การหาภาวะที่เหมาะสมของกระบวนการไบโอลิชชิงเพื่อการขจัดกำมะถันในรูปไพไรต์จากลิกไนท์ โดย *Thiobacillus ferrooxidans*

นางสาวนาตยา รวมทรัพย์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2544

ISBN 974-03-1472-4

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

OPTIMIZATION OF BIOLEACHING PROCESS FOR PYRITIC SULFUR REMOVAL FROM LIGNITE BY *Thiobacillus ferrooxidans*

Miss Nattaya Ruamsap

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Industrial Microbiology
Department of Microbiology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2001

ISBN 974-03-1472-4

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การหาภาวะที่เหมาะสมของกระบวนการไบโอลิชชิงเพื่อการขจัดกำมะถันในรูปไพไรต์จากลิกไนท์โดย *Thiobacillus ferrooxidans*
โดย	นางสาวนาตยา รวมทรัพย์
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อัญชริดา อัครจรัลญา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....รองคณบดีฝ่ายบริหาร
(รองศาสตราจารย์ ดร.พิพัฒน์ การเที่ยง) รักษาราชการแทนคณบดี
คณะวิทยาศาสตร์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อัญชริดา อัครจรัลญา)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน)

.....กรรมการ
(อาจารย์ ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นาตยา รวมทรัพย์ : การหาภาวะที่เหมาะสมของกระบวนการไบโอลิชชิงเพื่อการขจัดกำมะถันในรูปไพไรต์จากลิกไนท์โดย *Thiobacillus ferrooxidans*. (OPTIMIZATION OF BIOLEACHING PROCESS FOR PYRITIC SULFUR REMOVAL FROM LIGNITE BY *Thiobacillus ferrooxidans*) อ.ที่ปรึกษา : ผศ.ดร.อัญชริดา อัครจรัลญา, 103 หน้า. ISBN 974-03-1472-4

ภาวะที่เหมาะสมของกระบวนการไบโอลิชชิงเพื่อการขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์โดย *Thiobacillus ferrooxidans* Y4-3 เป็นดังนี้ เลี้ยงเชื้อเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 9K ที่อุณหภูมิ 30°ซ ให้อากาศโดยการเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน ปลูกเชื้อเริ่มต้นที่ได้ 10% (ปริมาตร/ปริมาตร) ลงในผงลิกไนท์ขนาดอนุภาค 45 ไมครอน แขวนลอยในน้ำกลั่น 10% (กรัม/100 มล.) ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเป็น 2.0 บ่มที่ภาวะเดิมเป็นเวลา 8 วัน ที่ภาวะที่เหมาะสม *T. ferrooxidans* Y4-3 สามารถขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์ได้ 11.52% ทำการปรับปรุงสายพันธุ์ของ *T. ferrooxidans* Y4-3 โดยการถ่ายโอนยีนประมวลรหัสเอทีพีซัลฟูรีเลสและเอพีเอสรีดักเตสจาก *Allochromatium vinosum* strain D (DSMZ 180) เข้าสู่ *T. ferrooxidans* Y4-3 โดยวิธีอิเลคโทรพอเรชัน สารสกัดจากเซลล์ทรานสฟอร์แมนท์มีกิจกรรมของเอทีพีซัลฟูรีเลส (0.034 หน่วยเอนไซม์/มก. โปรตีน) ที่ภาวะที่เหมาะสมทรานสฟอร์แมนท์สามารถขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์ได้ 43.49% หรือสูงกว่าสายพันธุ์เดิม 3.8 เท่า

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต นาตยา รวมทรัพย์

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2544 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม -

2327323 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEY WORD: *T. ferrooxidans* / BIOLEACHING / DESULFURIZATION / LIGNITE / ATP SULFURYLASE

NATTAYA RUAMSAP : THESIS TITLE. (OPTIMIZATION OF BIOLEACHING PROCESS FOR PYRITIC SULFUR REMOVAL FROM LIGNITE BY *Thiobacillus ferrooxidans*)

THESIS ADVISOR : ASST. PROF. ANCHARIDA AKARACHARANYA, 103 pp.

ISBN 974-03-1472-4.

The optimal conditions for bioleaching process of pyritic sulfur from lignite by *Thiobacillus ferrooxidans* Y4-3 were as follows: inoculum grown in 9K medium at 30°C with shaking at 200 rpm for 7 days, 10% (v/v) of the inoculum in 10% (g/100 ml) of 45 μm - lignite particles suspended in distilled water at the initial pH of 2.0, and incubation at the above conditions for 8 days. Under the optimal conditions, *T. ferrooxidans* Y4-3 desulfurized 11.52% of the total pyritic sulfur from lignite. For *T. ferrooxidans* Y4-3 strain improvement, gene encoding ATP sulfurylase and APS reductase from *Allochromatium vinosum* strain D (DSMZ 180) were transformed into *T. ferrooxidans* Y4-3 by electroporation. Crude extract of the transformant expressed ATP sulfurylase activity at 0.034 units/mg protein. Under the optimal conditions, the transformant desulfurized 43.49% of the total pyritic sulfur from lignite or about 3.8 times higher than that of the wild type.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Department Microbiology Student's signature Nattaya Ruamsap

Field of study Microbiology for industrial Advisor's signature Ancharida A

Academic year 2001 Co-advisor's signature -

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.อัญชริดา อัครจรัลญา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ให้คำแนะนำ คำปรึกษา ความช่วยเหลือ แนวคิด และข้อคิดเห็นต่างๆ ในการทำงานวิจัยตลอดมา รวมทั้งตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ จนสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ ซึ่งกรุณาเป็นประธานกรรมการ ผศ.ดร.สุเทพ ธนียวัน และ อ.ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์ ที่กรุณาเป็นกรรมการสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณการไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทย ที่ให้การสนับสนุนทุนการวิจัย

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์ รวมทั้งคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือและความอนุเคราะห์ในการทำงานวิจัย

ขอขอบพระคุณคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ที่ให้ความช่วยเหลือและความอนุเคราะห์ในการทำงานวิจัย

ขอขอบคุณ Dr.Tomonobu Kusano สำหรับพลาสมิดพาหะ pTMZ48 และ *T. ferrooxidans* Y4-3 และขอขอบคุณ Dr.Christiane Dahl สำหรับพลาสมิด pNTS50 รวมทั้งคำแนะนำและความช่วยเหลือต่างๆ

ท้ายที่สุดนี้ขอขอบคุณผู้วิจัยทุกคนในห้อง 405 และห้องอื่นๆ ที่ให้ความช่วยเหลือ และขอกราบขอบพระคุณ บิดา-มารดา พี่และน้อง ซึ่งเป็นกำลังใจ รวมถึงให้การสนับสนุนทุกสิ่งเสมอมาอย่างหาที่สุดมิได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ

กิตติกรรมประกาศ.....ฉ

สารบัญ.....ช

สารบัญตาราง.....ซ

สารบัญภาพ.....ฌ

คำย่อ.....ฎ

บทที่

1. บทนำ.....1

2. เครื่องมือ เคมีภัณฑ์ เชื้อจุลินทรีย์ และลิกไนท์.....19

3. วิธีทดลอง.....23

4. ผลการทดลอง.....38

5. สรุปผลการทดลอง.....63

รายการอ้างอิง.....71

ภาคผนวก.....78

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....103

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1.1 สมบัติบางประการของถ่านหินชนิดต่างๆ.....2
4.1 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ 4 สาย ซึ่งออกแบบและสังเคราะห์ 56
4.2 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอทีพีซัลฟูรีเลสใน crude extract ของ *T. ferrooxidans* Y4-3 sat-apr และ *T. ferrooxidans* Y4-3.....60
ข.1 สารเคมีและปริมาณที่ใช้ในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอทีพีซัลฟูรีเลส.....95

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

1.1 โครงสร้างทางเคมีของถ่านหินชนิดต่างๆ.....1
1.2 โครงสร้างทางเคมีของถ่านหิน (ลูกศรแสดงกำมะถันอินทรีย์ และสี่เหลี่ยมลูกบาศก์แสดงกำมะถันไพไรต์).....4
1.3 กลไกกระบวนการออกซิเดชันกำมะถันของ *T. ferrooxidans*.....15
4.1 ประสิทธิภาพการขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์โดย *T. ferrooxidans* Y4-3 และ *T. ferrooxidans* ATCC 19859.....39
4.2 ประสิทธิภาพการขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์โดย *T. ferrooxidans* Y4-3 เมื่อแขวนลอยผงลิกไนท์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 9K ไม่เติมเฟอรัสซัลเฟต และเมื่อแขวนลอยผงลิกไนท์ในน้ำกลั่น.....40
4.3 ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของสารแขวนลอยผงลิกไนท์ในน้ำกลั่นต่อประสิทธิภาพการขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์โดย *T. ferrooxidans* Y4-3.....41
4.4 ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น *T. ferrooxidans* Y4-3 ต่อประสิทธิภาพการขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์.....42
4.5 อุณหภูมิที่ใช้บ่มต่อประสิทธิภาพการขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์โดย *T. ferrooxidans* Y4-3.....43
4.6 ปริมาณผงลิกไนท์แขวนลอยในน้ำกลั่น (กรัม/100 มล.) ต่อประสิทธิภาพการขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์โดย *T. ferrooxidans* Y4-3.....44
4.7 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่อประสิทธิภาพการขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์โดย *T. ferrooxidans* Y4-3.....45
4.8 อายุของเชื้อเริ่มต้นต่อประสิทธิภาพการขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์โดย *T. ferrooxidans* Y4-3.....46
4.9 ระยะเวลาการบ่มต่อประสิทธิภาพการขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์โดย *T. ferrooxidans* Y4-3.....47
4.10 การตัดพลาสมิด pNTS50 และ pTMZ48 ด้วยเรสทริกชัน *Eco*RI และ *Xba*I ตามลำดับ.....49

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4.11 - 4.11ก แผนที่เรสทริกชันของพลาสมิด pTMZ48 และของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pFS24..51
- 4.11ข การตัดพลาสมิดพาหะ pTMZ48 และรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pFS24
ด้วยเรสทริกชัน *Sma*I.....52
4.12 การตัดพลาสมิดพาหะ pTMZ48 และรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pFS24 ด้วยเรสทริกชัน *Pst*I...53
4.13 ตำแหน่งจดจำของเรสทริกชัน *Pst*I บนรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pFS24
ทิศทางการจัดเรียงตัวที่เป็นไปได้ 2 ชนิด ของยีน *sat* และยีน *apr* ในพลาสมิด pFS24
และผลการตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pFS24 ด้วยเรสทริกชัน *Pst*I.....54
4.14 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการ PCR เมื่อใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ sat1 และ sat2....57
4.15 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการ PCR เมื่อใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ apr1 และ apr2...58
4.16 แสดงกิจกรรมของเอทีพีซัลฟูรีเลสใน crude extract ของ *T. ferrooxidans* Y4-3 sat-apr
จากค่าการดูดกลืนแสงของส่วนผสมของปฏิกิริยาที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร
กับเวลาที่เปลี่ยนแปลงไป.....60
4.17 แสดงกิจกรรมของเอทีพีซัลฟูรีเลสใน crude extract ของ *T. ferrooxidans* Y4-3
จากค่าการดูดกลืนแสงของส่วนผสมของปฏิกิริยาที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร
กับเวลาที่เปลี่ยนแปลงไป.....61
4.18 ประสิทธิภาพการขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์โดย *T. ferrooxidans* Y4-3 และ
T. ferrooxidans sat – apr.....62
ข.1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกำมะถันซัลเฟต
และค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร.....84
ข.2 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Bovine Serum Albumin (BSA)
และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร.....93
ค.1 แผนที่เรสทริกชันของพลาสมิดพาหะ pTMZ48.....97
ค.2 แผนที่เรสทริกชันของพลาสมิด pNTS50.....98
ค.3 แสดงตำแหน่งดีเอ็นเอไพรเมอร์ทั้ง 4 สาย บนลำดับเบสของยีน *sat* และยีน *apr*.....99

คำย่อ

มก.	หมายถึง	มิลลิกรัม
ซม.	หมายถึง	เซนติเมตร
มม.	หมายถึง	มิลลิเมตร
มล.	หมายถึง	มิลลิลิตร
^{o}ซ	หมายถึง	องศาเซลเซียส
%	หมายถึง	เปอร์เซ็นต์
kb	หมายถึง	กิโลเบส
Tf.	หมายถึง	*Thiobacillus ferrooxidans*

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย