บทคัดย่อ

ชื่อเรื่องโครงการวิจัย การประยุกต์ใช้ PEG-NAD ในปฏิกรณ์เอนไซม์แบบต่อเนื่องในการผลิตบิวทานอลจากผลิตผลของการหมักที่อาศัยแบคทีเรียจากดินไทย

ชื่อผู้เขียนรายงานการวิจัย รองศาสตราจารย์ ดร.สุรีย์ ฟูตระกูล

การประยุกต์ใช้เอนไซม์ที่ต้องการ NAD(H) เป็นโคเอนไซม์ในอุตสาหกรรมอย่างมีประสิทธิภาพนั้นต้องหมุนเวียนใช้โคเอนไซม์ที่ราคาแพงได้ใหม่อย่างต่อเนื่องเช่นเดียวกับเอนไซม์ จึงได้สังเคราะห์ NAD ให้มีโมเลกุลใหญ่ขึ้นและทดลองนำเอาโพลีเอธิลีนไกลคอลยาวต์เอนเอดี (PEG-NAD) ที่สังเคราะห์ได้มาศึกษาการทำหน้าที่เป็นโคเอนไซม์เทียบกับ NAD พบว่าประสิทธิภาพของ PEG-NAD ในปฏิกิริยาของเอนไซม์แลคเทตดีไฮโดรจิเนสจากหัวใจหมูและอัลกอฮอลดีไฮโดรจิเนสจากยีสต์เป็น 79 และ 90 % ของตามลำดับ เมื่อนำ PEG-NAD นี้ไปลองใช้ในปฏิกรณ์เอนไซม์แบบต่อเนื่องที่มีเมมเบรนกั้นซึ่งกักเอนไซม์ดีไฮโดรจิเนสทั้งสองชนิดข้างต้นและ PEG-NAD ในสารละลาย pH 7.5 ไว้ในปฏิกรณ์ที่อุณหภูมิ 30° แล้วผ่านสารละลายสับสเตรทเข้าไปอย่างต่อเนื่อง ผลผลิตที่ได้และสับสเตรทที่เหลือจะผ่านเมมเบรนออกมาได้ ไพรูเวทที่ผลิตจากแลคเททและเอธานอลจากอะเซทาลดีไฮด์เกิดขึ้นในปริมาณที่ต่ำและลดลงเรื่อย ๆ ตามเวลาเนื่องจากใส่เอนไซม์น้อยไปและเอนไซม์เองก็มีแอคทิวิตี้ลดลงตามเวลาด้วย นอกจากนี้ภาวะที่ใช้สำหรับปฏิกิริยาในปฏิกรณ์อาจยังไม่เหมาะสม ส่วน PEG-NAD นั้นเสถียรในปฏิกรณ์เอนไซม์ได้นานกว่า 200 ชั่วโมง ผลการทดลองสรุปได้ว่า PEG-NAD ที่สังเคราะห์ขึ้นสามารถจะนำไปใช้เป็นโคเอนไซม์ในปฏิกรณ์เอนไซม์แบบต่อเนื่องได้ดีและมีความเสถียรมาก แต่การที่จะให้ปฏิกรณ์ดังกล่าวผลิตสารได้เต็มประสิทธิภาพนั้น จำเป็นต้องศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับสภาวะที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาแบบหมุนเวียนในปฏิกรณ์เอนไซม์นั้น

การศึกษาเอนไซม์อัลกอฮอลดีไฮโดรจิเนสจากแบคทีเรียที่ผลิตอัลกอฮอลพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ Bacillus licheniformis ที่แยกจากดินไทยสามารถผลิตบิวทานอลได้และได้ลองสกัด crude enzyme พบว่ามีความจำเพาะต่อบิวทานอลด้วยและใช้ PEG-NAD เป็นโคเอนไซม์ได้แต่มีปริมาณของเอนไซม์ต่ำมากไม่พอที่จะนำมาแยกให้บริสุทธิ์ จึงเปลี่ยนไปศึกษาแบคทีเรียสายพันธุ์ Clostridium sp. isolate 7M9

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

พบว่าสามารถผลิตบิวทานอลได้สูงกว่ามากในน้ำเลี้ยงที่เป็นกากน้ำตาล-รำข้าว และมี activity ของ ADH สูงจึงได้ทำการเลี้ยงแบคทีเรียนี้ในกากน้ำตาล-รำข้าว ที่อุณหภูมิ 30° ซ เป็นเวลา 20 ชั่วโมง เพื่อสกัดเอนไซม์ crude เอนไซม์ที่ได้นำมาศึกษาสมบัติเบื้องต้นพบว่ามีความจำเพาะต่อสับสเตรทที่เป็นอัลกอฮอล์ในช่วงกว้างโดยวัดทั้งจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของ NADH และรีดักชันของ NAD^+ เอนไซม์นี้จะเสถียรถึงอุณหภูมิ 40° ซ เมื่อทำให้ร้อนนาน 10 นาที และที่อุณหภูมิประมาณ 50 - 60° ซ activity จะลดลง 50 % และที่ 70° ซ จะไม่มีแอคติวิตี้เหลือเลย ที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยารีดักชันของ NAD^+ คือ pH 10 ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์ จะประมาณ 35° ซ crude เอนไซม์ ADH นำไปแยกให้บริสุทธิ์โดยโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออนเจลฟิลเตรชันและ Affinity ใน Blue Sephasose 6B ตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยทำ polyacrylamide gel electrophoresis พบว่ามีความบริสุทธิ์ขึ้นประมาณ 112 เท่า และ yield ที่ได้ 1 %

Purified ADH นี้สามารถใช้ PEG-NAD เป็นโคเอนไซม์ได้ เมื่อนำ PEG-NAD ที่สังเคราะห์ขึ้น และ purified ADH ไปประยุกต์ใช้ในปฏิกรณ์เอนไซม์แบบต่อเนื่องที่มีเมมเบรนกั้นในการผลิตบิวทานอลจากกรดบิวทิริกโดยอาศัยปฏิกิริยาควบคู่ของ LDH ที่เปลี่ยนแลกเทตเป็นไพรูเวท ที่ pH 9.0 และอุณหภูมิ 30° ซ พบว่าเอนไซม์ทั้งสองชนิดและ PEG-NAD มีความเสถียรหลังจาก activity ลดลงเป็น 90 % ตลอด 7 วันที่ทำการทดลอง แต่ผลผลิตคือ เอซาทอลและไพรูเวทนั้นค่อนข้างต่ำเนื่องจากเอนไซม์ที่ใช้น้อยไปและขาดความสมดุลระหว่างปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ทั้งสองชนิดและปริมาณสับสเตรทตลอดจนอัตราเร็วในการผ่านสับสเตรทเข้าไปในปฏิกรณ์ การเพิ่มประสิทธิภาพของปฏิกรณ์เอนไซม์ ในการผลิตบิวทานอลให้ได้เต็มประสิทธิภาพต้องศึกษารายละเอียดเพิ่มเติมเกี่ยวกับสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเกิดปฏิกิริยาในปฏิกรณ์เอนไซม์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Abstract

Title : Application of PEG-NAD in a Continuous Enzyme Reactor for Butanol Production Using Fermentation Products of Bacteria from Thai Soil as Substrate

Report by: Dr.Suree Phutrakul

The efficient industrial application of NAD(H) dependent enzyme systems is the repeated use of the expensive coenzyme by regeneration. The molecular-weight enlarged NAD(H) was synthesized and the kinetic constants of the synthesized polyethyleneglycol-bound NAD (PEG-NAD) was studied compared to NAD. The coenzymic activities of PEG-NAD were 79 and 90 % of NAD for pig heart lactate dehydrogenase (LDH) and yeast alcohol dehydrogenase (ADH) respectively. The potential application of PEG-NAD was tested in a continuous enzyme membrane reactor retaining an aqueous solution pH 7.5 of ADH, LDH and PEG-NAD within ultrafiltration membrane reactor at 30°C, while the reaction products and unreacted substrates pass through. The production of pyruvate from L-lactate and ethanol from acetaldehyde was low compared to the amount of the substrates and gradually decrease according to time due to enzyme insufficiency, the decrease in enzymic activities and the unsuitable reaction conditions. However, PEG-NAD could be stable in the reactor longer than 200 hours under the experimental condition. The results implicated that the synthesized PEG-NAD functioned as an efficient coenzyme analogue and quite stable. To get maximal productivity, more basic research into the reaction conditions in the reactor is needed.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Alcohol dehydrogenases from alcohol producing bacteria were studies for their application in butanol production. A bacteria, Bacillus licheniformis isolated from Thai soil could produced butanol and the extracted crude enzyme showed specificity to butanol and could use PEG-NAD as coenzyme but the amount of the enzyme was not enough for purification. Therefore the bacteria Clostridium licheniformis isolate 7M9 was stucied and found that it could produce high concentration of butanol in the media containing molasses-rice bran and show high ADH activity. This bacteria was then cultured in molasses-rice bran at 30°C for 20 h for enzyme extraction. The preliminary study of the crude ADH found that it had wide range of substrate specificity when assayed from both oxidation of NADH and reduction of NAD^+. The enzyme would stable upto 40°C by heating for 10 min and its activity decreased to 50 % at 50°C and completely loss at 70°C The optimum pH for the reduction was found to be 10 and the optimal temperature was found to be 35°C. The crude ADH was then purified by ionexchange gel, filtration and affinity chromatography and the purity was checked by polyacrylamide gel electrophoresis. The enzyme was purified to about 122 folds with 1 % yield.

The purified enzyme could use PEG-NAD as its coenzyme. The synthesized PEG-NAD and the purified ADH was used in a continuous enzyme membrane reactor to produce butanol from butyric acid using the coupled reaction of the production of pyruvate from L-lactate by LDH at pH 9.0 30°C. Both enzymes and PEG-NAD could be stable after their activities decrease to about 90 % throughout the experimental periods (7 days). However, the production of ethanol and pyruvate was low due to enzyme insufficient and imbalance between

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

amount of the enzymes and substrates and the rate of passing the substrate solution into the reactor. More research into the reaction conditions in the enzyme reactor should be carried out to get maximum productivity.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved