

บทคัดย่อภาษาไทย

ในปัจจุบัน การผลิตพลังงานเชื้อเพลิงและสารเคมีอุตสาหกรรมประสบปัญหาเนื่องจากการขาดแคลนวัตถุดิบประเภทปิโตรเลียม การใช้กระบวนการผลิตทางเคมีใช้สภาวะที่รุนแรงและใช้ตัวเร่งทางเคมีซึ่งอาจก่อให้เกิดการตกค้างและเป็นมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม อีกทั้งใช้พลังงานและต้นทุนสูงและเกิดสารพลอยได้ที่ไม่ต้องการ ดังนั้น การใช้กระบวนการทางชีวภาพในการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพและสารปิโตรเคมีอุตสาหกรรมต่างๆ โดยใช้สารชีวมวลเป็นวัตถุดิบและมีจุลินทรีย์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพจึงเป็นทางเลือกที่ดีและมีศักยภาพอีกทางหนึ่ง อย่างไรก็ตาม ข้อจำกัดของกระบวนการนี้ได้แก่ ความเป็นพิษของสารผลิตภัณฑ์ประเภทไฮโดรคาร์บอนและสารพลอยได้บางชนิดต่อจุลินทรีย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อปริมาณสารผลิตภัณฑ์สะสมอยู่ในระบบการหมักสูงซึ่งทำให้จุลินทรีย์ตายหรือไม่สามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ การปรับปรุงทำได้โดยการใช้จุลินทรีย์ที่สามารถทนตัวทำละลายอินทรีย์เพื่อลดผลกระทบจากความเป็นพิษในระบบการหมักในการผลิตสารผลิตภัณฑ์ไฮโดรคาร์บอน เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของกระบวนการผลิตดังกล่าว นอกจากนั้นแล้ว จุลินทรีย์เหล่านี้ยังสามารถได้รับการพัฒนาเป็นเชื้อเจ้าบ้านในการทำวิศวกรรมพันธุศาสตร์เพื่อให้มีการแสดงออกของยีนและมีประสิทธิภาพสูงขึ้นในการผลิตสารผลิตภัณฑ์ไฮโดรคาร์บอนที่ต้องการ

โครงการวิจัยเรื่อง “การพัฒนาและประยุกต์ใช้ตัวเร่งทางชีวภาพสำหรับกระบวนการทางชีวภาพในการผลิตสารเคมี จากสารชีวมวล” อาศัยหลักการดังกล่าวข้างต้น ในการสร้างต้นแบบและการพัฒนาสร้างวิธีการผลิตสารโดยผลิตสารต้นแบบ R-1,3-butenediol (R13BD) ซึ่งเป็นสารที่มีมูลค่าทางอุตสาหกรรมจากสารชีวมวลเพื่อทดแทนการใช้สารตั้งต้นจากสารปิโตรเคมี โดยการพัฒนาศายพันธุ์ของแบคทีเรีย recombinant ด้วย metabolic engineering และการใช้กระบวนการผลิตทางเทคโนโลยีชีวภาพ ผลการวิจัยประสบความสำเร็จในการพัฒนาศายพันธุ์ของแบคทีเรีย *E. coli* recombinant ด้วยการใช้วิธีพันธุวิศวกรรม และการสร้างวิธีการผลิตที่มีประสิทธิภาพสำหรับการผลิต R13BD ด้วยวิธีชีวภาพจากกลูโคส โดยการสร้างพลาสมิดลูกผสมซึ่งประกอบด้วย ยีน *phaA* (3-ketothiolase), *phaB* (NAD(P)H dependent acetoacetyl-CoA reductase) จาก *Ralstonia eutropha* NBRC 102504 และ *bld* (butyraldehyde dehydrogenase) จากแบคทีเรีย *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* ATCC 27012 และแสดงออกในแบคทีเรีย *E. coli* MG1655 $lacI^q$ โดยแสดงให้เห็นว่าการคัดเลือกยีนเป็นองค์ประกอบสำคัญซึ่งนำไปสู่การแสดงออกของการทำงานของเอนไซม์และการสร้างสารผลิตภัณฑ์ ในสภาวะการผลิตที่เหมาะสม ผลการวิจัยนี้สามารถผลิต R13BD ได้ถึง 9.05 กรัม/ลิตร (100.4 มิลลิโมลาร์) ซึ่งเป็นความเข้มข้นและความบริสุทธิ์สูงที่สุดจากที่มีการรายงานในปัจจุบัน จากนั้น ศึกษาสภาวะการผลิตและปัจจัยต่างๆ ที่ส่งเสริมการผลิตในระดับถังหมักขนาด 2 ลิตร เพื่อเป็นต้นแบบการผลิตในระดับขยายขนาดภายใต้ระบบการหมักแบบ Fed-batch และประสบความสำเร็จในการผลิตสาร R13BD ที่มีค่าความเข้มข้นสูงสุดของการผลิตได้ถึง 174.8 มิลลิโมลาร์ ค่าผลผลิต (yield) ที่ 0.372 โมลต่อโมลกลูโคสที่ใช้ และค่าอัตราการผลิตสูงสุดที่ 3.90 มิลลิโมลาร์ต่อชั่วโมง ที่ 96 ชั่วโมงการหมัก ซึ่งมีค่า titer, yield, maximum production rate และความบริสุทธิ์ในรูปแบบ R ที่ต้องการ (98.6 %ee) สูงกว่าที่เคยมีรายงานมาก่อน

สำหรับการพัฒนากระบวนการผลิต 3-เมทิลแคทิคอล (3MC) จากสารชีวมวลโดยแบคทีเรียที่ทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์ แสดงตัวอย่างการพัฒนาแบคทีเรียแพลตฟอร์มสำหรับการผลิตสารเคมีไฮโดรคาร์บอนไม่ชอบน้ำ คือ 3-เมทิลแคทิคอล (3MC) จากโกลีอิน และสารชีวมวลกลีเซอรอล โดยใช้แบคทีเรียทนตัวทำละลายอินทรีย์ซึ่งดัดแปลงพันธุกรรม *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ TODE1 เป็นตัวเร่งชีวภาพ ในระบบการผลิตทางชีวภาพแบบการหมักสองเฟส การดำเนินการวิจัยเริ่มต้นจากการศึกษาการผลิตในระดับการผลิตขนาดเล็ก และศึกษาสภาวะและปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการเพิ่มผลผลิตของสารผลิตภัณฑ์เป้าหมาย ซึ่งรวมถึงชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ สารกระตุ้นเชื้อ สารกระตุ้น cofactor regeneration system ซึ่งมีผลอย่างมากในระบบที่มีการดัดแปรพันธุกรรมและ/หรือดัดแปลงวิธีการผลิตสาร นอกจากนั้น ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการทำงานของระบบการหมักแบบสองเฟส ทั้งนี้จากการคำนวณ Response Surface Methodology-based central composite design และจากผลการทดลองจริง ประสบความสำเร็จในการพัฒนาระบบหมักที่ใช้ในการผลิตสาร 3MC ด้วยแบคทีเรียกลายพันธุ์ *P. putida* T-57 สายพันธุ์ TODE1 ภายใต้ระบบการผลิตแบบสองเฟส โดยมี 1-เตคานอลเป็นขั้นของตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสม โดยมีการเติมกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนของเชื้อ, และพบว่า การเติม Fe^{2+} สามารถเพิ่มผลผลิตของ 3MC ได้อย่างมีนัยสำคัญ สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตโดยรวมของ 3MC ได้ถึง 34 มิลลิโมลาร์ ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่สูงที่สุดเมื่อเทียบกับงานวิจัยที่ผ่านมา จากนั้น การศึกษาการผลิตและปัจจัยต่างๆ ที่ส่งเสริมการผลิตในระดับถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่มีปริมาตรการผลิตที่ 0.8 ลิตร ด้วยระบบ Fed-batch fermentation ประสบความสำเร็จในการผลิตสาร 3MC ได้ถึง 150 มิลลิโมลาร์ ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่สูงที่สุดเมื่อเทียบกับงานวิจัยที่ผ่านมา

โดยสรุป ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นศักยภาพของการใช้แบคทีเรียแพลตฟอร์ม ซึ่งได้แก่แบคทีเรียทนทานต่อตัวทำละลายอินทรีย์ สำหรับการพัฒนาเป็นเชื้อเจ้าบ้านในการทำวิศวกรรมพันธุศาสตร์ และ/หรือวิศวกรรมเมแทบอลิซึมเพื่อให้มีการแสดงออกของยีนและ/หรือวิถีของยีน และมีประสิทธิภาพสูงขึ้นในการผลิตสารผลิตภัณฑ์ไฮโดรคาร์บอนที่มีมูลค่าต่ออุตสาหกรรมในระบบ single phase และ/หรือ two-liquid (organic-aqueous) phase fermentation ทั้งนี้ ผลผลิตที่ได้จากการวิจัยนี้ได้แก่ ผลงานตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติจำนวน 4 เรื่อง และอยู่ระหว่างการพิจารณาเพื่อการตีพิมพ์อีก 1 เรื่อง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ (Abstract)

At present, one of the most serious global problems is the depletion of petro-feedstock causing energy shortage problem and markedly affecting chemical production industries. Although industrial chemical production *via* conventional chemical process has been so far a fundamental part to produce industrial chemical products, it is expected to have fewer roles due to its reliance on fossil feedstock, its environmental adverse impact, its high energy-consumption process, the production of unwanted by-products and toxic waste generation. Therefore, biotechnological processes based on use of renewable biomass and microbial biocatalyst have been replaced chemical processes and become alternative environmental-friendly processes to produce various bioproducts including biofuel and industrial petrochemicals. However, when these hydrocarbon products are produced to certain concentration in the fermentation system, they become either less soluble in water or toxic to microorganisms, some of which are toxic even at low concentration. Consequently, the biocatalyst is harmed and the bioproduction is halted. To mitigate the hydrophobic effect and toxicity of hydrocarbon products/biomass contaminants to microbial catalyst, it can be achieved by using organic solvent-tolerant bacteria, which are able to thrive, i.e. tolerate and viable, in the presence of high concentration of hydrocarbon chemicals, and thus become the alternative biocatalysts for effective bioproduction. In addition, they can be genetically engineered and/or metabolically engineered to become biocatalytic hosts to improve the catalytic efficiency for a desired bioproduction process.

This research project, entitled “The development and applications of biocatalysts for chemical bioproduction from biomass”, has employed the abovementioned concept. Firstly, a model bioproduction system was initiated for R-1,3-butanediol (R13BD) production using a genetically-metabolically engineered *Escherichia coli* MG1655 Δ lacI^q. (R)-1,3-Butanediol is a valuable chemical extensively used as a key intermediate for the synthesis of pharmaceuticals and several industrial compounds. Despite its high demand, the production has been restricted from multi-step chemical production, petrochemical substrate requirement and a non-existence natural synthesis pathway from renewable biomass. In this study, an artificial synthesis route was genetically and metabolically engineered in *Escherichia coli* MG1655 Δ lacI^q to produce 1,3-butanediol from glucose. The selection of heterologous genes from several organisms and activity level of their corresponding gene products were demonstrated to be the key element for the product formation including *phaA* (3-ketothiolase), *phaB* (NAD(P)H dependent acetoacetyl-CoA reductase) of *Ralstonia eutropha* NBRC 102504, and *bltD* (butyraldehyde dehydrogenase) from *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* ATCC 27012. Improvement of fermentation aeration and the application of fed-batch system significantly enhanced 1,3-butanediol production. Under the optimized conditions, 1,3-butanediol was produced up to 9.05 g/l (100.4 mM) with 98.5 ± 0.2% enantiomeric excess (% ee) of (R)-1,3-butanediol. This is the highest yield of 1,3-butanediol produced from glucose with the highest optical purity by the recombinant strain reported thus far.

Secondly, a model bioproduction system using an organic-solvent tolerant bacterial host and a two-liquid (organic-aqueous) phase was demonstrated for 3-methylcatechol production. Genetically engineered *Pseudomonas putida* TODE1 served as a biocatalyst for the bioproduction of valuable 3-methylcatechol (3MC) from toluene in an aqueous-organic two-phase system. The two-phase system was used as an approach to increase the biocatalyst efficiency. Among the organic solvent tested, *n*-decanol offered several benefits including having the highest partitioning of 3MC, with a high 3MC yield and low cell toxicity. The effect of media supplementation with carbon/energy sources (glucose, glycerol, acetate and succinate), divalent metal cations (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} and Fe^{2+}), and short-chain alcohols (ethanol, *n*-propanol and *n*-butanol) as a cofactor regeneration system on the toluene dioxygenase (TDO) activity, cell viability, and overall 3MC yield were evaluated. Along with the two-step cell preparation protocol, supplementation of the medium with 4 mM glycerol as a carbon/energy source, and 0.4 mM Fe^{2+} as a cofactor for TDO significantly enhanced the 3MC production level. When combining with the use of *n*-decanol and *n*-butanol as the organic phase, a maximum overall 3MC concentration of 31.8 mM (166 mM in the organic phase) was obtained in a small-scale production, while it was at 160.5 mM (333.2 mM in the organic phase) in a 2-L scale. To our knowledge, this is the highest 3MC yield obtained from a TDO-based system so far.