เมทินี วสุนธราวัฒน์ : การปรับสภาพของฟางข้าวต่อการผลิตบิวทานอลโดยเชื้อ *CLOSTRIDIUM ACETOBUTYLICUM* (TREATMENT OF RICE STRAW FOR BUTANOL PRODUCTION BY *CLOSTRIDIUM ACETOBUTYLICUM*)
อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุนทร กาญจนทวี, 258 หน้า.

โครโมโซมของ *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล (ABE) มียีนที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสที่เรียกว่า *cel48A* ซึ่งอยู่ในรูปที่ไม่สามารถแสดงกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยคริสตัลไลน์เซลลูโลสได้ ในการศึกษานี้ได้พยายามแทนที่ยีน *cel48A* ด้วยยีนพันธุ์ลูกผสมที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสซึ่งสามารถแสดงแอคติวิตีของเอนไซม์และย่อยคริสตัลไลน์เซลลูโลสได้ที่เรียกว่า *SAFA* hybrid gene ในโครโมโซมของ *Cl. acetobutylicum* ATCC 824 Δ*cac1502*Δ*upp*Δ*cel48A* mutant โดยคาดหวังที่จะได้สายพันธุ์ลูกผสมใหม่ที่มีความสามารถทั้งย่อยเซลลูโลสและใช้น้ำตาลจากการย่อยเซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตบิวทานอลได้ อย่างไรก็ตามโคลนที่ได้ไม่แสดงการสอดแทรกของ *SAFA* hybrid gene บนโครโมโซม ความเป็นไปได้ของปัญหานี้น่าจะเกี่ยวข้องกับโครงสร้างที่ไม่เหมาะสมของ integration plasmid ที่ได้สร้างขึ้นในส่วนของ strong promoter และ reporter system การขาด scaffolding หรือ cohesion ที่ทำงานร่วมกันแบบเสริมสร้างซึ่งกันและกันระหว่าง cellulosome gene ในโครโมโซมและยีนพันธุ์ลูกผสม *SAFA* รวมถึงการขัดขวางระบบการขับเอนไซม์ภายในเซลล์โดย precursor ของยีนพันธุ์ลูกผสม *SAFA*

ในส่วนของแหล่งคาร์บอนสำหรับ *Cl. acetobutylicum* เพื่อใช้ในกระบวนการหมักสำหรับการสร้าง ABE นั้น เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสในฟางข้าวสามารถใช้เป็นสารตั้งต้น ทางเลือกใหม่สำหรับเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานให้กับ *Cl. acetobutylicum* ได้เมื่อฟางข้าวได้ถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปน้ำตาลที่ใช้ในกระบวนการหมักดังนั้นจึงทำการศึกษาถึงประสิทธิภาพของ Pretreatment โดยวิธีที่ต่างกันต่อคุณภาพของเซลลูโลสจากฟางข้าวที่ผลิตได้และสภาวะที่เหมาะสมของการเปลี่ยนเซลลูโลสจากฟางข้าวเป็นน้ำตาลที่ใช้ในกระบวนการหมักโดยวิธีการย่อยด้วยเอนไซม์หรือจุลินทรีย์หรือสารเคมี ผลการทดลองทำให้ทราบว่า วิธี A2WB1 pretreatment มีประสิทธิภาพสูงสุดในการปรับโครงสร้างของเซลลูโลสของฟางข้าวเมื่อเทียบกับวิธีอื่น ปริมาณที่เหมาะสมของเอนไซม์เซลลูเลสอย่างหยาบเพื่อให้ได้น้ำตาลรวมทั้งหมดที่มากที่สุด (96.83±1.25 g/L, เรียกน้ำตาลนี้ว่า GE) จากกระบวนการ saccharification คือ 0.7 มิลลิลิตรต่อกรัมเซลลูโลสแห้ง A2WB1 ส่วนการย่อยเซลลูโลสโดยจุลินทรีย์ พารามิเตอร์ที่สำคัญ ได้แก่ ความเข้มข้นของเซลลูโลส ความเข้มข้นของไนโตรเจนจากกากยีสต์แห้งจากโรงงานเบียร์ อุณหภูมิในการเลี้ยง และการเขย่าของผสมมีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อการเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลที่ผลิตได้หลังการเลี้ยง *Cl. cellulolyticum* DSM 5812

สำหรับการผลิตน้ำตาลไซโลสโดยกระบวนการย่อยฟางข้าวด้วยกรดสองครั้งทำให้ได้สารละลายไฮโดรไลเสท (ที่เรียกว่า ARSH) ซึ่งมีน้ำตาลทั้งหมด 44.67 กรัมต่อลิตร

ลำดับต่อมาได้ทำการศึกษาการผลิต ABE จากน้ำตาลไซโลสที่อยู่ใน ARSH ซึ่งได้ผ่านกระบวนการกำจัดสารพิษด้วยวิธีการต่างกัน ผลการทดลองสามารถสรุปได้คือ *Cl. acetobutylicum* ATCC 824 สามารถการเจริญและผลิตสารละลาย ABE ได้มากที่สุดใน ARSH ที่ผ่านการกำจัดสารพิษด้วยวิธี over-titration plus activated charcoal absorption สุดท้ายทำการศึกษาการใช้ *Cl. acetobutylicum* ร่วมสองสายพันธุ์คือ *Cl. acetobutylicum* ATCC 824 และ *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 และใช้น้ำตาล GE เพื่อปรับปรุงการผลิต ABE ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของ ABE ที่ผลิตได้จากการกระบวนการหมักแบบกะที่ใช้เชื้อสองสายพันธุ์ร่วมกันมีค่าต่ำกว่ากระบวนการหมักเดียวกันแต่ใช้เชื้อเพียงชนิดเดียวอย่างไรก็ตามผลผลิตและความเข้มข้นของ ABE มากที่สุดที่ผลิตได้โดยเชื้อชนิดเดียวที่ใช้น้ำตาล GE มีค่าสูงกว่าวิธีการหมักเดียวกันที่ใช้น้ำตาลกลูโคสในเชิงการค้า สรุปภาพโดยรวมทั้งหมดของการศึกษากล่าวได้ว่า ฟางข้าวมีศักยภาพที่จะใช้เป็นสารตั้งต้นจำพวกลิกโนเซลลูโลสในการผลิตบิวทานอลในกระบวนการหมักแบบกะด้วย *Cl. acetobutylicum* ATCC 824 และ TISTR 1462 ได้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2556 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____

METINEE WASOONTHARAWAT : TREATMENT OF RICE STRAW FOR BUTANOL PRODUCTION BY *CLOSTRIDIUM ACETOBUTYLICUM*.
THESIS ADVISOR : ASST. PROF. SUNTHORN KANCHANATAWEE, Ph.D., 258 PP.

BUTANOL PRODUCTION/*CLOSTRIDIUM ACETOBUTYLICUM*/RICE STRAW/ PRETREATMENT/DETOXIFICATION/CO-CULTURE

The chromosome of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 is an acetone-butanol-ethanol (ABE) producing strain which consists of the inactive cellulase gene *cel48A* which results in a lack of cellulase activity towards crystalline cellulose. In this study, the replacement of the *cel48A* with a *SAFA* hybrid gene as an active cellulase gene in the chromosome of *Cl. acetobutylicum* ATCC 824 *Δcac1502ΔuppΔcel48A* mutant was used to attempt the construction of a new recombinant strain as a cellulolytic-solvent producing strain. However, the clones obtained did not show the insertion of the hybrid gene on the chromosome. This could probably be attributed to the unsuitable gene structure of the integration plasmid such as the strong promoter and reporter system; lacking the complementary scaffolding or cohesion in the *Clostridium* chromosomal cellulosome gene to the hybrid gene employed; and blocking from the secretory system of the *Clostridium* cell from the precursor of the *SAFA* gene.

Regarding the carbon source for ABE fermentation by *Cl. acetobutylicum*, cellulose and hemicelluloses of rice straw can be an alternative substrate as a carbon source and energy for fermentation when they are converted to fermentable sugars. Thus, the effectiveness of various pretreatments of rice straw on the quality of rice straw cellulose (RSC) and the optimum condition of the RSC to fermentable sugars conversion

by enzymatic, microbial and chemical hydrolyses were investigated. The results revealed that the A2WB1 pretreatment method had the highest effective modification of the RSC compared with other methods. The optimum dose of crude cellulase enzymes to achieve maximal total sugars (96.83±1.25 g/L, this sugar called GE) from the saccharification was 0.7 mL/g of dry A2WB1 cellulose. For the cellulose hydrolysis of the microorganism, major parameters including cellulose concentration, spent's brewer yeast concentration, growth temperature and agitation had a significant effect on the increase of glucose concentration after fermentation by *Clostridium cellulolyticum* DSM 5812. With xylose production by the two-stage acid pretreatment of rice straw, acid rice straw hydrolysate (ARSH) was obtained. It consisted of 44.67 g/L total sugars.

The investigation of ABE production from xylose in ARSH was carried out by different detoxification methods. The results showed that *Cl. acetobutylicum* ATCC 824 could grow and produce ABE in the detoxified ARSH with over-titration plus activated charcoal carbon absorption. Finally, the use of co-culture between *Cl. acetobutylicum* ATCC 824 and *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 and GE sugar was investigated with the aim of improving ABE production. The results demonstrated that the amount of ABE obtained from batch fermentation by the co-culture was lower than the single culture. However, the maximum ABE yield and ABE concentration by using GE were higher than those of commercial glucose. Overall, the results of this study demonstrate that rice straw is a potential lignocellulosic substrate for ABE production in batch fermentation by both *Cl. acetobutylicum* ATCC 824 and TISTR 1462 strains.

School of Biotechnology Student's Signature_____

Academic Year 2013 Advisor's Signature _____

Co-Advisor's Signature _____