แบบสรุปผู้บริหาร
[Executive Summary]
---

1. รายละเอียดเกี่ยวกับโครงการวิจัย

1.1 ชื่อเรื่อง

(ภาษาไทย) การพัฒนาและประยุกต์ใช้ตัวเร่งทางชีวภาพที่เสถียรในตัวทำละลายอินทรีย์สำหรับกระบวนการทางชีวภาพในการผลิต 3-Methylcatechol และ *R*-1,3-butanediol

(ภาษาอังกฤษ) The development and applications of solvent-tolerant biocatalyst for bioproduction of 3-Methylcatechol and *R*-1,3-butanediol

1.2 ชื่อคณะผู้วิจัย

<u>คณะผู้วิจัยฝ่ายไทย</u>

1.2.1 หัวหน้าโครงการ (ภาษาไทย) ดร.อลิสา วังใน
(ภาษาอังกฤษ) ALISA VANGNAI
ตำแหน่ง รองศาสตราจารย์
หน่วยงาน ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
สถานที่ติดต่อ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนพญาไท เขตปทุมวัน กรุงเทพ 10330
โทรศัพท์ 02-218-5430 โทรสาร 02-218-5418
Email: alisa.v@chula.ac.th, avangnai@yahoo.com

1.2.2 นักวิจัยร่วมโครงการ (ภาษาไทย) ดร.ธัญญารัตน์ พงศ์ทรางกูร
(ภาษาอังกฤษ) THUNYARAT PONGTHARANGKUL
ตำแหน่ง อาจารย์
หน่วยงาน ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
สถานที่ติดต่อ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพ
โทรศัพท์ 02-201-5315 โทรสาร 02-354-7160
Email: sctpr@mahidol.ac.th

1.2.3 นักวิจัยร่วมโครงการ (ภาษาไทย) ดร. อจิราภรณ์ คงผล
(ภาษาอังกฤษ) AJIRAPORN KONGPOL
ตำแหน่ง นิสิตระดับดุษฎีบัณฑิต
Email: akongpol@yahoo.com

<u>คณะผู้วิจัยฝ่ายญี่ปุ่น</u>

1.2.4 หัวหน้าโครงการ Dr. JUNICHI KATO
ตำแหน่ง Professor
หน่วยงาน Department of Molecular Biotechnology, Graduate school of Advanced Sciences of Matter

สถานที่ติดต่อ Department of Molecular Biotechnology, Graduate school of Advanced Science of Matter, Hiroshima University, 1-3-1 Kagamiyama, Higashi-Hiroshima, Hiroshima 739-8530 Japan
Email: jun@hiroshima-u.ac.jp

1.2.5 นักวิจัยฝ่ายญี่ปุ่น YUTAKA NAKASHIMADA
ตำแหน่ง Associate Professor
หน่วยงาน Department of Molecular Biotechnology, Graduate school of Advanced Sciences of Matter
สถานที่ติดต่อ Department of Molecular Biotechnology, Graduate school of Advanced Science of Matter, Hiroshima University, 1-3-1 Kagamiyama, Higashi-Hiroshima, Hiroshima 739-8530 Japan

1.2.6 นักวิจัยฝ่ายญี่ปุ่น TSUNEHIRO AKI
ตำแหน่ง Associate Professor
หน่วยงาน Department of Molecular Biotechnology, Graduate school of Advanced Sciences of Matter
สถานที่ติดต่อ Department of Molecular Biotechnology, Graduate school of Advanced Science of Matter, Hiroshima University, 1-3-1 Kagamiyama, Higashi-Hiroshima, Hiroshima 739-8530 Japan

1.3 งบประมาณและระยะเวลาการทำวิจัย

ได้รับงบประมาณ 3 ปี ได้แก่ งบประมาณประจำปี พ.ศ. 2553 พ.ศ. 2554 และ พ.ศ. 2556
งบประมาณที่ได้รับ 500,000 บาทต่อปี รวม 1,500,000 บาท
ระยะเวลาการทำวิจัย ตั้งแต่ ปีที่ 1 เดือนกรกฎาคม 2553-มิถุนายน 2554, ปีที่ 2 เดือนกรกฎาคม 2554-มิถุนายน 2555 และ ปีที่ 3 เดือนกรกฎาคม 2556-มิถุนายน 2557

2. สรุปโครงการวิจัย

ในปัจจุบัน ทั่วโลกประสบปัญหาการขาดแคลนพลังงานเชื้อเพลิงและสารอุตสาหกรรมปิโตรเคมี การผลิตสารเหล่านี้ด้วยวิธีทางเคมีใช้ตัวเร่งทางเคมีที่มีต้นทุนสูง ใช้สภาวะที่รุนแรง ใช้พลังงานมาก และเกิดสารพลอยได้ที่ไม่ต้องการ ดังนั้น กระบวนการผลิตทางชีวภาพโดยใช้สารชีวมวลเป็นสารตั้งต้นโดยมีจุลินทรีย์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพจึงเป็นทางเลือกที่มีศักยภาพ อย่างไรก็ตาม ข้อจำกัดได้แก่ ความเป็นพิษของสารผลิตภัณฑ์ไฮโดรคาร์บอนและสารพลอยได้บางชนิดต่อจุลินทรีย์ การปรับปรุงทำได้โดยการใช้จุลินทรีย์ที่สามารถทนตัวทำละลายอินทรีย์และพัฒนาเป็นเชื้อเจ้าบ้านด้วยวิศวกรรมพันธุศาสตร์เพื่อให้มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตสารผลิตภัณฑ์ไฮโดรคาร์บอนเป้าหมายที่ต้องการ วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัยนี้ ได้แก่ การพัฒนาต้นแบบของตัวเร่งทางชีวภาพรีคอมบิแนนท์ การสร้างวิถีการผลิตสารเคมีอุตสาหกรรมด้วยวิธีวิศวกรรมเมแทบอลิซม ได้แก่ สาร *R*-1,3-butanediol (R13BD) และ 3-แมทิลแคทิคอล (3MC) รวมทั้งการพัฒนากระบวนการผลิตในระดับห้องปฏิบัติการ วิธีการดำเนินการสรุปเป็นขั้นตอนได้ดังนี้ การสร้างวิถีการผลิตสารด้วยการดัดแปลงพันธุกรรม (การตัดต่อยีนต่างๆ) ในพลาสมิด จากนั้น นำเข้าสู่แบคทีเรียเจ้าบ้านที่เหมาะสม เช่น *Escherichia coli* หรือ แบคทีเรียทนตัวทำละลายอินทรีย์ซึ่ง *Pseudomonas putida* สำหรับการผลิต R13BD และ 3MC ตามลำดับ จากนั้น ศึกษาสภาวะและปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อ

การเพิ่มผลผลิตของสารผลิตภัณฑ์เป้าหมาย ผลการวิจัยนี้ ในเบื้องต้นสามารถผลิต R13BD ได้ถึง 9.05 กรัม/ลิตร (100.4 มิลลิโมลาร์) ซึ่งเป็นความเข้มข้นและความบริสุทธิ์สูงที่สุดจากที่มีการรายงานในปัจจุบัน จากนั้น ศึกษาสภาวะการผลิตและปัจจัยต่างๆ ที่ส่งเสริมการผลิตในระดับถังหมักขนาด 2 ลิตร เพื่อเป็นต้นแบบการผลิตในระดับขยายขนาดภายใต้ระบบการหมักแบบ Fed-batch และประสบความสำเร็จในการผลิตสาร R13BD ที่มีค่าความเข้มข้นสูงสุดของการผลิตได้ถึง 174.8 มิลลิโมลาร์ มีค่าผลผลิต (yield) ที่ 0.372 โมลต่อโมลกลูโคสที่ใช้ และค่าอัตราการผลิตสูงสุดที่ 3.90 มิลลิโมลาร์ต่อชั่วโมง ที่ 96 ชั่วโมงการหมัก ซึ่งมีค่า titer, yield, maximum production rate และความบริสุทธิ์ในรูปแบบ *R* (98.6 %ee) สูงกว่าที่เคยมีรายงานมาก่อน สำหรับผลการวิจัยในการผลิต 3MC ประสบความสำเร็จในการพัฒนาระบบหมักโดยใช้แบคทีเรียทนตัวทำละลายอินทรีย์ดัดแปลงพันธุกรรม *P. putida* สายพันธุ์ TODE1 เป็นตัวเร่งชีวภาพ ในระบบการผลิตทางชีวภาพแบบการหมักสองเฟส จากสารชีวมวลกลีเซอรัล โดยมี 1-เดคานอลเป็นชั้นของตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสม สามารถสาร 3MC ได้ถึง 34 มิลลิโมลาร์ จากนั้น การศึกษาการผลิตและปัจจัยต่างๆ ที่ส่งเสริมการผลิตในระดับถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่มีปริมาตรการผลิตที่ 0.8 ลิตร ด้วยระบบ Fed-batch fermentation ประสบความสำเร็จในการผลิตสาร 3MC ได้ถึง 150 มิลลิโมลาร์ ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่สูงที่สุดเมื่อเทียบกับงานวิจัยที่ผ่านมา

โครงการนี้มีจุดเด่นของงานวิจัยในการพัฒนาต้นแบบตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพแบบรีคอมบิแนนท์ พัฒนาการสร้างวิถีการผลิตสารเคมีอุตสาหกรรมด้วยวิธีวิศวกรรมเมแทบอลิซม และพัฒนากระบวนการผลิตในระดับห้องปฏิบัติการ โดยมีสารเคมีอุตสาหกรรม 2 ชนิดเป็นสารผลิตภัณฑ์ต้นแบบในการผลิต ได้แก่ *R*-1,3-butanediol และ 3-แมทิลแคทิคอล ผลการศึกษาวิจัยที่ประสบความสำเร็จในการผลิตนี้แสดงศักยภาพของการใช้แบคทีเรียแพลตฟอร์มในการพัฒนาเป็นเชื้อเจ้าบ้านด้วยการทำวิศวกรรมพันธุศาสตร์และ/หรือวิศวกรรมเมแทบอลิซมในการผลิตสารผลิตภัณฑ์ไฮโดรคาร์บอนที่มีมูลค่าต่ออุตสาหกรรมในระบบ single phase และ/หรือ two-liquid (organic-aqueous) phase fermentation องค์ความรู้ที่ได้จากการวิจัยนี้สามารถนำไปใช้ประยุกต์ในการพัฒนากระบวนการผลิตสารปิโตรเคมีและเชื้อเพลิงชีวภาพต่างๆ ที่เป็นประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมโดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพ ทั้งนี้ กระบวนการผลิตทางชีวภาพ (bioproduction) เป็นกระบวนการผลิตทางเลือกที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ต้นทุนต่ำกว่า และสามารถใช้สารชีวมวล รวมทั้งของเสียอุตสาหกรรม(waste utilization) มาใช้ให้เป็นประโยชน์โดยเป็นสารตั้งต้นของกระบวนการผลิตสารเคมีอุตสาหกรรมมูลค่าเพิ่ม

3. บทคัดย่อภาษาไทยและบทคัดย่อภาษาอังกฤษ

บทคัดย่อภาษาไทย

ในปัจจุบัน การผลิตพลังงานเชื้อเพลิงและสารเคมีอุตสาหกรรมประสบปัญหาเนื่องจากการขาดแคลนวัตถุดิบประเภทปิโตรเลียม การใช้กระบวนการผลิตทางเคมีใช้สภาวะที่รุนแรงและใช้ตัวเร่งทางเคมีซึ่งอาจก่อให้เกิดการตกค้างและเป็นมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม อีกทั้งใช้พลังงานและต้นทุนสูงและเกิดสารพลอยได้ที่ไม่ต้องการ ดังนั้น การใช้กระบวนการทางชีวภาพในการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพและสารปิโตรเคมีอุตสาหกรรมต่างๆ โดยใช้สารชีวมวลเป็นวัตถุดิบและมีจุลินทรีย์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพจึงเป็นทางเลือกที่ดีและมีศักยภาพอีกทางหนึ่ง อย่างไรก็ตาม ข้อจำกัดของกระบวนการนี้ได้แก่ ความเป็นพิษของสารผลิตภัณฑ์ประเภทไฮโดรคาร์บอนและสารพลอยได้บางชนิดต่อจุลินทรีย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อปริมาณสารผลิตภัณฑ์สะสมอยู่ในระบบการหมักสูงขึ้น ซึ่งทำให้จุลินทรีย์ตายหรือไม่สามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ การปรับปรุงทำได้โดยการใช้จุลินทรีย์ที่สามารถทนตัวทำละลายอินทรีย์เพื่อลดผลกระทบจากความเป็นพิษในระบบการหมักในการผลิตสารผลิตภัณฑ์ไฮโดรคาร์บอน เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของกระบวนการผลิตดังกล่าว

นอกจากนั้นแล้ว จุลินทรีย์เหล่านี้ยังสามารถได้รับการพัฒนาเป็นเชื้อเจ้าบ้านในการทำวิศวกรรมพันธุศาสตร์เพื่อให้มีการแสดงออกของยีนและมีประสิทธิภาพสูงขึ้นในการผลิตสารผลิตภัณฑ์ไฮโดรคาร์บอนที่ต้องการ โครงการวิจัยเรื่อง “การพัฒนาและประยุกต์ใช้ตัวเร่งทางชีวภาพสำหรับกระบวนการทางชีวภาพในการผลิตสารเคมี จากสารชีวมวล” อาศัยหลักการดังกล่าวข้างต้น ในการสร้างต้นแบบและการพัฒนาสร้างวิถีการผลิตสารโดยผลิตสารต้นแบบ *R*-1,3-butanediol (R13BD) ซึ่งเป็นสารที่มีมูลค่าทางอุตสาหกรรมจากสารชีวมวลเพื่อทดแทนการใช้สารตั้งต้นจากสารปิโครเคมี โดยการพัฒนาสายพันธุ์ของแบคทีเรีย recombinant ด้วย metabolic engineering และการใช้กระบวนการผลิตทางเทคโนโลยีชีวภาพ ผลการวิจัยประสบความสำเร็จในการพัฒนาสายพันธุ์ของแบคทีเรีย *E. coli* recombinant ด้วยการใช้วิธีพันธุวิศวกรรม และการสร้างวิถีการผลิตที่มีประสิทธิภาพสำหรับการผลิต R13BD ด้วยวิธีชีวภาพจากกลูโคส โดยการสร้างพลาสมิดลูกผสมซึ่งประกอบด้วยยีน *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 laclq 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-แมทิลแคทิคอล (3MC) จากสารชีวมวลโดยแบคทีเรียที่ทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์ แสดงตัวอย่างการพัฒนาแบคทีเรียแพลตฟอร์มสำหรับการผลิตสารเคมีไฮโดรคาร์บอนไม่ชอบน้ำ คือ 3-แมทิลแคทิคอล (3MC) จากโทลูอีน และสารชีวมวลกลีเซอรัล โดยใช้แบคทีเรียทนตัวทำละลายอินทรีย์ซึ่งดัดแปลงพันธุกรรม *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ TODE1 เป็นตัวเร่งชีวภาพ ในระบบการผลิตทางชีวภาพแบบการหมักสองเฟส การดำเนินการวิจัยเริ่มต้นจากการศึกษาการผลิตในระดับการผลิตขนาดเล็ก และศึกษาสภาวะและปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการเพิ่มผลผลิตของสารผลิตภัณฑ์เป้าหมาย ซึ่งรวมถึงชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ สารกระตุ้นเชื้อ สารกระตุ้น cofactor regeneration system ซึ่งมีผลอย่างมากในระบบที่มีการดัดแปรพันธุกรรม และ/หรือดัดแปลงวิถีการผลิตสาร นอกจากนั้น ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการทำงานของระบบการหมักแบบสองเฟส ทั้งนี้จากการคำนวณ Response Surface Methodology-based central composite design และจากผลการทดลองจริง ประสบความสำเร็จในการพัฒนาระบบหมักที่ใช้ในการผลิตสาร 3MC ด้วยแบคทีเรียกลายพันธุ์ *P. putida* T-57 สายพันธุ์ TODE1 ภายใต้ระบบการผลิตแบบสองเฟส โดยมี 1-เดคานอลเป็นชั้นของตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสม โดยมีการเติมกลีเซอรัลเป็นแหล่งคาร์บอนของเชื้อ, และพบว่าการเติม 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 ผลการศึกษาวิจัยนี้แสดงศักยภาพของการใช้แบคทีเรียแพลตฟอร์ม ซึ่งได้แก่แบคทีเรียทนทานต่อตัวทำละลายอินทรีย์ สำหรับการพัฒนาเป็นเชื้อเจ้าบ้านในการทำวิศวกรรมพันธุศาสตร์ และ/หรือวิศวกรรมเมแทบอลิซมเพื่อให้มีการแสดงออกของยีนและ/หรือวิถีของยีน และมีประสิทธิภาพสูงขึ้นในการผลิตสารผลิตภัณฑ์ไฮโดรคาร์บอนที่มีมูลค่าต่ออุตสาหกรรมในระบบ single phase และ/หรือ two-liquid (organic-aqueous) phase fermentation ทั้งนี้ ผลผลิตที่ได้จากการวิจัยนี้ได้แก่ ผลงานตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติจำนวน 5 เรื่อง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

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/ormetabolically 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 lacIq. (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 lacIq 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 *bld* (butyraldehyde dehydrogenase) from *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* strain 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. The scientific outputs from this project are 5 international publications.

สรุปโครงการวิจัยสำหรับการประชาสัมพันธ์

ชื่อโครงการวิจัย การพัฒนาและประยุกต์ใช้ตัวเร่งทางชีวภาพที่เสถียรในตัวทำละลายอินทรีย์สำหรับกระบวนการทางชีวภาพในการผลิต 3-Methylcatechol และ *R*-1,3-butanediol (The development and applications of solvent-tolerant biocatalyst for bioproduction of 3-methylcatechol and *R*-1,3-butanediol)

คณะผู้วิจัย

1. รองศาสตราจารย์ดร.อลิสา วังใน (หัวหน้าโครงการ) ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โทรศัพท์ 02-218-5430 Email: alisa.v@chula.ac.th, avangnai@yahoo.com
2. ดร. ธัญญารัตน์ พงศ์ทรางกูร ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
3. ดร. อจิราภรณ์ คงผล สหสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
4. Professor Dr. JUNICHI KATO*
5. Associate Professor YUTAKA NAKASHIMADA*
6. Associate Professor TSUNEHIRO AKI*

*Department of Molecular Biotechnology, Graduate school of Advanced Sciences of Matter, Hiroshima University, Hiroshima, Japan

ประเด็นปัญหาก่อนการวิจัย

การผลิตพลังงานเชื้อเพลิงและสารเคมีอุตสาหกรรมประสบปัญหาเนื่องจากการขาดแคลนวัตถุดิบประเภทปิโตรเลียม การใช้กระบวนการผลิตทางเคมีใช้สภาวะที่รุนแรงและใช้ตัวเร่งทางเคมีซึ่งใช้พลังงานและต้นทุนสูง ดังนั้น การใช้กระบวนการทางชีวภาพในการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพและสารปิโตรเคมีอุตสาหกรรมต่างๆ โดยใช้สารชีวมวลเป็นวัตถุดิบ และมีจุลินทรีย์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพจึงเป็นกระบวนทางเลือกที่มีศักยภาพ อย่างไรก็ตาม ข้อจำกัดของกระบวนการนี้ ได้แก่ ความเป็นพิษของสารผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมประเภทไฮโดรคาร์บอนและสารพลอยได้บางชนิดต่อจุลินทรีย์ และข้อจำกัดของวิถีการสร้างและประสิทธิภาพในการสร้างสารเคมีอุตสาหกรรมในจุลินทรีย์นั้นๆ

การแก้ปัญหาโดยใช้ผลงานวิจัย

การลดข้อจำกัดด้านความเป็นพิษของสารและการเพิ่มประสิทธิภาพของกระบวนการผลิตพลังงานเชื้อเพลิงและสารเคมีอุตสาหกรรมด้วยวิธีทางชีวภาพ สามารถทำได้โดยการใช้จุลินทรีย์ที่ทนทานต่อสารไฮโดรคาร์บอนและ/หรือสารตัวทำละลายอินทรีย์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ นอกจากนั้นแล้วจุลินทรีย์เหล่านี้ยังสามารถได้รับการพัฒนาเป็นเชื้อเจ้าบ้านในการทำวิศวกรรมพันธุศาสตร์ และวิศวกรรมเมแทบอลิซมเพื่อสร้างวิถีการผลิตใหม่ (synthetic bioproduction pathway) ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตสารผลิตภัณฑ์ไฮโดรคาร์บอนตามที่อุตสาหกรรมต้องการ วัตถุดิบหรือสารตั้งต้นในกระบวนการผลิตนี้อาจเป็นสารชีวมวลและ/หรือสารของเสียจากอุตสาหกรรมปิโครเคมีต่างๆ ทั้งนี้ โครงการวิจัยนี้อาศัยหลักการดังกล่าวในการสร้างต้นแบบจุลินทรีย์ตัวเร่งชีวภาพ การสร้างและพัฒนาวิถีการผลิตสารที่มีประสิทธิภาพ โดยผลิตสารอุตสาหกรรมต้นแบบ 2 ชนิด ได้แก่ *R*-1,3-butanediol จากสารชีวมวลน้ำตาล และ 3-methylcatechol จากกลีเซอรัลของเสียอุตสาหกรรม ผลการดำเนินการประสบความสำเร็จในการผลิตสารทั้งสอลชนิดโดยมีปริมาณการผลิตสูงสุดจากที่เคยมีรายงานมาก่อน

สรุปโครงการวิจัย

โครงการ “การพัฒนาและประยุกต์ใช้ตัวเร่งทางชีวภาพที่เสถียรในตัวทำละลายอินทรีย์สำหรับกระบวนการทางชีวภาพในการผลิต 3-Methylcatechol และ *R*-1,3-butanediol” อาศัยหลักการการพัฒนาจุลินทรีย์ทนทานต่อไฮโดรคาร์บอนเป็นเชื้อเจ้าบ้าน การสร้างวิถีการผลิตสารเคมีอุตสาหกรรมด้วยวิธีวิศวกรรมพันธุศาสตร์และวิศวกรรมเมแทบอลิซม และการพัฒนาระบบการหมักเพื่อผลิตสารดังกล่าว ผลการดำเนินการประสบความสำเร็จในการผลิตสารทั้งสองที่ความเข้มข้นสูงสุดจากที่เคยมีรายงานมาก่อน

(รองศาสตราจารย์ดร.อลิสา วังใน ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ Professor Junichi Kato, Hiroshima University, Japan)