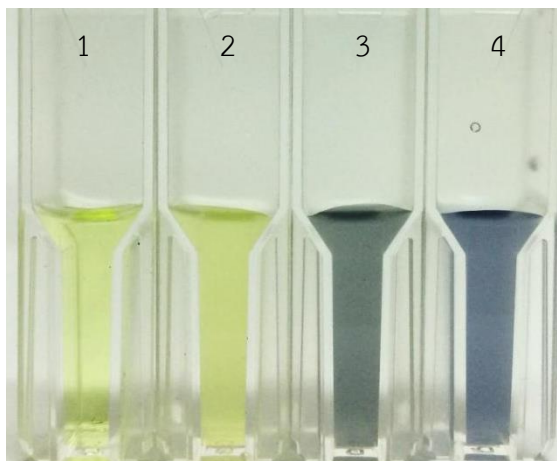
การผลิตตัวทำละลายอย่างเอทานอล บิวทานอล และ 2, 3 บิวเทนไดออล จากการหมักแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ร่วมกับน้ำตาลเซลโลไบโอส 1 กรัมต่อลิตรของ *Clostridium* sp. CUi พบว่า ผลิตเอทานอลได้สูงสุด 0.94 กรัมต่อลิตรที่ 48 ชั่วโมง ในขณะที่การผลิตบิวทานอลสูงสุดที่ 1.11 กรัมต่อลิตรที่ 24 ชั่วโมง และมีการผลิต 2, 3 บิวเทนไดออล ได้เล็กน้อยประมาณ 0.28 กรัมต่อลิตร การสร้างสารผลิตภัณฑ์ทั้งหมดถูกผลิตในช่วงหลัง Log phase คือ 72 ชั่วโมงแรก หลังจากนั้นปริมาณสารเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยและเริ่มคงที่ โดยมีความเข้มข้นสารผลิตภัณฑ์รวมสูงสุด 5.78 กรัมต่อลิตร



ภาพที่ 4. 7 การเปรียบเทียบการผลิตสารละลาย 2, 3 บิวเทนไดออก (/) เอทานอล (■) บิวทานอล (∴) กรดแอสติก (■) และกรดบิวทริก (▨) ที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการหมักคาร์บอนไดออกไซด์ร่วมกับน้ำตาลเซลโลไบโอส 1 กรัมต่อลิตร ด้วย *Clostridium* sp. CUi ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่ช่วงเวลาต่างๆ

4.7 วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของการเติบโต กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอนมอนอกไซด์ดีไฮโดรจีเนส และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมัก

วัดกิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอนมอนอกไซด์ดีไฮโดรจีเนสโดยดัดแปลงจากวิธีของ Lorite และคณะ (2000) ดูการเปลี่ยนแปลงสีของ nitroblue tetrazolium ที่เกิดขึ้นหลังจากรับอิเล็กตรอนจากปฏิกิริยาการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ จากสีเหลืองเป็นสีม่วง ดังภาพที่ 4.7 ทำการเปรียบเทียบกับ Positive control (*C. carboxidivorans*) และ Negative control (*E. coli*) พบว่าใน Negative control ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของสีเมื่อเทียบกับตัวควบคุมที่ไม่มีการเติมสารละลายเซลล์ ในขณะที่สารละลายเซลล์ไอโซเลต CUi เกิดสารประกอบสีม่วงเหมือนกับ Positive control และมีกิจกรรมสูงสุดที่ 24 ชั่วโมง คำนวณตามวิธีของ Beer-Lambert ที่มีค่าสัมประสิทธิ์ของ CODH ที่ 540 นาโนเมตรเท่ากับ 7.2 มิลลิโมลต่อเซนติเมตร ได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ของ CODH จาก *Clostridium* sp. CUi ในการรีดิวซ์คาร์บอนไดออกไซด์เท่ากับ 3.66 ไมโครโมลต่อนาที ในขณะที่ *C. carboxidivorans* ที่เป็น Positive control มีค่ากิจกรรมการรีดิวซ์คาร์บอนไดออกไซด์เท่ากับ 2.60 ไมโครโมลต่อนาที ซึ่งมีค่าน้อยกว่าไอโซเลตที่คัดแยกได้



ภาพที่ 4. 8 เปรียบเทียบสีของสาร nitroblue tetrazolium ที่เกิดขึ้นหลังจากรับอิเล็กตรอนจากปฏิกิริยาการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ โดยคิวเวตต์ที่ 1 เป็น control ไม่เติมสารละลายเซลล์; คิวเวตต์ที่ 2 เป็น Negative control (*E. coli*); คิวเวตต์ที่ 3 เป็น *Clostridium* sp. CUi และคิวเวตต์ที่ 4 เป็น *C. carboxidivorans*

บทที่ 5

การอภิปรายผล

5.1 การคัดแยกเชื้อ

การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียคลอสทริเดียมใช้อาหารเหลวสูตร DSMZ640 ที่มีแหล่งคาร์บอนอย่างจำกัด โดยมีน้ำตาลเซลโลไบโอส 1 กรัมต่อลิตรและแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน ในสภาวะไร้ออกซิเจนที่แทนที่ด้วยแก๊สผสมระหว่างแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 20 เปอร์เซ็นต์และไนโตรเจน 80 เปอร์เซ็นต์ เพื่อมุ่งเน้นการคัดแยกเชื้อที่สามารถเจริญได้ในแหล่งคาร์บอนจำกัด แหล่งคาร์บอนที่เป็นอาหารเลี้ยงเชื่อนั้นจัดเป็นวัตถุดิบที่ส่งผลโดยตรงต่อราคาต้นทุนการผลิต ดังนั้นการใช้แหล่งคาร์บอนที่มีมูลค่าในจำนวนที่น้อยย่อมส่งผลต่อราคาของต้นทุนการผลิต รวมถึงการใช้แหล่งคาร์บอนราคาถูกหรือไม่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจอย่างแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีมหาศาลในรูปของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมและการคมนาคมมาเป็นสารตั้งต้นในการผลิตสารผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่า นอกจากการจะเป็นนำแก๊สเสียจากโรงงานมาใช้ให้เกิดมูลค่าแล้วยังเป็นการลดแก๊สเรือนกระจกที่เป็นสาเหตุของภาวะโลกร้อนได้อีกด้วย

ในงานวิจัยนี้สามารถคัดแยกแบคทีเรียจากท่อส่งแก๊สในโรงงานอุตสาหกรรมและท่อไอเสียรถยนต์ได้ทั้งหมด 21 ไอโซเลต จากตัวอย่าง 38 ตัวอย่าง โดยกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากท่อส่งแก๊สในโรงงานอุตสาหกรรมส่วนใหญ่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37 และ 45 องศาเซลเซียส ซึ่งมีลักษณะเป็นแบคทีเรียชอบร้อน (Thermophilic bacteria) เนื่องจากพื้นที่เก็บตัวอย่างในโรงงานอุตสาหกรรมค่อนข้างมีอุณหภูมิสูงตลอดเวลา ดังนั้นแบคทีเรียที่พบส่วนใหญ่จึงมีลักษณะชอบร้อน ในขณะที่แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากท่อไอเสียส่วนใหญ่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แต่เจริญได้เล็กน้อยที่ 45 องศาเซลเซียส ซึ่งมีลักษณะเป็นแบคทีเรียทนร้อนได้ (Thermotolerant bacteria) เนื่องมาจากท่อไอเสียรถยนต์มีความร้อนสูงในช่วงขณะใช้งานเครื่องยนต์ เมื่อไม่มีการใช้งานท่อไอเสียจะมีอุณหภูมิลดลง ดังนั้นแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากท่อไอเสียจึงมีความสามารถในการทนร้อนได้ ซึ่ง Malashenko และคณะ (1974) ได้รายงานว่าแบคทีเรียทนร้อนสามารถเจริญได้ในช่วง 37-45 องศาเซลเซียส เมื่ออุณหภูมิสูงอาจเจริญได้ไม่ดีแต่สามารถดำรงอยู่ได้ จากการวิเคราะห์ลำดับเบสที่บริเวณ

16S rDNA ของแต่ละไอโซเลตพบว่าเป็นแบคทีเรียในสกุลคลอสทริเดียม 14 ไอโซเลต คิดเป็น 67 เปอร์เซ็นต์ของแบคทีเรียทั้งหมดที่คัดแยกได้ แสดงให้เห็นว่าอาหารเหลวสูตร DSMZ640 ที่มีการใช้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน มีประสิทธิภาพในการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียสกุลคลอสทริเดียมได้ถึง 67 เปอร์เซ็นต์ และเป็นแบคทีเรียกลุ่มอื่นๆ จำนวน 3 ไอโซเลต ได้แก่ *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, *Proteus mirabilis* และ *Enterococcus hirae* จากการสังเกตผลการวิจัยการพบแบคทีเรีย *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* เป็นสิ่งที่เกิดขึ้นได้เนื่องมาจากอาหารสูตร DSMZ640 นั้นมีสูตรที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อในกลุ่มคลอสทริเดียม และยังสามารถใช้เพาะเลี้ยงเชื้อกลุ่ม *Thermoanaerobacteriales* ได้อีกด้วย (Ivanova และคณะ, 2009) ส่วน *Proteus mirabilis* และ *Enterococcus hirae* เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มักพบปะปนกับคลอสทริเดียม โดยทั่วไปแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์ม (Coliforms) โปรเทียส (*Proteus*) ซูโดโมนาส (*Pseudomonas*) และกลุ่มที่เจริญในสภาวะไร้ออกซิเจนที่ไม่สร้างสปอร์ สามารถพบปะปนกับกลุ่มคลอสทริเดียมได้ในอาหารเพาะเลี้ยงที่บ่มในสภาวะไร้ออกซิเจน (อัญชลี ตันท์ศุภศิริ, 2548; Agnoletti และคณะ, 2004) ดังนั้นเทคนิคการคัดแยกและจำแนกชนิดของคลอสทริเดียมทางห้องปฏิบัติการจึงต้องอาศัยกระบวนการหลายวิธีร่วมกัน ได้แก่ การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ เพื่อสำรวจการติดสีย้อมแกรมและการมีสปอร์ ผลการเพาะแยกในอาหารชนิดคัดเลือก (selective medium) การเจริญได้ดีในสภาวะที่ไม่ออกซิเจน ปฏิกริยาทางชีวเคมีในการหมักย่อยน้ำตาลและโปรตีนชนิดต่างๆ และการตรวจผลิตผลของเมแทบอลิซึมด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี นอกจากนี้พบแบคทีเรียกลุ่มที่ระบุว่าลำดับเบสของ 16S rDNA ในช่วงบริเวณอนุรักษ์ มีความเหมือนกับลำดับเบสในฐานข้อมูลที่เป็นกลุ่มแบคทีเรียซึ่งไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ (uncultured bacterium) จำนวน 4 ไอโซเลต คือ ไอโซเลต CPA CMZ CUW และ CUSL1 โดยไอโซเลต CPA และ CMZ มีลำดับเบสที่บริเวณ 16S rDNA มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Unculture Clostridium* ที่ได้จากลำไส้ของสิ่งมีชีวิต 96 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งคลอสทริเดียมสามารถพบได้ในทางเดินอาหารของสิ่งมีชีวิตต่างๆ เนื่องมาจากการบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนของแบคทีเรียหรือสปอร์ของคลอสทริเดียม และจากแผนภาพความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการที่ได้จากงานวิจัยนี้ (ภาพที่ 4.4) พบว่า ไอโซเลต CPA และ CMZ ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ *C. perfringens* ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ McLaughlin และคณะ (2012) ศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในมูลของโลมาหัวบาตรหลังเรียบในแม่น้ำแยงซี ประเทศจีน พบว่า uncultured bacterium จากโคลน PLYFP105

(JN792371.1) ที่มีลำดับเบสเหมือนกับไอโซเลต CPA ของงานวิจัยนี้ ได้ถูกจัดอยู่ในไฟลัม Firmicutes และถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ *C. perfringens* ตามแผนภาพเชิงวิวัฒนาการของงานวิจัยของ McLaughlin และคณะ ในขณะที่ไอโซเลต CUW และ CUSL1 มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ในบริเวณอนุรักษ์เหมือน Uncultured bacterium จากเลือดของมนุษย์ 98 เปอร์เซ็นต์ ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยไม่ผ่านการเพาะเลี้ยงบนอาหาร

5.2 คุณลักษณะของแบคทีเรียในสกุลคลอสทริเดียมที่คัดแยกได้

คลอสทริเดียมเป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างเป็นท่อน มีสปอร์ เจริญได้ในสภาวะไร้ออกซิเจนพบได้ทั่วไปในดิน น้ำ ฝุ่นละออง และบางชนิดพบในลำไส้ของสิ่งมีชีวิต ซึ่งจากการศึกษา ลักษณะของแบคทีเรียคลอสทริเดียมที่คัดแยกได้ทั้ง 14 ไอโซเลต พบว่าส่วนใหญ่มีโคโลนีลักษณะกลม สีครีม รูปร่างไม่แน่นอน ยกตัวนูนจากผิวอาหาร และตรงกลางโคโลนีโค้งนูนเล็กน้อย เซลล์มีรูปร่างท่อน การติดสีแกรมบวก บางไอโซเลตพบการติดสีแกรมลบหลังจากการสร้างสปอร์ ซึ่งเกิดจากความสามารถในการติดสีย้อนแกรมของแบคทีเรียในสกุลคลอสทริเดียม เช่น ในบางสายพันธุ์ที่อาจติดสีย้อนเป็นแกรมลบได้หลังจากการเพาะเลี้ยงไว้ค้างคืน หรือเชื้อบางตัวที่ติดสีย้อนแกรมบวกอาจเปลี่ยนแปลงเป็นติดสีย้อนแกรมลบได้เมื่อมีการเพาะถ่ายเชื้อ หรือเชื้อบางสายพันธุ์อาจเปลี่ยนเป็นแกรมลบได้เมื่อมีการสร้างสปอร์ (Alexander และคณะ, 1995) นอกจากนี้แบคทีเรียทั้ง 14 ไอโซเลตที่คัดแยกได้นั้นสามารถเจริญได้โดยใช้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอนร่วมกับน้ำตาลที่มีความเข้มข้นต่ำได้

ไอโซเลต CUi คัดแยกได้จากโรงงานอุตสาหกรรมบริเวณท่าส่งแก๊สขาเข้าของถังกักเก็บแก๊สที่บรรจุแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์และแก๊สไฮโดรเจน แสดงผลการวิเคราะห์ลำดับเบสที่บริเวณอนุรักษ์ของ 16S rDNA มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *C. saccharolyticum* 93 เปอร์เซ็นต์ เซลล์มีลักษณะรูปท่อน สปอร์เป็นรูปรีอยู่บริเวณปลายเซลล์ เจริญได้ที่อุณหภูมิ 37 และ 45 องศาเซลเซียส การทดสอบการเจริญได้ในแหล่งคาร์บอนต่างๆเช่น น้ำตาลกลูโคส แมนโนส ฟรุคโตส อะราบิโนส ซาโลส และเซลโลไบโอส พบว่าสามารถใช้น้ำตาลได้ทุกชนิดและสามารถสร้างเอทานอล บิวทานอล 2, 3 บิวเทนไดออล กรดแอสติก และกรดบิวทริกได้ ซึ่งมีคุณสมบัติบางประการใกล้เคียงกับ *C. saccharolyticum* WM1 ที่คัดแยกได้จากตะกอนน้ำเสียโดย Murray และคณะ (1982) พบว่าแบคทีเรียชนิดนี้มีการสร้างสปอร์อยู่ที่ปลายเซลล์ มีคุณสมบัติในการใช้แหล่งคาร์บอนได้

หลากหลาย ได้แก่ กลูโคส อะราบิโนส ไซโลส กาแลคโตส แลคโตส แมนโนส และแมนนิทอล แต่ยังไม่
มีรายงานเกี่ยวกับการใช้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ สามารถผลิตเอทานอล และกรดแอสติคได้ดี ดังนั้น
ผลการทดลองในส่วนนี้แสดงถึงคุณลักษณะใหม่ที่ไม่มีข้อมูลบันทึกในงานวิจัยก่อนหน้า

ไอโซเลต CUSL2 คัดแยกได้จากดินบริเวณท่อส่งแก๊สในโรงงานอุตสาหกรรม มี
ลำดับเบสที่บริเวณอนุรักษ์ของ 16S rDNA มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *C. sporogenes*
99 เปอร์เซ็นต์ เซลล์มีรูปร่างเป็นท่อนยาว สปอร์มีขนาดใหญ่บวมพอง สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ
37 และ 45 องศาเซลเซียส ใช้น้ำตาลกลูโคสและเซลโลไบโอสได้ดี แต่ใช้น้ำตาลฟรุคโตสได้ไม่ค่อยดี
และไม่พบการเจริญในน้ำตาลแมนโนส ไซโลส และอะราบิโนส สามารถสร้างเอทานอล บิวทานอล
กรดแอสติค และกรดบิวทริกได้ แต่ไม่พบการผลิต 2, 3 บิวเทนไดออล จากรายงานของ Lovitt และ
คณะ (1987) พบว่าแบคทีเรีย *C. sporogenes* เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สามารถใช้
กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ดี ยังไม่มีรายงานการใช้น้ำตาล C5 ของแบคทีเรียชนิดนี้ และสามารถ
ผลิตกรดแอสติค บิวทริก เอทานอล และบิวทานอลได้ การสร้างสปอร์ของแบคทีเรียชนิดนี้มีลักษณะ
พองกลมใหญ่มีขนาดประมาณ 2.4 ไมโครเมตร (Yang และคณะ, 2009)

ไอโซเลต CHC1 และ CHC2 คัดแยกได้จากท่อไอเสียของรถยนต์ มีลำดับเบสที่
บริเวณ 16S rDNA มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *C. tertium* 96 เปอร์เซ็นต์ เซลล์มี
ลักษณะคล้ายคลึงกันคือ มีรูปท่อน แต่เซลล์ของ *C. tertium* CHC2 ยาวและพอมกว่า *C. tertium*
CHC1 ทั้ง 2 ไอโซเลตเจริญได้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สามารถใช้น้ำตาลเฮกโซส (กลูโคส
แมนโนส และฟรุคโตส) ได้ดีกว่าน้ำตาลเพนโตส โดย *C. tertium* CHC1 เจริญได้เล็กน้อยในน้ำตาล
ไซโลส แต่ไม่พบการเจริญในน้ำตาลอะราบิโนส ในขณะที่ *C. tertium* CHC2 ไม่พบการเจริญทั้งในอะ
ราบิโนส และไซโลส พบการสร้างเอทานอล 2, 3 บิวเทนไดออล กรดแอสติค และกรดบิวทริก แต่ไม่
พบบิวทานอล จากรายงานของ Kataoka และ Tokiwa (1998) พบว่าแบคทีเรียชนิดนี้เป็น
aerotolerant bacteria เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 15-40 องศาเซลเซียส มีสปอร์อยู่ที่ปลายเซลล์ สามารถ
ใช้น้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส ซูโครส แมนโนส แมนนิทอล มอลโตส ไซโลส และพบว่าบางสายพันธุ์ไม่
สามารถเจริญในอะราบิโนส และกลีเซอรอลได้ สามารถผลิตเอทานอล กรดแอสติค และบิวทริกได้

ไอโซเลต CNC CPN CTV และ CVI คัดแยกได้จากท่อไอเสียของรถยนต์ มีลำดับเบสที่บริเวณ 16S rDNA มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *C. beijerinckii* 96-100 เปอร์เซ็นต์ เซลล์ของทุกไอโซเลตมีรูปร่างท่อนสปอร์เป็นรูปรีอยู่บริเวณปลายเซลล์ ติดสีย้อมแกรมบวก สามารถเจริญได้ทั้งอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ยกเว้นไอโซเลต *C. beijerinckii* CPN สามารถเจริญได้ทั้งอุณหภูมิ 37 และ 45 องศาเซลเซียส ทั้ง 4 ไอโซเลตใช้น้ำตาลกลูโคสและเซลโลไบโอสได้ดี แต่ใช้น้ำตาลฟรุคโตสได้ไม่ค่อยดี และไม่พบการเจริญในน้ำตาลแมนโนส ไซโลส และอะราบิโนส สามารถสร้างเอทานอล บิวทานอล กรดแอซิดิก และกรดบิวทริกได้ แต่ไม่พบการผลิต 2, 3 บิวเทนไดออล ปัจจุบันมีงานวิจัยจำนวนมากที่ใช้แบคทีเรียชนิดนี้เพื่อผลิตเอทานอล และบิวทานอล ด้วยคุณสมบัติที่สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้อย่างหลากหลาย เช่น กลูโคส ฟรุคโตส กาแลคโตส แมนนิทอล อะราบิโนส เซลโลไบโอส และมีบางสายพันธุ์ที่สามารถใช้น้ำตาลไซโลสได้ (Mitchell, 1996) สามารถผลิตเอซิโตน เอทานอล บิวทานอล กรดแอซิดิก และกรดบิวทริกได้ โดยส่วนใหญ่ผลิตจากน้ำตาลที่ได้จากวัสดุเหลือจากการเกษตร ซึ่งงานวิจัยก่อนหน้านี้ไม่มีรายงานการผลิตตัวทำละลายจากแบคทีเรีย *C. beijerinckii* จากแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (Ezeji และคณะ, 2007; Survase และคณะ, 2001) อย่างไรก็ตาม ในงานวิจัยนี้พบว่าแบคทีเรียไอโซเลตนี้ มีความสามารถสร้างตัวทำละลาย เมื่อให้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอนได้

ไอโซเลต CAI CBP CCI CCW CMC และ CMK คัดแยกได้จากท่อไอเสียของรถยนต์ มีลำดับเบสที่บริเวณ 16S rDNA มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *C. perfringens* 95-99 เปอร์เซ็นต์ สามารถใช้น้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส และแมนโนสได้ เจริญได้ในน้ำตาลเซลโลไบโอสแต่ไม่ค่อยดีและไม่พบการเจริญในน้ำตาล C5 อย่างไซโลสและอะราบิโนส สารผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่เป็นกรดผลิตแอลกอฮอล์ได้เพียงเล็กน้อย ส่วนรูปร่างเซลล์ในแต่ละไอโซเลตยังมีความแตกต่างกันทั้งความยาวและขนาดของเซลล์ มีรายงานของ Ryu และ Labbe (1989) ว่าขนาดและความยาวของเซลล์ *C. perfringens* ขึ้นอยู่อาหารที่ใช้เพราะเลี้ยงให้เชื้อเจริญ เช่น ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคสจะเห็นเซลล์ที่มีรูปร่างค่อนข้างอ้วนสั้น ส่วนอาหารที่มีน้ำตาลโมเลกุลใหญ่เป็นองค์ประกอบนั้นจะเห็นเซลล์มีรูปร่างผอมยาว หรือบางครั้งอาจเห็นรูปร่างเซลล์เป็นแบบเส้นใย ในงานวิจัยนี้ทั้ง 6 ไอโซเลตไม่พบการสร้างสปอร์ ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจาก *C. perfringens* มีแตกต่างจากคลอสทริเดียมอื่นๆ คือเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไปจะไม่สร้างสปอร์ แต่จะสร้างสปอร์ได้เมื่ออยู่ในลำไส้หรือเมื่ออยู่ใน

อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมซึ่งสามารถกระตุ้นให้เชื้อสร้างสปอร์ได้ โดยสปอร์มีลักษณะเป็นรูปไข่ มีขนาดใหญ่แต่ไม่ทำให้เซลล์บวม อยู่ตรงกลางตัวเซลล์ หรือใกล้ปลายเซลล์ (อัญชลี ตันท์ศุภศิริ, 2548; Baron และคณะ, 1996) นอกจากนี้การสร้างสปอร์ของคลอสทริเดียมยังเกี่ยวข้องกับการสร้างตัวทำละลาย (เอทานอล และบิวทานอล) โดยยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการสร้างสปอร์และการสร้างตัวทำละลายเป็นยีนที่อยู่บนพลาสมิด เมื่อเซลล์มีการแบ่งตัวและสูญเสียพลาสมิดนี้ไป หรือในกรณีที่ยีนที่ทำหน้าที่สร้างสปอร์ไม่ได้ถูกกระตุ้นให้ทำงาน ซึ่งส่งผลให้ไม่พบการสร้างสปอร์และมีการสร้างตัวทำละลายได้น้อยลง (Long และคณะ, 1984; Ravagnani และคณะ, 2000; Harris และคณะ, 2002)

5.3 การตรวจหายีนที่สร้างเอนไซม์คาร์บอนไดออกไซด์ดีไฮโดรจีเนส

จากการออกแบบไพรเมอร์สำหรับตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับการตรึงแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์มาใช้ของแบคทีเรียคลอสทริเดียม คือยีน *acsA* และ *acsE* โดยออกแบบจากลำดับ นิวคลีโอไทด์ของ *Clostridium* spp. 3 สายพันธุ์ได้แก่ *C. autoethanogenum*, *C. carboxidivorans* และ *C. ljungdahlii* พบว่าสามารถตรวจหายีน *acsA* สำหรับสร้างเอนไซม์คาร์บอนมอนอกไซด์ดีไฮโดรจีเนสในคลอสทริเดียมได้ โดยพบในไอโซเลต *Clostridium* sp. CUi ไอโซเลต *C. beijerinckii* CNC ไอโซเลต *C. beijerinckii* CPN ไอโซเลต *C. beijerinckii* CTV ไอโซเลต *C. beijerinckii* CVI และไอโซเลต *C. perfringens* CCI ซึ่งแบคทีเรียคลอสทริเดียมเหล่านี้ยังไม่มีรายงานการพบยีน *acsA* มาก่อน การตรวจหายีน *acsE* ที่ทำหน้าที่สร้างเอนไซม์เมธิลทรานเฟอร์เรส ไม่พบในแบคทีเรียคลอสทริเดียมทุกไอโซเลตที่คัดแยกได้ เนื่องมาจากยีน *acsE* อาจมีความหลากหลายทางพันธุกรรม โดยมีงานวิจัยของ Zhuang และคณะ (2014) ได้ทำการศึกษาในหลายๆ ในวิถี Wood-Ljungdahl ของ *Dehalococcoides mccartyi* ที่มีความสามารถในการใช้คาร์บอนไดออกไซด์ พบว่าในแบคทีเรียชนิดนี้มียีน *acsA* ที่เป็น monofunction ในการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์มาใช้ แต่ไม่พบยีน *acsE* ซึ่งสันนิษฐานว่าเอนไซม์เมธิลทรานเฟอร์เรสอาจสร้างมาจากยีนที่มีความแตกต่างจากยีน *acsE* ที่รู้จัก และจากการทำงานของสาขาเมธิลในวิถีด้วยเอนไซม์เชิงซ้อนที่ทำหน้าที่ด้วยกันหลายชนิดอาจมีการส่งหมู่เมธิลผ่านตัวเร่งปฏิกิริยาอื่นๆ หรือผ่านวิถีที่ทำงานร่วมกับเอนไซม์เชิงซ้อนเหล่านั้น อย่างไรก็ตามวิธีการสังเคราะห์เซอร์ริน หรือเมทไธโอนีน เป็นต้น (Rüdiger และคณะ, 1973) ดังนั้นจึงสามารถอนุมานได้ว่าการไม่พบยีน *acsE* ในแต่ละไอโซเลต อาจไม่ส่งผลกระทบต่อการทำงานของแบคทีเรียในสภาวะไร้ออกซิเจนที่มีแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เป็น

แหล่งคาร์บอน แบบที่เรายังคงสามารถเจริญและใช้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ได้ด้วยการทำงานของ เอนไซม์คาร์บอนมอนอกไซด์ดีไฮโดรจีเนสรวมกับเอนไซม์อื่นๆ ที่ควบคุมการทำงานด้วยยีนต่างๆ ดัง แสดงในตารางที่ 2.6

5.4 ความสามารถในการใช้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์

Clostridium sp. CUi ที่คัดแยกได้จากท่อส่งแก๊สในโรงงานอุตสาหกรรม มีความสามารถใช้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนได้หลากหลายและสามารถผลิตสารที่ต้องการได้ทั้ง 3 ชนิด คือ เอทานอล บิวทานอล และ 2, 3 บิวเทนไดออล นอกจากนี้ยังพบยีน *acsA* ที่ควบคุมการทำงานของเอนไซม์คาร์บอนมอนอกไซด์ดีไฮโดรจีเนส จึงถูกคัดเลือกมาผลิตตัวทำละลายในถังหมักขนาด 5 ลิตร ด้วยอาหารเหลวดัดแปลง DSMZ640 พบว่าโดยสามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุด 0.94 กรัมต่อลิตร ที่ 48 ชั่วโมง ผลิตบิวทานอลได้สูงสุดที่ 1.11 กรัมต่อลิตร ที่ 24 ชั่วโมง และมีการผลิต 2, 3 บิวเทนไดออลได้เล็กน้อย (0.28 กรัมต่อลิตร) โดยสารผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่เป็นกรดบิวทริกที่พบสูงถึง 3.12 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 72 ซึ่งเป็นช่วง exponential phase เนื่องจากแบคทีเรียคลอสทริเดียมจะสร้างกรดได้สูงสุดในช่วงที่มีการแบ่งตัวและการเจริญสูงสุด และเมื่อเชื้อเข้าสู่ช่วง stationary phase จะมีการผลิตกรดได้น้อยลง (Lee และคณะ, 2008) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองในครั้งนี้ โดยหลังชั่วโมงที่ 72 ค่าความเป็นกรดต่างในอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มคงที่ ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีการผลิตกรดลดลง และจากการทดลองในครั้งนี้ได้สารละลายรวมทั้งหมด 5.78 กรัมต่อลิตรและมีน้ำหนักเซลล์แห้ง 955 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่าเกินกว่า 1 กรัมเซลล์ไลโปโอสที่เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเหลวสูตร DSMZ640 ดังนั้นส่วนที่เกินกว่า 1 กรัมมาจากการใช้คาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอนรวมกันกับน้ำตาล อีกทั้งการใช้ น้ำตาลของเชื้อหมดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 แต่การผลิตสารละลายต่างๆยังคงพบว่ามีปริมาณเพิ่มจนกระทั่ง ชั่วโมงที่ 96 ที่เริ่มมีการลดลงของสารละลายบางชนิด เมื่อนำเปรียบเทียบกับ *C. ljungdahlii* และ *C. autoethanolgenum* แบคทีเรียที่มีรายงานว่าสามารถใช้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ได้ พบว่า *Clostridium* sp. CUi มีการผลิต ABE และ ค่า Yield ABE (กรัม/กรัม) ที่สูงกว่า และมีผลิตบิวทานอลที่ดีกว่า เนื่องจาก Cotter และคณะ (2009) ได้รายงานว่าแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดมีการผลิตบิวทานอลค่อนข้างต่ำ (ประมาณ 0.2 กรัมต่อลิตร) (ตารางที่ 5.1)

ตารางที่ 5.1 เปรียบเทียบผลผลิตสารละลาย ABE ที่ได้จากเชื้อ *C. autoethanolgenum* *C. ljungdahlii* และ *Clostridium* sp. CUi

แบคทีเรีย	CAU	CLJ	CUi
สารตั้งต้น	ไซโลส	ฟรุคโตส	เซลโลไบโอส
ปริมาณ ABE (กรัมต่อลิตร)	0.24	0.60	1.165
Yield butanol (กรัม/กรัม)	NR	NR	0.758
Yield ABE (กรัม/กรัม)	0.048	0.12	1.165
อ้างอิง	Cotter และคณะ	Cotter และคณะ	การทดลองนี้

NR ไม่รายงานผล, CAU คือ *C. autoethanolgenum*, CLJ คือ *C. ljungdahlii* และ CUi คือ *Clostridium* sp. CUi

การวัดกิจกรรมของคาร์บอนมอนอกไซด์ดีไฮโดรจีเนส พบว่า *Clostridium* sp. CUi มีกิจกรรมสูงสุดที่ 24 ชั่วโมง โดยมีการรีดิวซ์คาร์บอนไดออกไซด์เท่ากับ 3.66 ไมโครโมลต่อนาที่ ในขณะที่ *C. carboxidivorans* ที่เป็น Positive control มีค่ากิจกรรมการรีดิวซ์คาร์บอนไดออกไซด์เท่ากับ 2.60 ไมโครโมลต่อนาที่ ซึ่งมีค่าน้อยกว่าไอโซเลตที่คัดแยกได้ โดยกิจกรรมของเอนไซม์มีค่าคงที่จนกระทั่งชั่วโมงที่ 36 และค่อยๆลดลง จนกระทั่งชั่วโมงที่ 72 ไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอนมอนอกไซด์ดีไฮโดรจีเนสแล้ว ซึ่งสอดคล้องกับผลการผลิตสารละลายที่ได้กล่าวมาแล้วว่ามีการผลิตน้อยลงหลังจากชั่วโมงที่ 72 กล่าวคือหลังจากที่น้ำตาลได้ถูกใช้หมด ช่วงเวลาชั่วโมงที่ 24 ถึง 72 ชั่วโมงกิจกรรมต่างๆภายในเซลล์ เกิดขึ้นโดยการใช้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ที่เป็นแหล่งคาร์บอนร่วมผ่านการทำงานของเอนไซม์คาร์บอนมอนอกไซด์ดีไฮโดรจีเนส จนกระทั่งชั่วโมงที่ 72 ไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ CODH ซึ่งส่งผลให้กิจกรรมการผลิตสารละลายต่างๆลดลงด้วย นอกจากนี้ได้มีการวิจัยของ Ukpong และคณะ (2012) ได้ศึกษาการเจริญ การแสดงออกของยีน กิจกรรมของเอนไซม์ และผลิตภัณฑ์ของแบคทีเรีย *C. carboxidivorans* ในการเปลี่ยนแก๊สไปเป็นของเหลว พบว่าในช่วง 72 ชั่วโมงแรก แบคทีเรียมีการสร้างแอสิตเททสูงมาก ในขณะที่เอทานอลมีอัตราการสร้างสูงสุดในช่วง 48-96 ชั่วโมง ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ CODH สูงสุดในช่วงการเจริญ (growth phase) 72 ชั่วโมงแรก ขณะที่ยีน *codh* มีการแสดงออกสูงสุดช่วง 48-192 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงการสร้างสารละลาย (solvent production) ซึ่งให้เห็นว่าแม้ยีนมีการแสดงออกแต่อาจมีประสิทธิภาพของ

เอนไซม์ลดลง ดังนั้นกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์จึงเป็นตัวบ่งชี้ประสิทธิภาพของเอนไซม์ได้ดี และพบว่าหลังจาก 72 ชั่วโมง เชื้อสามารถใช้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ได้น้อยลง



บทที่ 6

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

6.1 สรุปผลการวิจัย

การคัดแยกแบคทีเรียจากท่อส่งแก๊สในโรงงานอุตสาหกรรมและท่อไอเสียรถยนต์ได้จากตัวอย่างทั้งหมด 38 ตัวอย่าง สามารถคัดแยกแบคทีเรียที่แตกต่างกันได้ 21 ไอโซเลต โดยแบคทีเรียเหล่านี้สามารถเจริญในอาหารเหลวสูตร DSMZ640 ที่มีแหล่งคาร์บอนอย่างจำกัด ร่วมกับการใช้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน จากการวิเคราะห์ลำดับเบสที่บริเวณ 16S rDNA พบว่าเป็นแบคทีเรียในสกุลคลอสทริเดียม 14 ไอโซเลต โดยแบคทีเรียทั้งหมดนี้เป็นแกรมบวก มีรูปร่างเป็นท่อน มีสปอร์รูปรีอยู่บริเวณปลายเซลล์ และพบยีน *acsA* ที่ควบคุมการทำงานของเอนไซม์คาร์บอนมอนอกไซด์ดีไฮโดรจีเนสในคลอสทริเดียมบางไอโซเลตที่คัดแยกได้ ได้แก่ ไอโซเลต *Clostridium* sp. CUi ไอโซเลต *C. beijerinckii* CNC ไอโซเลต *C. beijerinckii* CPN ไอโซเลต *C. beijerinckii* CTV ไอโซเลต *C. beijerinckii* CVI และไอโซเลต *C. perfringens* CCI ซึ่งแบคทีเรียคลอสทริเดียมเหล่านี้ยังไม่มีรายงานการพบยีน *acsA* มาก่อน ในขณะที่การตรวจหายีน *acsE* ที่ทำหน้าที่สร้างเอนไซม์เมธิลทรานเฟอร์เรส ไม่พบในแบคทีเรียคลอสทริเดียมทุกไอโซเลตที่คัดแยกได้

การศึกษาความสามารถในการผลิตตัวทำละลาย พบว่าไอโซเลต *Clostridium* sp. CUi ที่คัดแยกได้จากท่อส่งแก๊สในโรงงานอุตสาหกรรม เป็นไอโซเลตที่มีศักยภาพในการผลิตตัวทำละลายได้ดีที่สุด สามารถผลิตสารที่ต้องการได้ทั้ง 3 ชนิด คือ เอทานอล บิวทานอล และ 2, 3 บิวเทนไดออล โดยมีการผลิตเอทานอลได้สูงสุด 0.94 กรัมต่อลิตร บิวทานอลได้สูงสุดที่ 1.11 กรัม และมีการผลิต 2, 3 บิวเทนไดออล 0.28 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังพบการผลิตกรดบิวทริกสูงถึง 3.12 กรัม และกรดแอสติก 0.92 กรัมต่อลิตร ไอโซเลต *Clostridium* sp. CUi มีความสามารถใช้น้ำตาลเฮกโซสและเพนโทสเป็นแหล่งคาร์บอนได้หลากหลายร่วมกับแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ และพบยีน *acsA* ที่ควบคุมการทำงานของเอนไซม์คาร์บอนมอนอกไซด์ดีไฮโดรจีเนส โดยสามารถการวัดกิจกรรมของเอนไซม์นี้จากการใช้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เป็นสารตั้งต้น โดยมีการรีดิวซ์คาร์บอนไดออกไซด์สูงสุดเท่ากับ 3.66 ไมโครโมลต่อนาที่ ที่ 24 ชั่วโมง

6.2 ข้อเสนอแนะ

จากการทดลองในครั้งนี้พบว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากท่อส่งแก๊สในโรงงานอุตสาหกรรม และท่อไอเสียรถยนต์มีความสามารถเจริญได้ในแหล่งคาร์บอนที่มีปริมาณน้อยร่วมกับแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ สามารถผลิตกรดและตัวทำละลายได้ โดยเฉพาะ *Clostridium* sp. CUi ที่สามารถสร้างสารผลิตภัณฑ์ได้มากกว่าสารตั้งต้น แสดงให้เห็นว่าแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์มีส่วนร่วมในการผลิต ซึ่งเป็นที่สนใจว่าควรศึกษาอัตราและปริมาณของแก๊สที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ เพราะการให้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ในปริมาณที่มากเกินไป จะทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีสถานะเป็นกรดซึ่งอาจไปยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ นอกจากนี้ควรศึกษายื่นอื่นๆที่เกี่ยวข้องกับการตรึงแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์หรือยื่นที่เกี่ยวข้องกับการตรึงแก๊สอื่นๆ ที่เป็นแก๊สเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม เพื่อการนำเอาแก๊สผสมที่เป็นของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมมาใช้ในกระบวนการหมักได้



รายการอ้างอิง

- กระทรวงพลังงาน. 2557. สารสนเทศเรื่องพลังงานทดแทน: แก๊สโซฮอล์. [online]. Available from: <http://www.eppo.go.th/encon/ebook/ep-51/gasohol.pdf> [25 มีนาคม 2557]
- กาญจนา แสงลัมสุวรรณ. 2553. เชื้อเพลิงชีวภาพ : แหล่งพลังงานทางเลือก., [online]. Available from: http://www.bu.ac.th/knowledgecenter/executive_journal/oct_dec_11/pdf/aw01.pdf.
- พรรณธิดา ส่งเสริมพานิช. 2553. การคัดกรอง *Clostridium spp.* ทนบิวทานอลเพื่อผลิตบิวทานอลจากน้ำอ้อย. (วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบริหารธุรกิจ, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย).
- อัญชลี ตันต์ศุภศิริ. 2548. คลอสทริเดียม เปอร์ฟริงเจนส์ ที่สำคัญทางการแพทย์และสาธารณสุข และการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ. บริษัทสยามแอดมินนิสเตรทีฟ เมเนจเม้นท์ จำกัด.
- Abrini, J., Naveau, H., and Nyns, E.-J. 1994. *Clostridium autoethanogenum*, sp. nov., an anaerobic bacterium that produces ethanol from carbon monoxide. *Archives of Microbiology*. 161(4): 345-351.
- Abubackar, H. N., Veiga, M. C., and Kennes, C. 2011. Biological conversion of carbon monoxide: rich syngas or waste gases to bioethanol. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*. 5(1): 93-114.
- Agnoletti, F., Bano, L., Comin, D., Parenti, E., Marcati, M., Bertolin, M., and Mazzolini, E. 2004. *Selective culture medium to isolate Clostridium spiroforme from rabbit gut*. Paper presented at the Proc. 8th World Rabbit Congress, 2004 September, Puebla, Mexico.
- Alexander, C. J., Citron, D. M., Brazier, J. S., and Goldstein, E. 1995. Identification and antimicrobial resistance patterns of clinical isolates of *Clostridium clostridioforme*, *Clostridium innocuum*, and *Clostridium ramosum* compared with those of clinical isolates of *Clostridium perfringens*. *Journal of Clinical Microbiology*. 33(12): 3209-3215.
- Allen, T. D., Caldwell, M. E., Lawson, P. A., Huhnke, R. L., and Tanner, R. S. 2010. *Alkalibaculum bacchi* gen. nov., sp. nov., a CO-oxidizing, ethanol-producing

- acetogen isolated from livestock-impacted soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 60(10): 2483-2489.
- Andreesen, J. R., and Ljungdahl, L. G. 1973. Formate dehydrogenase of *Clostridium thermoaceticum*: incorporation of selenium-75, and the effects of selenite, molybdate, and tungstate on the enzyme. *Journal of Bacteriology*. 116(2): 867-873.
- Baron, S., Wells, C. L., and Wilkins, T. D. 1996. *Clostridia*: sporeforming anaerobic bacilli.
- Bomar, M., Hippe, H., and Schink, B. 1991. Lithotrophic growth and hydrogen metabolism by *Clostridium magnum*. *FEMS Microbiology Letters*. 83(3): 347-349.
- Bruant, G., Lévesque, M.-J., Peter, C., Guiot, S. R., and Masson, L. 2010. Genomic analysis of carbon monoxide utilization and butanol production by *Clostridium carboxidivorans* strain PTT. *Public Library of Science one*. 5(9): 1-12.
- Celińska, E., and Grajek, W. 2009. Biotechnological production of 2, 3-butanediol-current state and prospects. *Biotechnology Advances*. 27(6): 715-725.
- Cotter, J. L., Chinn, M. S., and Grunden, A. M. 2008. Ethanol and acetate production by *Clostridium ljungdahlii* and *Clostridium autoethanogenum* using resting cells. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 32(3): 369-380.
- Cotter, J. L., Chinn, M. S., and Grunden, A. M. 2009. Influence of process parameters on growth of *Clostridium ljungdahlii* and *Clostridium autoethanogenum* on synthesis gas. *Enzyme and Microbial Technology*. 44(5): 281-288.
- Daniel, S. L., Hsu, T., Dean, S., and Drake, H. 1990. Characterization of the H₂-and CO-dependent chemolithotrophic potentials of the acetogens *Clostridium thermoaceticum* and *Acetogenium kivui*. *Journal of Bacteriology*. 172(8): 4464-4471.
- Daniell, J., Köpke, M., and Simpson, S. D. 2012. Commercial biomass syngas fermentation. *Energies*. 5(12): 5372-5417.

- Datar, R. P., Shenkman, R. M., Cateni, B. G., Huhnke, R. L., and Lewis, R. S. 2004. Fermentation of biomass-generated producer gas to ethanol. *Biotechnology and Bioengineering*. 86(5): 587-594.
- Demirbas, A. 2009. Political, economic and environmental impacts of biofuels: A review. *Applied Energy*. 86: 108-117.
- Demirbas, M., and Balat, M. 2006. Recent advances on the production and utilization trends of bio-fuels: a global perspective. *Energy Conversion and Management*. 47(15): 2371-2381.
- Diekert, G. B., and Thauer, R. K. 1978. Carbon monoxide oxidation by *Clostridium thermoaceticum* and *Clostridium formicoaceticum*. *Journal of Bacteriology*. 136(2): 597-606.
- Doukov, T. I., Iverson, T. M., Seravalli, J., Ragsdale, S. W., and Drennan, C. L. 2002. A Ni-Fe-Cu center in a bifunctional carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA synthase. *Science*. 298(5593): 567-572.
- Drake, H. L., Küsel, K., and Matthies, C. (2006). Acetogenic prokaryotes *The Prokaryotes* (pp. 354-420): Springer
- Dürre, P. 2007. Biobutanol: an attractive biofuel. *Biotechnology Journal*. 2(12): 1525-1534.
- Ezeji, T., Qureshi, N., and Blaschek, H. P. 2007. Butanol production from agricultural residues: impact of degradation products on *Clostridium beijerinckii* growth and butanol fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*. 97(6): 1460-1469.
- Fontaine, F., Peterson, W., McCoy, E., Johnson, M. J., and Ritter, G. J. 1942. A new type of glucose fermentation by *Clostridium thermoaceticum*. *Journal of Bacteriology*. 43(6): 701-715.
- Gillan, D. C., Speksnijder, A. G., Zwart, G., and De Ridder, C. 1998. Genetic diversity of the biofilm covering *Montacuta ferruginosa* (Mollusca, Bivalvia) as evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis analysis and cloning of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*. 64(9): 3464-3472.

- Goldemberg, J. 2007. Ethanol for a sustainable energy future. *Science*. 315(5813): 808-810.
- Gossner, A. S., Picardal, F., Tanner, R. S., and Drake, H. L. 2008. Carbon metabolism of the moderately acid-tolerant acetogen *Clostridium drakei* isolated from peat. *FEMS Microbiology Letters*. 287(2): 236-242.
- Graham, L. A., Belisle, S. L., and Baas, C.-L. 2008. Emissions from light duty gasoline vehicles operating on low blend ethanol gasoline and E85. *Atmospheric Environment*. 42(19): 4498-4516.
- Gravalos, I., Kateris, D., Moshou, D., Xyradakis, P., Gialamas, T., and Tsiropoulos, Z. 2011. *Performance and emission characteristics of spark ignition engine fuelled with ethanol and methanol gasoline blended fuels*. INTECH Open Access Publisher.
- Harris, L. M., Welker, N. E., and Papoutsakis, E. T. 2002. Northern, morphological, and fermentation analysis of spo0A inactivation and overexpression in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Journal of Bacteriology*. 184(13): 3586-3597.
- Huhnke, R. L., Lewis, R. S., and Tanner, R. S. 2010. Isolation and characterization of novel clostridial species: U.S. Patent.
- Ivanova, G., Rákhely, G., and Kovács, K. L. 2009. Thermophilic biohydrogen production from energy plants by *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* and comparison with related studies. *international journal of hydrogen energy*. 34(9): 3659-3670.
- Jeon, W. B., Cheng, J., and Ludden, P. W. 2001. Purification and characterization of membrane-associated CooC protein and its functional role in the insertion of nickel into carbon monoxide dehydrogenase from *Rhodospirillum rubrum*. *Journal of Biological Chemistry*. 276(42): 38602-38609.
- Jin, C., Yao, M., Liu, H., Chia-fon, F. L., and Ji, J. 2011. Progress in the production and application of n-butanol as a biofuel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 15(8): 4080-4106.
- Jones, D. T., and Woods, D. R. 1986. Acetone-butanol fermentation revisited. *Microbiological Reviews*. 50(4): 484-524.

- Kane, M. D., Brauman, A., and Breznak, J. A. 1991. *Clostridium mayombei* sp. nov., an H₂/CO₂ acetogenic bacterium from the gut of the African soil-feeding termite, *Cubitermes speciosus*. *Archives of Microbiology*. 156(2): 99-104.
- Kataoka, N., and Tokiwa, Y. 1998. Isolation and characterization of an active mannanase-producing anaerobic bacterium, *Clostridium tertium*KT-5A, from lotus soil. *Journal of Applied Microbiology*. 84(3): 357-367.
- Klasson, K., Ackerson, M., Clausen, E., and Gaddy, J. 1991. Bioreactor design for synthesis gas fermentations. *Fuel*. 70(5): 605-614.
- Klasson, K. T., Ackerson, M. D., Clausen, E. C., and Gaddy, J. L. 1992. Bioconversion of synthesis gas into liquid or gaseous fuels. *Enzyme and Microbial Technology*. 14(8): 602-608.
- Köpke, M., Held, C., Hujer, S., Liesegang, H., Wiezer, A., Wollherr, A., Ehrenreich, A., Liebl, W., Gottschalk, G., and Dürre, P. 2010. *Clostridium ljungdahlii* represents a microbial production platform based on syngas. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 107(29): 13087-13092.
- Köpke, M., Mihalcea, C., Bromley, J. C., and Simpson, S. D. 2011. Fermentative production of ethanol from carbon monoxide. *Current Opinion in Biotechnology*. 22(3): 320-325.
- Köpke, M., Mihalcea, C., Liew, F., Tizard, J. H., Ali, M. S., Conolly, J. J., Al-Sinawi, B., and Simpson, S. D. 2011. 2, 3-Butanediol production by acetogenic bacteria, an alternative route to chemical synthesis, using industrial waste gas. *Applied and Environmental Microbiology*. 77(15): 5467-5475.
- Köpke, M., Noack, S., and Dürre, P. 2011. The past, present, and future of biofuels—Biobutanol as promising alternative. *Biofuel Production-Recent Developments and Prospects*: 451-486.
- Kumar, M., Lu, W.-P., and Ragsdale, S. W. 1994. Binding of carbon disulfide to the site of acetyl-CoA synthesis by the nickel-iron-sulfur protein, carbon monoxide dehydrogenase, from *Clostridium thermoaceticum*. *Biochemistry*. 33(32): 9769-9777.
- Küsel, K., Dorsch, T., Acker, G., Stackebrandt, E., and Drake, H. 2000. *Clostridium scatologenes* strain SL1 isolated as an acetogenic bacterium from acidic

- sediments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 50(2): 537-546.
- Küsel, K., Karnholz, A., Trinkwalter, T., Devereux, R., Acker, G., and Drake, H. L. 2001. Physiological ecology of *Clostridium glycolicum* RD-1, an aerotolerant acetogen isolated from sea grass roots. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(10): 4734-4741.
- Lee, S. Y., Park, J. H., Jang, S. H., Nielsen, L. K., Kim, J., and Jung, K. S. 2008. Fermentative butanol production by *Clostridia*. *Biotechnology and Bioengineering*. 101(2): 209-228.
- Liew, F. M., Köpke, M., and Simpson, S. D. 2013. *Gas fermentation for commercial biofuels production*. INTECH Open Access Publisher.
- Liou, J. S.-C., Balkwill, D. L., Drake, G. R., and Tanner, R. S. 2005. *Clostridium carboxidivorans* sp. nov., a solvent-producing *Clostridium* isolated from an agricultural settling lagoon, and reclassification of the acetogen *Clostridium scatologenes* strain SL1 as *Clostridium drakei* sp. nov. *International journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 55(5): 2085-2091.
- Liu, K., Atiyeh, H. K., Tanner, R. S., Wilkins, M. R., and Huhnke, R. L. 2012. Fermentative production of ethanol from syngas using novel moderately alkaliphilic strains of *Alkalibaculum bacchi*. *Bioresource Technology*. 104: 336-341.
- Long, S., Jones, D. T., and Woods, D. R. 1984. The relationship between sporulation and solvent production in *Clostridium acetobutylicum* P262. *Biotechnology Letters*. 6(8): 529-534.
- Lorite, M. J., Tachil, J., Sanjuán, J., Meyer, O., and Bedmar, E. J. 2000. Carbon Monoxide Dehydrogenase Activity in *Bradyrhizobium japonicum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(5): 1871-1876.
- Lorowitz, W. H., and Bryant, M. P. 1984. *Peptostreptococcus productus* strain that grows rapidly with CO as the energy source. *Applied and Environmental Microbiology*. 47(5): 961-964.
- Lovitt, R., Kell, D., and Morris, J. 1987. The physiology of *Clostridium sporogenes* NCIB 8053 growing in defined media. *Journal of applied bacteriology*. 62(1): 81-92.

- Luo, L., Van Der Voet, E., and Huppes, G. 2009. Life cycle assessment and life cycle costing of bioethanol from sugarcane in Brazil. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 13(6): 1613-1619.
- Lux, M. F., and Drake, H. L. 1992. Re-examination of the metabolic potentials of the acetogens *Clostridium aceticum* and *Clostridium formicoaceticum*: chemolithoautotrophic and aromatic-dependent growth. *FEMS Microbiology Letters*. 95(1): 49-56.
- Lynd, L., Kerby, R., and Zeikus, J. 1982. Carbon monoxide metabolism of the methylotrophic acidogen *Butyribacterium methylotrophicum*. *Journal of Bacteriology*. 149(1): 255-263.
- Malashenko, I., Romanovskaia, V., Bogachenko, V., and Shved, A. 1974. [Thermophilic and thermotolerant bacteria that assimilate methane]. *Mikrobiologiya*. 44(5): 855-862.
- McLaughlin, R. W., Chen, M., Zheng, J., Zhao, Q., and Wang, D. 2012. Analysis of the bacterial diversity in the fecal material of the endangered Yangtze finless porpoise, *Neophocaena phocaenoides asiaeorientalis*. *Molecular Biology Reports*. 39(5): 5669-5676.
- Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 31(3): 426-428.
- Mitchell, W. J. 1996. Carbohydrate Uptake and Utilization by *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052. *Anaerobe*. 2(6): 379-384.
- Mohammadi, M., Najafpour, G. D., Younesi, H., Lahijani, P., Uzir, M. H., and Mohamed, A. R. 2011. Bioconversion of synthesis gas to second generation biofuels: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 15(9): 4255-4273.
- Mörsdorf, G., Frunzke, K., Gadkari, D., and Meyer, O. 1992. Microbial growth on carbon monoxide. *Biodegradation*. 3(1): 61-82.
- Murray, W. D., and Khan, A. 1982. *Clostridium saccharolyticum* sp. nov., a saccharolytic species from sewage sludge. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 32(1): 132-135.

- Naik, S., Goud, V. V., Rout, P. K., and Dalai, A. K. 2010. Production of first and second generation biofuels: a comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 14(2): 578-597.
- Nigam, P. S., and Singh, A. 2011. Production of liquid biofuels from renewable resources. *Progress in Energy and Combustion Science*. 37(1): 52-68.
- Petitdemange, E., Caillet, F., Giallo, J., and Gaudin, C. 1984. *Clostridium cellulolyticum* sp. nov., a cellulolytic, mesophilic: species from decayed grass. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 34(2): 155-159.
- Phillips, J. R., Atiyeh, H. K., Tanner, R. S., Torres, J. R., Saxena, J., Wilkins, M. R., and Huhnke, R. L. 2015. Butanol and hexanol production in *Clostridium carboxidivorans* syngas fermentation: Medium development and culture techniques. *Bioresource Technology*. 190: 114-121.
- Pierce, E., Xie, G., Barabote, R. D., Saunders, E., Han, C. S., Detter, J. C., Richardson, P., Brettin, T. S., Das, A., and Ljungdahl, L. G. 2008. The complete genome sequence of *Moorella thermoacetica* (f. *Clostridium thermoaceticum*). *Environmental Microbiology*. 10(10): 2550-2573.
- Poehlein, A., Schmidt, S., Kaster, A.-K., Goenrich, M., Vollmers, J., Thürmer, A., Bertsch, J., Schuchmann, K., Voigt, B., and Hecker, M. 2012. An ancient pathway combining carbon dioxide fixation with the generation and utilization of a sodium ion gradient for ATP synthesis. *Public Library of Science one*. 7(3): 33439-33439.
- Ragsdale, S. W. 2004. Life with carbon monoxide. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 39(3): 165-195.
- Ragsdale, S. W., and Pierce, E. 2008. Acetogenesis and the Wood–Ljungdahl pathway of CO₂ fixation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*. 1784(12): 1873-1898.
- Ravagnani, A., Jennert, K. C., Steiner, E., Gruenberg, R., Jefferies, J. R., Wilkinson, S. R., Young, D. I., Tidswell, E. C., Brown, D. P., and Youngman, P. 2000. Spo0A directly controls the switch from acid to solvent production in solvent-forming clostridia. *Molecular Microbiology*. 37(5): 1172-1185.

- Rozen, S., and Skaletsky, H. (1999). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers *Bioinformatics Methods and Protocols* (pp. 365-386): Springer
- Rüdiger, H., and Jaenicke, L. 1973. The biosynthesis of methionine. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 1(2): 157-168.
- Ryu, S., and Labbe, R. G. 1989. Coat and enterotoxin-related proteins in *Clostridium perfringens* spores. *Journal of General Microbiology*. 135(11): 3109-3118.
- Savage, M. D., Wu, Z., Daniel, S. L., Lundie, L., and Drake, H. L. 1987. Carbon monoxide-dependent chemolithotrophic growth of *Clostridium thermoautotrophicum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 53(8): 1902-1906.
- Sheehan, J., Aden, A., Paustian, K., Killian, K., Brenner, J., Walsh, M., and Nelson, R. 2003. Energy and environmental aspects of using corn stover for fuel ethanol. *Journal of Industrial Ecology*. 7(3-4): 117-146.
- Sims, R., Taylor, M., Saddler, J., and Mabee, W. 2008. From 1st-to 2nd-generation biofuel technologies: an overview of current industry and RD&D activities. *International Energy Agency*: 16-20.
- Survase, S. A., Jurgens, G., Van Heiningen, A., and Granström, T. 2011. Continuous production of isopropanol and butanol using *Clostridium beijerinckii* DSM 6423. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 91(5): 1305-1313.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., and Kumar, S. 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*. 24(8): 1596-1599.
- Tanner, R. S., Miller, L. M., and Yang, D. 1993. *Clostridium ljungdahlii* sp. nov., an acetogenic species in clostridial rRNA homology group I. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 43(2): 232-236.
- Ukpong, M. N., Atiyeh, H. K., De Lorme, M. J., Liu, K., Zhu, X., Tanner, R. S., Wilkins, M. R., and Stevenson, B. S. 2012. Physiological response of *Clostridium carboxidivorans* during conversion of synthesis gas to solvents in a gas-fed bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*. 109(11): 2720-2728.

- Vega, J., Prieto, S., Elmore, B., Clausen, E., and Gaddy, J. 1989. The biological production of ethanol from synthesis gas. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 20(1): 781-797.
- Wagner, F. S. 2002. Acetic acid. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*.
- Wood, H. 1991. Life with CO or CO₂ and H₂ as a source of carbon and energy. *The FASEB Journal*. 5(2): 156-163.
- Yang, W. W., Crow-Willard, E., and Ponce, A. 2009. Production and characterization of pure *Clostridium* spore suspensions. *Journal of Applied Microbiology*. 106(1): 27-33.
- Zeikus, J., Lynd, L. H., Thompson, T., Krzycki, J., Weimer, P., and Hegge, P. 1980. Isolation and characterization of a new, methylotrophic, acidogenic anaerobe, the Marburg strain. *Current Microbiology*. 3(6): 381-386.
- Zhuang, W.-Q., Yi, S., Bill, M., Brisson, V. L., Feng, X., Men, Y., Conrad, M. E., Tang, Y. J., and Alvarez-Cohen, L. 2014. Incomplete Wood-Ljungdahl pathway facilitates one-carbon metabolism in organohalide-respiring *Dehalococcoides mccartyi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 111(17): 6419-6424.



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก
วิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหาร DSMZ640

แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl)	0.90 กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	0.90 กรัม
แมกนีเซียมคลอไรด์ ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.40 กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.75 กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	1.50 กรัม
ทริปติเคส (Trypticase)	2.00 กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	1.00 กรัม
Trace element solution SL-10	1.00 มิลลิลิตร
เฟอร์ริกคลอไรด์ ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	2.50 มิลลิกรัม
น้ำตาลเซลโลไบโอส	1.00 กรัม
ซิสเทอีนไฮโดรคลอไรด์ (L-cysteine-HCl)	0.75 กรัม
Resazurin	0.50 มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	1 ลิตร

ปรับ pH ด้วยแอมโมเนียมจนได้ 7.2 นำไปต้มจนเดือด เทใส่ขวดซีรัม จากนั้นนำไปไล่ออกซิเจนด้วยแก๊สผสมระหว่างแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 20 เปอร์เซ็นต์และแก๊สไนโตรเจน 80 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที ปิดด้วยจุกยางและฝาอลูมิเนียม นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

การเตรียมอาหารแข็ง DSMZ640 ให้เติมในรูปของเหลวและเติมผงวุ้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ต้มจนเดือดและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอล หลังจากเทเพลทและทิ้งจนอาหารแข็งแล้ว นำไปเก็บในตู้เพาะเลี้ยงเชื้อแบบไร้ออกซิเจนอย่างน้อย 24 ชั่วโมง

2. Trace element solution SL-10

กรดไฮโดรคลอริก (HCl) (25%; 7.7 M)	10.00 มิลลิลิตร
เฟอร์รัสคลอไรด์ (FeCl ₂ ·4H ₂ O)	1.50 กรัม
ซิงค์คลอไรด์ (ZnCl ₂)	70.00 มิลลิกรัม
แมงกานีสคลอไรด์ (MnCl ₂ ·4H ₂ O)	100.00 มิลลิกรัม
กรดบอริก (H ₂ BO ₂)	6.00 มิลลิกรัม
โคบอลท์คลอไรด์ (CoCl ₂ ·6H ₂ O)	190.00 มิลลิกรัม
คอปเปอร์คลอไรด์ (CuCl ₂ ·2H ₂ O)	2.00 มิลลิกรัม
นิกเกิลคลอไรด์ (NiCl ₂ ·6H ₂ O)	24.00 มิลลิกรัม
โซเดียมโมลิบเดต (Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O)	36.00 มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	990.00 มิลลิลิตร

การเตรียมสารละลาย Trace element เริ่มต้นจากการละลายเฟอร์รัสคลอไรด์ในกรดไฮโดรคลอริกก่อนนำไปละลายในน้ำ หลังจากนั้นค่อยๆเติมสารที่ละลายแล้ว ละลายให้เข้ากัน สุดท้ายปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ภาคผนวก ข
วิธีการเตรียมสารเคมี

1. สีสำหรับย้อมแกรม

1.1 แอมโมเนียม ออกซาเลต คริสตัล ไวโอเลต (ammonium oxalate crystal violet)

- สารละลาย A เตรียมคริสตัล ไวโอเลต 2 กรัม ละลายในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ 20 มิลลิลิตร

- สารละลาย B เตรียมแอมโมเนียม ออกซาเลต (ammonium oxalate) 0.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร

- ผสมสารละลาย A และ B เข้าด้วยกัน เก็บในขวดสีชาและตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมงก่อนนำมาใช้

1.2 สารละลายแกรมไอโอดีน (Gram's iodine solution)

- เตรียมไอโอดีน 1 กรัม บดให้ละเอียด และโพแทสเซียมไอโอไดด์ (KI) 2 กรัม เติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชา ก่อนใช้ให้นำไปผสมกับน้ำในอัตรา 1 ต่อ 2 (น้ำ)

1.3 แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์

1.4 สารละลายซาฟรานิน-โอ (safranin-O solution)

- เตรียมซาฟรานิน-โอ 2 กรัม ละลายในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ 100 มิลลิลิตร

2. สีย้อมสปอร์

2.1 สีมาลาไคท์กรีน (Malachite green) 5 เปอร์เซ็นต์

- เตรียมมาลาไคท์กรีน 5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

2.2 สีซาฟรานิน-โอ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เตรียมซาฟรานิน-โอ 0.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ค

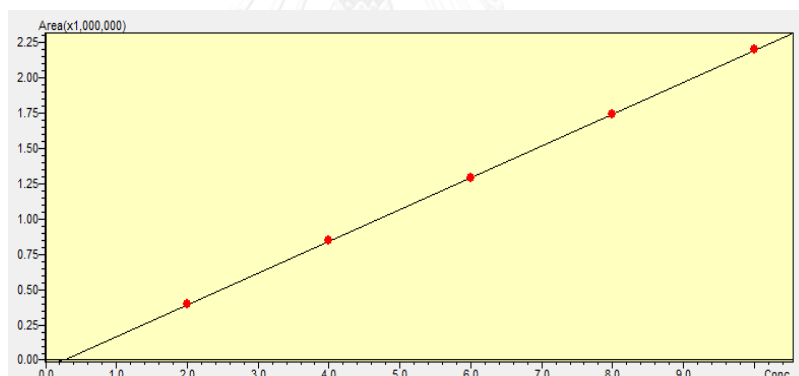
กราฟมาตรฐาน

1. การเตรียมกราฟมาตรฐานของแอสีโตน เอทานอล บิวทานอล 2, 3 บิวเทนไดออล กรดแอสิติก และกรดบิวทิริก

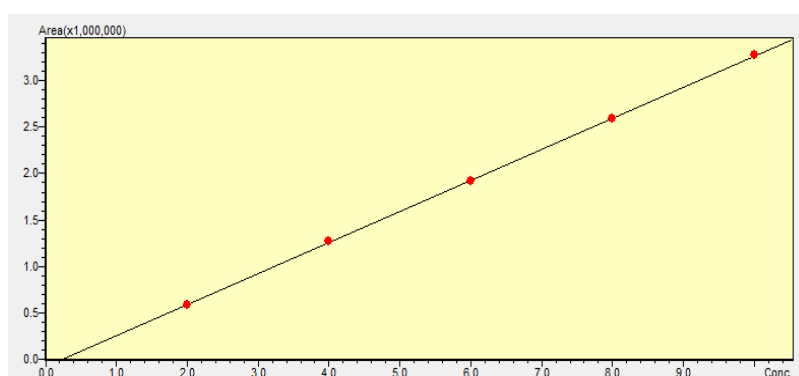
1.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานผสมระหว่างแอสีโตน เอทานอล บิวทานอล 2, 3 บิวเทนไดออล กรดแอสิติก และกรดบิวทิริกความเข้มข้น 2 4 6 8 และ 10 กรัมต่อลิตร

1.2 ดูดสารละลายผสมแต่ละความเข้มข้นใส่ vial ปริมาตร 700 มิลลิลิตร เพื่อนำไปฉีดวิเคราะห์ผลด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (GC-2010A Shimadzu, Japan)

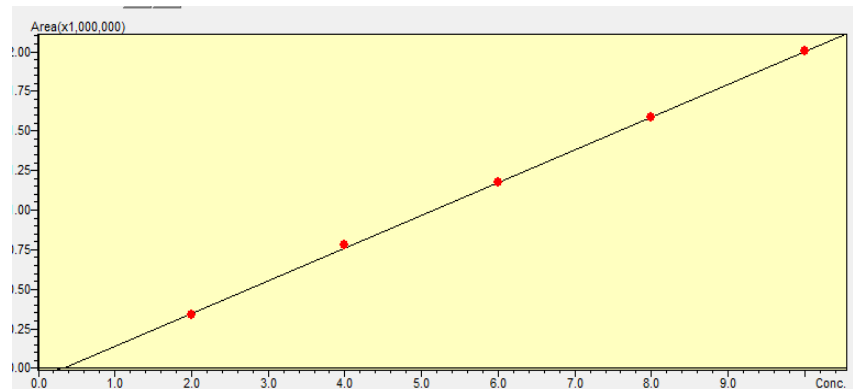
1.3 เขียนกราฟระหว่างพื้นที่ใต้กราฟกับค่าความเข้มข้นของสารละลายผสมทั้ง 5 ตัวจะได้กราฟมาตรฐานของแอสีโตน เอทานอล บิวทานอล 2, 3 บิวเทนไดออล กรดแอสิติก และกรดบิวทิริก



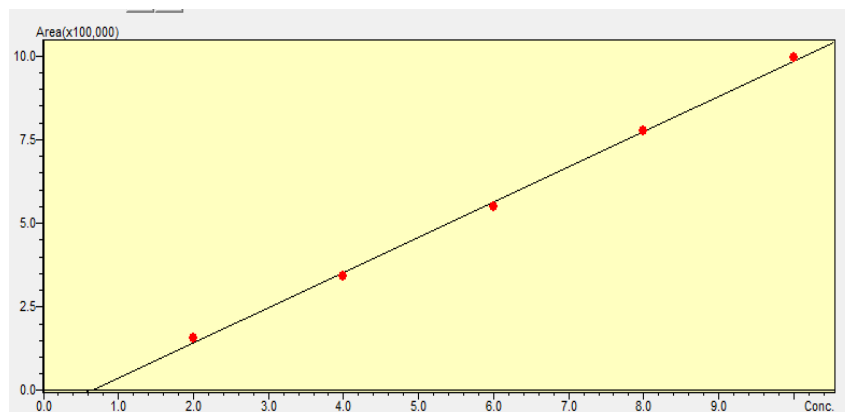
ภาพที่ ค-1 กราฟมาตรฐานเอทานอล



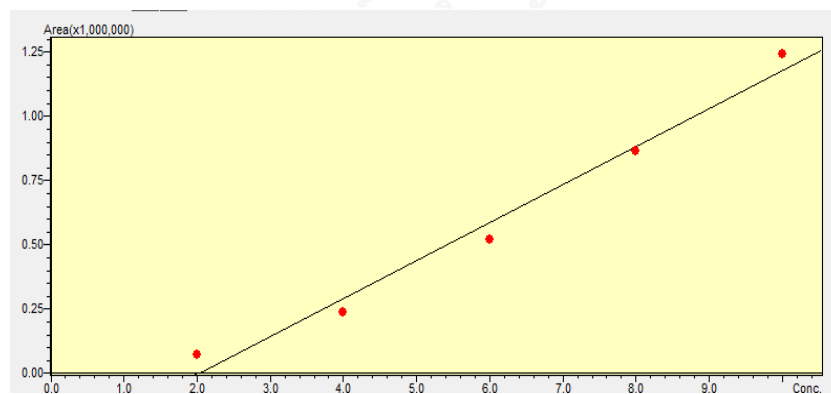
ภาพที่ ค-2 กราฟมาตรฐานบิวทานอล



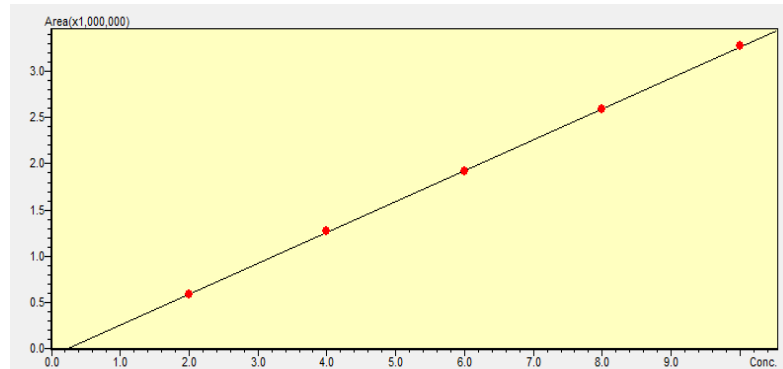
ภาพที่ ค-3 กราฟมาตรฐานแอสีโตน



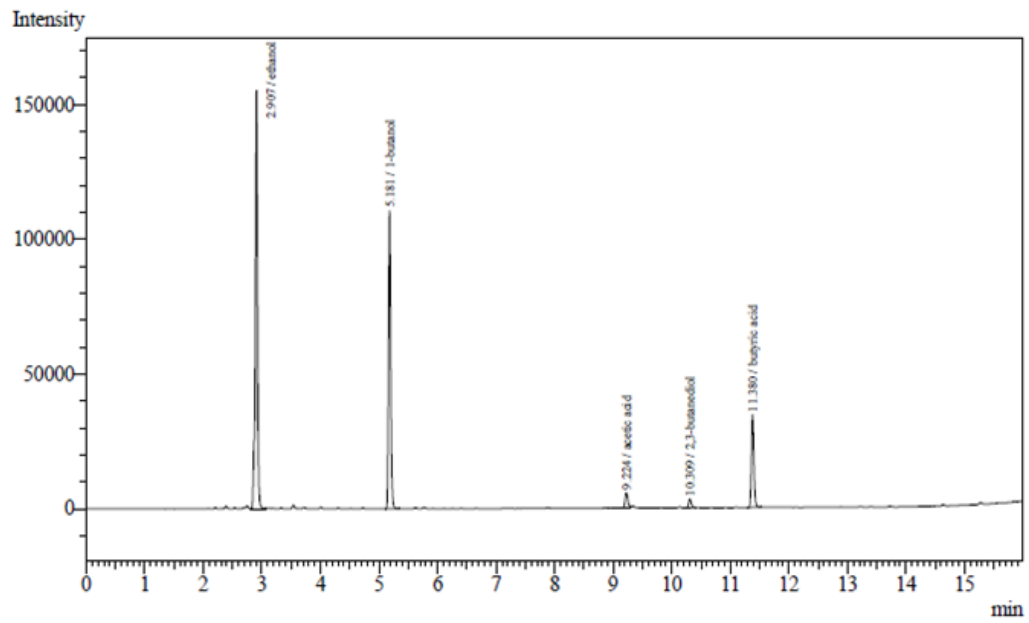
ภาพที่ ค-4 กราฟมาตรฐานแอสีติก



ภาพที่ ค-5 กราฟมาตรฐานบิวทริก



ภาพที่ ค-6 กราฟมาตรฐาน 2, 3- บิวเทนไดออล

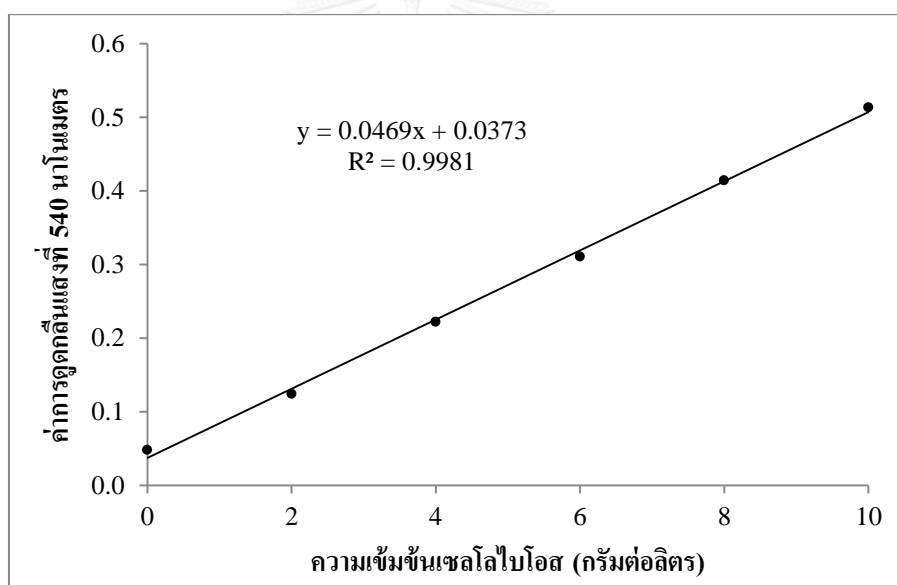


ภาพที่ ค-7 โครมาโทแกรมของสารละลายที่ได้จากกระบวนการหมัก

2. การเตรียมสารละลาย DNS สำหรับวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ (Miller, 1959)

3, 5 ไดโนโตรซาลิไซลิกแอซิด	10 กรัม
โพสแทสเซียมโซเดียมทาร์เตรต	300 กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์	16 กรัม
น้ำกลั่น	1 ลิตร

- การเตรียม ผสมสารเข้าด้วยกัน ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร รอนสารละลายเข้าด้วยกัน
- เตรียมสารละลายมาตรฐานเซลโลไบโอส ที่ความเข้มข้น 0 2 4 6 และ 10 กรัมต่อลิตร



ภาพที่ ค-8 กราฟมาตรฐานเซลโลไบโอส

ภาคผนวก ง

การคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์

1. เตรียมสารละลายสำหรับวัดกิจกรรมของเอนไซม์ประกอบด้วย

Nitroblue tetrazolium chloride	0.5 มิลลิโมล
Phenazine methosulfate	1.0 มิลลิโมล
Tris-HCl buffer pH 7.5	50 มิลลิโมล

- ก่อนนำไปใช้นำสารละลายมาไล่ออกซิเจนด้วยแก๊สไนโตรเจน และให้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 100 เปอร์เซ็นต์ก่อนเติมโปรตีนเพื่อวัดกิจกรรมของเอนไซม์

2. การคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ (ดัดแปลงจาก Lorite และคณะ)

- คำนวณกิจกรรมเอนไซม์ตามกฎของเบียร์-แลมเบิร์ต

ค่าการดูดกลืนแสง = (ค่าลงที่การดูดกลืนแสง)*(ความยาวของคิวเวตต์)*(ความเข้มข้นสาร)

โดยที่ค่าลงที่การดูดกลืนแสงของ CODH ที่ 540 นาโนเมตร เท่ากับ 7.2 มิลลิโมลต่อเซนติเมตร

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวสุพัตรา เลิศศรีวงษ์ เกิดเมื่อวันที่ 5 เมษายน พ.ศ. 2531 ที่จังหวัด กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เมื่อปี พ.ศ. 2552 และเข้าศึกษาต่อระดับปริญญาโท วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และสำเร็จการศึกษาในปีการศึกษา 2557 และได้เผยแพร่ผลงานวิจัยบางส่วนในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติในงาน International BioScience Conference 2014 ระหว่างวันที่ 29-30 กันยายน 2557 ณ จังหวัดภูเก็ต ซึ่งจัดโดยมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ร่วมกับ University of Novi Sad สาธารณรัฐเซอร์เบีย ในหัวข้อ Conversion of pentoses, hexoses and disaccharide to be acetone-butanol-ethanol (ABE) by *Clostridium* sp. CUi และได้ยื่นจดสิทธิบัตร 1 เรื่อง ชื่อ กระบวนการผลิต 2, 3 บิวเทนไดออลจากจุลินทรีย์ *Clostridium* spp.