

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: TRG5580015

ชื่อโครงการ: การพัฒนาระบบเอนไซม์เชิงซ้อนศักยภาพสูงสำหรับการย่อยสลายสารชีวมวลลิกโนเซลลูโลสอย่างมีประสิทธิภาพและเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตไบโอเอทานอล

ชื่อนักวิจัย: ดร. รัตติยา แววนุกุล มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

E-mail Address: rattiya.wae@kmutt.ac.th; rattiya_waeo@hotmail.com

ระยะเวลาโครงการ: 2555-2557

Clostridium thermocellum สายพันธุ์ S14 เป็นเซลล์โลไลติกแบคทีเรียชอบร้อนและไม่ใช้ออกซิเจนในการเจริญเติบโต คัดแยกได้จากกากตะกอนเยื่อกระดาษชานอ้อยในประเทศไทย สามารถผลิตกลุ่มเอนไซม์เชิงซ้อนที่เรียกว่าเซลล์ูโลโซมซึ่งมีความสามารถสูงในการย่อยสลายสารลิกโนเซลลูโลส เซลล์ูโลโซมจาก *C. thermocellum* S14 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์เซลล์ูเลสและเฮมิเซลล์ูเลสที่สูงมากและสูงกว่าเซลล์ูโลโซมที่ผลิตจาก *C. thermocellum* สายพันธุ์ ATCC27405 ซึ่งเป็นเชื้อที่มีการใช้ศึกษามากที่สุด และใช้เป็นเชื้อเปรียบเทียบ แต่อย่างไรก็ตาม ระบบการทำงานของเซลล์ูโลโซมถูกยับยั้งด้วยน้ำตาลเซลโลไบโอส ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์หลักจากการย่อย ดังนั้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของเซลล์ูโลโซมให้ดียิ่งขึ้น จำเป็นต้องมีการกำจัดน้ำตาลเซลโลไบโอสในปฏิกิริยา จากการทดลองพบว่าการใช้รีคอมบิแนนท์เอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสจากเชื้อ *Thermoanaerobacter brockii* ร่วมกับเซลล์ูโลโซมจาก *C. thermocellum* S14 ในการย่อยสลายเซลล์ูโลสชนิดผลึก ทำให้น้ำตาลเซลโลไบโอสที่สะสมถูกย่อยสลายส่งผลให้การย่อยสลายเซลล์ูโลสเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อนำมาย่อยฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยแอมโมเนีย โดยใช้ปริมาณเซลล์ูโลโซม 2 มิลลิกรัมโปรตีนต่อกรัมกลูแคน และเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส 10 ยูนิต พบว่าน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยฟางข้าวสูงถึง 91% และน้ำตาลที่ได้สามารถนำมาหมักเพื่อเปลี่ยนเป็นเอทานอลได้ด้วยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* โดยไม่เกิดการยับยั้งใดๆในกระบวนการหมัก และได้ผลผลิตของเอทานอลสูงถึง 95% นอกจากนี้เพื่อเป็นการลดปริมาณการใช้เอนไซม์ในกระบวนการย่อยลง ได้ทำการออกแบบระบบการนำเอนไซม์กลับมาใช้ใหม่ในกระบวนการผลิตน้ำตาลจากสารชีวมวล โดยทำการดัดแปลงเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส CgIT ให้มีคุณสมบัติในการยึดเกาะกับโพลีแซคคาไรด์ที่ไม่ละลายน้ำ โดยทำการเชื่อมต่อยีน CBM3 ของเซลล์ูโลโซมเข้าที่ปลาย N-terminal ของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส CgIT พบว่าเมื่อนำเซลล์ูโลโซมและเอนไซม์ดัดแปลงเบต้ากลูโคซิเดส CBM3-CgIT มาใช้ในระบบการนำเอนไซม์กลับมาใช้ใหม่ในกระบวนการผลิตน้ำตาลจากสารชีวมวล พบว่าเซลล์ูโลโซมและเอนไซม์ดัดแปลงเบต้ากลูโคซิเดส CBM3-CgIT หลังจากการย่อยเซลล์ูโลสและฟางข้าว สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้อีก 4 รอบ และยังคงประสิทธิภาพในการย่อยและผลิตน้ำตาลกลูโคสได้สูง จากงานวิจัยนี้ได้แสดง ระบบการทำงานของเอนไซม์เชิงซ้อนเซลล์ูโลโซมและเอนไซม์ดัดแปลงเบต้ากลูโคซิเดส CBM3-CgIT ที่ไม่เพียงเป็นระบบเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสารชีวมวล แต่ยังสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้อีกหลายรอบโดยยังคงประสิทธิภาพการทำงานได้ดี ทำให้อาจลดปริมาณการใช้เอนไซม์ในกระบวนการผลิตน้ำตาลจากสารชีวมวลได้อีกด้วย

คำสำคัญ: เซลล์ูโลโซม สารชีวมวลลิกโนเซลลูโลส เอนไซม์เชิงซ้อน

Abstract

Project code: TRG5580015

Project title: Development of Hyperactive Multienzyme Complex System for Effective Lignocellulosic Biomass Degradation and Application in Bioethanol Industries

Investigator: Dr. Rattiya Waeonukul King Mongkut's University of Technology Thonburi

E-mail Address: rattiya.wae@kmutt.ac.th; rattiya_waeo@hotmail.com

ระยะเวลาโครงการ: 2012-2014

Clostridium thermocellum strain S14, an anaerobic, thermophilic bacterium, isolated from bagasse paper sludge in Thailand, produces the multienzyme complex cellulosome with strong lignocellulose degrading ability (Tachaapaikoon et al., 2011). The cellulosomes from *C. thermocellum* S14 showed higher activity against microcrystalline cellulose and hemicellulose than the cellulosomes from the best-studied type strain, *C. thermocellum* ATCC27405. However, to bring out the maximum cellulolytic ability of the cellulosomes, it is necessary to eliminate the end product inhibition by cellobiose. Combinations of β -glucosidases from thermophilic anaerobic bacteria and *C. thermocellum* S14 cellulosomes were evaluated for optimization of cellulose degradation. β -Glucosidase (CglT) from *Thermoanaerobacter brockii*, in combination with cellulosomes, exhibited remarkable saccharification ability for microcrystalline cellulose. When aqueous ammonia soaked rice straw was hydrolyzed by an enzyme loading combination of 2 mg cellulosome and 10 units CglT per g glucan, 91% of glucan was hydrolyzed to glucose. Hydrolysates from rice straw hydrolysis by the combination of cellulosome and β -glucosidase also could be fermented to ethanol by yeast *Saccharomyces cerevisiae* without any inhibitions in theoretical yield of approximately 95%. Furthermore, to recover cellulosome and CglT through re-binding to additional cellulose, a chimeric CBM3–CglT was created by fusing family 3 carbohydrate binding module (CBM3) from the scaffolding protein CipA into the N-terminal region of CglT. When a recycling test using cellulosome and CBM3–CglT was performed on microcrystalline cellulose When a recycling test using cellulosomes and CBM3–CglT was performed on microcrystalline cellulose and pretreated rice straw, the process was capable of 4 rounds of recycling (1% w/v cellulose/round), consistent with a high saccharification yield. This novel recycling method using a combination of cellulosome and CBM3–CglT, contribute to establishing a cost-effective lignocellulose saccharification process, as a result of reduced enzyme loading, indicating this recycling system has great potential as an effective lignocellulose degradation system.

Keywords: Cellulosome, Lignocellulosic biomass, Multienzyme complex