ลุศิราณณพ์ ศรีพรหม : วิศวกรรมความทนทานต่อกลูโคสในเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสและการประยุกต์ใช้ในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพ (ENGINEERING GLUCOSE TOLERANCE IN β-GLUCOSIDASE AND APPLICATION IN BIOFUEL CELLS). อาจารย์ที่ปรึกษา : ศาสตราจารย์ ดร.เจมส์ เกตุทัต-คาร์นส์ และ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะนุช ปิ่นอยู่, 70 หน้า.

คำสำคัญ : เซลล์เชื้อเพลิงชีวมวล, วิศวกรรมเอนไซม์, เบต้า-กลูโคซิเดส, กลูโคสดีไฮโดรจีเนสที่ต้องอาศัย FAD ในการทำงาน, ความไม่ไวต่อออกซิเจน

ความต้องการที่เพิ่มขึ้นต่อแหล่งพลังงานทดแทนและยั่งยืนได้กระตุ้นให้เกิดนวัตกรรมในเทคโนโลยีเซลล์เชื้อเพลิงจากชีวมวล งานวิจัยนี้รายงานการพัฒนาเซลล์เชื้อเพลิงชีวมวลที่มีประสิทธิภาพสูงและไม่ไวต่อออกซิเจน โดยอาศัยวิศวกรรมเอนไซม์และกลยุทธ์ทางเคมีไฟฟ้าขั้นสูง การออกแบบแอโนดใช้เอนไซม์ที่ทำงานร่วมกัน ได้แก่ เบต้า-กลูโคซิเดส (β-glucosidase, BGL5) จาก *Agrobacterium tumefaciens* และเอนไซม์กลูโคส ดีไฮโดรจีเนสที่ต้องอาศัย FAD ในการทำงาน (FAD-GlcDH) จาก *Talaromyces emersonii* ทั้งสองเอนไซม์ถูกแสดงออกใน Escherichia coli โดยใช้เวกเตอร์ pET30a และ pET32a การวิเคราะห์สมบัติทางจลนพลศาสตร์แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพการเร่งปฏิกิริยาที่สูง: BGL5 มีค่าคงที่ทางจลนศาสตร์ของเอนไซม์ (K_m) 0.17 มิลลิโมลาร์ และ ค่าอัตราสูงสุดของปฏิกิริยาที่เร่งด้วยเอนไซม์ (V_{max}) 283 ไมโครโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโดยใช้พารา-ไนโตรฟีนิล-เบต้า-ดี-กลูโคไพราโนไซด์ (*p*NPG) เป็นสับสเตรทขณะที่ FAD-GlcDH มีค่า K_m 411 มิลลิโมลาร์ และ V_{max} 7040 ไมโครโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโดยใช้กลูโคสเป็นสับสเตรท การทำให้ BGL5 กลายพันธุ์แบบมีเป้าหมาย (H229S) แสดงความสามารถในการทนต่อกลูโคสได้ดีขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีค่า IC50 1320 มิลลิโมลาร์ เทียบกับ 94 มิลลิโมลาร์ของเอนไซม์ชนิดดั้งเดิม ระบบเคมีไฟฟ้าถูกประกอบขึ้นโดยใช้ BGL5 ชนิดดั้งเดิมในสารละลายเซลโลไบโอส ที่ pH 7.0 ร่วมกับการตรึงเอนไซม์ GlcDH, พอลิเอทิลีนอิมีน-เฟอร์โรซีน (PEI-Fc) และโพลีเอทิลีนไกลคอล ไดไกลซิดิลอีเทอร์ (PEGDGE) บนอิเล็กโทรดกราฟีน เซลโลไบโอสจะถูก BGL5 เร่งการย่อยสลายด้วยน้ำเป็นกลูโคส 2 โมเลกุล ซึ่งต่อมาจะถูก GlcDH ออกซิไดซ์เป็นกลูโคโนแลคโตน โดยมี PEI-Fc ทำหน้าที่เป็นตัวกลางถ่ายอิเล็กตรอนระหว่างเทอจีดีเอชกับผิวอิเล็กโทรด ทางด้านแคโทด ฮอร์สแรดิช เปอร์ออกซิ-

เดส (HRP) ถูกตรึงแบบโคเวเลนต์ผ่านสาร 1-ไพรีนบิวทาโนอิก แอซิด ซัคซินิไมดิล เอสเทอร์ (PBSE) ทำให้สามารถเกิดการซ้อนทับแบบไพ-ไพ (π-π stacking) กับอิเล็กโทรดโพลีอิ-ไมด์เคลือบกราฟีน โครงสร้างนี้ถูกทำให้เสถียรเพิ่มเติมด้วย Nafion™ ความเข้มข้น 0.5% เพื่อให้การรีดักชันของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ โดยใช้ 2,2′-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) ammonium salt; (AzBTS) เป็นตัวกลางรี-ดอกซ์ โครงสร้างของเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพนี้สามารถให้ความหนาแน่นกำลังไฟสูงสุดที่ 126 ไมโครวัตต์ต่อตารางเซนติเมตร และแรงดันวงจรเปิดที่ 0.6 โวลต์ อาจเพียงพอสำหรับจ่ายพลังงานให้กับอุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์พลังงานต่ำ ความไม่ไวต่อออกซิเจนและประสิทธิภาพการเร่งปฏิกิริยาที่สูงของระบบนี้ถือเป็นก้าวสำคัญสู่การประยุกต์ใช้งานจริงของระบบพลังงานชีวไฟฟ้าเคมี ผลการวิจัยนี้เน้นย้ำถึงศักยภาพของเซลล์เชื้อเพลิงชีวมวลที่ใช้เอนไซม์ที่ผ่านการดัดแปลงและพื้นผิวกราฟีนในการพัฒนาเทคโนโลยีพลังงานอย่างยั่งยืนในอนาคต

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเคมี
ปีการศึกษา 2567

ลายมือชื่อนักศึกษา _____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา _____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม Piyanut Pinyou

LUCIRANON SRIBRAHMA : ENGINEERING GLUCOSE TOLERANCE IN β-GLUCOSIDASE AND APPLICATION IN BIOFUEL CELLS. THESIS ADVISOR : PROF. JAMES R. KETUDAT-CAIRNS, Ph.D. AND THESIS CO-ADVISOR : ASST. PROF. PIYANUT PINYOU, Ph.D. 70 PP.

Keywords: Biomass fuel cell, Enzyme engineering, β-glucosidase (BGL5), FAD-dependent glucose dehydrogenase (FAD-GDH), Oxygen-insensitive

The increasing demand for renewable and sustainable energy sources has spurred innovations in biomass fuel cell technologies. This study reports the development of a high-efficiency, oxygen-insensitive biomass fuel cell through enzyme engineering and advanced electrochemical strategies. The anode design utilizes a synergistic enzyme pair: β-glucosidase (BGL) from *Agrobacterium tumefaciens* (BGL5, GH1 family) and FAD-dependent glucose dehydrogenase (FAD-GlcDH) from *Talaromyces emersonii*. Both enzymes were heterologously expressed in *Escherichia coli* using pET30a and pET32a vectors. Kinetic characterization revealed high catalytic efficiencies: BGL5 exhibited a K_m of 0.17 mM and V_{max} of 283 μmol/min·mg for *p*NPG, while FAD-GDH showed a K_m of 411 mM and V_{max} of 7040 μmol/min·mg for glucose. A rationally engineered BGL5 mutant (H229S) demonstrated significantly improved glucose tolerance, with an IC50 of 1320 mM compared to 94 mM for the wild type. The electrochemical system was assembled with wild-type BGL in the cellobiose solution, pH 7.0, with immobilized GlcDH, polyethyleneimine-ferrocene (PEI-Fc), and Poly(ethylene glycol) diglycidyl ether (PEGDGE) on a graphene electrode. Cellobiose is hydrolyzed by BGL into two molecules of D-glucose, which are subsequently oxidized to gluconolactone by TeGlcDH, with PEI-Fc facilitating mediated electron transfer between TeGlcDH and the electrode surface. On the cathode side, horseradish

peroxidase (HRP) was covalently immobilized via 1- pyrenebutanoic acid succinimidyl ester (PBSE), enabling π-π stacking on a graphene-coated polyimide electrode. The configuration was further stabilized with 0.5% Nafion, enabling efficient hydrogen peroxide reduction using 2,2′-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) ammonium salt (AzBTS) as a redox mediator. This biofuel cell configuration achieved a maximum power density of 126 μW/cm² with an open-circuit voltage of 0.6 V, which may be sufficient to power low-energy electronic devices. The system's oxygen insensitivity and high catalytic performance make it a significant step toward practical applications of bioelectrochemical energy systems. These findings highlight the potential for enzyme-engineered, graphene-based biomass fuel cells in the future of sustainable energy technologies.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

School of Chemistry
Academic Year 2024

Student's Signature _____
Advisor's Signature _____
Co-advisor's Signature Piyanut Pinyou