

Abstract

Ionic liquid (IL) has been used in biorefinery process of lignocellulose biomass due to its excellent properties in pretreatment to improve the enzymatic saccharification of lignocellulose in environmental-friendly manner. However, the major drawback of IL is the residual IL in hydrolysis reaction greatly reduce cellulase activities. In this project, three salt-tolerant bacterial strains, L2, D2 and D3, that previously isolated and identified to be *Bacillus* spp and *Halomonas* spp in our lab were aimed to be applied in biorefinery process with IL-consolidated process. The characterization and identification experiments on these homemade cellulases were conducted. The IL tolerance tests showed that L2, D2 and D3 could retained their activities to hydrolyze different cellulose and lignocellulose substrates in range of 80%-90% in 2.0 M IL condition, while efficiencies of commercial cellulase were reduced to only 20%-30% in ~1.6 M IL condition. The comparative enzyme kinetic study of commercial and homemade cellulase based on K_m and V_m in IL environment suggested the superior properties of homemade cellulase. The one-pot IL-consolidate process of conversion of rice straw to sugars were set up, and these homemade cellulase could perform better than conventional commercial cellulase for 5, 3 and 10 times. The mixed cellulase cocktails of L2, D2 and D3 were also formulated based on Lattice design with CMC, avicel and cellobiose substrates as representative of endoglucanase, exoglucanase and B-glucosidase to achieve the maximum of sugar yields. Interestingly, the mixed cellulase cocktails showed synergistic effect by improvement of sugar yields for 7.31%, 0.55% and 50% in CMCase, avicelase and cellobiase, respectively, suggesting the success of cocktail formulation. To validate cocktail formulation, the biogas production experiments were set up to monitor the effect of cocktail formulation, and it showed that the accumulated biogas was increased 1.32 times compared to control condition. In summary, the properties of cellulases produced from our salt-tolerance bacteria have good potential for application in "one-pot" biorefinery process using IL in the future.

Keywords: Cellulase; Ionic liquid tolerance, Biorefinery, Lignocellulosic biomass

บทคัดย่อ

สารไอออนิคลิควิดถูกนำมาใช้ในกระบวนการกลั่นทางชีวภาพสำหรับวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส เนื่องจากสารนี้มีประสิทธิภาพสูงในการใช้ปรับสภาพมวลเบื้องต้นเพื่อส่งเสริมปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ซึ่งเป็นสถานะที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม อย่างไรก็ตามหนึ่งในข้อจำกัดของไอออนิคลิควิดคือความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสหากมีการตกค้างในปฏิกิริยา โครงการนี้มุ่งหมายในการนำเอาแบคทีเรียที่มีความสามารถทนเกลือและผลิตเซลลูเลสได้ดีสามสายพันธุ์ที่ได้รับการคัดแยกมาจากแหล่งธรรมชาติก่อนหน้านี้คือสายพันธุ์ L2, D2 และ D3 ที่เป็นสายพันธุ์ *Bacillus* spp และ *Halomonas* spp เพื่อนำมาใช้ในกระบวนการกลั่นทางชีวภาพควบรวมขั้นตอนเดียว เอนไซม์ที่สกัดแยกออกมาจากสามสายพันธุ์นี้ได้ถูกนำไปทดสอบในปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่มีสารไอออนิคลิควิดความเข้มข้น 2.0 M และพบว่าเอนไซม์ทั้งสามนี้สามารถรักษาประสิทธิภาพไว้ได้มากกว่า 80%-90% ในขณะที่เอนไซม์เซลลูเลสทางการค้าที่มีขายในท้องตลาดกลับมีประสิทธิภาพลดลงเหลือเพียง 20%-30% ในสภาพที่มีไอออนิคลิควิดประมาณ 1.6 M จากนั้นเอนไซม์ทั้งสามและเอนไซม์ทางการค้าถูกนำไปศึกษาคุณสมบัติทางจลพลศาสตร์โดยเฉพาะค่า Km และ Vm ก็พบว่าเอนไซม์ที่ผลิตขึ้นมานี้มีค่าทางจลพลศาสตร์ในสภาพที่มีไอออนิคลิควิดเหมาะสมกว่าเอนไซม์ทางการค้า และเมื่อนำเอนไซม์ไปทดสอบในกระบวนการกระบวนการกลั่นทางชีวภาพควบรวมขั้นตอนเดียวที่ใช้ไอออนิคลิควิดในการปรับสภาพมวลเบื้องต้นก็พบว่าเอนไซม์ทั้งสามนี้มีค่าเอนไซม์จำเพาะสูงกว่าเอนไซม์ทางการค้า 5, 3 และ 10 เท่า จากนั้นเอนไซม์ทั้งสามถูกนำมาผสมกันจามหลักการออกแบบแพลตฟอร์มเพื่อให้ได้เอนไซม์สูตรที่สามารถผลิตน้ำตาลได้สูงสุด โดยทำการทดสอบกับสับสเตรตสามชนิดคือ CMC, avicel และ cellobiose ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นตัวบ่งชี้แอกติวิตีของ endoglucanase, exoglucanase และ B-glucosidase ได้ตามลำดับ โดยพบว่าสูตรที่ทำการพัฒนาขึ้นมานี้สามารถเพิ่มประสิทธิภาพของเอนไซม์ได้สูงขึ้น 7.31%, 0.55% และ 50% ตามลำดับ จากนั้นจึงได้นำเอาสูตรผสมเหล่านี้ไปทดสอบการปรับปรุงประสิทธิภาพการผลิตก๊าซชีวภาพจากฟางข้าวก็พบว่าสามารถเพิ่มการผลิตก๊าซได้ 1.32 เท่า ซึ่งผลการวิจัยในโครงการนี้ได้ทำการสาธิตให้เห็นถึงโอกาสและศักยภาพในการนำเอาเอนไซม์ทั้งสามชนิดนี้ไปทำการประยุกต์ใช้ในกระบวนการกลั่นทางชีวภาพควบรวมขั้นตอนเดียวต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ: เซลลูเลส, ความทนทานต่อไอออนิคลิควิด, กระบวนการกลั่นทางชีวภาพ, มวลลิกโนเซลลูโลส