รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย เรื่อง

การพัฒนาและประยุกต์ใช้ตัวเร่งทางชีวภาพที่เสถียรในตัวทำละลายอินทรีย์ สำหรับกระบวนการทางชีวภาพในการผลิต 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

โดย

คณะผู้วิจัยฝ่ายไทย

รองศาสตราจารย์ ดร. อลิสา วังใน (หัวหน้าโครงการฝ่ายไทย)

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพ 10330

ดร. ธัญญารัตน์ พงศ์ทรางกูร

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพ

คณะผู้วิจัยฝ่ายญี่ปุ่น

Professor Dr. Junichi Kato (หัวหน้าโครงการฝ่ายญี่ปุ่น)

Associate Professor Dr. Tsunehiro Aki

Associate Professor Dr. Yutaka Nakashimada

Department of Molecular Biotechnology,

Graduate school of Advanced Sciences of Matter, Hiroshima University, Hiroshima Japan

ได้รับอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

ประเภทโครงการความร่วมมือกับต่างประเทศ (ไทย-ญี่ปุ่น)

ปีที่พิมพ์ 2557

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย เรื่อง

การพัฒนาและประยุกต์ใช้ตัวเร่งทางชีวภาพที่เสถียรในตัวทำละลายอินทรีย์ สำหรับกระบวนการทางชีวภาพในการผลิต 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

โดย

คณะผู้วิจัยฝ่ายไทย
รองศาสตราจารย์ ดร. อลิสา วังใน (หัวหน้าโครงการฝ่ายไทย)
ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพ 10330
ดร. ธัญญารัตน์ พงศ์ทรางกูร
ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพ

คณะผู้วิจัยฝ่ายญี่ปุ่น
Professor Dr. Junichi Kato (หัวหน้าโครงการฝ่ายญี่ปุ่น)
Associate Professor Dr. Tsunehiro Aki
Associate Professor Dr. Yutaka Nakashimada
Department of Molecular Biotechnology,
Graduate school of Advanced Sciences of Matter, Hiroshima University, Hiroshima Japan

ได้รับอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ประเภทโครงการความร่วมมือกับต่างประเทศ (ไทย-ญี่ปุ่น)
ปีที่พิมพ์ 2557

กิตติกรรมประกาศ
(Acknowledgement)

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยประเภทโครงการความร่วมมือกับต่างประเทศ (ไทย-ญี่ปุ่น) ประจำปี 2556 จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ รายงานนี้เป็นรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

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 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-แมทิลแคทิคอล (3MC) จากสารชีวมวลโดยแบคทีเรียที่ทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์แสดงตัวอย่างการพัฒนาแบคทีเรียแพลตฟอร์มสำหรับการผลิตสารเคมีไฮโดรคาร์บอนไม่ชอบน้ำ คือ 3-แมทิลแคทิคอล (3MC) จากโทลูอีน และสารชีวมวลกลีเซอรัล โดยใช้แบคทีเรียทนตัวทำละลายอินทรีย์ซึ่งดัดแปลงพันธุกรรม Pseudomonas *putida* สายพันธุ์ TODE1 เป็นตัวเร่งชีวภาพ ในระบบการผลิตทางชีวภาพแบบการหมักสองเฟส การดำเนินการวิจัยเริ่มต้นจากการศึกษาการผลิตในระดับการผลิตขนาดเล็ก และศึกษาสภาวะและปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการเพิ่มผลผลิตของสารผลิตภัณฑ์เป้าหมาย ซึ่งรวมถึงชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ สารกระตุ้นเชื้อ สารกระตุ้น cofactor regeneration system ซึ่งมีผลอย่างมากในระบบที่มีการดัดแปรพันธุกรรมและ/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 4 เรื่อง และอยู่นระหว่างการพิจารณาเพื่อการตีพิมพ์อีก 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/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 $lacI^q$. (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 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* 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.

คำสำคัญ
(Keywords)

1. ตัวเร่งทางชีวภาพ (Biocatalyst)
2. แบคทีเรียที่เสถียรในตัวทำละลายอินทรีย์ (Organic-solvent tolerant bacteria)
3. กระบวนการผลิตทางชีวภาพ (Bioproduction)
4. 3-Methylcatechol
5. *R*-1,3-butanediol

สารบัญเรื่อง

หัวข้อ	หน้า
ส่วน ก ส่วนประกอบตอนต้น	
กิตติกรรมประกาศ	2
บทคัดย่อภาษาไทย	3
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	4
คำสำคัญ	5
สารบัญเรื่อง	6
สารบัญรูป	7
สารบัญตาราง	9
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	9
ส่วน ข ส่วนประกอบเนื้อเรื่อง	
1. บทนำ	10
1.1 ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	10
1.2 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ	11
1.3 การอนุมัติการเปลี่ยนแปลงวัตถุประสงค์โครงการวิจัย และรายละเอียด	14
2. การพัฒนาและประยุกต์ใช้ตัวเร่งทางชีวภาพในการผลิตสารเคมี 1,3-butanediol (13BD) จากสารชีวมวล	18
2.1 ความสำคัญ/ที่มาของปัญหา แนวคิดเหตุผล และหลักการสำคัญของการผลิต 1,3-บิวเทนไดออลจากสารชีวมวล	18
2.2 วัตถุประสงค์และขอบเขตการวิจัย	19
2.3 วิธีการดำเนินการวิจัย (โดยสรุป) ผลการวิจัย และข้อวิจารณ์	19
2.4 สรุป ข้อเสนอแนะ และผลผลิตจากโครงการ	31
3. การพัฒนาและประยุกต์ใช้ตัวเร่งทางชีวภาพในการผลิตสารเคมี 3-Methylcatechol (3MC) จากสารชีวมวล	32
3.1 ความสำคัญ/ที่มาของปัญหา แนวคิดเหตุผล และหลักการสำคัญของการผลิต 3-Methylcatechol (3MC) จากสารชีวมวล	32
3.2 วัตถุประสงค์และขอบเขตการวิจัย	33
3.3 วิธีการดำเนินการวิจัย โดยสรุป และผลการวิจัย	34
3.4 ข้อวิจารณ์ผลการวิจัย	47
3.5 สรุป ข้อเสนอแนะ และผลผลิตจากโครงการ	51
4. สรุป การพัฒนาและประยุกต์ใช้ตัวเร่งทางชีวภาพในการผลิตสารเคมีจากสารชีวมวล	52
ส่วน ค ส่วนประกอบตอนท้าย	
บรรณานุกรม (Bibliography)	54
ผลงานจากโครงการวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ	56
ประวัตินักวิจัย	57

สารบัญรูป

รูป 1 แผนผังของวิถีการผลิต 1, 3-บิวเทนไดออล จากกลูโคสของแบคทีเรีย *E. coli* วิศวกรรม laclq MG1655 ซึ่งเริ่มต้นจาก acetyl-CoA ประกอบด้วยสามเอนไซม์โดยมียีนมาจากสิ่งมีชีวิตต่างกัน คือ 3-Ketothiolase (*atoB* จาก E. coli ดังเดิม, *phaA* จาก *R. eutropha* NBRC 102504); NAD(P)H-dependent acetoacetyl-CoA reductase (hbd จาก *C. acetobutylicum* ATCC824, *phaB* จาก *R. eutropha* NBRC102504); alcohol/aldehyde dehydrogenase และ butyraldehyde dehydrogenase (*adhe* จาก *C. acetobutylicum* ATCC824 และ *bld* จาก *C. saccharoperbutylacetonicum* ATCC27012 ตามลำดับ)..... 20

รูป 2 วิถีการผลิตบิวทานอล..... 20

รูป 3 องค์ประกอบของยีนในพลาสมิด pNK1 ถึง pNK4 เพื่อการผลิต 13BD และการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ในแบคทีเรียเจ้าเรือน MG1655 $lacI^q$ การเลี้ยงแบคทีเรียแบบ batch ได้ดำเนินการที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในขวดแก้วปิดผนึกขนาน 10 มิลลิลิตร ด้วยอัตราส่วน 1:1.6 ระหว่างแบคทีเรียที่เลี้ยงและภาชนะซึ่งถือว่าเป็นสภาพกึ่งแอโรบิก และการผลิต 13BD ถูกตรวจสอบหลังจากหมักไป 12 ชั่วโมง โดยความหมายของแต่ละสัญลักษณ์ เป็นดังนี้: -, ไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ในสายพันธุ์ recombinant; ND, ตรวจไม่พบ และแหล่งที่มาของยีนสำหรับเอนไซม์แต่ละชนิดมาจากแบคทีเรีย *Ralstonia eutropha* NBRC102504 (RE), *Clostridium acetobutylicum* ATCC824 (CA) และ *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* ATCC27012 (CS) หมายเหตุ: ทดสอบเอนไซม์จากยีน *adh*E และ *bld* ไม่ได้ เนื่องจากความเสถียรของเอนไซม์เมื่อวัดแบบ *in intro*..... 22

รูป 4 การผลิต 13BD ด้วย recombinant *E. coli* สายพันธุ์ MG-NK3 ในสภาวะที่เติมอากาศปริมาณต่างๆ (แสดงด้วย ความแตกต่างของอัตราส่วนปริมาตรของเซลล์แขวนลอยต่อช่องว่างเหนือของเหลว) อาหารที่ใช้เริ่มต้นมีน้ำตาลกลูโคส 30 กรัม/ลิตร (167 มิลลิโมลาร์) เป็นสารตั้งต้น การผลิตแบบ Batch ดำเนินการที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (กราฟแท่ง) และอัตราการใช้น้ำตาลกลูโคส (วงกลม) ถูกตรวจสอบสำหรับแต่ละสภาพการผลิต..... 23

รูป 5 การผลิต 13BD โดย recombinant *E. coli* สายพันธุ์ MG-NK3 โดยไม่มีการควบคุม pH (A, B, C) และมีการควบคุม pH (D, E, F) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะแอโรบิก การตรวจสอบค่าความเป็นกรดที่เกิดขึ้นจริง (A) และควบคุม pH (D) และการตรวจสอบการผลิตของ 13BD (สี่เหลี่ยมปิด) การใช้น้ำตาลกลูโคส (สี่เหลี่ยมเปิด) (B, E) และการก่อตัวของสารอื่น ๆ (C, F)..... 24

รูป 6 การผลิต 13BD แบบ fed-batch โดย recombinant *E. coli* สายพันธุ์ MG-NK3 ภายใต้ภาวะที่มีการควบคุมค่า pH การผลิตแบบ fed-batch (A) ถูกดำเนินการที่อุณหภูมิ 37 เซลเซียส ภายใต้ภาวะแอโรบิกในbaffled flask ที่มีความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 30 กรัม/ลิตรกับการให้กลูโคสซ้ำสองครั้ง (สี่เหลี่ยมเปิด) ในขณะที่การผลิตของ 13BD ถูกตรวจสอบ (สี่เหลี่ยมปิด) ค่า pH (สี่เหลี่ยมเปิด) และปริมาณเซลล์ (สี่เหลี่ยมปิด) ถูกตรวจสอบ (B) และการผลิตของสารอื่น ๆ (C) ยังถูกตรวจสอบด้วย..... 25

รูป 7 การผลิตแบบแบทช์ของ 1,3-BD โดยแบคทีเรียลูกผสม *E. coli* BW-NK3 ภายใต้ K_La ต่างๆ: การผลิตแบบแบทช์ถูกดำเนินการที่อุณหภูมิ 37 °C ในระบบถังหมักชีวภาพ ค่าความเป็นกรดด่างถูกรักษาไว้ที่ 5.75 ด้วย 2 N NaOH หรือ 2 N HCl โดย (A) คือปริมาณลูโคสที่ลดลง (B) การผลิต 1,3-BD (C) การเจริญของเซลล์ (D) การผลิตอะซิเตรท และสัญลักษณ์ที่ใช้: 97.2/h (สี่เหลี่ยมเปิด) 87.6/h (สี่เหลี่ยมข้าวหลามตัดเปิด) 84.3/h1 (สามเหลี่ยมเปิด) และ 82.3/h (วงกลมเปิด)..... 27

รูป 8 การผลิต 1,3-BD แบบแบทช์โดยแบคทีเรียลูกผสม *E. coli* สายพันธุ์ BW-NK3 ภายใต้สภาวะการผลิตที่มีความเป็นกรดด่างต่างๆ การผลิตแบบแบทช์ถูกดำเนินการที่อุณหภูมิ 37 °C ด้วยถังหมักชีวภาพภายใต้ภาวะที่มี K_La ที่เหมาะสม (82.3/h) (A) ปริมาณกลูโคส (B) การผลิต 1,3-BD (C) การเจริญของเซลล์ (D) การผลิตอะซิเตท และสัญลักษณ์ที่ใช้: 6.0 (สี่เหลี่ยมเปิด), 5.75 (สามเหลี่ยมเปิด) และ 5.5 (วงกลมเปิด) 29

รูป 9 การผลิต 1,3-BD แบบเฟตแบทช์โดยแบคทีเรียลูกผสม *E. coli* สายพันธุ์ BW-NK3 ภายใต้สภาวะการผลิตที่มี K_La (82.3/h) และค่าความเป็นกรดด่าง (5.5) ที่เหมาะสม การหมักแบบเฟตแบทช์ถูกดำเนินการที่อุณหภูม 37 °C ด้วยถังหมักชีวภาพ (A) ปริมาณกลูโคส การผลิต 1,3-BD และเจริญของเซลล์ (B) การผลิตสารของสารอื่น ๆ และสัญลักษณ์ที่ใช้: การใช้ลูโคส (วงกลมเปิด) การผลิต 1,3-BD (สี่เหลี่ยมเปิด) การเจริญของเซลล์ (สามเหลี่ยมเปิด) เอทานอล (วงกลมปิด) อะซิเตท (สี่เหลี่ยมปิด) และฟอร์เมท (สามเหลี่ยมปิด) 30

รูป 10 วิธีการผลิต 3MC จากแบคทีเรียทนตัวทำละลายอินทรีย์แกรมลบ *P. putida* สายพันธุ์ TODE1 33

รูป 11 ความเป็นพิษของตัวทำละลายอินทรีย์ที่ละลายน้ำได้น้อย (A) เมื่อสัมผัสกับแบคทีเรียสายพันธุ์ TODE1 ในอาหาร MSB เป็นเวลา 20 ชั่วโมง ซึ่งตรวจสอบจากค่า log CFU/ml บนอาหารแข็ง LB เปรียบเทียบกับสภาวะที่ไม่มีการสัมผัสกับกับตัวทำละลายอินทรีย์ใดๆ (เส้นประ) 3MC (B) และ toluene (C) partition coefficents ในสภาวะที่ตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่างๆ ซึ่งถูกตรวจสอบในอาหาร MSB ที่มี 5 mM 3MC/toluene ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ คือ Hep, *n*-heptanol; Oct, *n*-octanol; Non, *n*-nonanol; Dec, *n*-decanol, and Oleyl, oleyl alcohol 37

รูป 12 ผลผลิต 3MC ที่เวลาการผลิต 20 ชั่วโมง เมื่อมีการให้ toluene แบบไอระเหย ซึ่งถูกตรวจสอบในระบบการผลิตขนาดเล็ก (10 ml) ในอาหาร MSB ที่มีตัวทำละลายอินทรีย์ 1 ml เมื่อมีการเติม (สีดำ) และไม่มีการเติม (สีเทา) *n*-butanol แบบไอระเหย การตรวจสอบความเข้มข้นของ 3MC ในชั้นอาหารและชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ ถูกวิเคราะห์เป็น ความเข้มข้นโดยรวม จากสมการ : (ความเข้มข้นของ 3MC ในชั้นอาหาร × ปริมาตารของอาหาร + ความเข้มข้นของ 3MC ในชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ × ปริมาตารของตัวทำละลายอินทรีย์)/(ปริมาตารของอาหาร + ปริมาตารของตัวทำละลายอินทรีย์) 38

สารบัญตาราง

ตาราง 1 สายพันธุ์ของเชื้อ และพลาสมิดที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ 22

ตาราง 2 ผลของ K_{La} ต่อการเจริญของเซลล์ ผลผลิตและอัตราการผลิตสูงสุดของ 13BD ในการหมักแบบแบทช์ 27

ตาราง 3 ลักษณะสมบัติของตัวทำละลายอินทรีย์ที่เคยใช้เป็นเฟสบนสำหรับการผลิต 3MC ด้วยการผลิตแบบสองเฟสด้วยแบคทีเรีย *P. putida* 36

คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

OST bacteria	Organic-solvent tolerant bacteria
13BD	1,3-butanediol
3MC	3-methylcatechol

1. บทนำ

1.1 ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย (Research significance)

ในปัจจุบัน ภาวะการขาดแคลนวัตถุดิบเชื้อเพลิง (Fossil feedstock) และวัตถุดิบตั้งต้นของอุตสาหกรรมปิโตรเคมี (Petrochemical feedstock) จำพวกสารอะโรมาติกและสารประกอบไฮโดรคาร์บอนจัดเป็นปัญหาสำคัญของโลก ดังนั้น จึงมีการศึกษาวิจัยต่างๆ ทั้งในภาคการศึกษา ภาครัฐ และภาคเอกชนเพื่อประยุกต์นำวัตถุดิบธรรมชาติ (renewable feedstocks หรือ biomass) มาใช้เป็นวัตถุดิบตั้งต้นของกระบวนการผลิตเชื้อเพลิง สารประกอบไฮโดรคาร์บอนอุตสาหกรรม และผลิตภัณฑ์ต่างๆ กระบวนการที่ใช้ในการผลิตเชื้อเพลิงและผลิตภัณฑ์ต่างๆ เหล่านี้ประกอบด้วยการสังเคราะห์ทางเคมีและกระบวนการผลิตทางชีวภาพ อย่างไรก็ตาม การสังเคราะห์สารผลิตภัณฑ์ทางเคมีก่อให้เกิดผลผลิตพลอยได้ (By-product) ที่ไม่ต้องการและก่อให้เกิดของเสียที่เป็นพิษจากกระบวนสังเคราะห์ ซึ่งส่งผลให้มีการปนเปื้อนตกค้างของสารเหล่านี้ในสิ่งแวดล้อมและเป็นอันตรายต่อมนุษย์และสิ่งมีชีวิต ดังนั้น วิธีการแก้ปัญหาดังกล่าวทางหนึ่ง ได้แก่ การใช้กระบวนการทางชีวภาพในการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพและผลิตภัณฑ์สำหรับอุตสาหกรรมปิโตรเคมีต่างๆ ซึ่งกระบวนการผลิตนี้จัดเป็นกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพ (Biotransformation) โดยหมายถึงกระบวนการหมักโดยมีจุลินทรีย์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพ (Whole-cell biocatalyst) ซึ่งอาศัยความสามารถของจุลินทรีย์ในการเร่งปฏิกิริยาอย่างจำเพาะและอย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นกระบวนการหมักโดยจุลินทรีย์เพื่อสร้างผลิตภัณฑ์เหล่านี้จึงก่อให้เกิดของเสียและสารมลพิษจากกระบวนการน้อยกว่าการสังเคราะห์ทางเคมี นอกจากนั้นแล้ว สารตั้งต้นที่มากเกินพอสามารถนำกลับมาใช้ในกระบวนการใหม่ได้ (Recycle) และมีสภาวะการผลิตที่ไม่รุนแรง จึงจัดเป็นกระบวนการผลิตแบบ Green process ที่มีความเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมมากกว่า และในแง่ของความสำคัญทางการค้าแล้ว การใช้กระบวนการผลิตที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมนี้จะลดปัญหาผลกระทบจากกฎหมายการกีดกันทางการค้ากับต่างประเทศอีกด้วย

ในปัจจุบันมีการนำวัตถุดิบธรรมชาติ เช่น น้ำตาล แป้ง น้ำมันพืชต่างๆ มาใช้เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการผลิตทางชีวภาพ (Bioproduction) เช่น การผลิตไบโอเอธานอล (Dien et al., 2003) การผลิตไบโอดีเซลโดยเอนไซม์ไลเพส รวมทั้งการผลิตผลิตภัณฑ์สำหรับอุตสาหกรรมปิโตรเคมีต่างๆ เช่น การผลิตสารอนุพันธ์อะโรมาติก และสารประกอบไฮโดรโฟบิค/ไฮโดรฟิลิคสำหรับอุตสาหกรรมเคมีและปิโตรเคมี (BASF, 2007) การผลิตสีสำหรับอุตสาหกรรมเคมีและสิ่งทอ เป็นต้น อย่างไรก็ตาม สารผลิตภัณฑ์เหล่านี้เมื่อผลิตได้ที่ความเข้มข้นสูงสะสมในระบบได้ในระดับหนึ่ง อาจก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นตัวเร่งทางปฏิกิริยาชีวภาพ ผลกระทบดังกล่าวของสารเหล่านี้จึงเป็นปัจจัยที่จำกัดการทำงานของกระบวนการผลิต กล่าวคือ เมื่อระดับความเข้มข้นของสารผลิตภัณฑ์เหล่านี้สูงขึ้น (เช่น ระดับเอธานอล ซึ่งเป็น hydrophilic chemical ในการผลิตไบโอเอธานอล) ในระหว่างกระบวนการหมัก จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพจะได้รับความเป็นพิษสูง จึงทำให้มีประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาลดลงและมีจำนวนลดลงในที่สุด ดังนั้น การปรับปรุงกระบวนการผลิตดังกล่าวสามารถทำได้ 2 วิธีหลัก ได้แก่ การปรับปรุงและพัฒนาระบบกระบวนการผลิตทางชีวภาพ (Development bioproduction system) ให้มีสภาวะที่เหมาะสมเพื่อลดความเป็นพิษที่เกิดจากสารผลิตภัณฑ์ต่อจุลินทรีย์ เช่น การใช้ระบบการหมักแบบสองเฟส (Two liquid-phase: water-organic solvent system) และ การใช้จุลินทรีย์ที่สามารถทนทานต่อความเป็นพิษของสารประกอบเหล่านี้ จุลินทรีย์เหล่านี้เป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีลักษณะสมบัติที่เป็นความเป็นเอกลักษณ์ รู้จักในชื่อ จุลินทรีย์ทนทานต่อตัวทำละลายอินทรีย์ (Organic-solvent tolerant bacteria, OSTB) จุลินทรีย์เหล่านี้มีประโยชน์อย่างยิ่งในการเป็น Heterologous host & biocatalyst สำหรับการประยุกต์ใช้ในกระบวนการเปลี่ยนรูปของวัตถุดิบตั้งต้นให้เป็นสารที่มีมูลค่าสูงในอุตสาหกรรม

รวมทั้งมีความเหมาะสมสำหรับการพัฒนาเป็นเชื้อเจ้าบ้าน (host) ในการทำวิศวกรรมพันธุศาสตร์ (genetic engineering) ของจุลินทรีย์ให้มีการแสดงออกและมีประสิทธิภาพสูงขึ้นในการผลิตสารผลิตภัณฑ์ตามต้องการ

ดังนั้น โครงการวิจัยนี้ได้มีวัตถุประสงค์หลักในการพัฒนาแบคทีเรียในกลุ่มจุลินทรีย์ทนทานต่อตัวทำละลายอินทรีย์ (Organic-solvent tolerant bacteria, OSTB) เหล่านี้ด้วยเทคนิคชีววิทยาโมเลกุลและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ เพื่อเป็นต้นแบบการประยุกต์ใช้แบคทีเรียเหล่านี้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาสำหรับกระบวนการผลิตสารเคมีอุตสาหกรรมและสารประกอบไฮโดรคาร์บอนมูลค่าเพิ่มจากชีวมวลต่อไป โครงการนี้ได้รับการสนับสนุนทุนอุดหนุนประเภทโครงการความร่วมมือกับต่างประเทศ (ไทย-ญี่ปุ่น) ทั้งนี้ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีความหลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์ในธรรมชาติ อีกทั้ง เป็นประเทศเกษตรกรรม มีความอุดมสมบูรณ์จึงเป็นแหล่งสำคัญของชีวมวล (biomass) ต่างๆ เช่น น้ำตาล แป้ง พืชน้ำมัน เป็นต้น ซึ่งชีวมวลเหล่านี้สามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบของกระบวนการผลิตได้อย่างดี จากความร่วมมือกับนักวิจัยจากประเทศญี่ปุ่น โครงการนี้ได้รับประโยชน์จากการแลกเปลี่ยนความรู้และเทคโนโลยีที่เกี่ยวกับการพัฒนาและการสร้าง (construct) แบคทีเรียด้วยเทคนิคชีววิทยาโมเลกุลและวิศวกรรมพันธุศาสตร์เพื่อใช้เป็นเชื้อเจ้าบ้านในกระบวนการผลิตทางชีวภาพ อีกทั้ง ได้สร้างองค์ความรู้ใหม่ร่วมกันในการพัฒนาระบบการผลิต (Bioprocess) เพื่อผลิตสารผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมเคมีที่มีมูลค่าสูงด้วยกระบวนการผลิตทางชีวภาพ (bioproduction system) โดยใช้แบคทีเรียที่มีความทนทานต่อตัวทำละลายอินทรีย์ที่พัฒนาขึ้นดังกล่าว

1.2 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ

ความสำคัญของกระบวนการผลิตทางเทคโนโลยีชีวภาพโดยใช้สารชีวมวลเป็นสารตั้งต้น (Biotechnological process for biomass conversion) เนื่องจากวัตถุดิบประเภท non-renewable resources เช่น ปิโตรเลียม เป็นวัตถุดิบหลักในการนำมาใช้ในกระบวนการผลิตพลังงานและการสังเคราะห์สารเคมีสำหรับอุตสาหกรรมต่างๆ การขาดแคลนวัตถุดิบประเภท non-renewable resources ดังกล่าวจึงจัดเป็นปัญหาสำคัญต่ออุตสาหกรรมเคมี อุตสาหกรรมปิโตรเคมีและก่อให้เกิดปัญหาทางเศรษฐกิจทั่วโลก ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีการศึกษาวิจัยต่างๆ ทั้งในภาคการศึกษา ภาครัฐและภาคเอกชนเพื่อประยุกต์นำวัตถุดิบธรรมชาติ (renewable feedstock หรือ biomass) มาใช้เป็นวัตถุดิบตั้งต้นของกระบวนการผลิตเชื้อเพลิงและผลิตภัณฑ์ต่างๆ กระบวนการที่ใช้ในการผลิตเชื้อเพลิงและผลิตภัณฑ์ต่างๆ เหล่านี้ประกอบด้วยการสังเคราะห์ทางเคมีและกระบวนการผลิตทางชีวภาพ อย่างไรก็ตามดังที่กล่าวข้างต้นถึงข้อเสียของกระบวนการผลิตทางเคมีซึ่งก่อให้เกิดสารพลอยได้ (By-product) ที่ไม่ต้องการและก่อให้เกิดของเสียที่เป็นพิษจากกระบวนสังเคราะห์ซึ่งส่งเสียต่อสิ่งแวดล้อม ดังนั้นการใช้กระบวนการทางชีวภาพโดยมีจุลินทรีย์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Whole-cell biocatalyst) จึงเป็นทางเลือกที่ดีอีกทางหนึ่งในการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพและสารผลิตภัณฑ์สำหรับอุตสาหกรรมปิโตรเคมีต่างๆ โดยกระบวนการทางชีวภาพนี้จัดเป็นกระบวนการผลิตแบบ Green process ที่มีความเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมมากกว่า กระบวนการเปลี่ยนรูปชีวมวลไปเป็นสารผลิตภัณฑ์เคมี วัสดุชีวภาพ รวมถึงพลังงานชีวภาพต่างๆ นี้ถูกเรียกรวมว่า “Biorefinery” (Kamm & Kamm, 2007) ซึ่งถูกจัดให้เป็นกระบวนการผลิตแบบยั่งยืน คุ้มทุน และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม (sustainable, cost-effective, environmentally favorable, and self-sustaining process) มากกว่ากระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี

ความสำคัญของแบคทีเรียทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์ที่สามารถใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพในกระบวนการไบโอรีฟายเนอรี ถึงแม้ว่ากระบวนการผลิตสารผลิตภัณฑ์ต่างๆ ด้วยกระบวนการทางชีวภาพจะมีความสำคัญอย่างสูงดังที่ได้กล่าวมาแล้วนั้น อย่างไรก็ตามข้อจำกัดต่างๆ ที่เกิดขึ้นในระหว่าง

กระบวนการผลิตจึงทำให้กระบวนการผลิตทางชีวภาพไม่อาจถูกใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากระบวนการทางเคมี กล่าวคือ การใช้เชื้อจุลินทรีย์ตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพที่ไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอต่อการขยายส่วนของกระบวนการผลิต ตัวอย่างเช่น การผลิตไบโอเอธานอลจากเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ ต่างๆ ให้ได้ในปริมาณสูงเพื่อนำมาใช้เป็นพลังงานทดแทน อย่างไรก็ตาม เมื่อเอธานอลถูกผลิตขึ้นในปริมาณมากในถังหมัก ผลที่ตามมาคือ จุลินทรีย์ในกระบวนการผลิตไม่สามารถทนทานต่อความเข้มข้นสูงของเอธานอลได้ และเกิดภาวะเป็นพิษต่อจุลินทรีย์ ดังนั้นกระบวนการสร้างเอธานอลจะถูกยับยั้งและเชื้อจุลินทรีย์ตาย ดังนั้นการพัฒนาสายพันธุ์จุลินทรีย์ด้วยวิธีการต่างๆ ให้สามารถผลิตไบโอเอธานอลได้ในปริมาณสูงจะไม่สามารถนำมาใช้ได้ในสภาวะการผลิตขนาดใหญ่ได้จริงหากจุลินทรีย์สายพันธุ์ดังกล่าวไม่สามารถทนทานต่อเอธานอลที่สะสมในระบบหมักดังกล่าว นอกจากนี้ ปัญหาความเป็นพิษนี้ยังเกิดขึ้นได้ในกระบวนการผลิตสารผลิตภัณฑ์ไฮโดรคาร์บอนต่างๆ อีกด้วย การแก้ไขปัญหาดังกล่าวได้แก่ การปรับปรุงกระบวนการผลิต ซึ่งสามารถทำได้ 2 วิธี ได้แก่ (1) การปรับปรุงและพัฒนาระบบกระบวนการผลิตทางชีวภาพ (Development bioproduction system) ให้มีสภาวะที่เหมาะสมเพื่อลดความเป็นพิษที่เกิดจากสารผลิตภัณฑ์ต่อจุลินทรีย์ เช่น การใช้ระบบการหมักแบบสองเฟส (Two liquid-phase: water-organic solvent system) และ (2) การใช้จุลินทรีย์ที่สามารถทนทานต่อความเป็นพิษของตัวทำละลายอินทรีย์ สารประกอบไฮโดรคาร์บอน และ/หรือสารที่มีสมบัติไฮโดรโฟบิคที่มีสมบัติไม่ชอบน้ำ จุลินทรีย์ที่มีความสามารถดังกล่าวนี้จะมีประโยชน์อย่างยิ่งสำหรับการประยุกต์ใช้ในกระบวนการเปลี่ยนรูปของวัตถุดิบตั้งต้นให้เป็นสารที่มีมูลค่าสูงในอุตสาหกรรมในระดับการผลิตที่มีความเข้มข้นของสารผลิตภัณฑ์สูง รวมทั้งมีความเหมาะสมสำหรับการพัฒนาเป็นเชื้อเจ้าบ้าน (host) ในการทำวิศวกรรมพันธุศาสตร์ (genetic engineering) ของจุลินทรีย์ให้มีการแสดงออกและมีประสิทธิภาพสูงขึ้นในการผลิตสารผลิตภัณฑ์ตามต้องการ (Dien et al, 2003)

ในกระบวนการผลิตทางชีวภาพนี้ ประสิทธิภาพของแบคทีเรียตัวเร่งปฏิกิริยาจัดเป็นปัจจัยที่สำคัญที่สุดปัจจัยหนึ่ง เนื่องจากเป็นปัจจัยที่จำกัดความสามารถของปฏิกิริยาในการเปลี่ยนรูปสารตั้งต้นไปเป็นสารผลิตภัณฑ์ ที่ผ่านมามีการคัดแยกและค้นพบจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพโดยใช้ชีวมวลเป็นสารตั้งต้นมากมาย แต่มีเพียงจำนวนหนึ่งเท่านั้นที่สามารถทำงานได้ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อกระบวนการผลิตซึ่งสามารถนำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรมเพื่อการค้าได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสภาวะของกระบวนการผลิตที่ได้สารผลิตภัณฑ์เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอน เช่น สารปิโตรเคมี ไบโอเอธานอล บิวทานอล และสารอนุพันธุ์ของแอลกอฮอล์ต่างๆ เป็นต้น สารผลิตภัณฑ์ที่มีสมบัติดังกล่าวนี้เมื่อถูกผลิตขึ้นในกระบวนการหมักจนถึงระดับความเข้มข้นสูงขึ้นจะมีความเป็นพิษต่อแบคทีเรียตัวเร่งปฏิกิริยา ตัวอย่างเช่น ในปัจจุบันความเข้มข้นสูงสุดในระบบที่เชื้อแบคทีเรีย Clostridium ทนต่อบิวทานอลในระบบหมักได้คือประมาณร้อยละ 1.2 โดยปริมาตร (Dien et al, 2003) ซึ่งเป็นอัตราการผลิตต่อครั้งที่ต่ำ ดังนั้น เพื่อเป็นการพัฒนากระบวนการผลิตทางชีวภาพเพื่อผลิตสารเคมีและสารประกอบไฮโดรคาร์บอนมูลค่าเพิ่มจากชีวมวลอย่างอย่างมีประสิทธิภาพจะต้องมีการพัฒนาแบคทีเรียที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาให้มีความเหมาะสมและทนทานต่อสภาวะที่ใช้ในการผลิต สำหรับการผลิตสารเคมีและสารประกอบไฮโดรคาร์บอนมูลค่าเพิ่มเหล่านี้ได้แก่ 1,3-butanediol และ 3-methylcatechol แบคทีเรียที่มีความเหมาะสมต้องมีความทนต่อความเป็นพิษของสารผลิตภัณฑ์ที่ถูกสร้างขึ้นซึ่งแบคทีเรียดังกล่าวถูกจัดอยู่ในกลุ่มที่เรียกว่า “แบคทีเรียที่ทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์” ดังนั้น แบคทีเรียที่ทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์เหล่านี้จึงมีความเหมาะสมในการนำมาพัฒนาให้เป็นเชื้อเจ้าบ้านในการเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ ทั้งนี้ ในการพัฒนาด้วยเทคนิควิศวกรรมพันธุศาสตร์นั้นเพื่อทำให้แบคทีเรียเหล่านี้มีประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาที่ดี และสามารถควบคุมการทำงานให้มีการแสดงออกตามต้องการได้

ดังนั้นในโครงการนี้มีเป้าหมายหลักได้แก่ 1) เพื่อพัฒนาแบคทีเรียทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์ด้วยวิธีพันธุวิศวกรรม (genetic engineering) และวิศวกรรมเมแทบอลิค (metabolic engineering) เพื่อให้เป็นเชื้อเจ้าบ้านและตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพที่มีสมบัติเหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาการผลิตสารเคมีอุตสาหกรรมมูลค่าเพิ่มจากสารชีวมวลอย่างมีประสิทธิภาพ โดยมีเป้าหมายของงานได้แก่ การผลิตสาร 3-methylcatechol จากกลีเซอรัลไม่บริสุทธิ์ และการผลิต 1,3-butanediol จากน้ำตาล และ 2) เพื่อออกแบบและพัฒนากระบวนการ เช่น ระบบหมักแบบสองเฟส และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของกระบวนการดังกล่าวในการแสดงออกของยีนในกระบวนการเปลี่ยนรูป (Biotransformation) ของสารชีวมวลเป็นสารเคมีอุตสาหกรรมมูลค่าเพิ่ม ความสำคัญของการพัฒนาแบคทีเรียตัวเร่งปฏิกิริยานี้จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้กับกระบวนการผลิตสารเคมีและสารปิโตรเคมีทางชีวภาพต่างๆ ได้ต่อไป ซึ่งเป้าหมายของโครงการนี้สอดคล้องกับ The Framework Academic-Industrial Program ของ The European Union (EU) Commission ที่เน้นให้การสนับสนุนงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการใช้และการพัฒนาจุลินทรีย์ที่เจริญได้ในภาวะยิ่งยวดต่างๆ (extremophiles, i.e. microorganisms capable of growing at extreme conditions) และเน้นงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนในเชื้อเจ้าบ้านที่เหมาะสมเพื่อพัฒนากระบวนการผลิตทางชีวภาพ ดังนั้นการดำเนินงานวิจัยของโครงการวิจัยนี้จะเป็นการเริ่มต้นการพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตและเทคโนโลยีการสร้างเชื้อเจ้าบ้านซึ่งจะทำให้ประเทศไทยมีเทคโนโลยีการผลิตสารไฮโดรโฟบิคเหล่านี้ที่เท่าเทียมต่อเทคโนโลยีการผลิตของประเทศอื่นๆ ต่อไป

กรอบความคิดและความเกี่ยวข้องของโครงการวิจัยอื่นด้านความสำคัญของสารผลิตภัณฑ์เป้าหมาย - สารผลิตภัณฑ์เป้าหมายของการผลิตในโครงการวิจัยนี้คือ 1,3-butanediol และ 3-methylcatechol สาร 1,3-butanediol (13BD) เป็นสารเคมีอุตสาหกรรมที่มีการใช้มากในอุตสาหกรรมต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งอุตสาหกรรมการผลิตโพลิเมอร์ (Vollenweider & Lacroix, 2004) ในปัจจุบันการผลิตสารไฮโดรคาร์บอนด้วยกระบวนการหมักโดยใช้กลีเซอรัลและ/หรือน้ำตาลเป็นสารตั้งต้นได้รับความสนใจมากขึ้น แต่ปัญหาหลักของระบบหมักได้แก่ความเป็นพิษของสารผลิตภัณฑ์ที่สะสมมากขึ้นในระบบหมัก ซึ่งส่งผลยับยั้งการเจริญและการทำงานของจุลินทรีย์ในระบบ ดังนั้น เพื่อเป็นการแก้ปัญหากระบวนการการผลิต 13BD ทางชีวภาพจึงต้องการ 1) จุลินทรีย์ที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่สามารถทนต่อความเข้มข้นในระดับหนึ่งของสาร 13BD ได้ และ 2) กระบวนการหมักที่เหมาะสมสำหรับการผลิต (Gokarn et al, 2007) สำหรับ 3-methylcatechol นั้นจัดเป็นสารตั้งต้นในอุตสาหกรรมต่างๆ ทั้งอุตสาหกรรมปิโตรเคมีและอุตสาหกรรมยา อย่างไรก็ตาม พบว่า 3-methylcatechol มีความเป็นพิษต่อจุลินทรีย์ ดังนั้น จึงเป็นปัญหาต่อการผลิต 3-methylcatechol ด้วยกระบวนการทางชีวภาพ ดังนั้นการลดปัญหาความเป็นพิษของสารผลิตภัณฑ์แอลกอฮอล์ที่เกิดขึ้นนี้สามารถทำได้โดยการใช้จุลินทรีย์ตัวเร่งปฏิกิริยาที่สามารถทนต่อ 3-methylcatechol ที่ความเข้มข้นสูงได้มากขึ้น และการพัฒนาระบบหมักแบบสองเฟสที่เหมาะสม ซึ่งการแก้ปัญหาดังกล่าวนั้นจะทำให้ประสิทธิภาพการผลิตสูงขึ้นด้วย

กรอบความคิดและความเกี่ยวข้องของโครงการวิจัยอื่นด้านความสำคัญของการพัฒนาแบคทีเรียตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ - ในประเทศต่างๆ ทั้งสหรัฐอเมริกา ยุโรปและญี่ปุ่น ได้มีการศึกษาและวิจัยอย่างต่อเนื่องเพื่อพัฒนาแบคทีเรียตัวเร่งปฏิกิริยา รวมทั้งการศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนาแบคทีเรียด้วยวิธีพันธุวิศวกรรมเพื่อให้มีการแสดงออกของยีนที่ควบคุมได้และมีการผลิตสารผลิตภัณฑ์ได้มากตามต้องการ การประยุกต์ใช้แบคทีเรียที่มีการปรับปรุงพัฒนาสายพันธุ์ดังกล่าวได้ถูกนำมาใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในกระบวนการผลิตสารเคมีทางยา สารเคมีทางการเกษตร รวมทั้งสารปิโตรเคมี เป็นต้น ตัวอย่างของโครงการวิจัยอื่นๆ ในต่างประเทศที่วิจัยพัฒนาแบคทีเรียที่ทนทานต่อตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ De Bont et al. (ประเทศเนเธอร์แลนด์) ได้ศึกษาวิจัยแบคทีเรียที่ทนทานต่อตัวทำละลายอินทรีย์และพัฒนาเชื้อเหล่านี้ให้เป็นเชื้อเจ้าบ้านสำหรับกระบวนการผลิตสารต่างๆ เช่น เชื้อกลายพันธุ์ Pseudomonas putida

S12 (ปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีพันธุวิศวกรรม) ได้ถูกใช้ในการผลิตสารฟีนอลจากสารตั้งต้นที่เป็นกลูโคสในระบบการหลักแบบสองเฟส (Wierckx et al, 2005) อีกทั้งยังได้รับการพัฒนาต่อมาเพื่อใช้ในการผลิตกรดซินนามิค (cinnamic acid) (Nijkamp et al, 2005) และสารพารา-คูมาเรตจากกลูโคส (p-coumarate) (Nijkamp et al, 2007) นอกจากนี้แล้ว Witholt et al. (ประเทศสเปน) ได้ศึกษาพัฒนาแบคทีเรียที่สามารถใช้ไฮโดรคาร์บอนเป็นสารอาหารในการเจริญมาเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในกระบวนการผลิตสารเคมีที่มีความเสถียรที่ดี (Panke et al, 1999) สำหรับประเทศญี่ปุ่น Kato et al. (Faizal et al, 2005) และ Ohtake et al. (ประเทศญี่ปุ่น) ได้ทำการศึกษาวิจัยแบคทีเรียที่ทนทานต่อตัวทำละลายอินทรีย์และพัฒนาเชื้อเหล่านี้ให้เป็นเชื้อเจ้าบ้านด้วยวิธีพันธุวิศวกรรมสำหรับกระบวนการผลิตสารต่างๆ ด้วยกระบวนการหมักแบบสองเฟส

องค์ความรู้ทางด้านการพัฒนาเชื้อด้วยวิธีทางพันธุวิศกรรมและวิศวกรรมเมแทบอลิกที่ได้จากการพัฒนาจากโครงการนี้จะสามารถใช้เป็นต้นแบบในการพัฒนาแบคทีเรียเจ้าบ้านอื่นๆ ในการผลิตสารเคมีที่มีมูลค่าสูง และ/หรือในการผลิตสารเคมีอุตสาหกรรมต่างๆ ด้วยกระบวนการผลิตทางชีวภาพ ซึ่งจะเป็นการใช้ประโยชน์จากความหลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์ในประเทศไทย (Microbial diversity in Thailand) ต่อไป อีกทั้ง ผลงานจากการพัฒนาเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธีทางชีววิทยาโลเลกุลนี้มีศักยภาพในการจดสิทธิบัตร ดังที่มีตัวอย่างของการจดสิทธิบัตรเกี่ยวกับแบคทีเรียทนตัวทำละลายอินทรีย์ในต่างประเทศ เช่น *Pseudomonas putida* which tolerates to organic solvent for industrial biotransformation applications as well as for bioremediation of toxic xenobiotics (US Patent 6136589, 1999) หรือ Solvent tolerant *Pediococcus* bacteria having enhanced tolerance to butanol for anaerobic butanol production (US Patent 20080138870, 2008) เป็นต้น

สำหรับการค้นคว้าเอกสารงานวิจัยในประเทศไทย ไม่พบเอกสารวิจัยใดๆ ที่มีที่เกี่ยวข้องกับโครงการวิจัยที่เกี่ยวกับการพัฒนาตัวเร่งทางชีวภาพ สำหรับคณะผู้วิจัยซึ่งประกอบด้วยบุคลากรของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และบุคลากรของมหาวิทยาลัยมหิดลนี้ เป็นคณะทำงานที่มีประสบการณ์ด้านแบคทีเรียที่มีความสามารถในการทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์และความสามารถด้านการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของสารตั้งต้นไฮโดรคาร์บอน โดยได้มีผลงานบทความวิจัยที่เกี่ยวข้องกับโครงการที่เสนอที่ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนาชาติ (Kongpol et al, 2008) นอกจากนั้น โครงการนี้ได้รับความร่วมมือเป็นอย่างดีจากนักวิจัยญี่ปุ่น ได้แก่ Professor Junichi Kato และคณะ เพื่อนำองค์ความรู้ที่จะได้จากงานวิจัยมาบูรณาการและประยุกต์ต่อยอดต่อไปได้

1.3 การอนุมัติการเปลี่ยนแปลงวัตถุประสงค์โครงการวิจัย และรายละเอียด

โครงการวิจัย เรื่อง “การพัฒนาและประยุกต์ใช้ตัวเร่งทางชีวภาพที่เสถียรในตัวทำละลายอินทรีย์สำหรับกระบวนการทางชีวภาพในการผลิตสารเคมี (แอลดีไฮด์และบิวทานอล) จากสารชีวมวล” ซึ่งเป็นโครงการวิจัยภายใต้ความร่วมมือกับ Professor Junichi Kato, Hiroshima University, Hiroshima, Japan นั้น เมื่อได้ดำเนินการมาเป็นระยะเวลา 2 ปีประสบปัญหาทางด้านธรรมชาติของงานวิจัยด้านชีววิทยาโมเลกุล ถึงแม้ว่าผู้วิจัยจะพยายามทำการศึกษา ปรับปรุงแก้ไขในส่วนต่างๆ ที่เป็นองค์ประกอบหลักของวิถีการผลิตสารต้นแบบ (แอลดีไฮด์และบิวทานอล) แล้ว แต่ยังมีปัญหาด้านอื่นๆ (ดังอธิบายรายละเอียดวิธีดำเนินการอย่างละเอียดในรายงานความก้าวหน้า พ.ศ. 2557 ครั้งที่ 1 และ 2) ซึ่งทำให้ต้องมีการปรับเปลี่ยนวัตถุประสงค์โครงการ ได้แก่ ชนิดของสารต้นแบบ และระเบียบวิธี/แผนการดำเนินการวิจัย โดยยังคงเป้าหมายสำคัญ ได้แก่ “การพัฒนาและประยุกต์ใช้ตัวเร่งทางชีวภาพสำหรับกระบวนการทางชีวภาพในการผลิตสารเคมีจากสารชีวมวล” ทั้งนี้ ได้รับอนุมัติการเปลี่ยนแปลงเรียบร้อยแล้ว ซึ่งตาม

ความเห็นของผู้ทรงคุณวุฒิที่ประเมินโครงการแล้ว มีความเห็นว่าการเปลี่ยนแปลงนี้ยอมรับได้เนื่องจากดำเนินการไปเพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์หลักของโครงการ กล่าวคือ ผลการการดำเนินการวิจัยที่มีการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวนั้นประสบความสำเร็จในการผลิตสารต้นแบบใหม่ ซึ่งสารต้นแบบที่ 1 (1,3-butanediol, 13BD) เป็นสารที่มีมูลค่าสูงทางอุตสาหกรรมและไม่เคยมีการรายงานในวารสารวิชาการใดๆ ด้านการผลิตทางชีวภาพ ส่วนสารต้นแบบที่ 2 (3-methylcatechol, 3MC) นั้น เป็นสารที่มีมูลค่าสูงทางอุตสาหกรรมและเป็นสารวัตถุดิบในอุตสาหกรรมปิโตรเคมีต่างๆ ดังนั้น การศึกษากระบวนการผลิตสารต้นแบบทั้งสองชนิดนี้ ถึงแม้ว่าจะเปลี่ยนแปลงไปจากชนิดต้นแบบเดิมแต่ยังอยู่ในขอบเขตวัตถุประสงค์หลักของโครงการ ได้แก่ การพัฒนาและประยุกต์ใช้ตัวเร่งทางชีวภาพทนตัวทำละลายอินทรีย์ในการผลิตสารเคมีอุตสาหกรรมจากสารชีวมวล โดยเน้นหนักการใช้วิศวกรรมพันธุศาสตร์ ดังนั้น การเปลี่ยนแปลงรายละเอียดโครงการนี้ดำเนินการไปเพื่อให้โครงการบรรลุวัตถุประสงค์หลัก ผลการดำเนินการพบว่าสามารถผลิตสารต้นแบบทั้งสองได้อย่างมีประสิทธิภาพ ประสบความสำเร็จในการผลิตสารต้นแบบนี้ได้ที่ความเข้มข้นที่สูงที่สุดเมื่อเทียบกับงานวิจัยที่ผ่านมา และผลการวิจัยได้รับการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติจำนวน 3 เรื่อง (อยู่ในระหว่างการพิจารณาอีก 1 เรื่อง)

รายละเอียดการเปลี่ยนแปลงการวิจัยสรุปได้ ดังนี้ ในการดำเนินการวิจัย คณะผู้วิจัยสามารถโคลนยีนทั้งหมดที่เกี่ยวข้องกับวิถีการผลิตสารผลิตภัณฑ์เป้าหมาย ดำเนินการ genetic engineering สร้าง metabolic pathway ใหม่สำหรับการผลิตสารผลิตภัณฑ์ พัฒนาวิธี genetic transformation ที่มีประสิทธิภาพ สร้าง Shuttle vectors และสร้าง expression vectors ศึกษาการแสดงออกของยีนในเชื้อ Heterologous hosts และ ศึกษาแอคติวิตีของ gene products อย่างไรก็ตาม ในขั้นตอนสุดท้าย คณะผู้วิจัยประสบปัญหาในการผลิตสารผลิตภัณฑ์เป้าหมาย กล่าวคือ ไม่สามารถตรวจพบการผลิตบิวทานอลใน *Bacillus subtilis* GRSW2B1 สำหรับการผลิต 3-Hydroxypropionaldehyde, 3HPA นั้นสามารถผลิตได้ แต่ผลผลิตที่ได้ (yield) ต่ำ ปัญหาดังกล่าวเกิดขึ้นเนื่องจากการดำเนินการตัดต่อยีนเพื่อสร้างวิถีการผลิตสาร (metabolic engineering) ในเชื้อ heterologous host มีความซับซ้อนมากกว่าการตัดต่อและการควบคุมการแสดงออกยีนเดี่ยว ความซับซ้อนต่างๆ ซึ่งมีผลต่อการแสดงออกของยีนในกระบวนการ metabolic engineering และการผลิตสารเป้าหมายในเชื้อเจ้าบ้านใหม่ แบ่งออกเป็น 3 ส่วนหลัก ได้แก่ 1) ความซับซ้อนของการสร้างวิถียีน 2) ระดับและประสิทธิภาพการแสดงออกของยีนต่างๆ ในวิถีใหม่ใน Heterologous host และ 3) สภาวะการผลิตสารเป้าหมาย และความสมดุลของ metabolic flux ของวิถีใหม่ใน heterologous host ซึ่งตัวอย่างของปัญหาที่อาจเกิดขึ้นใน 3 ส่วนหลักดังกล่าว เช่น

1. ความไม่เข้ากัน (incompatibility) ของลักษณะสมบัติของ structural genes (เช่น GC content) และ heterologous host
2. ปัญหา Codon bias, Codon incompatibility, Rare codon
3. ปัญหา promoter strength และ ความไม่สมดุลของปริมาณการแสดงออกของ genes และ gene products (enzymes) ต่างๆในวิถีที่ engineered ขึ้นในเชื้อ heterologous host ซึ่งก่อให้เกิดปัญหา metabolic flux shift
4. ปัญหาการควบคุมสภาวะการผลิตที่เหมาะสม และการควบคุม metabolic flux

คณะผู้วิจัยได้ตระหนักถึงปัญหาดังกล่าวและพยายามทำการศึกษา ปรับปรุงแก้ไขโดยใช้หลักการทางชีวเคมีและทฤษฎีทาง ทาง Molecular biology & metabolic engineering ต่างๆ โดยปรับเปลี่ยนสภาวะต่างๆ ใน 3 ส่วนหลักดังกล่าวแต่ไม่เป็นผล สรุปขั้นตอนการแก้ไขได้ดังนี้

การแก้ไขปัญหาสำหรับการผลิตบิวทานอลจากน้ำตาล

1. การแก้ไขปรับปรุงกระบวนการตัดต่อยีน การสร้างวิถียีน เพื่อสร้างวิถีการผลิตใหม่ของสารเป้าหมาย และประสิทธิภาพ ของ Genetic transformation ของเชื้อ heterologous host โดยการดำเนินการดังนี้
   1.1 การปรับเปลี่ยนชนิดของ structural genes ที่ถอดรหัสให้เอนไซม์เดียวกัน โดยใช้ยีนจากจุลินทรีย์ต่างๆ (Bacterial isozyme) เพื่อแก้ปัญหาการไม่แสดงออกของยีน โดยมีสมมติฐานว่าการไม่แสดงออกนั้นเนื่องมาจาก codon bias ในเชื้อเจ้าบ้าน
   1.2 การปรับเปลี่ยนโครงสร้างการตัดต่อยีน (engineered gene organization) ในวิถียีน
   1.3 การปรับปรุงสภาวะให้มีความเหมาะสมต่อ Genetic transformation ของเชื้อ heterologous host
2. การแก้ไขปรับปรุงระดับและประสิทธิภาพการแสดงออกของยีนต่างๆ ในวิถีใหม่ใน heterologous host โดยดำเนินการ ดังนี้
   2.1 การปรับเปลี่ยนปริมาณการแสดงออกของยีนแต่ละยีนในวิถีการผลิตในเชื้อรีคอมบิแนนท์ *Bacillus subtilis* GRSW2-B1 โดยการเปลี่ยนโปรโมเตอร์
   2.2 การปรับเปลี่ยน gene construction เพื่อปรับการแสดงออกของยีนแต่ละยีนในเชื้อรีคอมบิแนนท์ *Bacillus subtilis* GRSW2-B1 โดยปรับจากการควบคุมการแสดงออกของยีนแต่ละยีนเป็นการควบคุมการแสดงออกของ gene cluster
   2.3 การปรับเปลี่ยนเชื้อเจ้าบ้านในการแสดงออกของยีนเพื่อการผลิตบิวทานอล โดยเปลี่ยนจาก butanol-tolerant *Bacillus subtilis* GRSW2-B1 เป็น butanol-tolerant *Bacillus cereus* strain 3C1
3. การแก้ไขปรับปรุงสภาวะการผลิตสารเป้าหมาย และความสมดุลของ metabolic flux ของวิถีใหม่ใน heterologous host โดยการดำเนินการ ดังนี้
   3.1 การปรับเปลี่ยนสภาวะการเจริญของเชื้อที่เหมาะสม
   3.2 การปรับเปลี่ยนสภาวะการผลิตสารโดยเชื้อรีคอมบิแนนท์ *Bacillus subtilis* GRSW2-B1 แบบ aerobic และ miroaerobic โดยใช้ sequential steps (เช่น การใช้ aerobic growth and microaerobic production เป็นต้น)
   3.3 การปรับปรุงความสมดุลของ metabolic flux ของวิถีใหม่โดยคำนึงถึงปริมาณและการเปลี่ยนแปลงวิถีของสารตั้งต้น acetyl-CoA โดยทดสอบทั้งใน butanol-tolerant *Bacillus subtilis* GRSW2-B1 และ butanol-tolerant *Bacillus cereus* strain 3C1

การแก้ไขปัญหาสำหรับการผลิต 3HPA จากกลีเซอรัลหยาบ

1. การแก้ไขปรับปรุงกระบวนการตัดต่อยีน การสร้างวิถียีน เพื่อสร้างวิถีการผลิตใหม่ของสารเป้าหมาย และประสิทธิภาพ ของ Genetic transformation ของเชื้อ heterologous host โดยการดำเนินการดังนี้
   1.1 การปรับเปลี่ยน structural genes ที่ถอดรหัสให้เอนไซม์เดียวกัน โดยใช้ยีน *dhaB* จากจุลินทรีย์ 2 ชนิดที่แตกต่างกัน
   1.2 การปรับเปลี่ยนโครงสร้างการตัดต่อยีน (engineered gene organization) ในวิถียีน โดยการเพิ่ม orfX ซึ่งมีรายงานว่าเป็นเป็น gene cluster activator ในการผลิตสาร 3HPA
   1.3 การปรับปรุงสภาวะให้มีความเหมาะสมต่อ Genetic transformation ของเชื้อ heterologous host

2. การแก้ไขปรับปรุงระดับและประสิทธิภาพการแสดงออกของยีนต่างๆ ในวิถีใหม่ใน Heterologous host โดยดำเนินการ ดังนี้
   2.1 การปรับเปลี่ยนปริมาณการแสดงออกของยีนแต่ละยีนในวิถีการผลิตในเชื้อรีคอมบิแนนท์ *B. subtilis* BKS2-P2/3 โดยการเปลี่ยนโปรโมเตอร์
   2.2 การปรับเปลี่ยน gene construction โดยการเปลี่ยน ribosome binding site (RBS) และ RBS spacing ซึ่งมีรายงานว่ามีผลต่อการแสดงออกของยีนใน Heterologous host
   2.3 การปรับเปลี่ยนเชื้อเจ้าบ้านในการแสดงออกของยีนเพื่อการผลิต 3HPA โดยเปลี่ยนจาก Gram positive organic-solvent tolerant *B. subtilis* BKS2-P2/3 เป็น Gram negative organic-solvent tolerant *Pseudomonas putida* T57 ซึ่งการเปลี่ยน host นี้ต้องดำเนินการทุกขั้นตอนใหม่หมด โดยดำเนินการ genomic engineering สร้าง metabolic pathway ใหม่สำหรับการผลิตสารผลิตภัณฑ์ พัฒนาวิธี genetic transformation สร้าง Shuttle vector การสร้าง expression vector ศึกษาการแสดงออกของยีนในเชื้อ Heterologous host และศึกษาแอคติวิตีของ gene products พบว่ามีการผลิต 3HPA ได้ แต่ผลผลิตที่ได้ต่ำ
3. การแก้ไขปรับปรุงสภาวะการผลิตสารเป้าหมาย และความสมดุลของ metabolic flux ของวิถีใหม่ใน heterologous host โดยการดำเนินการ ดังนี้
   3.1 การปรับเปลี่ยนสภาวะการเจริญของเชื้อที่เหมาะสม
   3.2 การปรับเปลี่ยนสภาวะการผลิตสารโดยเชื้อรีคอมบิแนนท์ *B. subtilis* BKS2-P2/3 และ *Pseudomonas putida* T57 แบบ aerobic และ miroaerobic โดยใช้ sequential steps (เช่น การใช้ aerobic growth and microaerobic production เป็นต้น)

<u>รายละเอียดการวิจัยที่มีการปรับเปลี่ยน</u>- เพื่อเป็นการตอบวัตถุประสงค์หลักของโครงการ ได้แก่ การพัฒนาและประยุกต์ใช้ตัวเร่งทางชีวภาพในการผลิตสารเคมีจากสารชีวมวลโดยเน้นหนักการใช้วิศวกรรมพันธุศาสตร์ คณะผู้วิจัยจึงดำเนินการปรับโครงสร้างของวิถียีน (engineered gene organization) โดยใช้วิถีการผลิตเดิมเป็นหลัก แต่ปรับเปลี่ยนเป็นวิถีการผลิตชนิดใหม่ ได้แก่ สาร 1,3-butanediol (13BD) จากนั้น ศึกษาการแสดงออกใน heterologous host *E. coli* ทั้งนี้ สาร 1,3-butanediol (13BD) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง R-steroisomer-1, 3-บิวเทนไดออล ((R)-1, 3-butanediol; R13BD) เป็นสารที่มีมูลค่าในอุตสาหกรรม เช่นเดียวกันกับ สาร 1,3-propanediol (13PD) R13BD มีการใช้อย่างกว้างขวางโดยเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สารเคมี และสารประกอบในหลายอุตสาหกรรม เช่น น้ำหอม ยาฆ่าแมลง และเป็นกุญแจสำคัญใน chiral กลางสำคัญสำหรับสังเคราะห์ยาปฏิชีวนะ carbapenem beta-lactam สาร R13BD มีข้อจำกัดในด้านกระบวนการการผลิต เนื่องจากในปัจจุบันกระบวนการผลิตสาร 1,3-butanediol (13BD) ทำได้โดยวิธีการทางเคมีเป็นหลัก แต่วิธีการผลิตด้วยวิธีทางเทคโนโลยีชีวภาพถูกจำกัดภายใต้การจดสิทธิบัตรของบริษัทเคมีอุตสาหกรรมแห่งหนึ่งในประเทศญี่ปุ่น ดังนั้น ผลการวิจัยของโครงการนี้ซึ่งประสบความสำเร็จในการปรับเปลี่ยนวิถี (metabolic engineer) จากวิถีการผลิตบิวทานอลเดิม เป็นวิถีการผลิตสาร 1,3-butanediol (13BD) โดยใช้เชื้อ heterologous host E. coli จึงเป็นวิถีการผลิตใหม่ของสารที่มีมูลค่าในอุตสาหกรรม รายละเอียดผลการดำเนินการของการพัฒนา วิถีการผลิตสาร 1,3-butanediol (13BD) แสดงในรายงานครั้งที่ 1, 2 และสรุปในฉบับนี้ ผลงานจากการวิจัยนี้ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ และอยู่ระหว่างการพัฒนาต่อยอดเพื่อขยายขนาดการผลิตต่อไป

นอกจากนั้น ในส่วนของการผลิต 3-Hydroxypropionaldehyde, 3HPA ซึ่งสามารถผลิตได้ตามแผน แต่ผลผลิตที่ได้ (yield) ต่ำ ดังนั้น คณะผู้วิจัยจึงดำเนินการปรับโครงสร้างของวิถียีนเพื่อผลิตสาร 3-

แมทิลแคทิคอล (3MC) เพื่อทดแทน การแก้ไขนี้เพื่อเป็นการตอบวัตถุประสงค์ส่วนหนึ่งของโครงการ ได้แก่ การพัฒนาและประยุกต์ใช้ตัวเร่งทางชีวภาพทนตัวทำละลายอินทรีย์ในการผลิตสารเคมีจากสารชีวมวล โดยเน้นหนักการใช้วิศวกรรมพันธุศาสตร์ ดังนั้น คณะผู้วิจัยจึงดำเนินการพัฒนาแบคทีเรียแพลตฟอร์มสำหรับการผลิตสารเคมีไฮโดรคาร์บอนด้วยระบบการผลิตแบบสองเฟส (two liquid phase (organic-aqueous) production) โดยใช้แบคทีเรียทนตัวทำละลายอินทรีย์แกรมลบ *P. putida* T-57 เป็นแบคทีเรียเจ้าเรือนในการทำวิศวกรรมพันธุศาสตร์ในการผลิตสารเคมีอุตสาหกรรม 3-แมทิลแคทิคอล (3MC)

2. การพัฒนาและประยุกต์ใช้ตัวเร่งทางชีวภาพในการผลิตสารเคมี 1,3-butanediol (13BD) จากสารชีวมวล

2.1 ความสำคัญ/ที่มาของปัญหา แนวคิดเหตุผล และหลักการสำคัญของการผลิต 1,3-บิวเทนไดออล (1,3-butanediol, 13BD) จากสารชีวมวล

(R)-1, 3-บิวเทนไดออล ((R)-1, 3-butanediol; R13BD) เป็นสารเคมีที่มีคุณค่าและมีการใช้อย่างกว้างขวางในการสังเคราะห์สารเคมีและสารประกอบในหลายอุตสาหกรรม เช่น น้ำหอม, ยาฆ่าแมลงและเป็นกุญแจสำคัญใน chiral กลางสำคัญสำหรับสังเคราะห์ยาปฏิชีวนะ carbapenem beta-lactam (Matsuyama et al., 2001) เพราะยาปฏิชีวนะ beta-lactam เป็นยาที่ใช้มากที่สุดตัวหนึ่งเพื่อต้านแบคทีเรียในทางปฏิบัติทางคลินิก ทำให้ทั่วโลกมีความต้องการ R13BD เพิ่มขึ้นอย่างมากและเป็นผลให้วิธีการผลิตของ R13BD ได้รับการศึกษาอย่างต่อเนื่อง (Zheng et al., 2012) ปัจจุบันนี้ 13BD ได้รับการสังเคราะห์เป็น racemic ผสมของแบบ R- และ S-ฟอร์ม ซึ่งส่วนใหญ่มาจากสารเคมีที่ได้จากปิโตรเลียม เช่น prochiral, 4-hydroxy-2-butanone (4H2B) โดยมีขั้นตอนของปฏิกิริยาเคมีหลายขั้นตอน (Boaz et al., 2006) อย่างไรก็ตาม การขาดแคลนทรัพยากรฟอสซิลและปิโตรเคมีเป็นข้อจำกัดหลักของการผลิตสารเคมีนี้ ดังนั้น การผลิต 13BD ด้วยวิธีชีวภาพจากสารชีวมวล เช่น น้ำตาล จึงเป็นกระบวนการผลิตที่มีความสำคัญมากขึ้น กระบวนการผลิต 13BD ด้วยวิธีทางชีวภาพที่มีการรายงานก่อนหน้านี้ ทั้งจากจุลินทรีย์สายพันธุ์พื้นเมือง หรือสายพันธุ์ดัดแปลงทางพันธุกรรม (Matsuyama et al., 1993; Matsuyama et al., 2001) รวมถึง การใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในปฏิกิริยาที่ไม่ใช่น้ำ (non-aqueous system) (Matsuyama et al., 2001; Atsumi and Liao, 2008) นั้น มีข้อด้อย เนื่องจากการผลิตด้วยกระบวนการดังกล่าวมักจะได้ผลิตภัณฑ์หลักเป็น S-ฟอร์ม ซึ่งมีประโยชน์และมูลค่าน้อยกว่า R-ฟอร์ม ดังนั้น ด้วยคุณประโยชน์ของ R13BD จึงทำให้ต้องมีการพัฒนากระบวนการผลิตทางชีวภาพของสารดังกล่าวนี้ โดยเน้นการผลิตสารที่มีความบริสุทธิ์สูงจากสารชีวมวลทดแทน

การใช้วิธีการผลิต R13BD ทางเทคโนโลยีชีวภาพ สามารถทำได้โดยการพัฒนาสายพันธุ์ของแบคทีเรีย recombinant ด้วยการใช้วิธีพันธุวิศวกรรมเพื่อผลิต R13BD รายงานก่อนหน้านี้ รายงานวิถีการผลิตจากกลูโคสด้วยแบคทีเรีย recombinant *Escherichia coli* (*E. coli*) สายพันธุ์ HB101 โดยได้ผลผลิตสูงสุด 1.028 กรัม/ลิตร (11.4 มิลลิโมลาร์) ถึงแม้กลยุทธ์การสังเคราะห์จะได้รับความสำเร็จ แต่ข้อด้อยของวิถีการผลิตในรายงานดังกล่าว ได้แก่ ความบริสุทธิ์ของ13BD ซึ่งพบว่ามี R13BD ที่ผลิตได้ไม่มาก ซึ่งทำให้ประสิทธิภาพในการผลิตต่ำส่งผลให้การผลิตภาคอุตสาหกรรมของ R13BD ถูกจำกัด

ผลการศึกษาในงานวิจัยนี้ ประสบความสำเร็จในการสร้างวิถีการผลิตที่มีประสิทธิภาพสำหรับการผลิต R13BD ด้วยวิธีชีวภาพจากกลูโคส โดยการสร้างพลาสมิดลูกผสมซึ่งประกอบด้วยยีน *phaA* (3-ketothiolase), *phaB* (NAD(P)H dependent acetoacetyl-CoA reductase) จากแบคทีเรีย

Ralstonia eutropha NBRC 102504 และ *bld* (butyraldehyde dehydrogenase) จากแบคทีเรีย *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* ATCC 27012 และแสดงออกในแบคทีเรีย *E. coli* MG1655 *lacI*^{q} โดยแสดงให้เห็นว่าการคัดเลือกยีนเป็นองค์ประกอบสำคัญซึ่งนำไปสู่การแสดงออกของการทำงานของเอนไซม์และการสร้างสารผลิตภัณฑ์ ในสภาวะการผลิตที่เหมาะสมสำหรับแบคทีเรีย recombinant ที่สร้างขึ้นสามารถผลิต R13BD ได้ถึง 9.05 กรัม/ลิตร (100.4 มิลลิโมลาร์) ซึ่งเป็นการผลิต R13BD ด้วยความเข้มข้นและความบริสุทธิ์สูงที่สุดจากที่มีการรายงานในปัจจุบัน จากนั้น ศึกษาและปรับปรุงสภาวะการผลิต 13BD โดยใช้แบคทีเรียลูกผสม *E. coli* BW25113 *lacIq* ในระดับขยายขนาด ในระบบการเลี้ยงแบบแบทช์ (batch) ด้วยการควบคุมสภาวะในการเลี้ยงในระบบถังหมักชีวภาพอย่างเคร่งครัด เพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพของการผลิต 13BD

2.2 วัตถุประสงค์และขอบเขตการวิจัย

วัตถุประสงค์การวิจัย - เพื่อการพัฒนาตัวเร่งทางชีวภาพในการผลิตสารเคมีจากสารชีวมวลโดยเน้นหนักการใช้วิศวกรรมพันธุศาสตร์ โดยใช้การพัฒนา metabolic engineering system เพื่อผลิตสาร 1,3-butanediol (13BD) เป็นวิถีต้นแบบและสารต้นแบบ ตามลำดับ

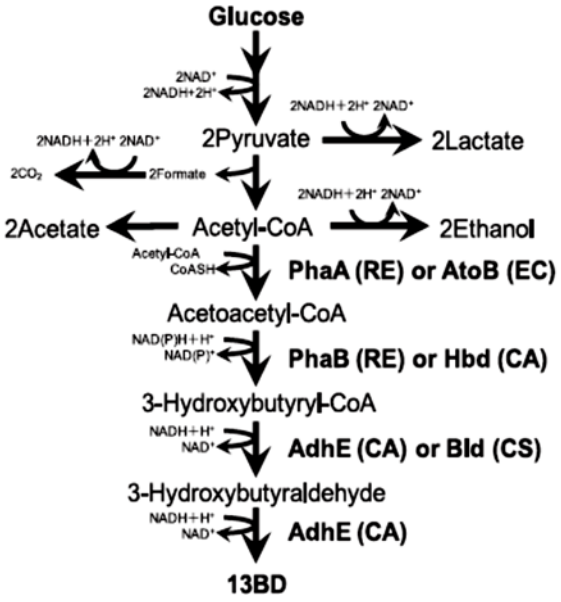
โดยมีขอบเขตการวิจัย ดังนี้

1. การออกแบบวิถี/เส้นทางสำหรับการสังเคราะห์ 13BD การตัดต่อยีนและการแสดงออกของยีนผลิตภัณฑ์
2. การผลิต 13BD แบบ batch ในระดับการผลิตขนาดเล็ก
3. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสม (Optimization) ในการผลิต 13BD แบบ batch ในระดับการผลิตขนาดเล็ก
4. การผลิต 13BD แบบ fed-batch ในระดับการผลิตขนาดเล็ก
5. การพัฒนากระบวนการผลิต 13BD ในถังหมัก (Bioreactor-scale production)
6. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสม (Optimization) ของกระบวนการผลิต 13BD ในถังหมัก

2.3 วิธีการดำเนินการวิจัย ผลการวิจัย และข้อวิจารณ์ (Brief methods, Results & Discussion)

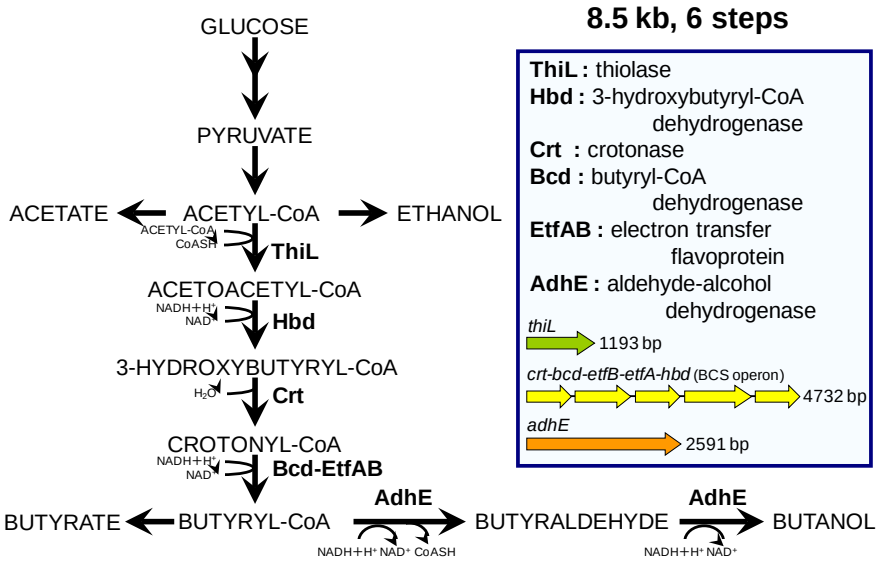
2.3.1 <u>การออกแบบวิถี/เส้นทางสำหรับการสังเคราะห์ 13BD การตัดต่อยีน และการแสดงออกของยีนผลิตภัณฑ์</u>

ปัจจุบันนี้การผลิต R13BD จากสารตั้งต้นชีวมวลยังมีข้อมูลอยู่น้อย โดยในการศึกษานี้ใช้วิธีการสังเคราะห์สารพันธุกรรมเพื่อออกแบบและสร้างยีนสำหรับการผลิต 13BD จากกลูโคส ซึ่งเป็นสารชีวมวลที่นิยมใช้กันมากที่สุดสำหรับอุตสาหกรรมการผลิต และยีนที่ได้ถูกแสดงออกในแบคทีเรียเจ้าเรือน *E. coli* MG1655 *lacI*^{q} ความสำเร็จของการผลิตอุตสาหกรรมเคมีจากการสังเคราะห์เส้นทางการเผาผลาญสารตั้งต้นมักจะขึ้นอยู่กับชนิดของยีนและกิจกรรมของยีนที่เกี่ยวข้องในแบคทีเรียเจ้าเรือนที่เลือก ดังนั้นการเลือกยีนที่เหมาะสม หรือยีนโฮโมลอก (Homologs) มาจากสิ่งมีชีวิตหลายชนิดจะเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญที่สุดเพื่อเพิ่มผลผลิต วิถีการผลิต 13BD จากกลูโคสต้องมีสองส่วนหลักของการเผาผลาญ องค์ประกอบแรกรวมถึงตัวกลางการเผาผลาญ เช่น pyruvate และ acetyl-CoA องค์ประกอบที่สอง คือ วิถีการเปลี่ยน acetyl-CoA ไปเป็น 13BD ซึ่งต้องใช้เอนไซม์ต่อไปนี้: 3-ketothiolase, acetoacetyl-CoA reductase, และ alcohol dehydrogenase/ aldehyde dehydrogenase (รูปที่ 1)



รูป 1 แผนผังของวิถีการผลิต 1, 3-บิวเทนไดออล จากกลูโคสของแบคทีเรีย *E. coli* วิศวกรรม lacIq MG1655 ซึ่งเริ่มต้นจาก acetyl-CoA ประกอบด้วยสามเอนไซม์โดยมียีนมาจากสิ่งมีชีวิตต่างกัน คือ 3-Ketothiolase (*atoB* จาก E. coli ดังเดิม, *phaA* จาก *R. eutropha* NBRC 102504); NAD(P)H-dependent acetoacetyl-CoA reductase (hbd จาก *C. acetobutylicum* ATCC824, *phaB* จาก *R. eutropha* NBRC102504); alcohol/aldehyde dehydrogenase และ butyraldehyde dehydrogenase (*adhe* จาก *C. acetobutylicum* ATCC824 และ *bld* จาก *C. saccharoperbutylacetonicum* ATCC27012 ตามลำดับ)

หมายเหตุ วิถีการผลิต 13BD นี้ได้มาจากการดัดแปลงวิถีการผลิตบิวทานอล โดยการตัด *crt-bcd-etfAB* gene cluster เพื่อกำจัดขั้นตอนการผลิต crotonyl-CoA ที่คาดว่าเป็นปัญหาสำคัญของวิถีการผลิตบิวทานอลออก ซึ่งแสดงการเปรียบเทียบแผนภาพการผลิตได้ ดังนี้ (รูปที่ 2)



รูป 2 วิถีการผลิตบิวทานอล

จนถึงปัจจุบัน วิถีการผลิต 13BD จากกลูโคสมีการรายงานเพียงวิถีการผลิตที่สร้างขึ้น ซึ่งประกอบด้วย *phbA* (ถอดรหัสของยีน B-ketothiolase) *phbB* (ถอดรหัสของยีน acetoacetyl-CoA reductase) จาก *R. eutropha* DSM531 และ *adhe* (ถอดรหัสของยีน aldehyde/alcohol dehydrogenase ที่ได้มาจาก *C. acetobutylicum*) สำหรับในงานวิจัยนี้ เพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต และเพิ่มความบริสุทธิ์ของการผลิต 13BD วิถีการผลิตจึงถูกออกแบบใหม่โดยดัดแปลงใช้ยีนซึ่งมีแหล่งที่มาแตกต่างกันมารวมกัน

ยีนดังต่อไปนี้และ homolog ที่ถูกเลือกมาจากหลายแหล่งที่มา (ดังตาราง) จะถูกใช้ในการถอดรหัสเป็นเอนไซม์ และใช้ใช้ในการสร้างพลาสมิด, pNK1 ถึง pNK4 (ดังตาราง) ก่อนที่จะ transform เข้าแบคทีเรียเจ้าเรือน *E. coli* MG1655 lacI^{q} เพื่อสร้างสายพันธุ์ผสม, MG-NK1 ถึง MG-NK4: *pha*A หรือ *ato*B สำหรับ 3-ketothiolase, *pha*B หรือ *hbd* สำหรับ NAD(P)H-dependent acetoacetyl-CoA reductase และ *adh*E หรือ *bld* สำหรับ alcohol/aldehyde dehydrogenase หรือ butylraldehyde dehydrogenase ตามลำดับ สำหรับการแสดงออกของยีน *ato*B ซึ่งสร้างขึ้นในพลาสมิด pNK พบว่ามีการตกตะกอนของโปรตีน (ไม่ได้แสดงข้อมูล) จึงไม่ได้ใช้ยีนนี้ในการศึกษาต่อไป ดังนั้น *pha*A เป็นยีนเดียวที่เหลืออยู่สำหรับ 3-ketothiolase ในการสร้างสายพันธุ์ที่เป็น recombinant ทั้งหมด

หลังจากนั้น ตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์และการสร้าง 13BD ภายใต้สภาพกึ่งแอโรบิกจากสายพันธุ์ recombinant ซึ่งพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ 3-ketothiolase (*pha*A) อยู่ในระดับที่เทียบเคียงกันได้จากสายพันธุ์ recombinant ทั้งหมด สำหรับการวิเคราะห์กิจกรรมของ alcohol/aldehyde dehydrogenase (*adhE*) และ butylraldehyde dehydrogenase (*bld*) ให้ผลคลุมเครือซึ่งอาจจะเป็นเพราะความไม่แน่นอนของเอนไซม์ภายใต้เงื่อนไขการทดสอบในสภาวะแอโรบิก (8) แต่อย่างไรก็ตามการผลิตปลายทางของ 13BD ถูกใช้ในการสันนิษฐานกิจกรรมของของเอนไซม์เหล่านี้ โดยสายพันธุ์ MG-NK2 ซึ่งมียีน *hbd* จาก *C. acetobutylicum* ATCC824 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ acetoacetyl-CoA reductase สูงถึง 50 เท่า ซึ่งสูงกว่ากิจกรรมของเอนไซม์จากสายพันธุ์ MG-NK1 ที่มียีน *pha*B จาก *R. eutropha* NBRC102504 แต่ไม่มีการผลิต 13BD ผลที่ได้นี้สอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ โดยกิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่าการแสดงออกของยีนหรือสูงเกินไปอาจก่อให้เกิดความไม่สมดุลของ metabolic network ของแบคทีเรียเจ้าเรือนซึ่งอาจส่งผลในการลดการสร้างสารผลิตภัณฑ์ (8) ในกรณีนี้การใช้ NADH ของ NAD(P)H-dependent acetoacetyl-CoA reductase (*hbd*) ที่มากเกินไปอาจรบกวนสมดุลวิถีการผลิต NAD+/NADH ถึงแม้ว่าสายพันธุ์ MG-NK1 ซึ่งมียีน *pha*B และ *adh*E สามารถผลิต 13BD ได้ค่อนข้างต่ำ (0.37 มิลลิโมลาร์) เมื่อเทียบกับรายงานก่อนหน้า (11.4 มิลลิโมลาร์ หรือ 1.03 กรัม/ลิตร) การปรับปรุงแก้ไขต่อไปจึงมุ่งเน้นไปที่การเลือกใช้ยีนจาก *adh*E

นอกจากนี้ alc/ald dehydrogenase จาก *C. acetobutylicum* ATCC824 butyraldehyde dehydrogenase จาก *C. saccharoperbutylacetonicum* ATCC27012 ถูกตรวจสอบความสามารถในการเปลี่ยน 3-hydroxybutyryl-CoA ไปเป็น 3-hydroxybutyraldehyde จากนั้น 3-hydroxybutyraldehyde ถูกเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ที่มีอยู่เดิมของแบคทีเรียเจ้าเรือน ซึ่งกิจกรรมของเอนไซม์ NAD(P)H-dependent acetoacetyl-CoA reductase (*pha*B) ใน MG-NK1 และ MG-NK3 นั้นใกล้เคียงกัน แต่ผลผลิตของ 13BD ใน MG-NK3 ที่มียีน *bld* สามารถผลิต 13BD ได้ถึง 1.45 มิลลิโมลาร์ ซึ่งต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (4 เท่า) ผลลัพธ์เหล่านี้บ่งบอกถึงความสำคัญของการเลือกยีนและความสมดุลของกิจกรรมของยีนผลิตภัณฑ์เพื่อให้มีการแสดงออกที่เหมาะสมและการสร้างผลิตภัณฑ์จากแบคทีเรีย recombinant ที่เลือก ตามผลการวิจัย, recombinant สายพันธุ์ MG-NK3 ซึ่งมียีน *pha*A, *pha*B และ *bld* ได้รับเลือกสำหรับการปรับปรุงกระบวนการผลิตทางชีวภาพเพื่อเพิ่มการผลิต 13BD ต่อไป

ตาราง 1 สายพันธุ์ของเชื้อ และพลาสมิดที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

Strain/Plasmid	Relevant characteristics
Strains	
Escherichia coli	
NEB 5-alpha F′ I^q	F′ *proA*$^+$*B*$^+$ *lacI*^{q} Δ(*lacZ*)M15 *zzf*::*Tn10* (Tet^R)/*fhuA2* Δ(*argF-lacZ*)U169 *phoA glnV44* Φ80Δ (*lacZ*)M15 *gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*
MG1655	F$^-$ λ$^-$ *ilvG*$^-$ *rfb*-50 *rph*-1
MG1655 *lacI*^{q}	F′[*proAB lacI*^{q}Z ΔM15 *Tn10* (Tet^R)] λ$^-$ *ilvG*$^-$ *rfb*-50 *rph*-1; source of *atoB*
MG-NK1	MG1655 *lacI*^{q}/pNK1
MG-NK2	MG1655 *lacI*^{q}/pNK2
MG-NK3	MG1655 *lacI*^{q}/pNK3
MG-NK4	MG1655 *lacI*^{q}/pNK4
Ralstonia eutropha NBRC 102504	Source of *phaA* and *phaB*
Clostridium acetobutylicum ATCC 824	Source of *hbd* and *adhE*
C. saccharoper-butylacetonicum ATCC 27012	Source of *bld*
Plasmids	
pKK223-3	Source of MCS; *rrnBT1T2*
pHZK	p15A ori; Amp^r; Kan^r
pNK	p15A ori; Amp^r; Kan^r; $P_{A1lacO-1}$::MCS; *rrnBT1T2*
pNK1	p15A ori; Amp^r; Kan^r; $P_{A1lacO-1}$::*phaA*(RE)-*adhE*(CA)-*phaB*(RE); *rrnBT1T2*
pNK2	p15A ori; Amp^r; Kan^r; $P_{A1lacO-1}$::*phaA*(RE)-*adhE*(CA)-*hbd*(CA); *rrnBT1T2*
pNK3	p15A ori; Amp^r; Kan^r; $P_{A1lacO-1}$::*phaA*(RE)-*bld*(CS)-*phaB*(RE); *rrnBT1T2*
pNK4	p15A ori; Amp^r; Kan^r; $P_{A1lacO-1}$::*phaA*(RE)-*bld*(CS)-*hbd*(CA); *rrnBT1T2*

NBRC, NITE Biological Resource Center, Japan; ATCC, American Type Culture Collection; RE, *Ralstonia eutropha* NBRC102504; CA, *Clostridium acetobutylicum* ATCC824; CS, *C. saccharoperbutylacetonicum* ATCC27012

	Enzymatic specific activity (unit/mg protein)			
	3-ketothiolase	acetoacetyl-CoA reductase		13BD production (mM)
Plasmid/13BD production genes	PhaA(RE)	PhaB(RE)	Hbd(CA)	
pNK1 *phaA* *adhE* *phaB*	6.39±0.37	0.33±0.01	-	0.37
pNK2 *phaA* *adhE* *hbd*	5.99±0.21	-	16.00±1.16	ND
pNK3 *phaA* *bld* *phaB*	7.59±0.63	0.27±0.01	-	1.45
pNK4 *phaA* *bld* *hbd*	8.61±0.54	-	30.50±1.68	ND

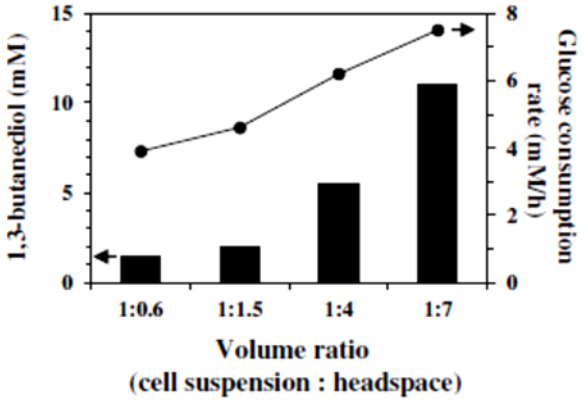
รูป 3 องค์ประกอบของยีนในพลาสมิด pNK1 ถึง pNK4 เพื่อการผลิต 13BD และการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ในแบคทีเรียเจ้าเรือน MG1655 lacI^q การเลี้ยงแบคทีเรียแบบ batch ได้ดำเนินการที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในขวดแก้วปิดผนึกขนาน 10 มิลลิลิตร ด้วยอัตราส่วน 1:1.6 ระหว่างแบคทีเรียที่เลี้ยงและภาชนะซึ่งถือว่าเป็นสภาพกึ่งแอโรบิก และการผลิต 13BD ถูกตรวจสอบหลังจากหมักไป 12 ชั่วโมง โดยความหมายของแต่ละสัญลักษณ์ เป็นดังนี้: -, ไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ในสายพันธุ์ recombinant; ND, ตรวจไม่พบ และแหล่งที่มาของยีนสำหรับเอนไซม์แต่ละชนิดมาจากแบคทีเรีย *Ralstonia eutropha* NBRC102504 (RE), *Clostridium acetobutylicum* ATCC824 (CA) และ *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* ATCC27012 (CS) หมายเหตุ: ทดสอบเอนไซม์จากยีน *adh*E และ *bld* ไม่ได้ เนื่องจากความเสถียรของเอนไซม์เมื่อวัดแบบ *in intro*

2.3.2 <u>การผลิต 13BD แบบ batch ในระบบการผลิตขนาดเล็ก</u>

การผลิตของ 13BD จากเชื้อ recombinant ดำเนินการโดยการหมักแบบ batch โดยปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตแบบ batch ได้รับการตรวจสอบเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิต 13BD ได้แก่

1) ความเข้มข้นของ IPTG - ยีนที่สร้างขึ้นใน pNK3 พลาสมิดอยู่ภายใต้การควบคุมการแสดงออกของ IPTG inducible-PA1lacO-1; ดังนั้นระดับที่เหมาะสมของ IPTG จะส่งผลในการแสดงออกของยีนและการผลิต 13BD โดยพบว่าการใช้ IPTG ความเข้มข้น 0.01 มิลลิโมลาร์ให้ผลการผลิต 13BD สูงสุด จึงได้รับเลือกเป็น inducer ความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบการผลิตต่อไป
2) ปริมาณออกซิเจนที่เหมาะสมสำหรับการผลิต 13BD - การผลิตด้วยระบบ resting cell reaction ดำเนินการที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีอัตราส่วนปริมาณที่แตกต่างกันระหว่างปริมาณของเซลล์และช่องว่างเหนือของเหลวที่เหลืออยู่ในภาชนะ (1:0.6, 1:1.5, 1:4 และ 1:7) ซึ่งทำให้มีผลต่อการเติมอากาศและปริมาณออกซิเจนที่แตกต่างกัน ผลการทดลองพบว่า ผลผลิตสูงขึ้น เมื่อออกซิเจนเพิ่มขึ้น โดยที่อัตราส่วน 1:7 ผลผลิตเพิ่มขึ้นถึง 11 มิลลิโมลาร์ (0.99 กรัม/ลิตร)
3) อัตราการใช้น้ำตาลในแต่ละสภาวะการผลิต - ผลการทดลองแสดงให้เห็นได้อย่างชัดเจนว่าสภาพแอโรบิกมีอัตราการใช้น้ำตาลสูง ส่งผลให้มีปริมาณสารตั้งต้น acetyl-CoA สูง (มาจากการใช้กลูโคส) ซึ่งผลักดันทิศทางของปฏิกิริยาไปในการผลิต 13BD

สภาวะที่เหมาะสมเหล่านี้ถูกนำมาใช้ในการผลิตต่อไป

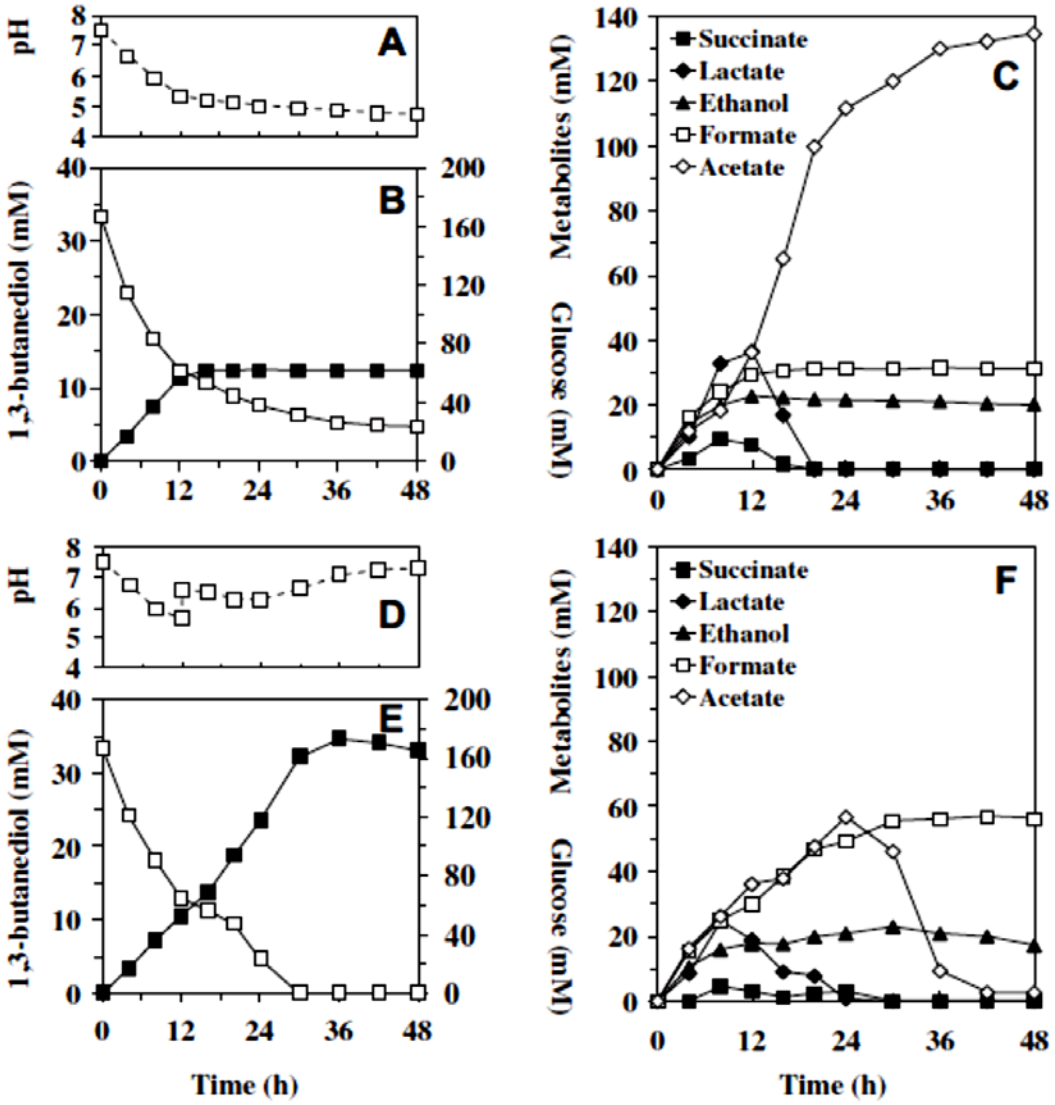


รูป 4 การผลิต 13BD ด้วย recombinant *E. coli* สายพันธุ์ MG-NK3 ในสภาวะที่เติมอากาศปริมาณต่างๆ (แสดงด้วย ความแตกต่างของอัตราส่วนปริมาตรของเซลล์แขวนลอยต่อช่องว่างเหนือของเหลว) อาหารที่ใช้เริ่มต้นมีน้ำตาลกลูโคส 30 กรัม/ลิตร (167 มิลลิโมลาร์) เป็นสารตั้งต้น การผลิตแบบ Batch ดำเนินการที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (กราฟแท่ง) และอัตราการใช้น้ำตาลกลูโคส (วงกลม) ถูกตรวจสอบสำหรับแต่ละสภาพการผลิต

2.3.3 <u>การศึกษาสภาวะที่เหมาะสม (Optimization) ในการผลิต 13BD แบบ batch ในระดับการผลิตขนาด - ผลของ pH</u>

การตรวจสอบการผลิต 13BD และสาร metabolites อื่นๆ ถูกตรวจสอบ ณ ช่วงเวลาต่างๆ ในการผลิตแบบ batch ซึ่งในการศึกษานี้ เพื่อให้มีการผลิตสารผลิตภัณฑ์ 13BD ในปริมาณมาก จึงใช้วิธี resting cell ในการผลิต โดยพบว่าในสภาวะที่ไม่มีการปรับ pH มีการสะสมของสารกลุ่ม organic acid เช่น succinate, lactate, formate และ acetate ที่ความเข้มข้นสูงอย่างเห็นได้ชัด ดังนั้น เพื่อ

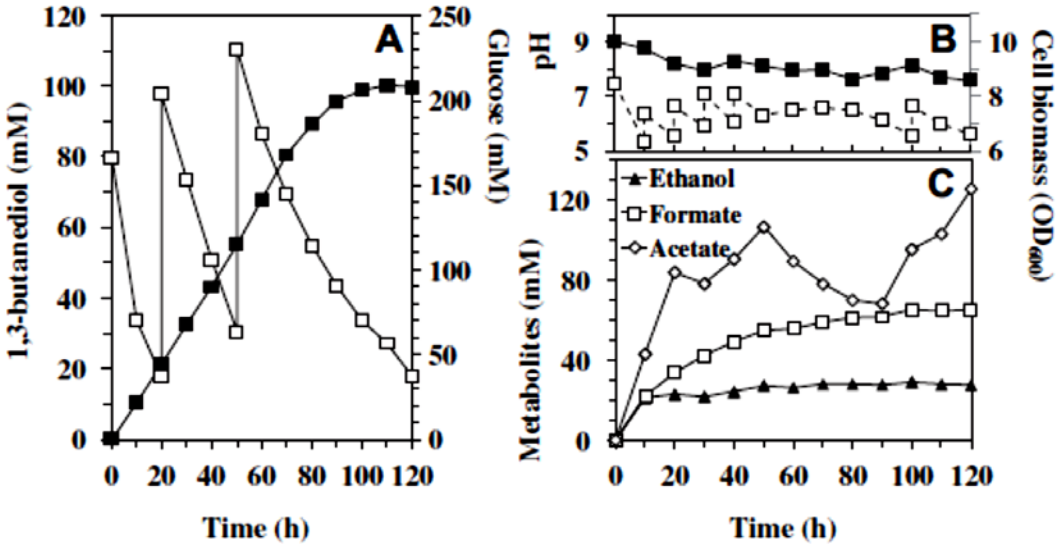
บรรเทาปัญหาความเป็นกรดด่าง การปรับ pH ประมาณ 6.0 ส่งผลให้การผลิต 13BD และการใช้กลูโคสไม่หยุดชะงักและสามารถผลิต 13BD สูงสุดถึง 34.6 มิลลิโมลาร์ ภายใน 36 ชั่วโมง ของการผลิตแบบ batch



รูป 5 การผลิต 13BD โดย recombinant *E. coli* สายพันธุ์ MG-NK3 โดยไม่มีการควบคุม pH (A, B, C) และมีการควบคุม pH (D, E, F) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะแอโรบิก การตรวจสอบค่าความเป็นกรดที่เกิดขึ้นจริง (A) และควบคุม pH (D) และการตรวจสอบการผลิตของ 13BD (สี่เหลี่ยมปิด) การใช้น้ำตาลกลูโคส (สี่เหลี่ยมเปิด) (B, E) และการก่อตัวของสารอื่น ๆ (C, F)

2.3.4 <u>การผลิต 13BD แบบ fed-batch ในระบบการผลิตขนาดเล็ก</u>

การศึกษาในส่วนนี้ เพื่อเป็นการเพิ่มผลผลิตของ 13BD โดยใช้การผลิตแบบ fed-batch ที่มีการควบคุม pH เพื่อขจัดการยับยั้งต่างๆ ที่อาจเกิดขึ้นจาก 1) สารตั้งต้นความเข้มข้นสูง และ 2) การสะสมสารมัธยันต์อื่น ๆ ที่ถูกสร้างขึ้นอย่างรวดเร็วและถูกสะสมอยู่ในที่เดียวกัน ในการศึกษาสารตั้งต้นของการผลิตนี้ การให้กลูโคสเริ่มต้นที่ 30 กรัม/ลิตร (167 มิลลิโมลาร์) ตามด้วยการให้กลูโคสซ้ำที่ความเข้มข้นใกล้เคียงกัน ที่ 20 ชั่วโมงและ 50 ชั่วโมงหลังจากการให้สารตั้งต้นเริ่มต้น และควบคุมค่า pH ในระบบ fed-batch, 13BD ถูกผลิตและแสดงในลักษณะเชิงเส้นตรงสูงสุดถึง 80 ชั่วโมง โดยได้ความเข้มข้นสูงถึง 100.4 มิลลิโมลาร์ (9.05 กรัม/ลิตร) ที่ 110 ชั่วโมง นอกจากนี้ความบริสุทธิ์ของ 13BD ถูกตรวจสอบโดยวิธี chiral HPLC เพื่อวิเคราะห์เชิงปริมาณและการเทียบกับสารเคมีมาตรฐาน พบว่า 13BD ผลิตได้จาก recombinant E. coli สายพันธุ์ MG-NK3 มีความบริสุทธิ์สูงถึง 98.5 ± 0.2% จากการเปรียบเทียบรายงานต่างๆ ที่ผ่านมานั้น ผลจากการศึกษาครั้งนี้เป็นครั้งแรกที่มีการรายงานความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ที่สูงสุดสำหรับการผลิต R13BD



รูป 6 การผลิต 13BD แบบ fed-batch โดย recombinant *E. coli* สายพันธุ์ MG-NK3 ภายใต้ภาวะที่มีการควบคุมค่า pH การผลิตแบบ fed-batch (A) ถูกดำเนินการที่อุณหภูมิ 37 เซลเซียส ภายใต้ภาวะแอโรบิกใน baffled flask ที่มีความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 30 กรัม/ลิตรกับการให้กลูโคสซ้ำสองครั้ง (สี่เหลี่ยมเปิด) ในขณะที่การผลิตของ 13BD ถูกตรวจสอบ (สี่เหลี่ยมปิด) ค่า pH (สี่เหลี่ยมเปิด) และปริมาณเซลล์ (สี่เหลี่ยมปิด) ถูกตรวจสอบ (B) และการผลิตของสารอื่น ๆ (C) ยังถูกตรวจสอบด้วย

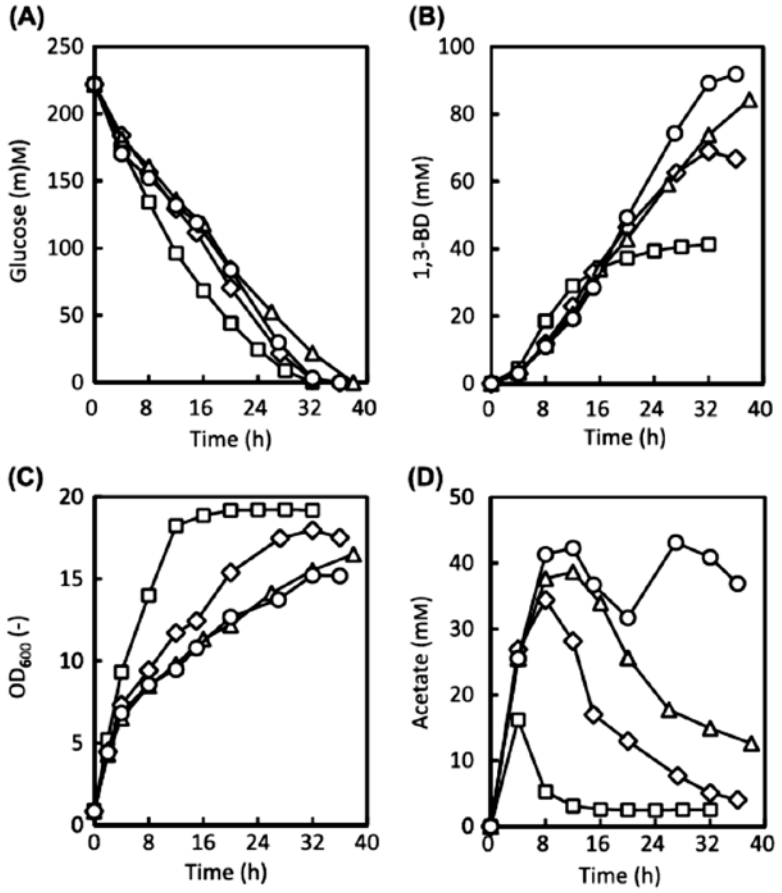
2.3.5 <u>การพัฒนาและการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของกระบวนการผลิต 13BD ในถังหมัก (Bioreactor-scale production)</u>

2.3.5.1 ผลของ K_{La} ในการหมักแบบแบทช์สำหรับการผลิต 13BD

เส้นทางการผลิต 13BD จากแบคทีเรียลูกผสม *E. coli* สายพันธุ์ BW-NK3 ที่ผ่านกระบวนการพันธุวิศวกรรม ประกอบด้วย 3 ปฏิกิริยา (รูปที่ 1) เพื่อการเปลี่ยน acetyl-CoA ไปเป็น

13BD ซึ่งแสดงให้เห็นว่าปริมาณออกซิเจนในการหมัก มีบทบาทสำคัญในการผลิต 13BD โดยสายพันธุ์ลูกผสมนี้ และควรจะปรับปรุงให้เหมาะสมสำหรับการผลิต ทั้งนี้เพราะ acetyl-CoA และ NAD(P)H เป็นสารตัวกลางสำคัญสำหรับการผลิต 13BD ซึ่งได้จากมาการ catabolism ของกลูโคส โดยการเพิ่มอัตรา catabolic ของกลูโคสเป็นสิ่งสำคัญที่จะช่วยเพิ่มอัตราการผลิต 13BD ดังนั้นเพื่อตรวจสอบผลของออกซิเจนในอาหารที่ใช้ในการหมักต่อผลผลิตและอัตราการผลิตของ 13BD ในระบบการหมักแบบแบทช์ โดยการเปลี่ยน KLa ในถังหมักชีวภาพมีการตรวจสอบ ประเมิน และปรับปรุงในการวิจัยนี้ ค่า KLa ถูกใช้เพื่อเป็นการปรับขนาดการผลิตจากระบบปฏิบัติการในห้องแลป (laboratory scale) ไปเป็นระดับที่ใหญ่ขึ้นในถังหมักชีวภาพ (Bioreactor / pilot scale) ดังนั้น การศึกษาค่า K_{La} ที่เหมาะสมจึงมีความสำคัญสำหรับผลิตสารเคมีในระบบการผลิตอุตสหกรรม

ในการผลิต 13BD ในถังหมักชีวภาพ จะต้องมีการตรวจสอบค่า K_{La} ที่เหมาะสม ซึ่งมีการรายงานว่า “ระดับการกวน” มีส่วนช่วย K_{La} (Gibbs and Seviour, 1996) ดังนั้น ระดับการกวนจึงถูกปรับเปลี่ยนเพื่อสร้างสภาวะที่มีออกซิเจนที่ความเข้มข้นต่างๆ ในอาหาร เพื่อใช้สำหรับการหมักแบบแบทช์ ภายใต้สภาวะเดียวกันนี้มีการควบคุมความเป็นกรดด่างให้อยู่ที่ 5.65 (รูปที่ 7) โดยพบว่าปริมาณกลูโคสถูกใช้อย่างรวดเร็วและใช้หมดภายในระยะเวลาประมาณ 36 ชั่วโมงของการหมัก เมื่อค่า K_{La} อยู่ในช่วง 82.3–97.2 /h (Fig. 7A) ในทางตรงกันข้าม เมื่อค่า K_{La} เป็น 65.8/h ปริมาณกลูโคสลดลงอย่างช้าๆ และ หลังจาก 30 ชั่วโมง พบกลูโคสเหลืออยู่ในอาหาร (116mM) เมื่อการหมักผ่านไป 30 ชั่วโมง เมื่อ K_{La} = 82.3 /h การผลิตของ 13BD มีประสิทธิภาพมากที่สุด ผลผลิต yield และอัตราการผลิตสูงสุดอยู่ที่ 91.8 mM, 0.414 โมล (โมล/กลูโคส) และ 3.78mM/h ตามลำดับ ภายในระยะเวลาการหมัก 36 ชั่วโมง (ตารางที่ 2, รูปที่ 7B) และยังพบการเจริญของเซลล์เพิ่มขึ้นภายใต้ K_{La} ที่ค่อนข้างสูง (ตารางที่ 2, รูปที่ 7C) ในแง่ของความสัมพันธ์ระหว่าง ผลผลิต 13BD และการเจริญของเซลล์ในการหมัก พบว่าในการหมัก 13BD แบบแบทช์ K_{La} = 97.2 /h การเจริญของเซลล์มี OD_{600} ประมาณ 19.2 ในระยะเวลาการหมัก 16 ชั่วโมง ในขณะที่ผลผลิตของ 13BD ตรวจพบแค่เพียง 41.3 mM เท่านั้น ในทางตรงกันข้ามเมื่อ K_{La} ถูกควบคุมที่ 82.3/h เซลล์มีการเจริญด้วย OD_{600} = 15.2 ในระยะเวลาการหมัก 36 ชั่วโมง และพบผลผลิตเพิ่มขึ้น (91.8 mM) (ตารางที่ 2) ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าเมื่อออกซิเจนในการหมักสูง (K_{La}: 97.2/h) พบว่าปริมาณการใช้กลูโคสในระหว่างการหมักจะเข้าสู่วงจรการผลิตกรดซิตริก (citric acid cycle) ไปเป็นพลังงานและส่งผลให้มีการส่งเสริม anabolism ในขณะที่ปริมาณออกซิเจนในอาหารค่อนข้างต่ำ (K_{La}: 82.3/h) ซึ่งจะเป็นการลดกิจกรรมการเผาผลาญอาหารและทิศทางนำไปสู่การผลิต 13BD เพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ หากปริมาณออกซิเจนในการหมักต่ำเกินไป (K_{La}: 65.8/h) พบว่าการเผาผลาญอาหารของเซลล์เปลี่ยนไป และไม่เพียงแต่การผลิต 13BD ต่ำเท่านั้น แต่ยังพบปริมาณกลูโคสเหลืออยู่สูงและเป็นผลให้มีการสะสมของอะซิเตท (acetate) อยู่สูงอีกด้วย (ตารางที่ 2) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการควบคุมค่า K_{La} ที่เหมาะสมจึงเป็นปัจจัยที่สำคัญเพื่อให้เกิดการผลิต 13BD อย่างมีประสิทธิภาพด้วยกระบวนการเผาผลาญที่ลดลง ในกระบวนการผลิตนี้ ปริมาณอะซิเตรท (acetate) เอทานอล (ethanol) และ ผลิตภัณฑ์พลอยได้ (by-products) พบที่ระดับความเข้มข้นสูงสุด คือ 43.1, 22.4 และ 43.6 mM ตามลำดับ เมื่อรักษาระดับ K_{La} ไว้ที่ 82.3/h ดังนั้น จากผลการทดลองนี้ ค่า K_{La} ที่เหมาะสม คือ 82.3/h ซึ่งจะถูกใช้เพื่อช่วยปรับปรุงการผลิต 13BD ต่อไป



รูป 7 การผลิตแบบแบทช์ของ 1,3-BD โดยแบคทีเรียลูกผสม *E. coli* BW-NK3 ภายใต้ K_La ต่างๆ: การผลิตแบบแบทช์ถูกดำเนินการที่อุณหภูมิ 37 °C ในระบบถังหมักชีวภาพ ค่าความเป็นกรดด่างถูกรักษาไว้ที่ 5.75 ด้วย 2 N NaOH หรือ 2 N HCl โดย (A) คือปริมาณลูโคสที่ลดลง (B) การผลิต 1,3-BD (C) การเจริญของเซลล์ (D) การผลิตอะซิเตรท และสัญลักษณ์ที่ใช้: 97.2/h (สี่เหลี่ยมเปิด) 87.6/h (สี่เหลี่ยมข้าวหลามตัดเปิด) 84.3/h1 (สามเหลี่ยมเปิด) และ 82.3/h (วงกลมเปิด)

ตาราง 2 ผลของ K_{La} ต่อการเจริญของเซลล์ ผลผลิตและอัตราการผลิตสูงสุดของ 13BD ในการหมักแบบแบทช์

K_La (h^{-1})	Final OD_{600} (−)	Glucose[a] (mM)	Acetate[b] (mM)	Ethanol[b] (mM)	Formate[b] (mM)	1,3-BD[b] (mM)	Yield of 1,3-BD (mol (mol glucose)$^{-1}$)	Maximum production rate of 1,3-BD (mM h^{-1})
65.8	6.1[c]	116[c]	77.7[c]	4.13[c]	17.8[c]	26.0[c]	0.245[c]	1.33[c]
82.3	15.2	0	43.1	22.4	43.6	91.8	0.414	3.78
84.3	16.5	0	38.7	19.9	43.0	84.3	0.380	3.35
87.6	17.5	0	34.3	15.8	58.6	66.8	0.301	3.36
97.2	19.2	0	16.2	4.14	50.2	41.3	0.186	3.52

หมายเหตุ: การหมักแบบแบทช์ถูกดำเนินการในถังหมักชีวภาพขนาด 2 ลิตร และมีปริมาณการใช้งาน 1 ลิตร ที่อุณหภูมิ 37 °C ในสภาวะที่มีการเปลี่ยนการกวน

[a] แสดงให้เห็นปริมาณกลูโคส

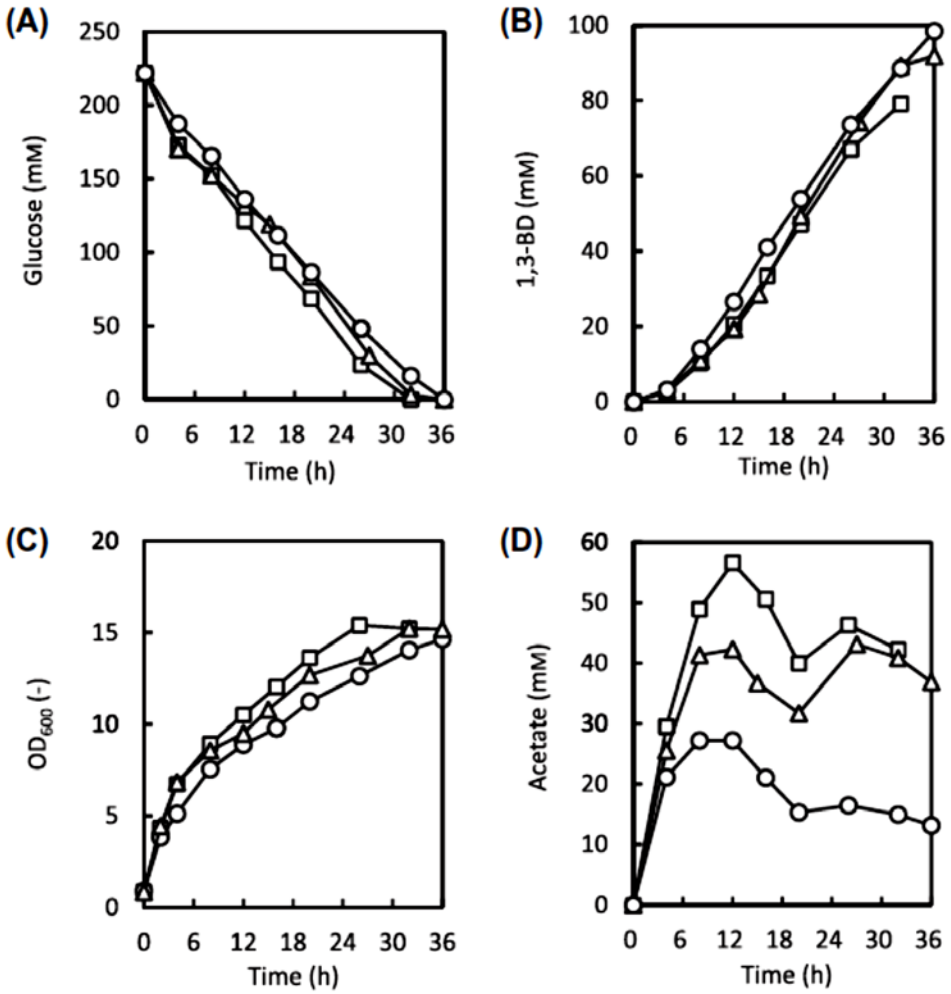
[b] แสดงค่าที่เหมาะสมที่สุด

[c] แสดงถึงค่ากลางหลังจากการหมัก 30 ชั่วโมง

2.3.5.2 ผลของความเป็นกรดด่างในการหมักแบบแบทช์สำหรับการผลิต 13BD ในถังหมัก

มีการรายงานก่อนหน้านี้ว่า อะซิเตทเป็นสารยับยั้งการทำงานของจุลินทรีย์ที่สำคัญ โดยไม่เพียงยับยั้งการเจริญของ *E. coli* แต่ยังยับยั้งวิถีการผลิตสาร recombinant proteins ของเชื้ออีกด้วย (MacDonald and Neway, 1990) ดังนั้นการลดการสะสมของอะซิเตท จะช่วยให้ *E. coli* มีการแสดงออก (overexpression) ของโปรตีน/เอนไซม์ได้ดี ซึ่งจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตของ 13BD ดังแสดงในรูปที่ 8D ซึ่งพบว่าอะซิเตทเป็นผลผลิตพลอยได้ที่สำคัญ โดยมีผลผลิตสูงสุด = 43.1 mM จากค่า K_{La} ที่เหมาะสมที่สุด (82.3/h) (รูปที่ 8D) ดังนั้น ในการวิจัยนี้มีความพยายามที่จะลดการผลิตอะซิเตท และเพื่อการยับยั้งการสะสมของอะซิเตทในระบบการผลิต ค่าความเป็นกรดด่างเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการผลิตอะซิเตทในการหมักโดยใช้กลูโคสเป็นสารตั้งต้น (Kleman and Strohl, 1994) ดังนั้น ในการศึกษาวิจัยนี้ ค่าความเป็นกรดด่างจึงถูกปรับให้เหมาะสม การผลิต 13BD ในถังหมักชีวภาพถูกดำเนินการภายใต้สภาวะที่มีความเป็นกรดด่างที่แตกต่างกัน จากนั้นสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจึงถูกตรวจสอบ (รูปที่ 8) ผลการศึกษาพบว่าการใช้กลูโคสหรือการเจริญของเซลล์ไม่แตกต่างกันเมื่อค่าความเป็นกรดด่าง 5.5-6.0 (รูปที่ 8A และ 8C) แต่เมื่อค่าความเป็นกรดด่างถูกปรับไว้ที่ 5.25 พบว่าการเจริญของเซลล์ถูกยับยั้ง เป็นผลให้ไม่เพียงแต่ปริมาณการใช้กลูโคส และการผลิต 13BD ลดลง แต่ยังมีการสะสมของอะซีเตทเพิ่มขึ้นเป็นอย่างมาก (ไม่ได้แสดงข้อมูล) การสะสมของอะซิเตทลดลงในขณะที่ค่าความเป็นกรดด่างอยู่ในช่วง 6.0-5.5 และเมื่อค่าความเป็นกรดด่างได้รับการรักษาระดับไว้ที่ 5.5 พบว่ามีการสะสมออะซิเตทอยู่น้อย (27.2 mM) และการผลิต 1,3-BD ที่สูงที่สุดถูกตรวจพบ (รูปที่ 8D) ดังนั้นค่าความเป็นกรดด่างนี้ ได้ถูกเลือกเพื่อใช้ในการตรวจสอบเพื่อเพิ่มการผลิต 13BD ต่อไป ในการหมักแบบแบทช์ ค่าความเป็นกรดด่าง 5.5 และค่า K_{La} = 82.3/h เป็นสภาวะที่ให้ผลผลิตสูง (98.5 mM) yield = 0.444 โมล (โมล/กลูโคส) และอัตราการผลิตสูงสุด (3.63 mM/h) สำหรับการผลิต 1,3 - BD ที่ได้รับในการวิจัยนี้ (รูปที่ 8B) การสะสมของเอทานอล (ethanol) และฟอร์เมท (formate) สูงสุดถึง 26.6 และ 34.7 mM ตามลำดับ ในการหมักแบบแบทช์ที่ความเป็นกรดด่าง = 5.5

สภาวะการเลี้ยงนี้แสดงให้เห็นว่าการสะสมของอะซิเตทสามารถควบคุมให้ลดลงได้โดยการใช้วิธีของกระบวนการทางชีวภาพ แต่อย่างไรก็ตามก็ยังตรวจพบอะซิเตทได้หลังจาก 36 ชั่วโมง ซึ่งอาจเป็นผลให้ผลผลิตของ 13BD ลดลง ดังนั้น ถึงแม้ว่าวิธีการนี้จะช่วยลดการสะสมได้น้อยในงานวิจัยนี้ แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาการหยุดการทำงานของยีน (disruption of genes) ที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์ของอะซิเตทและสารอนุพันธ์ acetyl-CoA อื่น ๆ อาจมีประสิทธิภาพในการปรับปรุงการผลิตของ 13BD ได้ ซึ่งมีการตรวจสอบโดย Atsumi et al. (Atsumi and Liao, 2008)

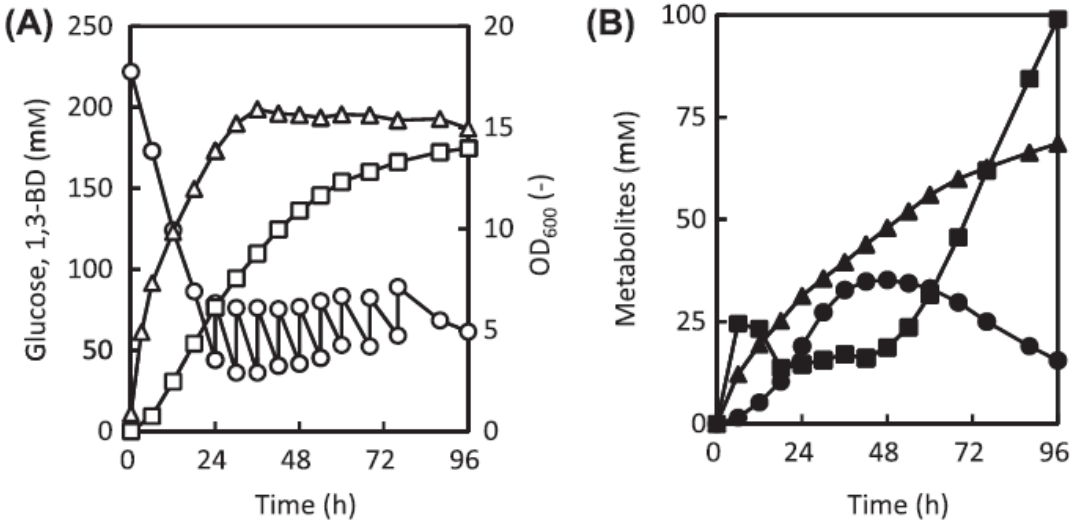


รูป 8 การผลิต 1,3-BD แบบแบทช์โดยแบคทีเรียลูกผสม *E. coli* สายพันธุ์ BW-NK3 ภายใต้สภาวะการผลิตที่มีความเป็นกรดด่างต่างๆ การผลิตแบบแบทช์ถูกดำเนินการที่อุณหภูมิ 37 °C ด้วยถังหมักชีวภาพภายใต้ภาวะที่มี $K_L a$ ที่เหมาะสม (82.3/h) (A) ปริมาณกลูโคส (B) การผลิต 1,3-BD (C) การเจริญของเซลล์ (D) การผลิตอะซิเตท และสัญลักษณ์ที่ใช้: 6.0 (สี่เหลี่ยมเปิด), 5.75 (สามเหลี่ยมเปิด) และ 5.5 (วงกลมเปิด)

2.3.5.3 <u>การหมักแบบเฟดแบทช์สำหรับการผลิต 1,3-BD ภายใต้ $K_L a$ และความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในระดับถังหมัก</u>

ดังแสดงในรูปที่ 8A และ 8B ถึงแม้ว่ากลูโคสในระบบการหมักจะหมดแต่พบว่าอัตราการผลิตของ 13BD นั้นไม่ได้ลดลง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการให้กลูโคสอย่างต่อเนื่องอาจจะช่วยให้แบคทีเรียสายพันธุ์ลูกผสมมีการผลิตของ 13BD สูงขึ้น ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงดำเนินการการหมักแบบเฟดแบทช์ (Fed-batch) เพื่อเพิ่มปรับปรุงการผลิตของ 13BD ภายใต้สภาวะของ $K_L a$ (82.3/h) และความเป็นกรดด่าง (5.5) ที่เหมาะสม โดยความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น คือ 222 mM และทำการเติมกลูโคสซ้ำเพื่อรักษาความเข้มข้นของกลูโคสในอาหารจาก 36 ถึง 90 mM เพื่อหลีกเลี่ยงผลกระทบ Crabtree ดังได้กล่าวในรายงานก่อนหน้านี้ (Luli and Strohl, 1990) (รูปที่ 9) ในระบบการหมักแบบเฟทแบทช์ (fed-batch fermentation system) 13BD ถูกผลิตในลักษณะเส้นตรงได้ถึง 42 ชั่วโมง และสามารถผลิต 13BD ความ

เข้มข้น 174.8 mM เมื่อทำการหมักเป็นเวลา 96 ชั่วโมง (รูปที่ 9) ซึ่งได้รับผลผลิต (0.372 โมล (โมล/กลูโคส)) และอัตราการผลิต (3.90 mM/h) ค่าของ 13BD titer ผลผลิตและอัตราการผลิตที่ได้รับสูงสุดในระบบการเลี้ยงแบบเฟตแบทช์ คือ 1.74, 1.64, และ 3.05 เท่า ตามลำดับ ผลการผลิตนี้เมื่อเทียบการงานวิจัยที่ผ่านมา (Kataoka et al., 2013) ในแง่ของการผลิต 13BD และการเจริญของเซลล์ที่มีอัตราการผลิต 13BD ลดลงเมื่ออัตราการเจริญของเซลล์ลดลงนี้ชี้ให้เห็นว่าการผลิต 13BD มีความเชื่อมโยงกับการเจริญของเซลล์ ความบริสุทธิ์ (% ee) ของ 13BD ซึ่งตรวจสอบโดยใช้ chiral HPLC และการวิเคราะห์เชิงปริมาณจากการสอบเทียบกับสารเคมีมาตรฐานเผยให้เห็นว่า (R)-1,3-BD ที่ผลิตได้จากวิถีการผลิตสังเคราะห์ในแบคทีเรียลูกผสม *E. coli* สายพันธุ์ BW-NK3 มีความบริสุทธิ์ถึง 98.6% ee ทั้งนี้ พบว่ามีสารอะซิเตทซึ่งสะสมเป็นผลผลิตผลพลอยได้ ในขณะที่อัตราการผลิตของ 13BD ฟอร์เมท และเอทานอลลดลงในช่วงหลังของการหมัก (รูปที่ 9B) การค้นพบในงานวิจัยนี้ชี้ให้เห็นว่า acetyl-CoA มาจากไพรูเวต (pyruvate) และผลิตเป็น 13BD และเอทานอล ซึ่งการผลิตลดลงอันเนื่องมาจากการทำงานของ pyruvate formate-lyase ทำงานได้ไม่เพียงพอ เป็นผลให้ไม่เพียงแต่การผลิตของฟอร์เมทเท่านั้นที่ลดลง แต่ยังเพิ่ม pyruvate pool และยังกระตุ้นการทำงานของการเผาผลาญของไพรูเวต เป็นอะซิเตทโดยเอนไซม์ pyruvate oxidase (รูปที่ 1) ซึ่งปรากฏการณ์นี้มีสาเหตุมาจากระดับความแตกต่างของการเผาผลาญของเซลล์ ดังนั้น งานวิจัยนี้ได้ตรวจสอบผลกระทบของการเผาผลาญอาหารของเซลล์ต่อการผลิตเซลล์ 13BD นอกจากนี้เห็นได้ชัดเจนว่าอาจจะเป็นวิธีที่มีประโยชน์ในการพัฒนาเทคโนโลยีเพื่อการผลิต 13BD ที่มีประสิทธิภาพในระยะยาวต่อไป



รูป 9 การผลิต 1,3-BD แบบเฟตแบทช์โดยแบคทีเรียลูกผสม *E. coli* สายพันธุ์ BW-NK3 ภายใต้สภาวะการผลิตที่มี K_La (82.3/h) และค่าความเป็นกรดด่าง (5.5) ที่เหมาะสม การหมักแบบเฟตแบทช์ถูกดำเนินการที่อุณหภูม 37 °C ด้วยถังหมักชีวภาพ (A) ปริมาณกลูโคส การผลิต 1,3-BD และเจริญของเซลล์ (B) การผลิตสารของสารอื่น ๆ และสัญลักษณ์ที่ใช้: การใช้ลูโคส (วงกลมเปิด) การผลิต 1,3-BD (สี่เหลี่ยมเปิด) การเจริญของเซลล์ (สามเหลี่ยมเปิด) เอทานอล (วงกลมปิด) อะซิเตท (สี่เหลี่ยมปิด) และฟอร์เมท (สามเหลี่ยมปิด)

2.4 สรุป ข้อเสนอแนะและผลผลิตจากโครงการ (Conclusion, Recommendation & Output)

โดยสรุป ผลการวิจัยนี้แสดงตัวอย่างการพัฒนาการสร้างวิถีการผลิตสาร (synthetic production pathway) R13BD ที่มีมูลค่าทางอุตสาหกรรมจากสารชีวมวลเพื่อทดแทนการใช้สารตั้งต้นจากสารปิโตรเคมี โดยการพัฒนาสายพันธุ์ของแบคทีเรีย recombinant และการใช้กระบวนการผลิตทางเทคโนโลยีชีวภาพ ผลการศึกษาในงานวิจัยนี้ ประสบความสำเร็จในการพัฒนาสายพันธุ์ของแบคทีเรีย recombinant ด้วยการใช้วิธีพันธุวิศวกรรม และการสร้างวิถีการผลิตที่มีประสิทธิภาพสำหรับการผลิต R13BD ด้วยวิธีชีวภาพจากกลูโคส โดยการสร้างพลาสมิดลูกผสมซึ่งประกอบด้วยยีน *phaA* (3-ketothiolase), *phaB* (NAD(P)H dependent acetoacetyl-CoA reductase) จากแบคทีเรีย *Ralstonia eutropha* NBRC 102504 และ *bld* (butyraldehyde dehydrogenase) จากแบคทีเรีย *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* ATCC 27012 และแสดงออกในแบคทีเรีย *E. coli* MG1655 $lacI^q$ โดยแสดงให้เห็นว่าการคัดเลือกยีนเป็นองค์ประกอบสำคัญซึ่งนำไปสู่การแสดงออกของการทำงานของเอนไซม์และการสร้างสารผลิตภัณฑ์ ในระดับการผลิตขนาดเล็กและภายใต้สภาวะการผลิตที่เหมาะสมสำหรับแบคทีเรีย recombinant ที่สร้างขึ้น สามารถผลิต R13BD ได้ถึง 9.05 กรัม/ลิตร (100.4 มิลลิโมลาร์) ซึ่งเป็นการผลิต R13BD ด้วยความเข้มข้นและความบริสุทธิ์สูงที่สุดจากที่มีการรายงานในปัจจุบัน จากนั้น ศึกษาสภาวะการผลิตและปัจจัยต่างๆ ที่ส่งเสริมการผลิตในระดับถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่มีปริมาตรการผลิตที่ 1.0 ลิตร ภายใต้ระบบการหมักแบบ Fed-batch โดยใช้ข้อมูลข้างต้นเป็นข้อมูลเบื้องต้น โดยควบคุมสภาวะที่เหมาะสมของ K_La และความเป็นกรดด่างเพื่อให้มีประสิทธิภาพการผลิต 13BD ที่ดี และประสบความสำเร็จในการผลิตสาร R13BD ที่มีค่าความเข้มข้นสูงสุดของการผลิตได้ถึง 174.8 มิลลิโมลาร์ ค่าผลผลิต (yield) ที่ 0.372 โมลต่อโมลกลูโคสที่ใช้ และค่าอัตราการผลิตสูงสุด (maximum production rate) ที่ 3.90 มิลลิโมลาร์ต่อชั่วโมง ที่ระยะเวลาการหมักที่ 96 ชั่วโมง ซึ่งค่า titer, yield และ maximum production rate ที่ได้นี้สูงกว่าที่เคยมีรายงานมาก่อนถึง 1.74, 1.64 และ 3.05 เท่า นอกจากนั้นแล้ว สารผลิตภัณฑ์ที่ได้ดังกล่าวยังมีความบริสุทธิ์สูงและมีรูปแบบดังที่ต้องการ (ในที่นี้ คือ *R*-steriomer 13BD) โดยมี %ee ถึง 98.6 % ซึ่งเป็นค่าที่มีความบริสุทธิ์สูงสุดที่มีการรายงานมาก่อน กระบวนการผลิตโดยใช้ metabolically engineered bacteria นี้สามารถใช้ได้ ไม่เพียงแต่การผลิต 13BD เท่านั้น แต่ยังสามารถประยุกต์ใช้กับสารเคมีมูลค่าเพิ่มในอุตสาหกรรมอื่น ๆ ได้อีกด้วย โดยเฉพาะจากการผลิตผลิตผ่าน acetyl-CoA โดยใช้ recombinant *E. coli* ทั้งนี้ ผลการวิจัยดังกล่าวนี้ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ จำนวน 3 เรื่อง ดังนี้

1. Naoya Kataoka, Alisa S. Vangnai, Hiromitsu Ueda, Takahisa Tajima, Yutaka Nakashimada, and Junichi Kato (2014) Enhancement of (R)-1,3-butanediol production by engineered Escherichia coli using a bioreactor system with strict regulation of overall oxygen transfer coefficient and pH. BioSci Biotech Biochem. (Accepted).

2. Naoya Kataoka, Alisa S. Vangnai, Takahisa Tajima, Yutaka Nakashimada, and Junichi Kato (2013) Improvement of (R)-1,3-butanediol production by engineered Escherichia coli. Journal of Bioscience and Bioengineering 115(5), 475-480.

3. Naoya Kataoka, Takahisa Tajima, Junichi Kato, Wanitcha Rachadech, and Alisa S Vangnai (2011) Development of butanol-tolerant *Bacillus subtilis* strain GRSW2-B1 as a potential bioproduction host. Applied Microbiology and Biotechnology Express 30; 1(1), 10-21.

3. การพัฒนาและประยุกต์ใช้ตัวเร่งทางชีวภาพในการผลิตสารเคมี 3-Methylcatechol (3MC) จากสารชีวมวล

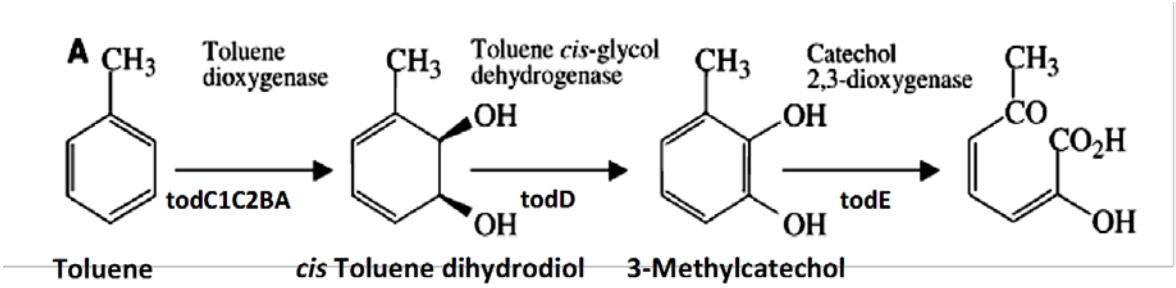
3.1 ความสำคัญ/ที่มาของปัญหา แนวคิดเหตุผล และหลักการสำคัญของการผลิต 3-Methylcatechol (3MC) จากสารชีวมวล

สาร 3-แมทิลแคทิคอล (3-Methylcatechol; 3MC) จัดเป็นสารในกลุ่ม catechol derivatives ซึ่งเป็นสารเคมีที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมต่างๆ ทั้งอุตสาหกรรมเคมี ยา อาหาร รวมทั้งอุตสาหกรรมเกษตรเคมี โดยมีการใช้เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการผลิต fine chemicals ยาในกลุ่ม adrenergic catecholamines ยาปฏิชีวนะบางกลุ่ม สารให้รส (flavor chemical) ในอุตสาหกรรมอาหาร รวมทั้ง ยังเป็นองค์ประกอบสำคัญในการผลิตสารปราบศัตรูพืชบางกลุ่ม (Prakash et al., 2010) ในปัจจุบันการผลิตสาร 3-แมทิลแคทิคอล อาศัยปฏิกิริยาทางเคมีเป็นหลัก อย่างไรก็ตาม ปฏิกิริยาและกระบวนการผลิตทางเคมีนั้นมีขั้นตอนหลายขั้นตอน อีกทั้งปฏิกิริยาการผลิตมี regio-selectivity ต่ำ โดยสารผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นสารผสมระหว่างรูปแบบ 3- และ 4-substituted catechol นอกจากนั้น ภายใต้สภาวะการผลิตทางเคมีซึ่งมีตัวเร่งปฏิกิริยาทางเคมี สารผลิตภัณฑ์ 3MC ที่ผลิตได้มีความเสถียรต่ำ เนื่องจากถูกออกซิไดซ์อย่างรวดเร็ว ดังนั้น เนื่องจากความต้องการการใช้สาร 3MC นี้ในอุตสาหกรรมต่างๆ การพัฒนากระบวนการผลิตทางชีวภาพจึงมีความสำคัญมากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้รีคอมบิแนนท์แบคทีเรียในการผลิต เนื่องจากเป็นกระบวนการที่มีประสิทธิภาพ สามารถควบคุม regio-selectivity เพื่อให้ได้รูปแบบของสารผลิตภัณฑ์ที่ต้องการได้ดีกว่ากระบวนการทางเคมี

การผลิต 3MC ด้วยกระบวนการทางชีวภาพนั้นสามารถผลิตได้จากการเปลี่ยนสารตั้งต้น aromatic hydrocarbon ได้แก่ โทลูอีน (toluene) โดยใช้ความสามารถของเอนไซม์ toluene dioxygenase ที่มีอยู่แบคทีเรียที่มีความสามารถในการออกซิไดซ์สาร aromatic hydrocarbon อย่างไรก็ตาม พบว่าทั้งสารตั้งต้น toluene และสารผลิตภัณฑ์ 3MC นั้นมีความเป็นพิษต่อแบคทีเรียส่วนใหญ่ เนื่องจากความเป็น hydrophobicity ของสารทั้งสอง ดังนั้น เพื่อให้กระบวนการผลิตทางชีวภาพมีประสิทธิภาพที่ดีขึ้น การแก้ไขลดผลกระทบจากความเป็นพิษของสารตั้งต้น และหรือสารผลิตภัณฑ์ไฮโดรคาร์บอนที่ถูกสร้างขึ้นและสะสมในระบบการหมักที่ใช้จุลินทรีย์เป็นตัวเร่งทางชีวภาพนั้น สามารถทำได้ด้วย 1) การใช้ whole cell biocatalyst จำพวกแบคทีเรียทนตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent-tolerant bacteria; OST bacteria) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของสารไฮโดรคาร์บอนและตัวทำละลายอินทรีย์ที่ความเข้มข้นสูง และ 2) การใช้ระบบสองเฟส (two-phase system) (เฟสน้ำ-เฟสตัวทำละลายอินทรีย์) สำหรับการดึงเอาสารตั้งต้น และ/หรือสารผลิตภัณฑ์ที่ไม่ละลายน้ำซึ่งเป็นพิษต่อตัวเร่งทางชีวภาพ จากเฟสน้ำไปอยู่ในเฟสตัวทำละลายอินทรีย์ (Husken et al. 2001, Wery et al. 2000) แต่กระนั้นปัจจุบันระบบสองเฟสนี้ยังมีความต้องการตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมต่อตัวเร่งทางชีวภาพ และสารเคมีเป้าหมาย

จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า กระบวนการทางผลิตทางชีวภาพของสาร 3MC จาก toluene อาศัยแบคทีเรีย *Pseudomonas putida* ซึ่งมี *tod* genes cluster ซึ่งเข้ารหัสให้เอนไซม์ในกลุ่ม toluene dioxygenase (TDO) (Zylstra and Gibson, 1989) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพ จากนั้น เพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพการผลิต 3MC ได้มีการเปลี่ยนแปลง/ปรับปรุงทางพันธุกรรมของแบคทีเรียที่ใช้เป็นตัวเร่งทางชีวภาพ เช่น *P. putida* DS10, MC1 และ MC2 ถูกตัดต่อพันธุกรรมจากการเพิ่มจำนวนยีน *todC1C2BAD* ใน chromosomal DNA ของ OST *P. putida* S12, *P. putida* F1 และ *P. putida* F107 ซึ่งให้ผลผลิต 3MC โดยรวม 11, 7 และ 14 mM ตามลำดับ (Wery et al., 2000; Husken et al., 2001) นอกจากนั้น

รายงานของแบคทีเรีย *P. putida* T-57 แสดงคุณสมบัติที่ดีในการทนตัวทำละลายอินทรีย์ได้หลากหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งโทลูอีน ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการผลิต 3MC ซึ่งพบว่า *P. putida* T-57 สามารถทนได้ความเข้มข้นสูง นอกจากนี้แบคทีเรียกลายพันธุ์สายพันธุ์ TODE1 ซึ่งถูกพัฒนามาจาก *P. putida* T-57 ด้วยการตัดต่อพันธุกรรมยับยั้งการทำงานของยีน *todE* (รูปที่ 10) เพื่อไม่ให้ 3MC ถูกใช้เป็นอาหารและแหล่งพลังงานต่อไปได้นั้น สามารถผลิต 3MC ได้ในความเข้มข้นสูงภายใต้ระบบการผลิตแบบสองเฟสอย่างง่าย ดังนั้น ในงานวิจัยขั้นตอนนี้จะเป็นการออกแบบและพัฒนากระบวนการผลิตแบบสองเฟสที่เหมาะสมต่อการผลิต 3MC ด้วยแบทีเรียที่ทนตัวทำละลายอินทรีย์แกรมลบ *P. putida* สายพันธุ์ TODE1 การผลิตสารผลิตภัณฑ์เป้าหมาย โดยการศึกษาสภาวะที่เหมาะสม (optimization) และปัจจัยที่เกี่ยวข้องต่างๆ เช่น ชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์ในระบบ อัตราส่วนโดยปริมาตรของชั้นน้ำและชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ รวมทั้งสภาวะที่เหมาะสมของกระบวนการผลิต เป็นต้น ซึ่งปัจจัยเหล่านี้มีความแตกต่างจากระบบการหมักโดยทั่วไป (conventional fermentation)



รูป 10 วิธีการผลิต 3MC จากแบคทีเรียทนตัวทำละลายอินทรีย์แกรมลบ *P. putida* สายพันธุ์ TODE1

ถึงแม้ว่าการใช้ระบบสองเฟส และการใช้ OST bacteria ที่ถูกตัดแต่งพันธุกรรมเป็นตัวเร่งทางชีวภาพ จะสามารถเพิ่มผลตอบแทนการผลิต 3MC ได้ แต่อย่างไรก็ตามความเข้าใจพื้นฐานของการเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของตัวเร่งทางชีวภาพ หรือเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในระบบการผลิตที่เหมาะสมนั้นเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถปรับปรุงการผลิตสารเคมีด้วยวิธีทางชีวภาพได้ ซึ่งยังมีการศึกษาอยู่น้อยสำหรับการผลิต 3MC ในปัจจุบัน ดังนั้นเพื่อแสดงให้เห็นถึงความสำคัญของการปรับปรุงและการเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของตัวเร่งทางชีวภาพสำหรับการผลิต 3MC จาก toluene การศึกษานี้ใช้ OST bacteria กลายพันธุ์ *P. putida* TODE1 ในการผลิต 3MC ด้วยระบบสองเฟส ร่วมกับการสรรหาตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมสำหรับระบบสองเฟส การปรับปรุงอาหารในการผลิตด้วยการเสริมแหล่งคาร์บอนและพลังงานและไอออนที่จำเป็นเพื่อให้ตัวเร่งทางชีวภาพมีประสิทธิภาพในการทำงานได้สูงสุด และการควบคุมสภาวะการผลิตที่เหมาะสม ทั้งนี้จากการศึกษาบทบาทของปัจจัยเหล่านี้ทำให้งานวิจัยนี้สามารถผลิต 3MC จาก toluene โดย *P. putida* TODE1 ในระบบสองเฟส ด้วยอัตราการผลิตและผลผลิตโดยรวมสูงกว่าที่มีการรายงานมา ดังนั้นการศึกษานี้ได้ให้ข้อมูลในการศึกษาปัจจัยซึ่งเสริมประสิทธิภาพการทำงานของตัวเร่งทางชีวภาพ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตสารผลิตภัณฑ์เป้าหมาย ซึ่งสามารถประยุกต์ใช้สำหรับการผลิตสารเคมีต่างๆด้วยวิธีทางชีวภาพได้

3.2 วัตถุประสงค์และขอบเขตการวิจัย

วัตถุประสงค์การวิจัย – เพื่อพัฒนาและประยุกต์ใช้ตัวเร่งทางชีวภาพทนตัวทำละลายอินทรีย์ในการผลิตสารเคมีจากสารชีวมวล โดยเน้นหนักการใช้วิศวกรรมพันธุศาสตร์ โดยการพัฒนาแบคทีเรียแพลตฟอร์มสำหรับการผลิตสารเคมีไฮโดรคาร์บอนด้วยระบบการผลิตแบบสองเฟส (two liquid phase

(organic-aqueous) production) โดยใช้แบคทีเรียทนตัวทำละลายอินทรีย์แกรมลบ *P. putida* T-57 เป็นแบคทีเรียเจ้าเรือนในการทำวิศวกรรมพันธุศาสตร์ในการผลิตสารเคมีอุตสาหกรรม 3-แมทิลแคทิคอล (3MC) เป็นระบบต้นแบบและสารต้นแบบ ตามลำดับ

โดยมีขอบเขตการวิจัย ดังนี้

1. การคัดเลือกตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมสำหรับการผลิต 3MC ด้วยระบบสองเฟส ในระดับการผลิตขนาดเล็ก
2. ผลของแอลกฮอล์ต่อการผลิต 3MC ด้วยระบบสองเฟส ในระดับการผลิตขนาดเล็ก
3. ปัจจัยส่งเสริมประสิทธิภาพการทำงานของตัวเร่งทางชีวภาพและการผลิต 3MC ด้วยระบบสองเฟส
4. การผลิต 3-MC แบบ Batch ในระบบสองเฟส ในระดับการผลิตขนาดเล็ก
5. การผลิต 3-MC แบบ Fed-batch ในระบบสองเฟส ในระดับถังหมัก

3.3 วิธีการดำเนินการวิจัย โดยสรุป และผลการวิจัย (Methods & Results)

3.3.1 <u>การคัดเลือกตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมสำหรับการผลิต 3MC ด้วยระบบสองเฟส ในระดับการผลิตขนาดเล็ก</u>

การผลิต 3MC ในระบบเฟสเดียวโดย *P. putida* มีการศึกษามาแล้วก่อนหน้านี้ และพบว่ามีผลผลิตค่อนข้างต่ำ เนื่องจากความเป็นพิษของสารตั้งต้น/สารผลิตภัณฑ์ รายงานที่ผ่านมาพบว่าแค่เพียงความเข้มข้นต่ำของ 3MC (5.5 mM) สามารถยับยั้งการเจริญและการผลิตเมื่อใช้แบคทีเรีย *P. putida* เป็นตัวเร่งทางชีวภาพได้ (Husken et al., 2001) แต่สำหรับสายพันธุ์ TODE1 พบว่าสายพันธุ์ TODE1 สามารถทนทานความเป็นพิษได้มากกว่าโดยพบว่า 3MC ความเข้มข้นมากกว่า 7 mM จึงจะยับยั้งการเจริญ เมื่อทดสอบความเป็นพิษของ 3MC ต่อสายพันธุ์ TODE1 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในอาหาร MSB ที่มีการเติมกลูโคส 11 mM จากความสามารถในการทนต่อความเป็นพิษของสารผลิตภัณฑ์ 3MC ได้สูงกว่าแบคทีเรียอื่นที่มีการรายงานมานี้ แสดงให้เห็นว่า *P. putida* สายพันธุ์ TODE1 เป็นตัวเลือกที่มีประสิทธิภาพเพื่อใช้เป็นตัวเร่งทางชีวภาพสำหรับการผลิต 3MC จาก toluene

การปรับปรุงระบบการผลิตด้วยการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่ละลายน้ำเป็นเฟสที่สอง สามารถกักเก็บสารตั้งต้น/ผลิตภัณฑ์ที่เป็นพิษออกจากเฟสน้ำได้ดังนั้นตัวเร่งทางชีวภาพจึงได้รับความเป็นพิษลดลง ส่งผลให้ระบบสองเฟสนี้ให้ผลผลิต 3MC สูงกว่าการผลิตในระบบเฟสเดียว (Wery et al., 2000) แต่อย่างไรก็ตามข้อจำกัดของระบบนี้ คือ ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้อาจเป็นพิษหรืออาจส่งผลต่อการทำงานของตัวเร่งทางชีวภาพหรือเอนไซม์ที่สำคัญสำหรับการผลิตได้เช่นกัน ดังนั้นเพื่อให้ได้ผลผลิต 3MC สูงสุด งานวิจัยนี้จึงดำเนินการคัดเลือกตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสม ด้วยการตรวจสอบความเป็นพิษของตัวทำลายอินทรีย์ต่อสายพันธุ์ TODE1 ความสามารถในการกักเก็บสารตั้งต้นหรือผลิตภัณฑ์ของตัวทำละลายอินทรีย์ที่คัดเลือก และ ความสามารถของสายพันธุ์ TODE1 ในการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์เหล่านี้เป็นแหล่งอาหาร ตัวทำละลายอินทรีย์ long chain aliphatic alcohols 5 ชนิด (*n*-Heptanol, *n*-Octanol, *n*-Nonanol, *n*-Decanol และ Oleyl alcohol) ถูกคัดเลือกเพื่อตรวจสอบในงานวิจัยนี้ เนื่องจากไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์และสามารถใช้งานได้ดีในกระบวนการอุตสาหกรรม

การเลือกชนิดตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมในการผลิต 3MC ด้วยระบบการผลิตแบบสองเฟสมีความสำคัญ ดังนั้นงานวิจัยได้ศึกษาปัจจัยที่ใช้ในการเลือกตัวทำละลายอินทรีย์เพื่อใช้เป็นชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่

1) ค่า log P_{ow} (ค่าการ partition ของตัวทำละลายอินทรีย์ในชั้นของน้ำและชั้นของ octanol) โดยมีการรายงานว่า octanol ซึ่งมี log Pow 2.8 ผลิตภัณฑ์ 3MC สามารถ partition ไปอยู่ใน

ชั้นนี้ได้ดีที่สุด แต่อย่างไรก็ตาม octanol กลับมีผลต่อการมีชีวิต และกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการผลิต 3MC ของแบคทีเรียผู้ผลิต ซึ่งทำให้ผลผลิตไม่สูงเท่าที่ควร นอกจากนี้พบว่าตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีค่า log Pow มากกว่า 3.1 จะส่งผลกระทบต่อการมีชีวิตของแบคทีเรีย *P. putida* น้อย เรียกค่า log P_{ow} นี้ว่า log P_{crist}

2) functional group ของตัวทำละลายอินทรีย์ โดยพบว่า functional group ที่มีความเป็นขั้วสูงจะมีประสิทธิภาพสำหรับ partition 3MC ได้ดี เช่น ester และ alcohol ในขณะที่ Alcan มีประสิทธิภาพน้อย งานวิจัยนี้ทำการคัดเลือกตัวทำละลายอินทรีย์ตามคุณสมบัติของ functional group และค่า log Pow ดังนี้

1. butylbutyrate (log Pow 2.8) เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีค่า log Pow เท่ากับ octanol และมี functional group เป็น ester ซึ่งพบว่ามีประสิทธิภาพในการ partition 3MC ได้ดีสำหรับสารที่มี functional group เป็น ester และมีค่า log Pow สูง เช่น bis (2-ethylhexyl) phthalate (BEHP or DEHP) ไม่ได้ใช้ในการวิจัยเนื่องจากเป็นสารเคมีอันตราย

2. 1-decanol (log Pow 4.0) มีค่า log Pow ใกล้เคียงกับ log Pcrist และมี functional group เป็น alcohol

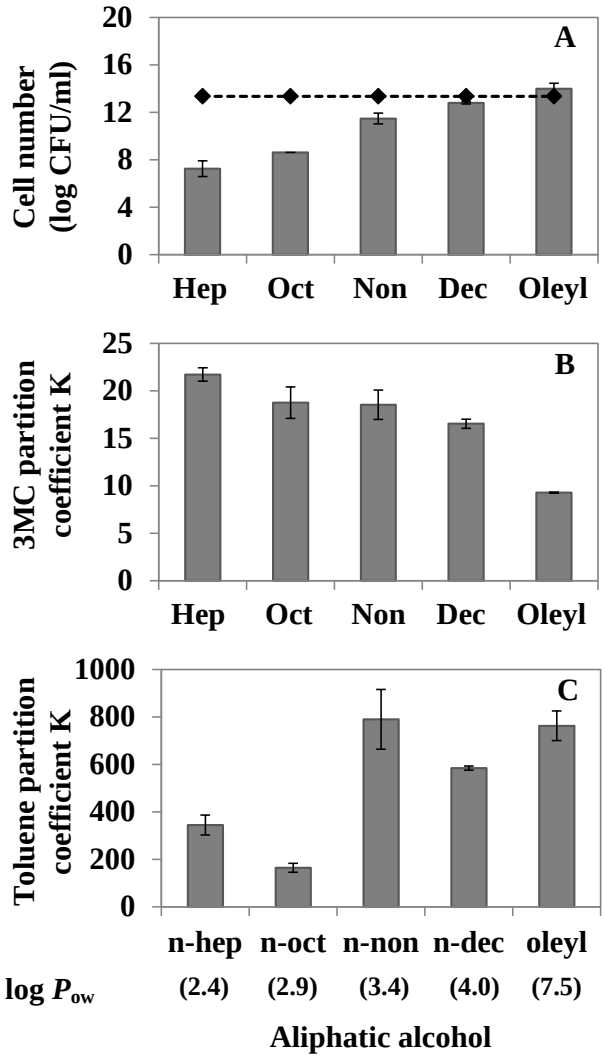
3. oleyl alcohol (log Pow 7.7) มีค่า log Pow สูงกว่า log Pcrist มากและมี functional group เป็น alcohol ซึ่งมีรายงานการผลิต 3MC ได้สูง

ตัวอย่างชนิดและลักษณะสมบัติของตัวทำละลายอินทรีย์ที่เคยใช้เป็น organic เฟสสำหรับการผลิต 3MC ด้วยการผลิตแบบสองเฟสด้วยแบคทีเรีย *P. putida* ดังแสดงในตารางที่ 3

การตรวจสอบการรอดชีวิตของ TODE1 เซลล์ภายใต้ภาวะที่มีตัวละลายอินทรีย์แต่ละชนิดในอาหาร MSB เป็นเวลา 20 ชั่วโมง รูปที่ 11 พบว่าตัวทำละลายอินทรีย์ส่งผลกระทบต่อจำนวนเซลล์ของ TODE1 อย่างเห็นได้ชัดเมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะที่ไม่มีตัวทำละลายอินทรีย์ใดๆในระบบ โดยค่า octanol-water partition coefficients (log P_{ow}) เพิ่มสูงขึ้นพบว่าแนวโน้มความเป็นพิษของตัวทำลายอินทรีย์ลดลง นอกจากนี้แล้วตัวทำละลายอินทรีย์ซึ่งจะใช้เป็นเฟสที่สองได้ดีนอกจากไม่เป็นพิษต่อตัวเร่งทางชีวภาพแล้ว ตัวทำละลายอินทรีย์นั้นต้องไม่สามารถใช้เป็นอาหารสำหรับตัวเร่งทางชีวภาพได้ เนื่องจากอาจส่งผลกระทบต่อปริมาตรของเฟสที่สองของระบบได้ ซึ่งพบว่าสายพันธุ์ TODE1 มีความสามารถในการใช้ oleyl alcohol ได้ดี นอกจากนี้เพื่อลดความเป็นพิษของ สารตั้งต้น toluene และ สารผลิตภัณฑ์ 3MC ต่อตัวเร่งทางชีวภาพ การตรวจสอบการ partitioning coefficient K ของ toluene และ 3MC จึงถูกตรวจสอบในงานวิจัยนี้ โดยพบว่า ค่า log P_{ow} ของตัวทำละลายอินทรีย์ยิ่งต่ำการ partition ของ 3MC (log P_{ow} 1.5) ยิ่งดี ซึ่งผลนี้มีทิศทางตรงกันข้ามกับการรอดชีวิตของเซลล์พบ เนื่องจากสายพันธุ์ TODE1 สามารถทนต่อ toluene ได้ในความเข้มข้นสูง แต่อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้ก็ทำการตรวจสอบการ partition ของ toluene เช่นกัน ดังแสดงใน รูปที่ 11 จากคุณสมบัติทั้ง 4 ซึ่งถูกตรวจสอบในงานวิจัยนี้ ท่ามกลาง long chain aliphatic alcohols ทั้ง 5 ชนิดที่ถูกตรวจสอบ พบว่า *n*-decanol มีความเหมาะสมเพื่อเป็นตัวทำละลายอินทรีย์สำหรับการผลิต 3MC จาก toluene โดยสายพันธุ์ TODE1 ด้วยระบบสองเฟส

ตาราง 3 ลักษณะสมบัติของตัวทำละลายอินทรีย์ที่เคยใช้เป็นเฟสบนสำหรับการผลิต 3MC ด้วยการผลิตแบบสองเฟสด้วยแบคทีเรีย *P. putida*

Solvents	**Log P_{ow}**	**Property**	**Description**	**Reference**
1-octanol	2.8	Aliphatic alcohol	3MC production with aqueous/1-octanol from toluene by *P. pudida*	(Husken E. Leonie et al., 2001; Wery et al., 2000)
1-octanol	2.8	Aliphatic alcohol low log P_{ow}	Control with previous report and low log P_{ow}	(Prpich P.G. and Daugulis A.J., 2007)
1-dodecanol	4.7	Aliphatic alcohol, log P_{ow} higher than 1-octanol	Possesses log *P* value sufficiently high enough to support biological system, but high melting point (24ºC) (difficult to work on it, then not selected)	
bis (2-ethylhexyl) sebacate (BES)	10	Esters, polar functional group and high log *P* values	More favorable log *P* value for use in biological system. Not carbon/energy source for *P. putida*	
bis (2-ethylhexyl) phthalate (BEHP or DEHP)	8.4		Absorb 3MC, but it is hazardard compound	
silicone oil	-	Effective immiscible liquid in two-phase systems	Did not have 3MC partitioning	
decane	5.2	Alkanes, brancing or chain length would affect affinity for 3MC and based on high log P_{ow}	Did not absorb towards 3MC	
iso-octane	4.0			
dodecane	6.2			
1-dodecane	6.1			
1-octanol	2.8	Aliphatic alcohol, low log *P* value	Affect to TDO activity of mutant strain TODE1	(Faizal et al., 2007)
oleyl alcohol	7.7	Aliphatic alcohol, High log *P* value	Low effect to TDO activity and improve 3MC production, melting point 13-19 °C	
butylbutyrate	2.8	Ester group, low log *P* value	Affect to TDO activity of mutant strain TODE1	This study
1-decanol	4.0	Aliphatic alcohol, High log *P* value	Good 3MC uptake, high log *P* value, use for carbon & energy source for *P. putida* TODE1, low melting point (6.4ºC)	
oleyl alcohol	7.7	Aliphatic alcohol, High log *P* value	Control with publication and high log P_{ow}	

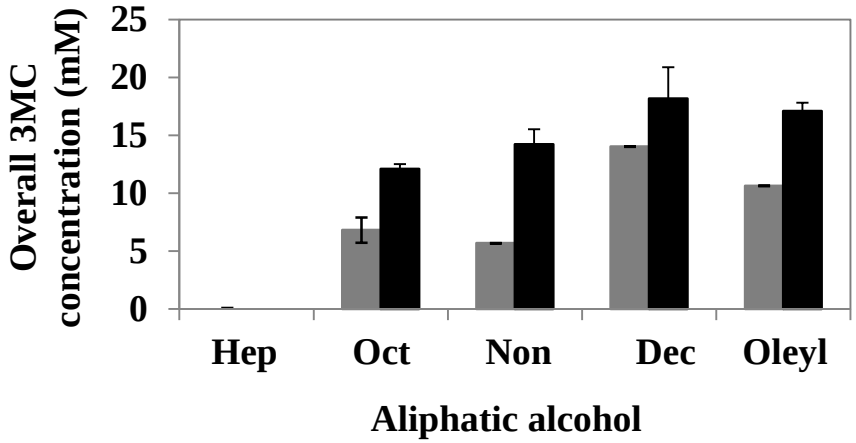


รูป 11 ความเป็นพิษของตัวทำละลายอินทรีย์ที่ละลายน้ำได้น้อย (A) เมื่อสัมผัสกับแบคทีเรียสายพันธุ์ TODE1 ในอาหาร MSB เป็นเวลา 20 ชั่วโมง ซึ่งตรวจสอบจากค่า log CFU/ml บนอาหารแข็ง LB เปรียบเทียบกับสภาวะที่ไม่มีการสัมผัสกับกับตัวทำละลายอินทรีย์ใดๆ (เส้นประ) 3MC (B) และ toluene (C) partition coefficents ในสภาวะที่ตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่างๆ ซึ่งถูกตรวจสอบในอาหาร MSB ที่มี 5 mM 3MC/toluene ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ คือ Hep, *n*-heptanol; Oct, *n*-octanol; Non, *n*-nonanol; Dec, *n*-decanol, and Oleyl, oleyl alcohol

นอกจากนั้น การศึกษาอัตราส่วนโดยปริมาตรของชั้นน้ำและชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ 1-decanol เป็นปัจจัยสำคัญต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต 3MC ด้วยระบบการผลิตแบบสองเฟส ดังนั้นจึงได้ตรจสอบอัตราส่วนโดยปริมาตรของชั้นน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์ 1-decanol ดังนี้ 10:1, 10:3 และ 10:5 ต่อประสิทธิภาพในการผลิต 3MC พบว่าอัตราส่วน 10:1 ให้ผลการผลิต 3MC ด้วยระบบการผลิตแบบสองเฟสโดยมี 1-decanol เป็นชั้นของตัวทำละลายอินทรีย์สูงที่สุด ตามด้วย 10:3 และ 10:5 ตามลำดับ ซึ่งการวิจัยนี้ใช้อัตราส่วนที่เหมาะสม 10:1 สำหรับการผลิต 3MC ต่อไป

3.3.2 <u>ผลของแอลกอฮอล์ต่อการผลิต 3MC ด้วยระบบสองเฟส ในระดับการผลิตขนาดเล็ก</u>

การผลิตสารเคมีด้วยวิธีทางชีวภาพของ 3MC และ *o*-cresol ในระบบสองเฟสโดยมี oleyl alcohol เป็นเฟสที่สอง ได้แสดงให้เห็นบทบาทสำคัญของ *n*-butanol ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานที่สามารถช่วยส่งเสริมผลผลิตได้ดี (Yamashita et al., 2007) ดังนั้น งานวิจัยนี้ได้ศึกษาบทบาทของแอลกอฮอล์อื่นๆ เพื่อเป็นแหล่งพลังงาน (energy source) เปรียบเทียบกับ *n*-butanol ดังนี้ ethanol, *n*-propanol และ *n*-hexanol ต่อการผลิต 3MC จาก toluene ด้วยระบบสองเฟสเมื่อมี *n*-decanol เป็นเฟสที่สอง โดยสายพันธุ์ TODE1 ซึ่งพบว่าสภาวะที่มีการเติม *n*-butanol แสดงประสิทธิภาพการส่งเสริมการผลิต 3MC ได้ดีเหนือกว่าแอลกอฮอล์ชนิดอื่นๆที่ทำการศึกษา นอกเหนือจากนี้ยังพบว่า *n*-butanol ไม่เพียงแต่มีบทบาทส่งเสริมการผลิต 3MC เมื่อมี *n*-decanol เป็นเฟสที่สองเพียงชนิดเดียว แต่ยังพบว่าในระบบสองเฟสที่มีตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดอื่นๆอีก 5 ชนิด (*n*-heptanol, *n*-octanol, *n*-nonanol, *n*-decanol และ oleyl alcohol) โดย *n*-butanol ยังสามารถส่งเสริมการผลิต 3MC wได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะที่ไม่มีการเติม *n*-butanol (รูปที่ 12) ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นความสำคัญของ *n*-butanol ต่อการผลิตสารเคมีด้วยวิธีทางชีวภาพด้วยระบบสองเฟสในระบบที่เร่งปฏิกิริยาด้วยระบบ dioxygenation



รูป 12 ผลผลิต 3MC ที่เวลาการผลิต 20 ชั่วโมง เมื่อมีการให้ toluene แบบไอระเหย ซึ่งถูกตรวจสอบในระบบการผลิตขนาดเล็ก (10 ml) ในอาหาร MSB ที่มีตัวทำละลายอินทรีย์ 1 ml เมื่อมีการเติม (สีดำ) และไม่มีการเติม (สีเทา) *n*-butanol แบบไอระเหย การตรวจสอบความเข้มข้นของ 3MC ในชั้นอาหารและชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ ถูกวิเคราะห์เป็น ความเข้มข้นโดยรวม จากสมการ : (ความเข้มข้นของ 3MC ในชั้นอาหาร × ปริมาตรของอาหาร + ความเข้มข้นของ 3MC ในชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ × ปริมาตรของตัวทำละลายอินทรีย์)/(ปริมาตรของอาหาร + ปริมาตรของตัวทำละลายอินทรีย์)

3.3.3 <u>ปัจจัยส่งเสริมประสิทธิภาพการทำงานของตัวเร่งทางชีวภาพและการผลิต 3MC ด้วยระบบสองเฟส</u>

P. putida strain TODE1 เป็น mutant strain ที่ไม่สามารถใช้ toluene เป็นสารตั้งต้นสำหรับการเจริญได้เนื่องจากไม่มี *todE* gene ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมการเปลี่ยน 3MC เพื่อเข้าสู่วิธีการผลิตพลังงาน ดังนั้นแหล่งคาร์บอน/พลังงานจึงมีความจำเป็นสำหรับการผลิต 3MC โดยสายพันธุ์ TODE1 ด้วยระบบสองเฟส ซึ่งแหล่งคาร์บอน/พลังงาน 4 ชนิดที่มีคุณสมบัติละลายน้ำได้ดีถูกตรวจสอบในการศึกษาครั้งนี้ (glucose, glycerol, succinate และ citrate) ดังแสดงในตารางที่ 5 การเติมน้ำตาล glucose เพื่อเป็นแหล่งพลังงานให้กับสายพันธุ์ TODE1 ในระบบการผลิตของ 3MC ด้วยระบบสองเฟสโดยมี oleyl alcohol เป็นเฟสที่สอง มีการตรวจสอบมาแล้วก่อนหน้านี้ ซึ่งพบว่าความเข้มข้นของ glucose ที่ถูกเติมมีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ toluene dioxygenase (TDO) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญสำหรับการเปลี่ยนสารตั้งต้น toluene ไปเป็นผลิตภัณฑ์ 3MC (Faizal et al., 2007) ดังนั้นความเข้มข้นของกลูโคสจึงถูกเลือกเพื่อเปรียบเทียบเนื่องจากมีการใช้ในการศึกษาก่อนหน้านี้ เพื่อศึกษาการให้แหล่งพลังที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ TDO การผลิต 3MC ในระบบสองเฟส และจำนวนเซลล์รอดชีวิต ในการวิจัยนี้ แหล่งคาร์บอน/พลังงานจาก succinate, glycerol และ acetate ถูกตรวจสอบเปรียบเทียบกับ glucose โดยการผลิตของ 3MC และเซลล์รอดชีวิตถูกตรวจสอบภายใน 20h ในอาหาร MSB ที่มีการเติมแหล่งคาร์บอน/พลังงานที่ความเข้มข้นและชนิดต่างๆ เมื่อ toluene และ n-butanol ถูกให้แบบไอระเหย การตรวจสอบนี้ถูกเปรียบเทียบกับสภาวะที่ไม่มีการเติมแหล่งแหล่งคาร์บอน/พลังงานใดๆ พบว่าในสภาวะที่มีการเติม acetate แม้การทำงานของเอนไซม์ TDO จะไม่ได้รับผลกระทบใดๆก็ตามแต่ acetate ส่งผลกระทบต่อการผลิตโดยรวมของ 3MC และความอยู่รอดของเซลล์ ในขณะที่การเติม succinate มีแนวโน้มส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ TDO แต่ไม่ได้ช่วยส่งเสริมการผลิตโดยรวมของ 3MC มากนัก และเป็นที่น่าสนใจเมื่อเติม glycerol พบว่าไม่ส่งผลกระทบต่อการทำงานของเอนไซม์ TDO และยังช่วยให้การอยู่รอดและการผลิต 3MC โดยรวมสูงขึ้นอย่างเห็นได้ชัด ด้วยอัตราการผลิตสูงสุด 1.40 mM/h ในสภาวะที่มี glycerol 3 mM ซึ่งสูงกว่าสภาวะที่ไม่มีการเติมถึง 1.4 เท่า แสดงให้เห็นว่าการเติม glycerol แค่เพียงความเข้มข้นต่ำๆ สามารถเพิ่มผลผลิต 3MC โดยรวมมากกว่า 55% ภายในระยะเวลาการผลิต 20 ชั่วโมง

<u>การศึกษาอิทธิพลของสารอาหารและไอออนต่อการผลิต 3MC</u> - เป็นที่ทราบกันดีแล้วว่าไอออนมีบทบาทสำคัญต่อการทำงานของเอนไซม์ หรือตัวเร่งทางชีวภาพดังนั้น เพื่อเพิ่ม/รักษาประสิทธิภาพการทำงานของตัวเร่งทางชีวภาพ สำหรับส่งเสริมการผลิต 3MC จาก toluene ด้วยระบบสองเฟส การวิจัยนี้จึงตรวจสอบ อิทธิพลของไอออนต่อการทำงานของเอนไซม์ TDO และการผลิต 3MC ในอาหาร MSB ที่มีการเติมไอออนแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นต่างๆ ตารางที่ 5 ไอออน 4 ชนิด (Ca^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+} และ Fe^{2+}) ถูกเลือกตามพื้นฐานการทำงานที่เฉพาะเจาะจงต่อการทำงานของเอนไซม์ TDO หรือเอนไซม์ที่เกี่ยวกับการเผาผลาญอาหารทั่วไปและกลไกการทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์ แคลเซียม (Ca^{2+}) แสดงบทบาทสำคัญในการทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์ใน OST แบคทีเรียหลายชนิด เช่น แกรมลบ *Pseudomonas* (Isken and Bont, 1998) และ *Escherichia coli* K-12 (Aono et al., 1994) และแกรมบวก *Deinococcus geothermalis* T27 (Kongpol et al., 2008) พบว่าการเติม Ca^{2+} แม้จะไม่ส่งผลกระทบต่อการรอดชีวิตของเซลล์ แต่มีแนวโน้มยับยั้งการผลิต 3MC และการทำงานของเอนไซม์ TDO ในขณะที่แมกนีเซียม (Mg^{2+}) มีการรายงานว่าเป็นส่วนประกอบของบริเวณเร่งปฏิกิริยา (active site component) ของเอนไซม์หลายชนิดและทำหน้าที่ transporter molecule ของ adenosine triphosphate (ATP) ในเซลล์ {Srikanth, 2012 #2522} อีกทั้งยังช่วยในการทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์ใน *Pseudomonas* การเติม Mg^{2+} มีแนวโน้มส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ TDO และผลผลิต 3MC โดยรวม แต่อย่างไรก็ตามการ

ส่งเสริมการผลิตนี้ต้องการ Mg^{2+} ความเข้มข้นสูง สำหรับแมงกานีส (Mn^{2+}) ซึ่งมีบทบาทที่หลากหลายในระบบชีวภาพ เช่น cofactor ของเอนไซม์สำหรับ free radical detoxifying (Kehres and Maguire 2003) และเหล็ก (Fe^{2+}) เป็นส่วนที่มีความจำเพาะต่อบริเวณเร่ง (unique active site components) ของระบบเอนไซม์ TDO ใน *P. putida* (Friemann et al. 2009) ทุกความเข้มข้นของ Mn^{2+} และ Fe^{2+} ที่ตรวจสอบมีแนวโน้มส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ TDO ทั้งยังให้ผลผลิต 3MC โดยรวมและการอยู่รอดของเซลล์สูงด้วยปริมาณสารที่เติมความเข้มข้นต่ำ

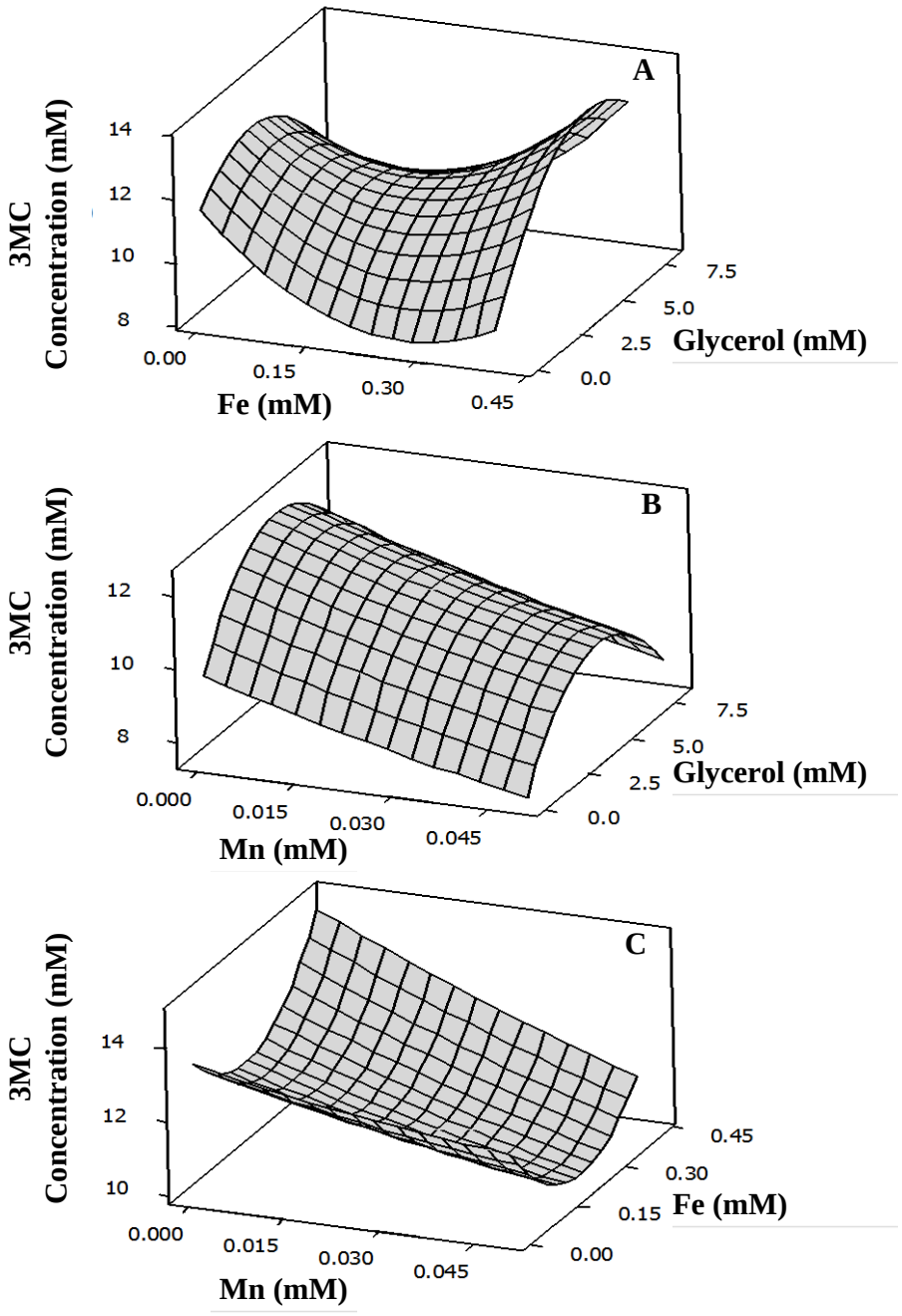
จากผลการเติมแหล่งคาร์บอน/พลังงาน หรือไอออนข้างต้นนี้ ชี้ให้เห็นว่าองค์ประกอบของอาหารมีความจำเป็น เพื่อให้ได้ผลผลิต 3MC สูงสุดในระบบสองเฟส โดย glycerol, Fe^{2+} และ Mn^{2+} มีศักยภาพสามารถเพิ่มการผลิต 3MC โดยรวมอย่างเห็นได้ชัด ดังนั้นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ควรเติมในอาหาร MSB ของสารดังกล่าว จึงถูกตรวจสอบโดย response surface methodology (RSM) ร่วมกับ central composite design (CCD) จาก ตารางที่ 5 ค่าความเข้มข้นกลางของแต่ละสารที่ถูกเลือกสำหรับการออกแบบการทดลองด้วย RSM-CCD คือ 4 mM glycerol, 0.2 mM Fe^{2+} และ 0.025 mM Mn^{2+} จากการออกแบบทำให้ได้การทดลอง 20 ชุด ซึ่งแต่ละชุดจะถูกตรวจสอบการผลิต 3MC ที่ 20h (แสดงถึงช่วงเริ่มต้นของการผลิต) และ 40 ชั่วโมง (แสดงถึงช่วงปลายของการผลิต) ทั้งนี้ *P*-value และ t-test ถูกนำมาใช้ในการระบุผลกระทบของแต่ละปัจจัยในการผลิต 3MC โดยค่า *P*-value ต่ำกว่า 0.05 ($P < 0.05$) แสดงให้เห็นว่ามีการส่งเสริมการผลิตอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งพบว่าการเติม glycerol และ Mn^{2+} ด้วยกันช่วยส่งเสริมผลผลิต 3MC โดยรวม ในช่วงเวลาการผลิต 40 ชั่วโมง เท่านั้น ในขณะที่การเติม glycerol และ Fe^{2+} ด้วยกันสามารถส่งเสริมการผลิตโดยรวมทั้งช่วงเวลา 20 และ 40 ชั่วโมง ซึ่งพบว่าอาหารที่มีการเติม glycerol และ Fe^{2+} ส่งเสริมการผลิต 3MC โดยรวมได้ดี และจากผลของ 3D response surface methodology พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของ glycerol และ Fe^{2+} คือ 4 และ 0.4 mM ตามลำดับ ซึ่งถือว่าอาหารนี้เป็นอาหารที่ถูกปรับปรุงให้เหมาะสม (optimized medium; OM medium) สำหรับการผลิต 3MC โดยสายพันธุ์ TODE1 (รูปที่ 13)

ตาราง 4 ปัจจัยส่งเสริมประสิทธิภาพการทำงานของตัวเร่งทางชีวภาพและการผลิต 3MC ด้วยระบบสองเฟส

Factors		TDO specific activity (µg indigo/min/OD600) [a]	3MC production (mM) [b]			Cell survival Log CFU/ml [b]
			Aqueous phase	Organic phase	Overall	
None		4.21 ± 0.02	8.7 ± 1.1	91.8 ± 4.6	17.8 ± 3.5	7.20
Carbon and energy (mM)						
Glucose	3	4.75 ± 0.03	3.0 ± 0.8	76.2 ± 3.1	11.6 ± 1.0	7.36
	6	3.21 ± 0.02	3.1 ± 0.0	76.3 ± 7.7	12.7 ± 0.7	7.38
	11	2.43 ± 0.01	3.5 ± 0.2	69.3 ± 6.5	11.4 ± 0.8	7.43
Glycerol	3	4.20 ± 0.03	14.6 ± 0.8	131.0 ± 3.1	25.2 ± 1.0	7.63
	6	4.17 ± 0.02	13.1 ± 3.6	125.7 ± 9.2	22.6 ± 5.1	7.36
	11	3.87 ± 0.02	10.7 ± 0.8	103.9 ± 1.2	21.1 ± 0.8	7.29
Acetate	5	4.72 ± 0.02	9.8 ± 0.4	99.4 ± 3.1	17.9 ± 1.0	7.23
	10	4.87 ± 0.01	8.1 ± 0.7	86.7 ± 0.1	15.2 ± 0.6	6.90
	20	4.73 ± 0.02	8.1 ± 1.2	91.5 ± 6.6	15.4 ± 2.1	6.71
Succinate	5	5.57 ± 0.01	5.3 ± 4.2	89.8 ± 1.2	8.9 ± 2.0	7.04
	10	5.72 ± 0.02	11.0 ± 1.5	108.3 ± 8.1	19.8 ± 2.1	7.41
	20	4.29 ± 0.01	9.8 ± 0.5	121.7 ± 1.4	20.0 ± 0.3	7.46
Metal ion (mM)						
Mg^{2+}	5	4.61 ± 0.02	8.8 ± 1.1	71.8 ± 4.2	14.5 ± 1.4	7.27
	10	4.63 ± 0.01	18.9 ± 1.5	98.2 ± 1.7	25.3 ± 2.6	7.16
	20	4.54 ± 0.01	12.3 ± 1.0	106.2 ± 3.8	20.9 ± 1.3	7.08
Ca^{2+}	1	3.73 ± 0.00	3.0 ± 0.5	76.2 ± 5.9	11.6 ± 0.1	7.38
	5	3.80 ± 0.01	4.1 ± 0.0	78.3 ± 7.7	12.9 ± 0.7	7.57
	10	3.87 ± 0.02	3.5 ± 0.2	69.3 ± 6.5	11.4 ± 0.8	6.80
Fe^{2+}	0.05	4.69 ± 0.03	12.2 ± 0.4	110.2 ± 2.0	21.2 ± 0.6	7.43
	0.10	4.67 ± 0.05	13.6 ± 0.7	123.5 ± 3.2	23.6 ± 1.0	7.56
	0.50	4.45 ± 0.04	12.3 ± 3.3	120.4 ± 9.7	21.4 ± 5.0	7.01
Mn^{2+}	0.01	4.65 ± 0.04	13.7 ± 0.3	124.7 ± 2.2	23.8 ± 0.5	7.25
	0.025	4.69 ± 0.03	15.3 ± 0.7	132.3 ± 5.0	25.9 ± 1.1	7.27
	0.05	4.24 ± 0.04	13.6 ± 1.7	107.2 ± 7.7	22.1 ± 0.8	7.37

[a] การทำงานของเอนไซม์ TDO ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย toluene ถูกตรวจสอบในอาหาร MSB ที่มีการเติมแหล่งคาร์บอน/พลังงาน และ ไอออน ที่ความเข้มข้นต่างๆ เปรียบเทียบกับสภาวะที่ไม่มีการเติมเป็นสภาวะควบคุม การทำงานของเอนไซม์ TDO ในอาหาร MSB ที่มี toluene เพียงอย่างเดียว คือ 5.09 ± 0.02 µg indigo/min/OD600.

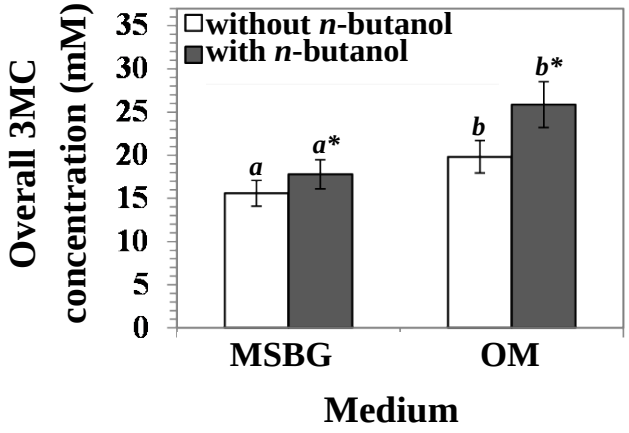
[b] การผลิต 3MC ด้วยระบบสองเฟส ภายในระยะเวลาการผลิต 20 ชั่วโมง เมื่อมีการเติม toluene และ *n*-butanol แบบไอระเหย และจำนวนเซลล์รอดชีวิต ถูกตรวจสอบในอาหาร MSB ที่มีเซลล์เริ่มต้น ที่ OD_{600} = 1.0 (CFU/ml = 7.0 X 10^6) ในสภาวะที่มีและไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอน/พลังงาน และไอออนใดๆ



รูป 13 รูปแบบของ dimension contour plots สำหรับการผลิต 3MC ที่ความเข้มข้นสูงสุดที่เวลาการผลิต 20 ชั่วโมง โดยระดับการผลิตของ 3MC ด้วยแบคทีเรียสายพันธุ์ TODE1 ในระบบสองเฟสเมื่อมีการเติม toluene และ *n*-butanol แบบไอระเหย ในอาหาร MSB ที่มีการเติม Fe^{2+}-glycerol (A) Mn^{2+} - glycerol (B) และ Fe^{2+} - Mn^{2+} (C)

3.3.4 <u>การผลิต 3-MC แบบ Batch ในระบบสองเฟส ในระดับการผลิตขนาดเล็ก</u>

การผลิต 3MC จาก toluene ด้วยสายพันธุ์ TODE1 ด้วยระบบสองเฟสเริ่มผลิตในระบบการผลิตขนาดเล็ก (10 ml) ด้วยการผลิตแบบ batch ในระบบสองเฟสโดยมี *n*-decanol เป็นเฟสที่สอง ถูกตรวจสอบในอาหาร OM เปรียบเทียบกับอาหาร MSB ในสภาวะที่มีและไม่มี *n*-butanol เมื่อเติมแบบไอระเหย ภายในระยะเวลาการผลิต 20 ชั่วโมง จากการผลิตในสภาวะที่เหมาะสม คือ ความเร็วในการกวน 200 rpm อุณหภูมิ 30°C และ pH 7.0 และนอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์ TDO ซึ่งเป็นกุญแจสำคัญสำหรับการผลิต 3MC จาก toluene เป็นที่ทราบกันดีแล้วว่าทำงานได้ดีในสภาวะที่มีอากาศ (aerobic) ดังนั้นเพื่อให้ได้ผลผลิต 3MC สูงสุด การตรวจสอบปริมาณออกซิเจนที่เหมาะสมจึงมีความจำเป็น การผลิตถูกตรวจสอบในขวดเลี้ยงเชื้อที่มีอัตราส่วนต่อปริมาณแตกต่างกันระหว่างเซลล์ที่อยู่ในอาหาร OM และช่องว่างเหนือของเหลวในขวดเลี้ยงเชื้อ (1:6, 1:12, 1:24 และ 1:48) โดยช่องว่างเหนือของเหลวแสดงถึงปริมาณของออกซิเจน ดังผล ชี้ให้เห็นว่าด้วยปริมาณออกซิเจนที่สูงขึ้นให้ผลผลิต 3MC โดยรวมสูงขึ้นตามไปด้วย แต่อย่างไรก็ตามปริมาณออกซิเจนที่ละลาย (dissolved oxygen) มากจนเกินพอ (1:48) อาจส่งผลต่อการผลผลิต 3MC ได้ ดังแสดงใน (รูปที่ 14) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าระบบที่มีการเติม *n*-butanol ในกระบวนการผลิตให้ความเข้มข้น 3MC โดยรวมเพิ่มขึ้นในอาหารทั้งสองชนิด นอกจากนี้อาหาร OM แสดงให้เห็นประสิทธิภาพในการส่งเสริมการผลิต 3MC โดยสายพันธุ์ TODE1 ในระบบสองเฟสทั้งในสภาวะที่มีหรือไม่มีการเติม *n*-butanol โดยแต่ละสภาวะการผลิตให้ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P <0.05) สิ่งนี้แสดงให้เห็นถึงความสำคัญจากการทำความเข้าใจความรู้พื้นฐานในการเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของตัวเร่งทางชีวภาพ ด้วยการศึกษาชนิดตัวทำละลายอินทรีย์ การให้แหล่งพลังงานเสริมที่เหมาะสม และการปรับปรุงองค์ประกอบของอาหาร สามารถเพิ่มผลผลิตจากการผลิตด้วยวิธีทางชีวภาพได้ จากการศึกษาความเข้าใจพื้นฐานในการเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของตัวเร่งทางชีวภาพ ด้วยหลายปัจจัยข้างต้น การผลิต 3MC ด้วยสายพันธุ์ TODE1 จาก toluene ในอาหาร OM ซึ่งใช้การผลิตแบบ batch ด้วยสภาวะการผลิตที่เหมาะสม ซึ่งมี *n*-decanol เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ในระบบสองเฟสภายในกระบวนการผลิต 20h ให้ผลผลิต 3MC โดยรวม 31.78 mM ความเข้มข้นของ 3MC ที่ผลิตได้จากงานวิจัยนี้ เป็นความเข้มข้นที่สูงสุดที่เคยมีการรายงานมา



รูป 14 การผลิต 3MC ด้วยระบบการผลิตแบบ batch ด้วยแบคทีเรียสายพันธุ์ TODE1 ในระบบสองเฟส ที่ระยะเวลาการผลิต 20 ชั่วโมง ซึ่งผลผลิตของ 3MC จาก toluene ที่เติมแบบไอระเหย ในอาหาร MSB และอาหาร OM ในสภาวะที่มีและไม่มีการเติม *n*-butanol ตัวเอียงแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P < 0.05) ทั้งภายในกลุ่มและต่างกลุ่มกัน (Student-Newman-Keuls posttest)

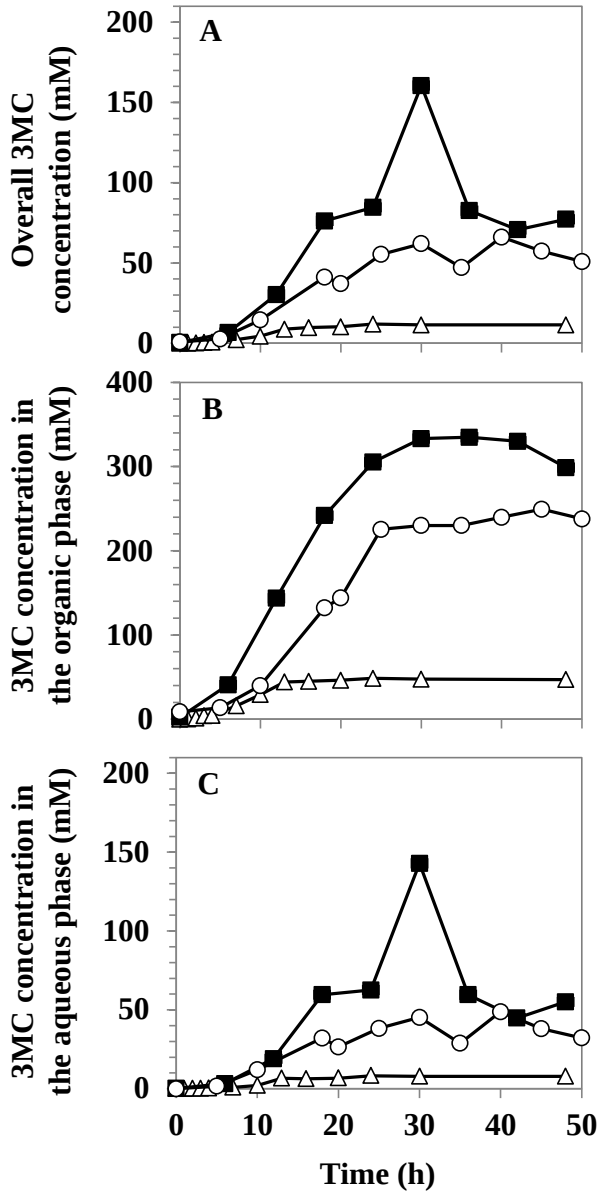
3.3.5 การผลิต 3-MC แบบ Fed-batch ในระบบสองเฟส ในระดับถังหมัก

การผลิตในถังหมักชีวภาพได้รับการดำเนินการเพื่อเพิ่มผลผลิต 3MC จาก toluene ด้วยสายพันธุ์ TODE1 เพื่อขจัดข้อจำกัดของการผลิตในระบบการผลิตขนาดเล็ก (10 ml) เช่น การควบคุมความเป็นกรดด่าง และปริมาณออกซิเจน แม้ว่าสายพันธุ์ TODE1 เป็นแบคทีเรียที่มาจาก OST แบคทีเรียซึ่งสามารถทนตัวทำละลายอินทรีย์ได้หลากหลายชนิดโดยเฉพาะอย่างยิ่ง toluene แต่สำหรับ *n*-butanol นั้นพบว่าทนได้ในความเข้มข้นไม่สูงมากนัก {Faizal, 2005 #375} ดังนั้น ผลของ toluene และ *n*-butanol ที่ความเข้มข้นต่างๆต่อการผลิต 3MC จึงถูกศึกษา ซึ่งพบว่าการให้ 60 mM toluene และ 10 mM *n*-butanol เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสม ต่อการผลิต 3MC ด้วยสายพันธุ์ TODE1 (อัตราการผลิต 2.24 ± 0.09 mM/h) ซึ่ง toluene และ *n*-butanol ความเข้มข้นเหล่านี้ถูกใช้ในการศึกษาการผลิตในถังหมักชีวภาพต่อไป แต่อย่างไรก็ตาม toluene ซึ่งเป็นสารตั้งต้นสำคัญในการผลิต 3MC สามารถระเหยได้ง่ายในถังหมักชีวภาพซึ่งมีการเติมอากาศและการปั่นกวน (อัตราการระเหย 0.85 mM/h) ดังนั้นการผลิตแบบ fed-batch โดยการเติม 60 mM toluene ซ้ำในแต่ละช่วงเวลาจึงมีความจำเป็นสำหรับการผลิต 3MC โดยสายพันธุ์ TODE1 ดังนั้นเพื่อศึกษาปริมาณสารตั้งต้นที่เพียงพอต่อการผลิต การผลิต 3MC แบบ fed-batch ในอาหาร OM ถูกดำเนินการในถังหมักชีวภาพขนาด 2 ลิตร ซึ่งมีการเติม 60 mM toluene ซ้ำที่เวลาต่างๆ จึงถูกตรวจสอบ ระบบการผลิตถูกควบคุมที่อุณหภูมิ 30°C ให้อากาศ 1 vvm และการกวน 400 rpm หลังจากมีการให้ toluene เริ่มต้นที่ 60 mM แล้วจะมีการให้ซ้ำในอาหารด้วยความเข้มข้นเดียวกันนี้ในช่วงเวลาที่แตกต่างกันจากนั้นความเข้มข้นของ 3MC ในเฟสน้ำและเฟสตัวทำละลายอินทรีย์จะได้รับการตรวจสอบโดยพบว่า 3MC ถูกผลิตความเข้มข้นต่ำ เมื่อ toluene ถูกเติมทุกๆ 3 ชั่วโมงและ 10 ชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งการเติมสารตั้งต้นซ้ำทุกๆ 3 ชั่วโมง อาจเกิดการยั้บยั้งของสารตั้งต้นที่มีมากเกินไป (substrate inhibition) และที่ 10 ชั่วโมง ปริมาณสารตั้งต้นอาจมีไม่เพียงพอต่อการผลิต แต่อย่างไรก็ตามการเติมทุกๆ 6 ชั่วโมงพบว่ามีอัตราการผลิตสูงกว่าที่ 3 และ 10 ชั่วโมงถึง 7.9 และ 2.4 เท่า ตามลำดับ และนอกนี้จากการตรวจสอบในระบบการผลิตขาดเล็ก (10 ml) ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสำคัญของปริมาณออกซิเจนต่อการผลิต 3MC ดังนั้นเพื่อตรวจสอบปริมาณออกซิเจนที่เหมาะสมในถังหมักชีวภาพ การให้ออกซิเจนที่ 0.5, 1.0 และ 1.5 vvm และการกวนที่ 300, 400 และ 500 rpm ภายในระยะเวลาการผลิต 30 ชั่วโมงจึงถูกตรวจสอบ ซึ่งพบว่า 1.0 vvm ของการให้ออกซิเจน และ 400 rpm ของการกวนเป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิต 3MC โดย TODE1 ดังนั้นสภาวะการผลิตเหล่านี้ถูกใช้ในการศึกษาต่อไป (รูปที่ 15)

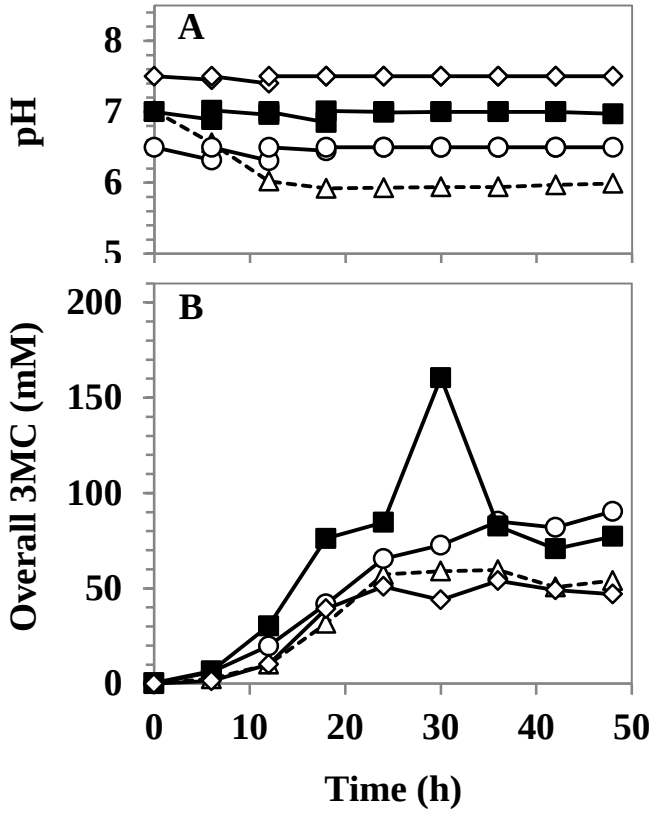
ความเป็นกรดด่าง (pH) เป็นปัจจัยสำคัญต่อการทำงานและความเสถียรของเอนไซม์ต่างๆ ซึ่ง pH นี้ควบคุมได้ยากในการผลิตขนาดเล็ก (10 ml) ดังนั้นเพื่อให้ได้สารผลิตภัณฑ์เป้าหมายสูงสุด การผลิต 3MC ถูกตรวจสอบในถังหมักชีวภาพเมื่อมีการควบคุม pH ระหว่างการผลิต ด้วยระบบการผลิตแบบ fed-batch ในอาหาร OM (รูปที่ 16) โดยพบว่าในสภาวะที่ไม่มีการควบคุม pH นั้น มี pH เริ่มต้นของการผลิตอยู่ที่ 6.9 ระหว่างการผลิต pH ลดลงอย่างรวดเร็ว จนกระทั่งต่ำสุดอยู่ที่ 5.9 และหลังจากผลิตผ่านไป 18 ชั่วโมง pH มีแนวโน้มคงที่ และด้วยสภาวะการเปลี่ยนแปลงนี้ ทำให้ได้อัตราการผลิตของ 3MC ค่อนข้างต่ำ (1.96 mM/h) ดังนั้นเมื่อมีการควบคุม pH ที่ต่างกัน 0.5 จุดคือ pH 6.5, 7.0 และ 7.5 ท่ามกลางการควบคุม pH นี้พบว่าสภาวะเป็นกลาง (pH 7.0) ให้อัตราการผลิตสูงสุด

จากผลเหล่านี้สรุปได้ว่า สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิต 3MC จาก toluene ด้วยระบบการผลิตแบบ fed-batch ด้วยแบคทีเรียสายพันธุ์ TODE1 ในอาหาร OM ในถังหมักชีวภาพ คือการเติม 60 mM toluene ตั้งแต่จุดเริ่มต้นและทุกๆ 6 ชั่วโมงของการผลิต และควบคุมสภาวะการผลิตที่อุณหภูมิ 30°C ด้วยการให้ออกซิเจน 1.0 vvm การกวน 400 rpm และ pH 7.0 สามารถให้ผลผลิตโดยรวมของ 3MC 160.53 mM (19.93 g/l) ซึ่งประกอบด้วย 333.22 mM (47.37 g/l) ในเฟสตัวทำ

ละลายอินทรีย์ และ 142.89 mM (17.74 g/l) ในเฟสน้ำ ภายในระยะเวลาการผลิต 30 ชั่วโมง ซึ่งเป็นการรายงานความเข้มข้นสูงสุดของ 3MC ที่มีการรายงานมาจนถึงขณะนี้สิ่งนี้ย้ำให้เห็นถึงความสำคัญของการเพิ่มศักยภาพการทำงานของตัวเร่งทางชีวภาพ และการผลิตในสภาวะที่เหมาะสมซึ่งเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่มีความสำคัญในการปรับปรุงการผลิตให้มีการผลิตที่ดีขึ้นได้



รูป 15 ผลผลิตของ 3MC ด้วยระบบการผลิตแบบ fed-bath โดยแบคทีเรีย *P. putida* TODE1 ภายใต้ระบบการผลิตแบบสองเฟส ในถังหมักชีวภาพขนาด 2 ลิตร การผลิตถูกตรวจสอบที่อุณหภูมิ 30 °C สารตั้งต้น toluene ถูกเติมเริ่มต้นที่ 60 mM และเติมซ้ำที่ความเข้มข้นเดิมเป็นเวลาต่างๆ (△: 3 h,■: 6 h, and○: 10 h). ความเข้มข้นของ 3MC ที่ผลิตได้ถูกตรวจสอบเป็น (A) ความเข้มข้นโดยรวมของ 3MC (B) ความเข้มข้นของ 3MC ในชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ และ (C) ความเข้มข้นของ 3MC ในชั้นอาหาร



รูป 16 ผลผลิตของ 3MC ด้วยระบบการผลิตแบบ fed-bath โดยแบคทีเรีย *P. putida* TODE1 ภายใต้ระบบการผลิตแบบสองเฟส ในถังหมักชีวภาพขนาด 2 ลิตร ซึ่งมีการควบคุม pH 6.5 (○), 7.0 (■), 7.5 (◇), และไม่มีการควบคุม (△) ระบบการผลิตถูกตรวจสอบในอาหาร OM ที่อุณหภูมิ 30 °C ให้อาหาร 1 vvm และการกวน 400 rpm สารตั้งต้น toluene ถูกเติมเริ่มต้นที่ 60 mM และเติมซ้ำที่ความเข้มข้นเดิมทุกๆ ชั่วโมง โดยที่ pH (A) และความเข้มข้นโดยรวมของ 3MC ที่ผลิตได้ (B) ถูกตรวจสอบ

3.4 ข้อวิจารณ์ผลการวิจัย (Discussion)

ที่ผ่านมามีการรายงานความเป็นไปได้ในการปรับปรุงการผลิต 3MC ด้วยวิธีทางชีวภาพ ซึ่งสามารถทำได้โดย 1) การตัดต่อพันธุกรรมของแบคทีเรียที่ทนตัวทำละลายอินทรีย์ด้วยการเพิ่ม/การทำลายยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตบางตัว (introduce gene copy number/gene disruption) 2) การดึงสารเคมีที่เป็นพิษต่อแบคทีเรียผู้ผลิตออกจากอาหารด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่ละลายน้ำได้น้อย (immiscible organic solvent) ด้วยระบบสองเฟส (two-phase system) (Hüsken et al. 2001, Robinson et al. 1992, Wery et al. 2000) งานวิจัยนี้ใช้ทั้งสองวิธีขางต้นร่วมกับการปรับปรุงประสิทธิภาพการทำงานของตัวเร่งทางชีวภาพ ในระบบการผลิตที่เหมาะสม เพื่อปรับปรุงการผลิตของ 3MCโดยใช้แบคทีเรียทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์ *P. putida* TODE1 ซึ่งถูกตัดต่อพันธุกรรมจากการทำลายยีน *tod*E (disrupted todE gene) อีกทั้งแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ยังสามารถทนความเป็นพิษของสารตั้งต้น toluene และสารผลิตภัณฑ์ 3MC ได้สูง โดยขั้นตอนสำหรับการปรับปรุงการผลิต ในงานวิจัยนี้สามารถแบ่งออกเป็น 3 หัวส่วนหลักๆ ดังนี้ 1) การคัดเลือกตัวทำละลายอินทรีย์ที่ละลายน้ำได้น้อย (immiscible organic solvent) ซึ่งเหมาะสมสำหรับใช้ในระบบสองเฟส 2) การปรับปรุงส่วนประกอบของอาหารเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของตัวเร่งทางชีวภาพ 3) การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต

การผลิตทางชีวภาพของ 3MC จาก toluene มีข้อจำจัดจากความเป็นพิษของสารตั้งต้นและสารผลิตภัณฑ์ต่อตัวเร่งทางชีวภาพ (Husken et al. 2001, Prpich and Daugulis 2007) แต่อย่างไรก็ตาม แบคทีเรีย *P. putida* TODE1 ซึ่งเป็นอนุพันธุ์ที่มาจากแบคทีเรียทนตัวทำละลายอินทรีย์สามารถทนตัวทำละลายอินทรีย์ได้หลายชนิดที่ความเข้มข้นสูงโดยเฉพาะอย่างยิ่ง toluene หรือแม้แต่ 3MC นั้นพบว่าสายพันธุ์ TODE1 สามารถทนได้ความเข้มข้นสูงกว่า (7 mM) แบคทีเรียอื่นๆ ที่มีการรางานมา การผลิตแบบสองเฟสสามารถลดความเป็นพิษจากการสัมผัสของสารตั้งต้น/สารผลิตภัณฑ์ซึ่งอาจทำให้ตัวเร่งทางชีวภาพนั้นมีประสิทธิภาพในการทำงานลดลงได้ อีกทั้งเป็นระบบที่มีการรายงานว่าเหมาะสมต่อการผลิต 3MC ซึ่งให้การผลิตสูงกว่าการผลิตแบบเฟสเดียวถึง 2-7 เท่า (Faizal et al. 2007, Wery et al. 2000) ชี้ให้เห็นว่าระบบสองเฟสมีบทบาทที่สำคัญในการผลิต 3MC จาก toluene ถึงแม้ว่ามีงานวิจัยทำการผลิต 3MC ในระบบสองเฟสด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่ละลายน้ำได้น้อยหลายชนิดแล้วก็ตาม เช่น ตัวทำลายอินทรีย์ในกลุ่ม alkene, ester หรือ alcohol (Faizal et al. 2007, Husken et al. 2001, Prpich and Daugulis 2007) แต่อย่างไรก็ตามปัจจุบันนี้ยังมีความต้องการการวิจัยเพื่อศึกษาตัวทำละลายอินทรีย์ที่ละลายน้ำน้อยที่เหมาะสมต่อตัวเร่งชีวภาพหรือ สารเคมีเป้าหมาย ซึ่งท่ามกลางตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีการศึกษา aliphatic alcohol ซึ่งไม่เป็นพิษต่อมนุษย์ ราคาไม่แพง และมีคุณสมบัติ 3MC partition เช่น *n*-octanol และ oleyl alcohol เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่ละลายน้ำได้น้อยที่มีการใช้วิจัยการผลิต 3MC จาก toluene และสารเคมีอื่นๆมาแล้ว แต่อย่างไรก็ตามการใช้ *n*-octanol พบว่ามีความเป็นพิษต่อ *P. putida* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ใช้ในการผลิต (Faizal et al. 2007, Husken et al. 2001) ดังนั้นเพื่อศึกษาตัวทำละลายอินทรีย์ที่ละลายน้ำได้น้อยที่เหมาะสมต่อการผลิต 3MC ด้วยแบคทีเรียสายพันธุ์ TODE1 aliphatic alcohol ถูกใช้ในการศึกษานี้ โดยมี *n*-octanol และ oleyl alcohol เป็นตัวทำละลายอินทรีย์เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบ (reference compound) งานวิจัยนี้ใช้คุณสมบัติการรอดชีวิตของเซลล์เมื่อสัมผัสกับตัวทำละลายอินทรีย์ (exposed with organic solvent) การใช้ตัวทำละลายอินทรีย์เป็นแหล่งอาหาร (organic solvent utilization) และ 3MC partition เป็นคุณสมบัติหลักในการคัดเลือก aliphatic alcohol ที่เหมาะสมต่อการผลิต 3MC โดยตัวทำละลายอินทรีย์ ซึ่งมีค่า log P_{ow} value (octanol-water partitioning coefficient) 2.4 ถึง 7.5 ถูกคัดเลือกเพื่อใช้ในการตรวจสอบ ที่ผ่านมามีการรายงานว่า log P_{ow} ซึ่งมีค่าระหว่าง 1-4 เป็นพิษต่อจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ (Prpich and Daugulis 2007) แต่อย่างไรก็ตามการศึกษานี้พบว่า log P_{ow} ต่ำกว่า 4.0 ส่งผลกระทบต่อเซลล์รอดชีวิตของ TODE1 ทั้งนี้อาจเนื่องจาก

อาหาร MSB ซึ่งไม่มีคาร์บอนและพลังงานใดๆ ถูกใช้ในการตรวจสอบการรอดชีวิตของเซลล์รวมทั้งความสามารถในการใช้ organic solvent ที่คัดเลือก ดังนั้นเป็นไปได้ที่ความสามารถในการทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์อาจต่ำกว่าที่มีการรายงาน นอกจากนี้ยังพบว่าการเพิ่ม chain length ของ aliphatic alcohol พบการรอดชีวิตของเซลล์มากขึ้น ทั้งนี้เนื่องจาก chain length ที่เพิ่มขึ้นของ aliphatic alcohol ทำให้ค่าความสามารถในการละลายน้ำลดลง สารเคมีที่ละลายน้ำได้น้อยจะเข้าสู่ cell membrane ได้ในความเข้มข้นน้อย ดังนั้นจึงเป็นพิษต่อจุลินทรีย์น้อยตามไปด้วย (Neumann et al. 2005) คุณสมบัติที่ดีของตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ในระบบสองเฟสนอกจากไม่ส่งผลกระทบต่อเซลล์แล้วเซลล์ไม่ควรจะใช้เป็นอาหารได้ สำหรับแบคทีเรียสายพันธุ์ TODE1 พบว่าไม่สามารถใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ถูกเลือกมาทดสอบได้ ยกเว้น oleyl alcohol นอกจากนี้เป็นที่ทราบกันดีถึงความเป็นพิษของ 3MC ต่อแบคทีเรียผู้ผลิต ดังนั้นเพื่อลดความเป็นพิษที่จะเกิดขึ้นนี้ 3MC การตรวจสอบ partition coefficient ของแต่ละ aliphatic alcohol จึงมีความจำเป็นที่ควรตรวจสอบ ซึ่งพบว่า aliphatic alcohol ที่มี log Pow ต่ำให้ partition coefficient ของ 3MC สูง โดยที่ n-octanol ถูกใช้เป็นตัวทำละลายอินทรีย์อ้างอิง (reference) สำหรับการตรวจสอบ partition coefficient ของ 3MC ซึ่งค่าที่ได้จากการตรวจสอบนี้ให้ค่าใกล้เคียงกับ log P_{ow} (1.8) เพื่อแสดงให้เห็นความสำคัญของคุณสมบัติที่ใช้ในการคัดเลือกตัวทำละลายอินทรีย์ซึ่งสามารถช่วยเพิ่มผลผลิตของ 3MC ได้ ในการศึกษานี้จึงผลิต 3MC ในอาหาร MSB ภายใต้ภาวะที่มีและไม่มีแหล่งพลังงานเสริม (power supply) จาก *n*-butanol เมื่อมีการเติม long chain aliphatic alcohol ชนิดต่างๆ เป็นเฟสที่สอง ท่ามกลาง aliphatic alcohol ที่ใช้ทดสอบ *n*-decanol ซึ่งไม่ส่งผลกระทบต่อ TODE1 เซลล์ ไม่สามารถใช้เป็นแหล่งอาหาร และมีคุณสมบัติ 3MC partition ที่ดีให้ผลผลิต 3MC โดยรวมสูงที่สุด โดยที่ผ่านมาพบว่า *n*-decanol ถูกใช้เป็นตัวทำละลายอินทรย์ที่ละลายน้ำได้น้อย สำหรับลดความเป็นพิษของ 3-nitrotoluene จากระบบการผลิต (Neumann et al. 2005) หรือแม้กระทั้งการผลิต 3MC จาก *m*-xylene (Rojas et al. 2004) สิ่งนี้ย้ำให้เห็นความสำคัญของคุณสมบัติที่ใช้ในการคัดเลือกตัวทำละลายอินทรีย์สามารถช่วยเพิ่มผลผลิตสารเคมีด้วยวิธีชีวภาพได้ โดย *n*-decanol เหมาะสมเพื่อใช้เป็นเฟสที่สองของระบบสองเฟสในการระบวนการผลิต 3MC โดยมี TODE1 เป็นตัวเร่งทางชีวภาพ

ปัจจัยที่มีบทบาทสำคัญสำหรับการผลิตสารเคมีด้วยวิธีทางชีวภาพคือประสิทธิภาพของตัวเร่งปฏิกิริยาซึ่งจำเป็นจะต้องใช้พลังงานในการอยู่รอดและปัจจัยร่วม/องค์ประกอบที่จะสนับสนุนการทำงานของเอนไซม์ แบคทีเรียสายพันธุ์ TODE1 ซึ่งถูกใช้เป็นตัวเร่งทางชีวภาพในงานวิจัยนี้ไม่มี *tod*E gene จึงไม่สามารถใช้ toluene ซึ่งเป็นสารตั้งต้นสำหรับการผลิตเป็นแหล่งอาหารและพลังงานได้ ดังนั้นการเติมแหล่งคาร์บอน/พลังงานจึงมีความจำเป็นที่ต้องศึกษา แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาก่อนหน้านี้พบการยับยั้ง catabolite repressions ของ TOL pathway ซึ่งเป็น pathway สำคัญในการผลิต 3MC ใน *P. putida* ด้วยแหล่งคาร์บอน/พลังงานที่สามารถย่อยสลายได้ง่ายและมีปริมาณมาก (Duetz et al. 1994, Faizal et al. 2007, Lovanh and Alvarez 2004) เพื่อหลีกเลี่ยงข้อจำกัดนี้ช่วงความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน/พลังงานที่เลือกใช้จึงถูกตรวจสอบให้อยู่ในช่วงที่ไม่มีผลกระทบจาก catabolite repressions เมื่อเทียบกับสภาวะที่ไม่มีการเติมใดๆ ด้วยการตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ toluene dioxygenase (TDO) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในการผลิต 3MC จาก toluene ใน *P. putida* โดย glucose มีการรายงานว่ามีผลกระทบของ catabolite repressions จึงถูกใช้เป็นตัวควบคุม (Faizal et al. 2007) การเติม acetate มีแนวโน้มเพิ่ม TDO activity แต่พบว่ามีผลกระทบต่อการรอดชีวิตของเซลล์ ดังนั้นจึงได้ผลผลิต 3MC ต่ำ เช่นเดียวกันนี้เมื่อเติม succinate สามารถช่วยส่งเสริม TDO activity และไม่ส่งผลกระทบใดๆต่อการรอดชีวิตของเซลล์แต่ผลผลิต 3MC ก็ยังไม่สูงมากนัก และเป็นที่น่าสนใจ เมื่อเติม glycerol ซึ่งไม่ส่งผลกระทบต่อ TDO activity และการรอดชีวิตของเซลล์ แต่สามารถเพิ่มผลผลิต 3MC ถึง 1.4 เท่า เมื่อเติม 3 mM glycerol เปรียบเทียบกับสภาวะที่ไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอนและพลังงาน

เป็นที่ทราบกันแล้วว่าไอออนสามารถเป็นสารกระตุ้น/สารยับยั้งและดังนั้นจึงมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีนหรือความมั่นคงของเอนไซม์ได้ เนื่องจาก *P. putida* สามารถเปลี่ยน toluene ไปเป็น 3MC ได้ด้วยระบบการทำงานของเอนไซม์ TDO ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่มของ nonheme iron-containing dioxygenase ที่ประกอบด้วย a reductase, a feredoxin and a Rieske non-heme iron dioxygenase (Lee et al. 2005) โดย Fe^{2+} เป็นสิ่งที่มีความจำเป็นและสำคัญสำหรับ active site ของเอนไซม์นี้ และหากไม่มี Fe^{2+} โครงสร้างของเอนไซม์จะมีความยืดหยุ่นและโครงสร้างจะเปลี่ยนแปลง (Friemann et al. 2009, Wackett and Gibson 1988) นอกจากนี้แล้วไอออนหลายชนิดยังมีการรายงานถึงความสำคัญต่อการผลิต การเพิ่มการทนความเป็นพิษต่อตัวทำละลายอินทรีย์ของจุลินทรีย์ (Guzik et al. 2013, Kongpol et al. 2008) ดังนั้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของตัวเร่งชีวภาพ ผลกระทบของไอออนแต่ละชนิด (Fe^{2+}, Mn^{2+}, Ca^{2+}, Mg^{2+}) ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการทำงานของเอนไซม์ TDO การรอดชีวิตของเซลล์และผลผลิต 3MC จึงถูกตรวจสอบเปรียบเทียบกับอาหารที่ไม่มีการเติมไอออนใดๆ พบว่าการทำงานของเอนไซม์ TDO ในสภาวะที่มีการเติม Ca^{2+} ส่งผลกระทบต่อ TDO activity อย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะที่ไม่เติมไอออนเป็นผลให้ผลผลิต 3MC ค่อนข้างต่ำ ในขณะที่สภาวะที่มีการเติม Mg^{2+} Mn^{2+} และ Fe^{2+} จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการผลิต 3MC และการทำงานของเอนไซม์ TDO ได้แต่ Mn^{2+} และ Fe^{2+} แค่เพียงความเข้มข้นต่ำๆ ให้ผลผลิต 3MC สูงสุด และสูงกว่าในสภาวะที่ไม่มีการเติมไอออน ได้ถึง 1.33 and 1.45 เท่าตามลำดับ ปัจจัยซึ่งส่งเสริมการผลิตข้างต้น (glycerol, Mn^{2+} และ Fe^{2+}) ถูกวิเคราะห์ความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วย RSM based-CCD เพื่อให้ได้ผลผลิต 3MC สูงสุดและนั่นคืออาหาร MSB ที่มีการเติม 4 mM glycerol และ 0.4 mM Fe^{2+} (optimized medium; OM medium) ซึ่งให้ผลผลิต 3MC สูงกว่าสภาวะที่ไม่มีการปรับปรุงส่วนประกอบอาหารใดๆ (MSB medium) ถึง 1.5 เท่า สิ่งนี้แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของการเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของตัวเร่งทางชีวภาพสำหรับกระบวนการผลิตสารเคมีด้วยวิธีทางชีวภาพ ที่ผ่านมาการผลิต 3MC ด้วย *P. putida* ในระบบสองเฟสด้วยระบบการผลิตขนาดเล็ก (10 ml) มีการศึกษาในอาหารและระบบการผลิตหลายชนิด แต่อย่างไรก็ตามจากกลยุทธ์ของการศึกษานี้ให้ผลการผลิต 3MC สูงที่สุดจากที่มีการรายงาน และถึงแม้ว่า TODE1 จะถูกใช้เป็นตัวเร่งทางชีวภาพสำหรับการผลิต 3MC ด้วยระบบสองเฟสโดยมี oleyl alcohol เป็นเฟสที่สอง ในอาหาร MSB มาแล้วก็ตาม แต่ภายใต้สภาวะการผลิตของการศึกษานี้สามารถเพิ่มผลผลิตมากกว่าระบบเดิมถึง 1.3 เท่า ด้วยด้วยอัตราการผลิต 1.59 mM/h ผลนี้ย้ำให้เห็นบทบาทสำคัญของการเพิ่มศักยภาพการทำงานของตัวเร่งทางชีวภาพในระบบการผลิตที่เหมาะสม ซึ่งเป็นอีกวิธีหนึ่งที่มีความสำคัญในการปรับปรุงการผลิตสารเคมีด้วยวิธีทางชีวภาพ

การผลิตแบบ fed-batch ในอาหาร OM โดยถังหมักชีวภาพขนาด 2 ลิตร ถูกใช้ในการศึกษาเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ความเข้มข้นสูง การเติมสารตั้งต้น toluene แบบต่อเนื่องแม้สามารถช่วยเพิ่มผลผลิตได้แต่อย่างไรก็ตามตัวเร่งทางชีวภาพอาจได้รับผลกระทบจากการยับยั้งของสารตั้งต้นนี้ ดังนั้นการเติม toluene ในอาหารแต่ละช่วงเวลาที่เหมาะสมจึงถูกตรวจสอบและพบว่าการให้ 60 mM toluene ซ้ำทุกๆ 6 ชั่วโมงเหมาะสมสำหรับการผลิต 3MC แบบ fed-batch ในถังหมักชีวภาพโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ TODE1 นอกจากนี้มีการรายงานว่าการผลิต 3MC มีเสถียรภาพการผลิตแตกต่างกันในสภาวะ pH ต่างๆ (Hüsken et al. 2001, Subramanian et al. 1981) ดังนั้นการผลิต 3MC ด้วยระบบ fed-batch โดยสายพันธุ์ TODE1 ถูกตรวจสอบการผลิตในอาหารที่มีการควบคุม pH ต่างๆในการศึกษานี้ด้วย โดยพบว่าเริ่มต้นการผลิตอาหารที่ใช้เป็นสีขาวและจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแดงเข้มหลังจาก 24 ชั่วโมง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่ผ่านมา พบว่าผลิตภัณฑ์ 3MC ไม่เสถียรในสภาวะที่เป็นด่าง (Husken et al. 2001) สำหรับการผลิต 3MC ด้วยถังหมักชีวภาพ ในอาหาร OM โดยสภาวะที่เหมาะสมสำหรับงานวิจัยนี้ นั่นคือ การเติม 10 mM n-butanol ความเข้มข้นเริ่มต้นของ toluene ควรเริ่มด้วย 60 mM และเติม toluene 60 mM

ทุกๆ 6 ชั่วโมง ในอาหารที่มีการควบคุม pH 7.0 การให้อากาศ 1vvm การกวน 400 rpm โดยเริ่มต้นการผลิตอาหารที่ใช้ไม่มีสี (colorless) จากนั้นค่อยๆเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแดงเข้ม (dark reddish brown) และหลังจาก 30 ชั่วโมง พบว่าการผลิตโดยรวมมีแนวโน้มลดลง แม้ว่าตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ในระบบสองเฟสจะช่วยลดการออกซิเดชันของ 3MC ลงได้ แต่แนวโน้มการผลิตในเฟสน้ำก็ยังมีแนวโน้มลง 8.7 mM/h ซึ่งหลายงานวิจัยพบสถานการณ์เช่นนี้เช่นกัน (Hüsken et al. 2001, Wery et al. 2000) โดยสีที่เกิดขึ้นนี้พบว่าเกิดจาก o-benzoquinone และการ polymerization ของสารผลิตภัณฑ์ด้วยออกซิเจนที่ละลายในระบบการผลิต (Borraccino et al. 2001, Mijangos et al. 2006) นอกจากนั้นผลผลิตของ 3MC ที่ลดลงนี้อาจเกิดจากปฏิกิริยาของเอนไซม์ (enzyme degradation) ได้เช่นกัน ถึงแม้ว่ายีน todE gene ซึ่งควบคุมการทำงานของเอนไซม์ catechol 2, 3-dioxygenase โดย meta cleavage pathway ใน *P. putida* T-57 ถูก disrupted ทำให้ไม่สามารถเปลี่ยน 3MC เข้าสู่วิถีการผลิตพลังงานงานได้, แต่อย่างไรก็ตาม 3MC อาจถูกเปลี่ยนไปเป็น muconic acid ได้โดย catechol 1, 2-dioxygenase ใน modified ortho cleavage pathway (Broderick and O'Halloran 1991, William and Murray 1974) และสารในกลุ่ม pyrogallol โดย toluene dioxygenase ซึ่งมี substrates หลากหลายและสามารถเกิด catalyze direct hydroxylation ของสาร monoaromatics (Nitisakulkan et al. 2013) แต่อย่างไรก็ตามการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวเหล่านี้ไม่ได้เป็นปัจจัยหลักในการทำให้ผลผลิต 3MC ในการศึกษานี้ลดลงเนื่องจาก TODE1ไม่สามารถเจริญในสภาวะที่มี toluene หรือ 3MC เป็นแหล่งอาหารและพลังงานได้ เพื่อให้ได้ผลผลิต 3MC สูงสุด ระบบนี้ต้องการการผลิตระยะสั้นซึ่งไม่ควรเกิน 30h ชั่วโมงนอกจากนี้เนื่องจาก ปริมาณ 3MC ที่ผลิตได้มีความเข้มข้นสูง

ในที่สุดการใช้กลยุทธ์การปรับปรุงประสิทธิภาพการทำงานของตัวเร่งทางชีวภาพในระบบการผลิตที่เหมาะสมโดยแบคทีเรีย *P. putida* TODE1 ในระบบการผลิตขนาดเล็ก (10 ml) สามารถผลิต 3MC ความเข้มข้นโดยรวมสูงสุดถึง 31.8 mM โดยพบในชั้นน้ำ 28.3 mM และชั้นของตัวทำละลายอินทรีย์ 166.5 mM ในขณะที่การผลิตในถึงหมักชีวภาพ ขนาด 2 ลิตร สามารถผลิตผลผลิต 3MC โดยรวมได้ถึง 160.53 mM โดยพบในเฟสน้ำ 142.89 mM และเฟสตัวทำละลายอินทรีย์ 333.22 mM ภายใน 30 ชั่วโมง ซึ่งการวิจัยนี้เป็นการรายงานอัตราการผลิตและความเข้มข้นสูงสุดของ 3MC ที่มีการรายงานมาจนถึงขณะนี้ (ตารางที่ 5)

โดยสรุป การศึกษาครั้งนี้ย้ำให้เห็นประโยชน์ของเทคโนโลยีวิศวกรรม/เทคโนโลยีการหมักในการประยุกต์ใช้ตัวเร่งทางชีวภาพในการผลิตผลิตภัณฑ์ที่ไม่ละลายน้ำหรือละลายน้ำได้น้อยซึ่งมีศักยภาพในเชิงพาณิชย์ซึ่งการศึกษานี้แสดงให้เห็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะ การเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ และกระบวนการผลิตทางชีวภาพที่เหมาะสม ซึ่งเป็นกระบวนการที่เฉพาะแม้จะอยู่ในเป้าหมายและระบบโฮสต์ที่คล้ายกัน ซึ่งยังต้องมีการปรับปรุงทั้งนี้ขึ้นอยู่กับเป้าหมายของการทดลองนั้น

ตาราง 5 การเปรียบเทียบการผลิต 3MC จาก toluene จากแบคทีเรียชนิดต่างๆ ในแต่ละระบบการผลิต

Microorganism	Production system	3MC production (mM)			References
		Aqueous phase	Organic phase	Overall	
Small scale: 10 ml					
P. putida MC2	Single phase (MM)	14.0	-	-	[1]
P. putida MC2	Single phase (MM)	14.2	-	-	[2]
P. putida DS10	Two-phase (LB/*n*-octanol)	7.0	11.5	8.3	[3]
P. putida MC2	Two-phase (LB/*n*-octanol)	3.8	83.0	19.6	[4]
P. putida TODE1	Two-phase (MSB/oleyl alcohol)	16.1	107.3	24.4	[5]
P. putida TODE1	Two-phase (MSB/*n*-decanol)	28.3	166.5	31.8	Present study
Fermentor scale: 800 ml					
P. putida TODE1	Two-phase (MSB/*n*-decanol)	142.9	333.2	160.5	Present study

3.5 สรุป ข้อเสนอแนะและผลผลิตจากโครงการ (Conclusion, Recommendation & Output)

สรุป ผลการวิจัยนี้ แสดงตัวอย่างการพัฒนาแบคทีเรียแพลตฟอร์มสำหรับการผลิตสารเคมีไฮโดรคาร์บอน คือ 3-แมทิลแคทิคอล (3MC) จากโทลูอีน และสารชีวมวลกลีเซอรัล ซึ่งสามารถดำเนินการได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยใช้แบคทีเรียทนตัวทำละลายอินทรีย์ (OST) ซึ่งเป็นแบคทีเรียดัดแปลงพันธุกรรม *P. putida* สายพันธุ์ TODE1 เป็นตัวเร่งชีวภาพ ในระบบการผลิตทางชีวภาพแบบการหมักสองเฟส การดำเนินการวิจัยเริ่มต้นจากการศึกษาการผลิตในระดับการผลิตขนาดเล็ก และศึกษาสภาวะและปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการเพิ่มผลผลิตของสารผลิตภัณฑ์เป้าหมาย ซึ่งรวมถึงชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ สารกระตุ้นเชื้อ สารกระตุ้น cofactor regeneration system ซึ่งมีผลอย่างมากในระบบที่มีการดัดแปรพันธุกรรม และ/หรือดัดแปลงวิถีการผลิตสาร นอกจากนั้นแล้ว เนื่องด้วยระบบการหมักนี้เป็นระบบสองเฟส จึงต้องมีการศึกษาชนิดและปริมาตรของตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสม ทั้งนี้ จาก response surface methodology-based central composite design และจากผลการศึกษา พิสูจน์ด้วยการทดลองจริง พบว่าประสบความสำเร็จในการพัฒนาระบบหมักที่ใช้ในการผลิตสาร 3MC ด้วยแบคทีเรียกลายพันธุ์ *Pseudomonas putida* T-57 สายพันธุ์ TODE1 ภายใต้ระบบการผลิตแบบสองเฟส โดยมี 1-เดคานอลเป็นชั้นของตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสม โดยมีการเติมกลีเซอรัลเป็นแหล่งคาร์บอนของเชื้อ, และพบว่าการเติม Mn^{2+} หรือ Fe^{2+} สามารถเพิ่มผลผลิตของ 3MC ได้อย่างมีนัยสำคัญ สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตโดยรวมของ 3MC ได้ถึง 34 มิลลิโมลาร์ ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่สูงที่สุดเมื่อเทียบกับงานวิจัยที่ผ่านมา จากนั้น การศึกษาการผลิตและปัจจัยต่างๆ ที่ส่งเสริมการผลิตในระดับถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่มีปริมาตรการผลิตที่ 0.8 ลิตร ด้วยระบบ Fed-batch fermentation โดยใช้ข้อมูลข้างต้นเป็นข้อมูลเบื้องต้นนั้น ประสบความสำเร็จในการผลิตสาร 3MC ได้ถึง 150 มิลลิโมลาร์ ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่สูงที่สุดเมื่อเทียบกับงานวิจัยที่ผ่านมา นอกจากนั้น การศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นประโยชน์ของเทคโนโลยีวิศวกรรม/

เทคโนโลยีการหมักในการประยุกต์ใช้ตัวเร่งทางชีวภาพในการผลิตผลิตภัณฑ์ที่ไฮโดรคาร์บอนที่ละลายน้ำน้อย ซึ่งเป็นกระบวนการที่มีศักยภาพในเชิงพาณิชย์ ทั้งนี้การศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ และกระบวนการผลิตทางชีวภาพที่เหมาะสม ทั้งนี้ ผลการวิจัยดังกล่าวนี้ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ จำนวน 1 เรื่อง และอยู่ภายใต้การพิจารณาเพื่อการตีพิมพ์อีก 1 เรื่อง ดังนี้

1. Kongpol A, Kato J, Tajima T, Vangnai AS. (2012) Characterization of Acetonitrile-Tolerant Marine Bacterium *Exiguobacterium* sp. SBH81 and Its Tolerance Mechanism. Microbes and Environments 27(1), 30-35.
2. Ajiraporn Kongpol, Junichi Kato, Takahisa Tajima, Thunyarat Pongtharangkul, & Alisa S. Vangnai (2014) Enhanced 3-methylcatechol production by Pseudomonas putida TODE1 in a two-phase biotransformation system (submitted)

4. สรุป การพัฒนาและประยุกต์ใช้ตัวเร่งทางชีวภาพในการผลิตสารเคมีจากสารชีวมวล

ในปัจจุบัน การผลิตพลังงานเชื้อเพลิงและสารเคมีอุตสาหกรรมประสบปัญหาเนื่องจากการขาดแคลนวัตถุดิบประเภทปิโตรเลียม ดังนั้น การใช้กระบวนการทางชีวภาพในการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพและสารปิโตรเคมีอุตสาหกรรมต่างๆ โดยใช้สารชีวมวลเป็นวัตถุดิบและมีจุลินทรีย์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพจึงเป็นทางเลือกที่ดีและมีศักยภาพอีกทางหนึ่ง อย่างไรก็ตาม ข้อจำกัดของกระบวนการนี้ได้แก่ ความเป็นพิษของสารผลิตภัณฑ์ประเภทไฮโดรคาร์บอนและสารพลอยได้บางชนิดต่อจุลินทรีย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อปริมาณสารผลิตภัณฑ์สะสมอยู่ในระบบการหมักสูงขึ้น ซึ่งทำให้จุลินทรีย์ตายหรือไม่สามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ การปรับปรุงทำได้โดยการใช้จุลินทรีย์ที่สามารถทนตัวทำละลายอินทรีย์เพื่อลดผลกระทบจากความเป็นพิษในระบบการหมักในการผลิตสารผลิตภัณฑ์ไฮโดรคาร์บอน และการใช้จุลินทรีย์ทนร้อนเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของกระบวนการผลิตดังกล่าว นอกจากนั้นแล้ว จุลินทรีย์เหล่านี้ยังสามารถได้รับการพัฒนาเป็นเชื้อเจ้าบ้านในการทำวิศวกรรมพันธุศาสตร์เพื่อให้มีการแสดงออกของยีนและมีประสิทธิภาพสูงขึ้นในการผลิตสารผลิตภัณฑ์ไฮโดรคาร์บอนที่ต้องการ

โครงการวิจัยเรื่อง “การพัฒนาและประยุกต์ใช้ตัวเร่งทางชีวภาพที่เสถียรในตัวทำละลายอินทรีย์สำหรับกระบวนการทางชีวภาพในการผลิตสารเคมีจากสารชีวมวล” นี้อาศัยหลักการดังกล่าวข้างต้น ในการสร้างต้นแบบและการพัฒนาสร้างวิถีการผลิตสาร (synthetic production pathway) โดยผลิตสารต้นแบบ *R*-1,3-butanediol (R13BD) ซึ่งเป็นสารที่มีมูลค่าทางอุตสาหกรรมจากสารชีวมวลเพื่อทดแทนการใช้สารตั้งต้นจากสารปิโครเคมี โดยการพัฒนาสายพันธุ์ของแบคทีเรีย recombinant ด้วย metabolic engineering และการใช้กระบวนการผลิตทางเทคโนโลยีชีวภาพ ผลการศึกษาในงานวิจัยนี้ ประสบความสำเร็จในการพัฒนาสายพันธุ์ของแบคทีเรีย recombinant ด้วยการใช้วิธีพันธุวิศวกรรม และการสร้างวิถีการผลิตที่มีประสิทธิภาพสำหรับการผลิต R13BD ด้วยวิธีชีวภาพจากกลูโคส โดยการสร้างพลาสมิดลูกผสมซึ่งประกอบด้วยยีน *phaA* (3-ketothiolase), *phaB* (NAD(P)H dependent acetoacetyl-CoA reductase) จากแบคทีเรีย *Ralstonia eutropha* NBRC 102504 และ *bld* (butyraldehyde dehydrogenase) จากแบคทีเรีย *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* ATCC 27012 และแสดงออกในแบคทีเรีย *E. coli* MG1655 $lacI^q$ โดยแสดงให้เห็นว่าการคัดเลือกยีนเป็นองค์ประกอบสำคัญซึ่งนำไปสู่การแสดงออกของการทำงานของเอนไซม์และการสร้างสารผลิตภัณฑ์ ในสภาวะการผลิตที่เหมาะสมสำหรับแบคทีเรีย recombinant ที่สร้างขึ้นสามารถผลิต R13BD ได้ถึง 9.05 กรัม/ลิตร (100.4

มิลลิโมลาร์) ซึ่งเป็นการผลิต R13BD ด้วยความเข้มข้นและความบริสุทธิ์สูงที่สุดจากที่มีการรายงานในปัจจุบัน จากนั้น ศึกษาสภาวะการผลิตและปัจจัยต่างๆ ที่ส่งเสริมการผลิตในระดับถังหมักขนาด 2 ลิตร เพื่อเป็นต้นแบบการผลิตในระดับขยายขนาดที่มีปริมาตรการผลิตที่ 1.0 ลิตร ภายใต้ระบบการหมักแบบ Fed-batch โดยใช้ข้อมูลข้างต้นเป็นข้อมูลเบื้องต้นนั้น และประสบความสำเร็จในการผลิตสาร R13BD ที่มีค่าความเข้มข้นสูงสุดของการผลิตได้ถึง 174.8 มิลลิโมลาร์ ค่าผลผลิต (yield) ที่ 0.372 โมลต่อโมลกลูโคสที่ใช้ และค่าอัตราการผลิตสูงสุด (maximum production rate) ที่ 3.90 มิลลิโมลาร์ต่อชั่วโมง ที่ระยะเวลาการหมักที่ 96 ชั่วโมง ซึ่งค่า titer, yield และ maximum production rate ที่ได้นี้สูงกว่าที่เคยมีรายงานมาก่อนถึง 1.74, 1.64 และ 3.05 เท่า นอกจากนั้นแล้ว สารผลิตภัณฑ์ที่ได้ดังกล่าวยังมีความบริสุทธิ์สูงและมีรูปแบบดังที่ต้องการ (ในที่นี้ คือ *R*-steriomer 13BD) โดยมี %ee ถึง 98.6 % ซึ่งเป็นค่าที่มีความบริสุทธิ์สูงสุดที่มีการรายงานมาก่อน

สำหรับการพัฒนากระบวนการผลิต 3-แมทิลแคทิคอล (3MC) จากสารชีวมวล โดยแบคทีเรียที่ทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์ แสดงตัวอย่างการพัฒนาแบคทีเรียแพลตฟอร์มสำหรับการผลิตสารเคมีไฮโดรคาร์บอนไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic chemical) คือ 3-แมทิลแคทิคอล (3MC) จากโทลูอีน และสารชีวมวลกลีเซอรัล ซึ่งสามารถดำเนินการได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยใช้แบคทีเรียทนตัวทำละลายอินทรีย์ (OST) ซึ่งเป็นแบคทีเรียดัดแปลงพันธุกรรม *P. putida* สายพันธุ์ TODE1 เป็นตัวเร่งชีวภาพ ในระบบการผลิตทางชีวภาพแบบการหมักสองเฟส การดำเนินการวิจัยเริ่มต้นจากการศึกษาการผลิตในระดับการผลิตขนาดเล็ก และศึกษาสภาวะและปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการเพิ่มผลผลิตของสารผลิตภัณฑ์เป้าหมาย ซึ่งรวมถึงชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ สารกระตุ้นเชื้อ สารกระตุ้น cofactor regeneration system ซึ่งมีผลอย่างมากในระบบที่มีการดัดแปรพันธุกรรม และ/หรือดัดแปลงวิถีการผลิตสาร นอกจากนั้นแล้ว เนื่องด้วยระบบการหมักนี้เป็นระบบสองเฟส จึงต้องมีการศึกษาชนิดและปริมาตรของตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสม ทั้งนี้ จาก response surface methodology-based central composite design และจากผลการศึกษา พิสูจน์ด้วยการทดลองจริง พบว่าประสบความสำเร็จในการพัฒนาระบบหมักที่ใช้ในการผลิตสาร 3MC ด้วยแบคทีเรียกลายพันธุ์ *Pseudomonas putida* T-57 สายพันธุ์ TODE1 ภายใต้ระบบการผลิตแบบสองเฟส โดยมี 1-เดคานอลเป็นชั้นของตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสม โดยมีการเติมกลีเซอรัลเป็นแหล่งคาร์บอนของเชื้อ, และพบว่าการเติม Mn^{2+} หรือ Fe^{2+} สามารถเพิ่มผลผลิตของ 3MC ได้อย่างมีนัยสำคัญ สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตโดยรวมของ 3MC ได้ถึง 34 มิลลิโมลาร์ ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่สูงที่สุดเมื่อเทียบกับงานวิจัยที่ผ่านมา จากนั้น การศึกษาการผลิตและปัจจัยต่างๆ ที่ส่งเสริมการผลิตในระดับถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่มีปริมาตรการผลิตที่ 0.8 ลิตร ด้วยระบบ Fed-batch fermentation โดยใช้ข้อมูลข้างต้นเป็นข้อมูลเบื้องต้นนั้น ประสบความสำเร็จในการผลิตสาร 3MC ได้ถึง 150 มิลลิโมลาร์ ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่สูงที่สุดเมื่อเทียบกับงานวิจัยที่ผ่านมา

ผลการศึกษาวิจัยนี้แสดงศักยภาพของการใช้แบคทีเรียแพลตฟอร์ม ซึ่งได้แก่แบคทีเรียทนทานต่อตัวทำละลายอินทรีย์ สำหรับการพัฒนาเป็นเชื้อเจ้าบ้านในการทำวิศวกรรมพันธุศาสตร์ และ/หรือวิศวกรรมเมแทบอลิซมเพื่อให้มีการแสดงออกของยีนและ/หรือวิถีของยีน และมีประสิทธิภาพสูงขึ้นในการผลิตสารผลิตภัณฑ์ไฮโดรคาร์บอนที่มีมูลค่าต่ออุตสาหกรรมในระบบ single phase และ/หรือ two-liquid (organic-aqueous) phase fermentation ทั้งนี้ ผลผลิตที่ได้จากการวิจัยนี้ได้แก่ ผลงานตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติจำนวน 4 เรื่อง (ภาคผนวก) และอยู่นระหว่างการพิจารณาเพื่อการตีพิมพ์อีก 1 เรื่อง

ส่วน ค ส่วนประกอบตอนท้าย

บรรณานุกรม

Aono, R., Kobayashi, H., Joblin, K.N., and Horikoshi, K. (1994) Effects of organic solvents on growth of Escherichia coli K-12. Biosci Biotechnol Biochem 58: 2009-2014.

Atsumi, S., and Liao, J.C. (2008) Metabolic engineering for advanced biofuels production from Escherichia coli. Curr Opin Biotechnol 19: 414-419.

BASF (2007) Financial Report (2005). In.

Boaz, N.W., Ponasik, J.A., and Large, S.E. (2006) Ruthenium complexes of phosphine-aminophosphine ligands. Tetrahedron Lett 47: 4033-4035.

Dien, B.S., Cotta, M.A., and Jeffries, T.W. (2003) Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status. Appl Microbiol Biotechnol 63: 258-266.

Faizal, I., Ohba, M., Kuroda, A., Takiguchi, N., Ohtake, H., Honda, K., and Kato, J. (2007) Bioproduction of 3-methylcatechol from toluene in a two-phase (organic-aqueous) system by a genetically modified solvent-tolerant Pseudomonas putida strain T-57. J Environ Biotech 7: 39-44.

Gibbs, P.A., and Seviour, R.J. (1996) Does the agitation rate and/or oxygen saturation influence exopolysaccharide production by Aureobasidium pullulans in batch culture? Appl Microbiol Biotechnol 46: 503-510.

Husken, L.E., Dalm, M.C., Tramper, J., Wery, J., de Bont, J.A., and Beeftink, R. (2001) Integrated bioproduction and extraction of 3-methylcatechol. J Biotechnol 88: 11-19.

Isken, S., and Bont, J.A.M.d. (1998) Bacteria tolerant to organic solvents. Extremophiles 2: 229-238.

Kataoka, N., Vangnai, A.S., Tajima, T., Nakashimada, Y., and Kato, J. (2013) Improvement of (R)-1,3-butanediol production by engineered Escherichia coli. J Biosci Bioeng 115: 475-480.

Kleman, G.L., and Strohl, W.R. (1994) Acetate metabolism by Escherichia coli in high-cell-density fermentation. Appl Environ Microbiol 60: 3952-3958.

Kongpol, A., Kato, J., and Vangnai, A.S. (2008) Isolation and characterization of Deinococcus geothermalis T27, a slightly thermophilic and organic solvent-tolerant bacterium able to survive in the presence of high concentrations of ethyl acetate. FEMS Microbiol Lett 286: 227-235.

Luli, G.W., and Strohl, W.R. (1990) Comparison of growth, acetate production, and acetate inhibition of Escherichia coli strains in batch and fed-batch fermentations. Appl Environ Microbiol 56: 1004-1011.

MacDonald, H.L., and Neway, J.O. (1990) Effects of medium quality on the expression of human interleukin-2 at high cell density in fermentor cultures of Escherichia coli K-12. Appl Environ Microbiol 56: 640-645.

Matsuyama, A., Kobayashi, Y., and Ohnishi, H. (1993) Microbial production of optically active 1,3-butanediol from 4-hydroxy-2-butanone. Biosci Biotechnol Biochem 348-349.

Matsuyama, A., Yamamoto, H., Kawada, N., and Kobayashi, Y. (2001) Industrial production of (R)-1,3-butanediol by new biocatalysts. J Mol Catal B-Enzym 11: 513-521.

Wery, J., Mendes da Silva, D.I., and Bont, J.A.M.d. (2000) A genetically modified solvent-tolerant bacterium for opimized production of a toxic fine chemical. Applied Microbiology and Biotechnology 54: 180-185.

Yamashita, S., Sameshima, Y., Konishi, M., Kato, J., Kishimoto, M., Honda, K. et al. (2007) Integrated biooxidation and acid dehydration process for monohyxylation of aromatics. Process Biochemistry 42: 46-51.

Zheng, R.C., Ge, Z., Qiu, Z.K., Wang, Y.S., and Zheng, Y.G. (2012) Asymmetric synthesis of (R)-1,3-butanediol from 4-hydroxy-2-butanone by a newly isolated strain Candida krusei ZJB-09162. Appl Microbiol Biotechnol 94: 969-976.

Zylstra, G.J., and Gibson, D.T. (1989) Toluene degradation by Pseudomonas putida F1. Nucleotide sequence of the todC1C2BADE genes and their expression in Escherichia coli. J Biol Chem 264: 14940-14946.

ผลงานจากโครงการวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

ผลงานที่ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ จำนวน 5 เรื่อง ดังนี้

1. Naoya Kataoka, Alisa S. Vangnai, Hiromitsu Ueda, Takahisa Tajima, Yutaka Nakashimada, and Junichi Kato (2014) Enhancement of (*R*)-1,3-butanediol production by engineered Escherichia coli using a bioreactor system with strict regulation of overall oxygen transfer coefficient and pH. BioSci Biotech Biochem. (Accepted).
2. Naoya Kataoka, Alisa S. Vangnai, Takahisa Tajima, Yutaka Nakashimada, and Junichi Kato (2013) Improvement of (*R*)-1,3-butanediol production by engineered *Escherichia coli*. Journal of Bioscience and Bioengineering 115(5), 475-480.
3. Naoya Kataoka, Takahisa Tajima, Junichi Kato, Wanitcha Rachadech, and Alisa S Vangnai (2011) Development of butanol-tolerant *Bacillus subtilis* strain GRSW2-B1 as a potential bioproduction host. Applied Microbiology and Biotechnology Express 30; 1(1), 10-21.
4. Kongpol A, Kato J, Tajima T, Vangnai AS. (2012) Characterization of Acetonitrile-Tolerant Marine Bacterium *Exiguobacterium* sp. SBH81 and Its Tolerance Mechanism. Microbes and Environments 27(1), 30-35.
5. Ajiraporn Kongpol, Junichi Kato, Takahisa Tajima, Thunyarat Pongtharangkul, & Alisa S. Vangnai (2014) Enhanced 3-methylcatechol production by *Pseudomonas putida* TODE1 in a two-phase biotransformation system (Accepted to Journal of General and Applied Microbiology)

รายละเอียดนักวิจัย

1. คณะผู้วิจัยฝ่ายไทย

1.1 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 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

1.3 นักวิจัยร่วมโครงการ (ภาษาไทย) **ดร. อจิราภรณ์ คงผล**

(ภาษาอังกฤษ) **AJIRAPORN KONGPOL**

ตำแหน่ง นิสิตระดับดุษฎีบัณฑิต
Email: akongpol@yahoo.com

2. คณะผู้วิจัยฝ่ายญี่ปุ่น

2.1 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

2.2 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

2.3 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