บทที่ 1

บทนำ

สืบเนื่องมาจากการขยายตัวอย่างรวดเร็วของภาคอุตสาหกรรมในประเทศไทย ทำให้ความต้องการกระแสไฟฟ้าเพิ่มสูงขึ้นอย่างมาก ถ่านหินลิกไนต์เป็นเชื้อเพลิงหลักเพื่อการผลิตกระแสไฟฟ้าของประเทศไทย เนื่องจากเป็นเชื้อเพลิงที่มีราคาถูกและมีปริมาณสำรองอยู่ภายในประเทศสูงถึง 1,468 ล้านตัน ที่เหมืองแม่เมาะ อ.แม่เมาะ จ.ลำปาง ซึ่งเท่ากับปริมาณถ่านหินลิกไนต์ที่สามารถใช้การผลิตกระแสไฟฟ้าจำนวนเท่าที่ใช้อยู่ในปัจจุบันนี้เป็นเวลานานถึง 30 ปี ถ่านหินลิกไนต์ที่ขุดได้จากเหมืองแม่เมาะ จังหวัดลำปางนี้มีปริมาณสารกำมะถันปนเปื้อนอยู่สูงถึงร้อยละ 6 โดยเฉลี่ย ดังนั้นการเผาถ่านหินลิกไนต์เพื่อการผลิตกระแสไฟฟ้าในปริมาณสูงถึง 3.5 หมื่นตันต่อวันนั้น จึงมีเกิดขึ้นในปริมาณมาก กาซซัลเฟอร์ไดออกไซด์เหล่านี้หากปล่อยออกสู่บรรยากาศจะก่อให้เกิดปัญหามลพิษต่อสิ่งแวดล้อม เป็นอันตรายต่อสุขภาพของคนและสัตว์ และเป็นสาเหตุของการเกิดฝนกรด ก่อให้เกิดความเสียหายต่อระบบนิเวศน์ปัจจุบันการไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทยดักจับกาซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นจากการเผาถ่านหินลิกไนต์นี้ไว้ด้วยเครื่อง Flue gas desulfurization แต่เนื่องจาก Flue gas desulfurization มีราคาแพงมากคือสูงถึง 2,194 ล้านบาท ดังนั้นการกำจัดกำมะถันที่ปนเปื้อนอยู่ในถ่านหินลิกไนต์ออกก่อน กระบวนการเผาไหม้จึงมีความสำคัญและจำเป็นอย่างยิ่ง เพื่อที่จะได้สามารถนำถ่านหินลิกไนต์ซึ่งเป็นทรัพยากรเชื้อเพลิงที่มีอยู่แล้วมาใช้ให้เกิดประโยชน์ โดยไม่ก่อให้เกิดปัญหาภาวะมลพิษสิ่งแวดล้อม นอกจากนั้นยังเป็นการช่วยยืดอายุการใช้งานของเครื่อง Flue gas desulfurization ด้วย หากใช้ร่วมกันเพราะกาซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ที่เกิดมาจากการเผาไหม้ของถ่านหินลิกไนต์นั้น ทำให้เครื่อง Flue gas desulfurization เกิดการผุกร่อนเสียหายได้

ถ่านหินเกิดจากการผุพังหรือการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและกายภาพของซากพืชที่สะสมกันอยู่เป็นเวลานาน ภายใต้ความดันและความร้อนของผิวโลก มีธาตุคาร์บอน (C) เป็นองค์ประกอบหลัก แร่ธาตุอื่น ๆ ที่พบเจือปน เช่น ซิลิกอน (Si) ไนโตรเจน (N) กำมะถัน (S) ซึ่งกำมะถันที่ปนเปื้อนอยู่ในถ่านหินนี้เป็นตัวการสำคัญในการก่อให้เกิดปัญหามลพิษ อันเนื่องมาจากกาซซัลเฟอร์ไดออกซได์ที่เกิดขึ้น เมื่อถ่านหินถูกนำมาเผาไหม้เพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิง

สารกำมะถันที่ปนเปื้อนอยู่ในถ่านหิน แบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท คือ

1. กำมะถันอินทรีย์ (organic sulfur)

กำมะถันอินทรีย์คือโมเลกุลของกำมะถันที่พบกระจายอยู่ทั่วไปในโมเลกุลของถ่านหิน ส่วนมากอยู่ในรูปของสารประกอบพวกเฮทเทอโรไซคลิก (heterocyclic) ซึ่งมีพันธะที่เสถียรมาก เช่น เมอแคปแทน (mercaptan, R-S-H), ซัลไฟด์ (Sulfide, R-S-R′), ไดซัลไฟด์ (disulfide, R-S-S-R′) และไทโอฟีนอล (thiophenol, C_6M_5SH) เป็นต้น

2. กำมะถันอนินทรีย์ (Inorganic sulfur) แบ่งเป็น 2 รูป คือ

2.1 กำมะถันไพไรต์ (pyritic sulfur)

กำมะถันไพไรต์ในถ่านหินอยู่ในรูปของสารประกอบโลหะซัลไฟด์ คือ แร่ไพไรต์ (pyrite) และแร่มาร์คาไซต์ (marcasite) แร่ทั้งสองชนิดมีสูตรเคมีเหมือนกันคือ FeS_2 แต่มีความแตกต่างกันทางโครงสร้างผลึกและสมบัติทางกายภาพ

2.2 กำมะถันซัลเฟต (sulfate sulfur)

พบในถ่านหินในลักษณะของโลหะซัลเฟต เช่น สารประกอบแคลเซียมซัลเฟต ($CaSO_4$) สารประกอบซัลเฟตของเหล็ก ($FeSO_4$) และแร่ยิบซัม (gypsum) เป็นต้น ปริมาณกำมะถันซัลเฟตนี้มีน้อยมากในถ่านหินเมื่อเทียบกับปริมาณกำมะถันไพไรต์และกำมะถันอินทรีย์

การกำจัดกำมะถันในถ่านหิน สามารถทำได้ 2 วิธีคือ

1. การกำจัดกำมะถันหลังการเผาไหม้ (post-combustion)

การกำจัดกำมะถันหลังการเผาไหม้นี้ทำโดยการใช้สารเคมีเช่น $CaCO_3$ จับกับก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการเผาถ่านหิน โดยเครื่องมือที่เรียกว่า Flue Gas Desulfurization หรือ FGD ซึ่งมีประสิทธิภาพในการจับก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ไว้ได้สูงถึง 95 เปอร์เซนต์ แต่ค่าใช้จ่ายในการลงทุนสูงมาก เพราะเครื่อง FGD มีราคาแพงมาก นอกจากนั้นยังพบว่าอายุการใช้งานของเครื่องสั้นกว่าที่ควรจะเป็นมาก ทั้งนี้เพราะปัญหาการผุกร่อนของเครื่องอันเนื่องมาจากผลของก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์

2. การกำจัดกำมะถันก่อนการเผาไหม้ (pre-combustion)

2.1 วิธีทางกายภาพ

การกำจัดกำมะถันออกจากถ่านหินโดยวิธีทางกายภาพเป็นการกำจัดเฉพาะกำมะถันไพไรต์โดยอาศัยความแตกต่างด้านสมบัติทางกายภาพของถ่านหินและกำมะถันไพไรต์ สมบัติทางกายภาพเหล่านี้ได้แก่ ความถ่วงจำเพาะ (specitic gravity) สมบัติการเป็นสารประเภท hydrophobic ของถ่านหินและสมบัติการเป็นสารประเภท hydrophilic ของไพไรต์ กรรมวิธีการที่ใช้คือ การตกตะกอนแยกชั้น (floatation) ปัญหาของวิธีการนี้คือการสูญเสียอนุภาคของถ่านหินขนาดเล็กบางส่วนระหว่างกระบวนการ

2.2 วิธีทางเคมี

การกำจัดกำมะถันออกจากถ่านหินโดยวิธีทางเคมีนี้ ทำโดยการใช้สารเคมีมาทำปฏิกิริยากับถ่านหินที่อุณหภูมิ 100-400°ซ. และความดัน 100-800 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เนื่องจากปฏิกิริยาเกิดขึ้นที่อุณหภูมิและความดันที่สูงมาก ทำให้ต้นทุนการกำจัดกำมะถันโดยวิธีการเคมีนี้สูงมาก นอกจากนั้นยังมีปัญหาว่าถ่านหินที่ผ่านกระบวนการทางเคมีดังกล่าวนี้ สมบัติความเป็นเชื้อเพลิงจะถูกทำลายไปบางส่วน

2.3 วิธีทางชีวภาพ

การกำจัดกำมะถันออกจากถ่านหินโดยวิธีทางชีวภาพอาศัยความสามารถของจุลินทรีย์บางชนิดในการย่อยสลายกำมะถัน ทั้งกำมะถันอินทรีย์และกำมะถันอนินทรีย์ในถ่านหินไปเป็นกรดกำมะถัน ซึ่งเป็นของเหลวจึงง่ายต่อการกำจัดออกภายหลังมากกว่าการกำจัดกาซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ที่เกิดหลังจากการเผาไหม้ถ่านหิน เนื่องด้วยปฏิกิริยาการย่อยสลายกำมะถันในถ่านหินไปเป็นกรดกำมถันโดยจุลินทรีย์เกิดขึ้นที่อุณหภูมิและความดันปกติ ทำให้ต้นทุนการดำเนินการต่ำ ถ่านหินที่ผ่านกระบวนการทางชีวภาพนี้ สมบัติความเป็นเชื้อเพลิงจึงไม่ถูกทำลาย นอกจากนี้ยังไม่มีการใช้สารเคมีที่เป็นอันตรายจึงไม่ก่อให้เกิดปัญหามลพิษ ปัจจุบันถ่านหินที่ผ่านกระบวนการกำจัดกำมะถันโดยวิธีทางชีวภาพสามารถนำมาใช้เป็นเชื้อเพลิงเผาไหม้ตามกระบวนการเผาแบบเปียก (Madgurkar, 1989) ได้ จึงทำให้การกำจัดกำมะถันออกจากถ่านหินโดยกิจกรรมของจุลินทรีย์มีศักยภาพสูงที่จะนำมาประยุกต์ใช้งานจริงได้

Hoffman และคณะ(1981) รายงานว่า *Thiobacillus ferrooxidans* สามารถกำจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากถ่านหินโดยกระบวนออกซิเดชันได้สูงถึง 90 เปอร์เซนต์ของปริมาณกำมะถันไพไรต์ทั้งหมดภายในเวลา 25 วัน

Kargi และ Robinson (1982) รายงานว่า *Sulfolobus acidocaldarius* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงประมาณ 60-93 °ซ และที่ค่าความเป็นกรดต่าง 1.5-4.0 สามารถกำจัดกำมะถัน

ไพไรต์ออกจากถ่านหินได้ 96 เปอร์เซนต์จากปริมาณกำมะถันไพไรต์ทั้งหมดภายในเวลา 10 วัน และสามารถกำจัดกำมะถันอินทรีย์ออกจากถ่านหินได้ด้วยในปริมาณ 44 เปอร์เซนต์ ของปริมาณกำมะถันอินทรีย์ทั้งหมดภายในเวลา 28 วัน

Rai และ Reyniers (1988) รายงานว่า *Pseudomonas putida* สามารถกำจัดกำมะถันอินทรีย์และกำมะถันอนินทรีย์ออกจากถ่านหินลิกไนต์ในมลรัฐเท็กซัส สหรัฐอเมริกา ปริมาณกำมะถันที่กำจัดได้คือ 37.4 เปอร์เซนต์ของกำมะถันอินทรีย์ทั้งหมด และ 75 เปอร์เซนต์ของกำมะถันอนินทรีย์ทั้งหมด ภายในเวลา 7 วัน

เนื่องจากกำมะถันที่ปนเปื้อนอยู่ในถ่านหินส่วนใหญ่นั้นอยู่ในรูปของกำมะถันไพไรต์ แม้ว่าจะมีรายงานว่ามีแบคทีเรียหลายชนิดที่สามารถกำจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากถ่านหินได้ก็ตาม แต่ก็ต้องใช้ระยะเวลานานมากในกระบวนการกำจัด ดังนั้นแบคทีเรียที่มีอยู่แล้วในธรรมชาติเหล่านี้ จึงไม่มีศักยภาพในการนำมาใช้เพื่อการกำจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากถ่านหินได้จริง หากต้องใช้ระยะเวลาดังที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น แต่การย่นระยะเวลาการกำจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากถ่านหินนี้ อาจทำได้โดยการเพิ่มประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการออกซิไดซ์กำมะถันไพไรต์ไปเป็นกรดกำมะถัน ซึ่งวิธีการเพิ่มประสิทธิภาพนี้อาจทำได้โดยการเพิ่มจำนวนชุดของยีนที่เป็นรหัสของเอนไซม์ในกระบวนการนั่นเอง

เอทีพีซัลฟูรีเลส (ATP sulfurylase. ATP : sulfate adenyltransferase, EC 2.7.7.4) เป็นเอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการเมตาบอลิซึม (metabolism) ของสารประกอบกำมะถันอนินทรีย์ inorganic sulfur) พบในจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น แบคทีเรียจำพวกที่ได้พลังงานเพื่อการดำรงชีวิตโดยกระบวนการออกซิเดชัน (oxidation) ของกำมะถันอนินทรีย์ และแบคทีเรียจำพวกที่ใช้สารประกอบซัลเฟตเป็นแหล่งกำมะถันเพื่อการเจริญโดยกระบวนการรีดักชัน (reduction) แต่เอนไซม์เอทีพีซัลฟูรีเลสซึ่งพบในแบคทีเรียทั้งสองจำพวกดังกล่าวข้างต้น จะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาในทิศทางตรงข้ามกัน แบคทีเรียพวกคีโมลิโทรโทรฟ (chemolithotroph) บางชนิด เช่น *Thiobacillus* sp. และ แบคทีเรียที่อาศัยแบบภาวะที่ต้องพึ่งพาอยู่กับ *Riftia* pachyptila เป็นต้น ได้พลังงานจากกระบวนการออกซิเดชันของกำมะถันอนินทรีย์โดยวิถีเอพีเอส (APS pathway) ซึ่งมีสารตัวกลางที่สำคัญคือสารประกอบซัลไฟต์ (sulfite,SO_3^{2-}) สารประกอบซัลไฟต์นี้จะถูกเปลี่ยนไปเป็นสารเอพีเอส (APS, adenosine 5′-phosphosulfate) โดยการทำงานของเอนไซม์เอพีเอสรีดักเตส (APS reductase) ต่อจากนั้นสารเอพีเอสจะถูกเปลี่ยนไปเป็นสารประกอบซัลเฟต (sulfate,SO_4^{2-}) และสารพลังงานสูงเอทีพี (ATP) โดยการทำงานของเอนไซม์เอทีพีซัลฟูรีเลส (Laue และ Nelson, 1994) ดังสมการที่ 1

$$HS^- \longrightarrow SO_3^{2-} \xrightarrow[AMP]{\text{APS reductase}} APS \xrightarrow[PPi]{\text{ATP sulfurylase}} SO_4^{2-} + ATP \qquad (1)$$

แบคทีเรีย เช่น *Escherichia coli* (Layh, et. al., 1988), *Saccharomyces cerevisiae* (Cherest, et. al., 1987) สามารถใช้สารประกอบซัลเฟตเป็นแหล่งกำมะถันเพื่อการสังเคราะห์สารอินทรีย์ที่มีกำมะถันเป็นองค์ประกอบเช่นกรดอะมิโนเมไธโอนีน ซิสตีน และซิสเตอีน เป็นต้น มีเอนไซม์เอทีพีซัลฟูรีเลสทำหน้าที่เปลี่ยนซัลเฟตไปเป็นสารเอพีเอส (ดังสมการที่ 2) สารเอพีเอสนี้จะถูกเปลี่ยนไปเป็นสารพีเอพีเอส (PAPS, 3′-phosphoadenosin 5′-phosphosulfate) โดยเอนไซม์เอพีเอสไคเนส (ดังสมการที่ 3) สารพีเอพีเอสนี้จะถูกเปลี่ยนต่อไปเป็นซัลไฟต์ เพื่อนำไปใช้ในกระบวนการสังเคราะห์สารอินทรีย์ต่อไป

$$ATP + SO_4^{2-} \xrightarrow{\text{ATP sulfruylase}} APS + PPi \qquad (2)$$

$$APS + ATP \xrightarrow{\text{APS kinase}} PAPS + ADP \qquad (3)$$

จากสมการที่ 1 และ 2 จะเห็นว่าเอนไซม์เอทีพีซัลฟูรีเลสในแบคทีเรียทั้งสองจำพวกทำงานในทิศทางตรงข้ามกัน

จากเมตาบอลิซึมของสารประกอบกำมะถันอนินทรีย์โดยจุลินทรีย์ที่พบในธรรมชาติ โดยเฉพาะแบคทีเรียกลุ่มที่สังเคราะห์พลังงานโดยกระบวนการออกซิเดชันกำมะถันอนินทรีย์นั้น น่าจะมีประโยชน์หากได้มีการนำมาใช้เพื่อการกำจัดกำมะถันอนินทรีย์ที่ปนเปื้อนในถ่านหินออก หากแบคทีเรียเหล่านี้มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายกำมะถันอนินทรีย์ ซึ่งอาจทำได้โดยวิธีการทางพันธุวิศวกรรม ด้วยการเพิ่มจำนวนชุดของยีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการ การวิจัยนี้จะทำการศึกษาเอนไซม์เอทีพีซัลฟูรีเลส ซึ่งเป็นเอนไซม์ในขั้นตอนสุดท้ายของการเปลี่ยนกำมะถันอนินทรีย์ไปเป็นซัลเฟต เพื่อพัฒนาสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ให้มีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดกำมะถันอนินทรีย์ออกจากถ่านหิน โดยการเพิ่มจำนวนชุดของยีนที่เป็นรหัสของเอนไซม์เอทีพีซัลฟูรีเลส มีผู้รายงานผลการศึกษาเกี่ยวกับยีนซึ่งเป็นรหัสของเอนไซม์เอทีพีซัลฟูรีเลสไว้ดังนี้

Cherest และคณะ (1987) ประสบความสำเร็จในการโคลนยีนเอทีพีซัลฟูรีเลส (*MET 3*) ซึ่งใช้ในกระบวนการสังเคราะห์กรดอะมิโนเมไธโอนินของ *Saccharomyces cerevisiae* ได้โดยวิธีคอมพลีเมนเตชัน (complementation) พร้อมรายงานลำดับเบสของยีนที่โคลนได้

ยีน *MET3* นี้ประกอบด้วย 1,666 นิวคลีโอไทด์แปลรหัสเป็นสายพอลิเปปไทด์ (polypeptide) ขนาด 521 กรดอะมิโน หรือขนาดน้ำหนักโมเลกุล 59 กิโลดาลตัน เมื่อเปรียบเทียบกับขนาดน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์นี้ของ *Penicillium chrysogenum* Tweedie และ Segel (1971) ได้สรุปว่าเอนไซม์เอทีพีซัลฟูรีเลสของ *S. cerevisiae* น่าจะประกอบด้วยสองหน่วยย่อย (subunit)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Layh และคณะ (1988) โคลนยีนที่เป็นรหัสของเอนไซม์เอทีพีซัลฟูรีเลสซึ่งใช้ในกระบวนการสังเคราะห์กรดอะมิโนซิสเตอีนของ *Escherichia coli* โดยวิธีคอมพลีเมนเตชัน พบว่ายีนซึ่งเป็นรหัสของเอนไซม์ประกอบด้วยยีน *cys D* และ *cys N* ซึ่งมีกระบวนการถอดรหัสเป็น mRNA อย่างเป็นอิสระต่อกัน แปลรหัสเป็นสายพอลิเปปไทด์ 2 สาย ขนาดน้ำหนักโมเลกุล 27 กิโลดาลตันและ 62 กิโลดาลตัน ตามลำดับ ซึ่งเป็นหน่วยย่อยของเอนไซม์

การอยู่ร่วมกันแบบภาวะที่ต้องพึ่งพา (Symbiosis) ระหว่างเชื้อแบคทีเรีย *Rhizobium meliloti* ที่ปมของรากพืชมีความจำเพาะต่อพืชอาศัยคือเฉพาะต่อรากของต้น *Medicago sativa* L. เท่านั้น ทั้งนี้เนื่องจาก *R. meliloti* มีเอนไซม์ที่สามารถเปลี่ยนโอลิโกแซคคาไรด์ (olicosaccharide) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เป็นผลมาจากปฏิกิริยาซึ่งใช้เอนไซม์ที่แปลรหัสมาจากยีน *nod ABC* เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาไปเป็นสาร NodRm-1 ซึ่งเป็นสารที่มีซัลเฟตเป็นองค์ประกอบ (sulphated NodRm-1) Schwedock และ Long (1990) ทำการศึกษายีน *nod PQ* โดยวิธี Southern hybridization และการวิเคราะห์แผนที่เรสติกชัน (Restriction map) พบว่ายีน *nod PQ* ของ *R. metiloti* มีความคล้ายคลึงกัน (homology) กับยีน *cys DN* ของ *E. coli* และเมื่อทดสอบโดยวิธีคอมพลีเมนเตชัน ยืนยันได้ว่ายีน *nod PQ* ของ *R. meliloti* และยีน *cys DN* ของ *E.coli* เป็นรหัสของเอนไซม์เอทีพีซัลฟูรีเลส นอกจากนั้นยังพบกิจกรรมของเอนไซม์เอทีพีซัลฟูรีเลสในน้ำสกัดจากเซลล์ *E. coli* ที่มียีน *nod PQ* ของ *R. neliloti* ด้วย ทำให้สรุปได้ว่าความจำเพาะต่อพืชอาศัยของ *R. meliloti* นั้นเกิดจาก *R. meliloti* มีเอนไซม์เอทีพีซัลฟูรีเลสซึ่งแปลรหัสจากยีน *nod PQ* ทำหน้าที่สังเคราะห์สารเอพีเอสซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะหสาร NodRm-1 จากโอลิโกแซคคาไรด์ที่เป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์แปลรหัสจากยีน *nod ABC* เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

Cavanaugh และคณะ (1981) พบกิจกรรมของเอนไซม์เอทีพีซัลฟูรีเลสปริมาณสูงในน้ำสกัดจากเนื้อเยื่อโทรโฟโซม (trophosome) ของหนอนตัวกลมชนิด *Riftia pachyptila* ซึ่งอาศัยอยู่ใต้ทะเลลึกบริเวณที่มีความเข้มข้นของไฮโดรเจนซัลไฟด์สูงถึง 160 ไมโครโมล จากการศึกษาพบว่าเอนไซม์เอทีพีซัลฟูรีเลสนี้ผลิตโดยแบคทีเรียกลุ่มคีโมลิโทรโทรพ (chemoliithotroph) ซึ่งเจริญอยู่ที่เนื้อเยื่อโทรโฟโซม ใช้เอนไซม์เอที-พีซัลฟูรีเลสผลิตพลังงานเพื่อการเจริญโดยขบวนการออกซิเดชันไฮโดรเจนซัลไฟด์สังเคราะห์สารอินทรีย์เพื่อการเจริญโดยขบวนการเคลวิน (Calvin cycle) แบคทีเรียนี้อยู่ร่วมกับ *R. pachyptila* แบบภาวะที่ต้องพึ่งพา ทั้งนี้เพราะแบคทีเรียได้รับกาซออกซิเจน และ กาซคาร์บอนไดออกไซด์จาก *R. pachyptila* ในขณะที่ *R. pachyptila* ได้รับสารอินทรีย์เพื่อการเจริญจากแบคทีเรีย Renosto และคณะ (1991) รายงานกรรมวิธีการทำให้เอนไซม์เอทีพีซัลฟูรีเลสซึ่งสกัดได้จากเนื้อเยื่อโทรโฟโซมของ R. pachyptila บริสุทธิ์ เอนไซม์บริสุทธิ์ที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุล 90 กิโลดาลตัน ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย ขนาดน้ำหนักโมเลกุลหน่วยละ 48 กิโลดาลตัน

Laue และ Nelson (1994) ประสบความสำเร็จในการโคลนยีนที่เป็นรหัสของเอนไซม์เอทีพีซัลฟูรีเลสของแบคทีเรียกลุ่มคีโมลิโทรโทรพที่อาศัยแบบภาวะที่ต้องพึ่งพาอยู่กับ *R. pachyptila* นับเป็นยีนเอทีพีซัลฟูรีเลสของแบคทีเรียที่ใช้ในกระบวนการออกซิเดชันกำมะถันอนินทรีย์โดยวิถีเอพีเอสชนิดแรกที่โคลนได้ (*sopT*) โดยการสังเคราะห์สายโอลิโกนิวคลีโอไทด์ (oligonucleotide) 2 สาย ซึ่งทำนายจากลำดับกรดอะมิโนด้านปลายเอ็น (N-terminus) ของเอนไซม์เอทีพีซัลฟูรีเลสบริสุทธิ์ (Renosto และคณะ, 1991) และลำดับกรดอะมิโนของสายพอลิเปปไทด์ที่ได้จากการย่อยสลายเอนไซม์เอทีพีซัลฟูรีเลสบริสุทธิ์ด้วยเอนไซม์ทริฟซิน (trypsin) นำมาใช้เป็นสายโอลิโกนิวคลีโอไทด์ตั้งต้น (primer) ในขบวนการเพิ่มดีเอ็นเอ (DNA amplification) โดยใช้โครโมโซมอลดีเอ็นเอ(chromosomal DNA)ของแบคทีเรียที่อาศัยแบบภาวะที่ต้องพึ่งพาอยู่กับ*R. pachyptila* เป็นแม่แบบ แล้วนำชิ้นดีเอ็นเอที่ผลิตได้ในปริมาณมากนี้มาใช้เป็นดีเอ็นเอติดตาม (DNA probe) เพื่อตรวจหายีนที่เป็นรหัสของเอนไซม์เอทีพีซัลฟูรีเลสจากธนาคารยีน (genomic library) ของแบคทีเรียที่อาศัยแบบภาวะที่ต้องพึ่งพาอยู่กับ *R. pachyptila* ผลการหาลำดับเบสของยีนที่ติดตามได้พบว่ายีนนี้ประกอบด้วย 1,317 นิวคลีโอไทด์ สามารถแปลรหัสเป็นสายพอลิเปปไทด์ขนาด 437 กรดอะมิโน หรือขนาดน้ำหนักโมเลกุล 48 กิโลดาลตัน ไม่พบความคล้ายคลึงกันของลำดับเบสระหว่างยีน *sop T* ที่โคลนได้กับยีน *cys DN* ของ *E.coli* และกับยีน *nod PQ* ของ *R. meliloti* เมื่อทำการทดสอบโดยวิธี Southern hybridization แต่พบความคล้ายคลึงกันในระดับกรดอะมิโนทั้งหมด (47.7%) ระหว่างเอนไซม์เอทีพีซัลฟูรีเลสของแบคทีเรียนี้และของ *S. cerevisiae* ซึ่งแปลรหัสมาจากยีน *MET 3* โดยลำดับกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 193 ถึง 209 มีความคล้ายคลึงกันสูงถึง 94 เปอร์เซนต์

ผู้วิจัยจึงประสงค์ที่จะโคลนยีนที่เป็นรหัสของเอนไซม์เอทีพีซัลฟูรีเลสของแบคทีเรียซึ่งแยกได้จากแหล่งธรรมชาติในประเทศไทยที่สามารถออกซิไดซ์ (oxidise) กำมะถันอนินทรีย์ โดยการสังเคราะห์สายโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่เป็นรหัสของกรดอะมิโนบนสายพอลิเปปไทด์ บริเวณที่มีรายงานว่าลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัสจากยีน *sop T* และยีน *MET 3* มีความคล้ายคลึงกันสูงถึง 94 เปอร์เซนต์ (Laue และ Nelson, 1994) เป็นตัวติดตามจากธนาคารยีน