ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การประยุกต์ใช้โพลีเอธิลีนไกลคอลบาวด์เอนเอดีในปฏิกรณ์เอนไซม์แบบต่อเนื่อง เพื่อผลิตบิวทานอล

ชื่อผู้เขียน นางสาววันเพ็ญ เหล่าศรีไพบูลย์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์ :

รศ.ดร. สุรีย์	ฟูตระกูล	ประธานกรรมการ
รศ.ดร. พูนศุข	ศรีโยธา	กรรมการ
ผศ.ดร. ศิริรัตน์	สาระเวก	กรรมการ

บทคัดย่อ

การประยุกต์ใช้เอนไซม์ที่ต้องการเอนเอดีเป็นโคเอนไซม์ในอุตสาหกรรมอย่างมีประสิทธิภาพนั้น ต้องหมุนเวียนใช้โคเอนไซม์ที่มีราคาแพงได้ใหม่อย่างต่อเนื่องเช่นเดียวกับเอนไซม์ จึงได้สังเคราะห์เอนเอดีให้มีขนาดโมเลกุลที่ใหญ่ขึ้นในรูปของโพลีเอธิลีนไกลคอลบาวด์เอนเอดี (PEG-NAD) และนำมาใช้ร่วมกับเอนไซม์อัลกอฮอล์ดีไฮโดรจิเนส (ADH) ที่สกัดได้จาก Clostridium sp. isolate 7M9 เพื่อนำไปใช้ในปฏิกรณ์เอนไซม์แบบต่อเนื่องที่มีเมมเบรนกั้นเพื่อผลิตบิวทานอล เอนไซม์อัลกอฮอล์ดีไฮโดรจิเนสที่สกัดได้จากแบคทีเรียที่เลี้ยงในกากน้ำตาล-รำข้าว ที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมงนี้ เมื่อถูกทำให้บริสุทธิ์แล้วโดยผ่าน DEAE-Sephadex A-50, Sephadex G-200 และ Blue-Sepharose CL-6B คอลัมน์โครมาโตกราฟฟี โดยเลือกเก็บเฉพาะส่วนที่มีความจำเพาะต่อบิวทานอลสูง พบว่าเอนไซม์จะมีความบริสุทธิ์ขึ้น 106 เท่า มีเปอร์เซนต์ผลผลิตในรูปของแอคติวิตี 4.2% polyacrylamide gel electrophoresis pattern ของเอนไซม์อัลกอฮอล์ดีไฮโดรจิเนสที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว แสดงแถบโปรตีนสองแถบที่มีแอคติวิตีซึ่งมีความจำเพาะต่อบิวทานอลสูงที่สุดเหมือนกัน เมื่อหามวลโมเลกุลโดยวิธี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis และเจลฟิลเตรชัน พบว่ามีค่าใกล้เคียงกัน คือประมาณ 55,000 และ 32,000 อุณหภูมิที่เหมาะในการทำงานของเอนไซม์อัลกอฮอล์ดีไฮโดรจิเนสคือ 38 °ซ และ pH ที่เหมาะสมคือ 10 และ 9 เมื่อใช้บิวทานอล-1 และกรดบิวทิริกเป็นสับสเตรทตามลำดับ เอนไซม์นี้จะเสถียรถึงอุณหภูมิประมาณ 40 °ซ เมื่อทำให้ร้อนนาน 10 นาที และเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นแอคติวิตีของเอนไซม์จะลดลงเรื่อย ๆ จนเสียสภาพไปเมื่ออุณหภูมิถึง 70 °ซ ค่าคงที่ทางจลนศาสตร์ของเอนไซม์นี้ มีค่า K_m = 0.16 โมลาร์ V_{max} = 0.159 ไมโครโมล/นาที เมื่อใช้บิวทานอล-1 เป็นสับสเตรท และ K_m = 0.10 โมลาร์ V_{max} = 0.174 ไมโครโมล/นาที เมื่อใช้กรดบิวทิริกเป็นสับสเตรท การทดสอบแนวโน้มการใช้ PEG-NAD เป็นโคเอนไซม์ของเอนไซม์อัลกอฮอล์ดีไฮโดรจิเนสจากแบคทีเรีย และเอนไซม์แลคเตทดีไฮโดรจิเนสจากหัวใจหมูเทียบกับเอนเอดี พบว่ามีประสิทธิภาพเป็น 82% และ 79% ของเอนเอดีตามลำดับ ทั้งเอนไซม์อัลกอฮอล์ดีไฮโดรจิเนส, แลคเตทดีไฮโดรจิเนส และ PEG-NAD มีความเสถียรถึง 48 ชั่วโมงในสารละลายที่เป็นด่าง (pH∼9-11) ที่ 30 °ซ เมื่อนำ PEG-NAD และเอนไซม์อัลกอฮอล์ดีไฮโดรจิเนสไปใช้ในปฏิกรณ์เอนไซม์แบบต่อเนื่องเพื่อผลิตบิวทานอลจากกรดบิวทิริกที่ pH 9 โดยอาศัยปฏิกิริยาควบคู่ของเอนไซม์แลคเตทดีไฮโดรจิเนส ในการเปลี่ยนแลคเตทเป็นไพรูเวทเพื่อหมุนเวียนใช้ PEG-NAD(H) ในปฏิกรณ์เอนไซม์ได้อย่างต่อเนื่อง พบว่าผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นคือ ไพรูเวทและบิวทานอลนั้น จะมีปริมาณไม่คงที่ และเมื่อมีการเติมเอนไซม์อัลกอฮอล์ดีไฮโดรจิเนส ปริมาณของไพรูเวทและบิวทานอลจะเพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะบิวทานอลจะเพิ่มขึ้นถึง 80% ในช่วงแรก และค่อย ๆ ลดลง ในช่วงสุดท้ายที่มีการเติมเอนไซม์อัลกอฮอล์ดีไฮโดรจิเนส พบว่าทั้งไพรูเวทและบิวทานอลจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ทั้งเอนไซม์อัลกอฮอล์ดีไฮโดรจิเนส, แลคเตทดีไฮโดรจิเนส และ PEG-NAD สามารถทำงานในปฏิกรณ์เอนไซม์ได้นานเกินกว่า 120 ชั่วโมง (∼ 5 วัน) โดยที่ทั้งเอนไซม์อัลกอออล์ดีไฮโดรจิเนส และแลคเตทดีไฮโดรจิเนสมีแอคติวิตีเหลืออยู่ถึง 90% และ PEG-NAD มีความเข้มข้นเหลืออยู่ 78% เนื่องจากปริมาณบิวทานอลที่ได้ยังต่ำอยู่ จึงมีการปรับปรุงสภาวะต่าง ๆ เพื่อให้เหมาะสมขึ้น โดยการปรับปรุงในครั้งแรก มีการเพิ่มปริมาณเอนไซม์ทั้งสองชนิดและโคเอนไซม์ PEG-NAD ให้มากขึ้น รวมทั้งเพิ่มความเข้มข้นของสับสเตรท และ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ที่ใช้ พบว่าปริมาณไพรูเวทและบิวทานอลจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ในช่วงเวลาต่าง ๆ ได้มีการลองเติมโคเอนไซม์ PEG-NAD และเอนไซม์ทั้งสองชนิด พบว่าการเติม PEG-NAD จะทำให้ปริมาณไพรูเวทและบิวทานอลเพิ่มขึ้นอีกเล็กน้อย แต่การเติมเอนไซม์ทั้งสองชนิดจะไม่มีผลทำให้ผลผลิตเพิ่มขึ้น เมื่อเวลาผ่านไปแอคติวิตีของเอนไซม์และโคเอนไซม์จะลดลงเรื่อย ๆ เนื่องจากที่บัฟเฟอร์ความเข้มข้นสูง ๆ เอนไซม์และโคเอนไซม์จะไม่เสถียรและทำการเร่งปฏิกิริยาได้ไม่ดี ปริมาณบิวทานอลจึงไม่เพิ่มขึ้น เมื่อมีการปรับปรุงสภาวะต่าง ๆ เพื่อให้เหมาะสมใหม่อีกครั้ง โดยใช้ปริมาณสับสเตรทและความเข้มข้นของบัฟเฟอร์เท่าครั้งแรก แต่เพิ่มปริมาณเอนไซม์ทั้งสองชนิดและโคเอนไซม์ พบว่าการเพิ่มเอนไซม์และโคเอนไซม์จะทำให้ปริมาณไพรูเวทและบิวทานอลเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในช่วงแรก เมื่ออัตราการไหลของสารที่ออกจากปฏิกรณ์เอนไซม์ลดลงเนื่องจากเมมเบรนอุดตันบางส่วน จะมีบิวทาริลดีไฮด์เกิดขึ้น และจะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ส่วนปริมาณบิวทานอลก็จะลดลง จนถึงชั่วโมงที่ 134 จะไม่มีบิวทานอลเกิดขึ้นเลย จากผลการทดลองนี้สรุปได้ว่า PEG-NAD ที่เตรียมขึ้น และเอนไซม์อัลกอฮอล์ดีไฮโดรจิเนสที่สกัดได้ สามารถนำไปใช้ในปฏิกรณ์เอนไซม์แบบต่อเนื่องเพื่อผลิตบิวทานอลได้ดี แต่อาจจะต้องมีการปรับปรุงสภาวะต่าง ๆ ให้เหมะสมขึ้นอีก เพื่อที่จะผลิตบิวทานอลได้อย่างเต็มประสิทธิภาพ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title Application of Polyethylene Glycol-bound NAD in a Continuous Enzyme Reactor for Butanol Production

Author Ms. Vanpen Laosripaiboon

M.S. Chemistry

Examining Committee :

Assoc. Prof. Dr. Suree Phutrakul Chairman

Assoc. Prof. Dr. Poonsook Sriyotha Member

Assist.Prof. Dr. Sirirat Sarawek Member

Abstract

The efficient industrial application of NAD dependent enzyme system is the repeated use of the expensive coenzyme by regeneration. The molecular weight enlarged NAD was synthesized in the form of polyethyleneglycol-bound NAD (PEG-NAD) and used as a coenzyme of alcohol dehydrogenase (ADH) from Clostridium sp. isolate 7M9 in a continuous enzyme membrane reactor for butanol production. ADH from the bacteria culturedin molasses-rice bran at 37 ^{o}C for 24 h. was purified by DEAE-Sephadex A-50, Sephadex G-200 and Blue-Sepharose CL-6B column chromatography and only fractions that had high specificity to butanol were collected. The enzyme was purified to 106 folds with the yield of 4.2%. Polyacrylamide gel electrophoresis pattern of the purified ADH showed two protein bands, both contained ADH activity with high specificity to butanol.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

The molecular weight determination of the two protein bands by SDS--polyacrylamide gel electrophoresis and gel filtration gave the same results which were estimated to be about 55,000 and 32,000. The optimum temperature for ADH activity and optimum pH were 10 and 9 when used butanol-1 and butyric acid as substrate respectively. This enzyme was stable up to 40 ^{o}C by heating for 10 min and all the activity was lost at 70 ^{o}C. Kinetic constant of ADH by using butanol-1 and butyric acid as substrate were K_m 0.16, 0.10 M and V_{max} 0.159, 0.174 (μmole/min) respectively. The possibility of using polyethyleneglycol-bound NAD as coenzyme of alcohol dehydrogenase from bacteria and lactate dehydrogenase from pig heart (LDH) were tested and compared to NAD and found that the coenzymic activities of PEG-NAD were 82 % and 79 % of NAD respectively. The alcohol dehydrogenase , Lactate dehydrogenase and PEG-NAD were stable for 48 h. or longer in alkali solution (pH ∿ 9-11) at 30 ^{o}C. When both enzymes and coenzyme were used in a continuous enzyme reactor for butanol production at pH 9, the production of pyruvate from lactate and butanol from butyric acid were not constant. Addition of more ADH into the reaction mixture could increase the products especially the butanol production was increased to 80% and then decreased The ADH, LDH and PEG-NAD could be used in the enzyme reactor for longer than 120 h. (∿ 5 days). Both enzyme activities remained at about 90% of that of their original activities and the PEG-NAD concentration remained about 78%. Since the production of butanol was low, two improvements of the reactions were tried. Firstly, the condition was changed by increasing the

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

amount of both enzymes, coenzyme and substrate in higher concentration of phosphate buffer. The production of butanol and pyruvate were slightly increased at the begining and then decreased. The addition of more PEG-NAD could slightly increase the production. On the other hand the addition of more enzyme could not increase the production and the activities of both enzymes and coenzyme were also decreased which might be caused by high buffer concentration. The second improvement was done by using the substrate and buffer concentration as before but increasing the amount of enzymes and coenzyme. This time the products were increased. Accidentally, when the flow rate of the system dropped, butyraldehyde was produced with low butanol production and no butanol was detected after 134 h.

The results indicate that the synthesized PEG-NAD, the extracted ADH can be used in a continuous enzyme membrane reactor for butanol production. To get the maximal productivity more basic research into the reaction conditions in the reactor is needed.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved