

การអំពីការងារសក៍ដបេន មិនតែនៅក្នុងទូរទឹក តាមការងារសក៍ដបេន នៃក្រសួងវឌ្ឍនភាព

ជាអ្នកចូលរួម ក្រសួងវឌ្ឍនភាព

គុណឃាតិ និង ការងារ
សាខាភិសោធន៍យោបាយ

វិធាននិងប្រព័ន្ធឌីជីថល និងការងារសក៍ដបេន នៃក្រសួងវឌ្ឍនភាព
សាខាភិសោធន៍យោបាយ និងការងារសក៍ដបេន នៃក្រសួងវឌ្ឍនភាព

ឆ្នាំ ២០១៧

ISBN 978-617-6144-9

តិចតិច និង ការងារសក៍ដបេន នៃក្រសួងវឌ្ឍនភាព

BATCH EXTRACTIVE FERMENTATION OF ALKALINE PROTEASE USING
AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEM

Mr. Cao Xuan Thang

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Engineering in Chemical Engineering

Department of Chemical Engineering

Chulalongkorn University

Academic Year 2004

ISBN 974 -17-6144 -9

Thesis Title BATCH EXTRACTIVE FERMENTATION OF ALKALINE PROTEASE USING AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEM

By Mr. Cao Xuan Thang

Field study Chemical Engineering

Thesis Advisor Assistant Professor Seeroong Prichanont

Thesis Co-Advisor Associate Professor Napa Siwarungson

Accepted by the Faculty of Engineering, Chulalongkorn University, in
Partial Fulfilment of the Requirements for the Master's Degree

DL Lavansiri Dean of the Faculty of Engineering
(Professor Direk Lavansiri, Ph.D)

THESIS COMMITTEE

Chirakarn Muangnaph Chairman
(Associate Professor Chirakarn Muangnaph, Dr.-Ing.)

Am Thesis Advisor
(Assistant Professor Seeroong Prichanont, Ph.D)

Napa Siwarungson Thesis Co-advisor
(Associate Professor Napa Siwarungson)

Artwan Shotipruk Member
(Artiwan Shotipruk, Ph.D)

Woraphat Arthayukti Member
(Woraphat Arthayukti, Ph.D)

ชวน หัง เก้า: การหมักควบคู่การสกัดแบบไม่ต่อเนื่องของอัลคาไลน์โปรตีอีสโดยใช้ระบบสารละลายน้ำสองวัฏจักร

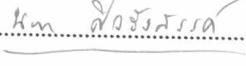
(Batch Extractive Fermentation of Alkaline Protease Using Aqueous Two-phase System)

อ.ที่ปรึกษา: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สีรุ่ง ปรีชาแนนท์

อ.ที่ปรึกษาร่วม: รองศาสตราจารย์ นภา ศิริรังสรรค์, 75 หน้า ISBN 974-17-6144-9

อัลคาไลน์โปรตีอีสเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญมากในเชิงอุตสาหกรรม เพราะถูกใช้งานได้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมพังชั้กฟอก ทำความสะอาดคราบสกปรก โปรดีนปืนเมือง อุตสาหกรรมอาหาร เกษ็ชภัณฑ์ เครื่องหนัง และพื้น รวมทั้งใช้ในกระบวนการกำจัดของเสีย แต่ปัจจุบันในการผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ยังอยู่ที่กระบวนการผลิตที่ให้ผลได้ต่ำ ปัจจุบันเกิดจากการบัญชีปฎิกริยาโดยผลิตภัณฑ์ และปัจจุบันในเมืองความยุ่งยากในกระบวนการแยก ทำให้การผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีอีสยังใช้การลงทุนสูง การหมักควบคู่การสกัดโดยใช้ระบบสารละลายน้ำสองวัฏจักรซึ่งเป็นทางเลือกหนึ่งเพื่อการแก้ปัญหา และในโครงงานวิจัยนี้ได้สนใจศึกษาระบบสารละลายน้ำสองวัฏจักรของโพลีเอทิลีนไกลดอล (PEG)/โปตัตเซียมฟอสเฟต โดยที่ระบบสารละลายน้ำสองวัฏจักรนี้มีคุณสมบัติที่เป็นมิตรกับชีวโมเลกุล และช่วยทำให้เซลล์มีความเสถียร จากการวิจัยพบว่า PEG1000 เป็นองค์ประกอบที่ไม่เหมาะสมต่อ *Bacillus subtilis* TISTR25 ซึ่งตรงข้ามกับ PEG 4000 6000 และ 10 000 พนบว่ายังน้ำหนักโมเลกุลของ PEG มีค่ามากเท่าไรยังมีผลทำให้อัตราการผลิตอัลคาไลน์โปรตีอีสน้อยลงเท่านั้น เพส 岱อะแกรมของระบบสารละลายน้ำสองวัฏจักรซึ่งมีองค์ประกอบของ PEG ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกันไม่ได้ให้ลักษณะที่แตกต่างกันมากนัก แต่ยังไงก็ตามเราพบว่าเพส岱อะแกรมของระบบ PEG1000 มีระยะห่างจากจุดกำเนิดมากที่สุด และในเพสล่างของระบบบังพวนปริมาณของ PEG ละลายอยู่ในปริมาณพอสมควรเมื่อเปรียบเทียบ กับระบบที่มี PEG น้ำหนักโมเลกุลสูงกว่า นอกจากนี้ยังพบว่ารูปร่างของเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงไปในทางที่ขาวขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ในน้ำหนักปกติ จากการศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของ PEG4000 และ โปตัตเซียมฟอสเฟตพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นขององค์ประกอบเหล่านี้จะมีผลทำให้การผลิตอัลคาไลน์โปรตีอีสต่ำลง การศึกษาผลของการต่อส่วนโดยปริมาตรระหว่างเพสซึ่งให้เห็นว่าเมื่อมีอัตราส่วนเชิงปริมาตรมากยิ่งมีผลทำให้มีความเข้มข้นของเอนไซม์ในวัฏจักรบนน้อยลง อิกทึ่งเมื่อมีอัตราส่วนเชิงปริมาตรระหว่างเพสต่อขบลงพบว่าเซลล์มีขนาดสั้นลงด้วยเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ในสภาพน้ำหนักปกติ องค์ประกอบที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตอัลคาไลน์โปรตีอีสโดย *B.subtilis* TISTR25 คือ PEG4000 10.2% โดยน้ำหนัก และโปตัตเซียมฟอสเฟต 9.36% โดยน้ำหนัก ซึ่งจะทำให้ได้ปัจจุบันบริสุทธิ์และความเข้มข้นจำเพาะของอัลคาไลน์โปรตีอีสในเพสบนถึง 4.38 และ 56.29

ยุนิต/วิศวกรรม ตามลำดับ

ภาควิชา วิศวกรรมเคมี ลายมือชื่อนิสิต 
สาขาวิชา วิศวกรรมเคมี ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา 
ปีการศึกษา.....2547..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม 

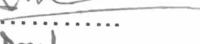
45 70698121: CHEMICAL ENGINEERING

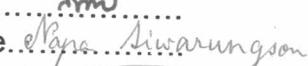
KEYWORDS: EXTRACTIVE FERMENTATION, ALKALINE PROTEASE, AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEM, POLYETHYLENE GLYCOL.

CAO XUAN THANG: BATCH EXTRACTIVE FERMENTATION OF ALKALINE PROTEASE USING AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEM.
THESIS ADVISOR: ASSISTANT PROF. SEEROONG PRICHANONT,
THESIS CO-ADVISOR: ASSOCIATE PROF. NAPA SIWARUNGSON
75 pp. ISBN: 974 -17- 6144 - 9

Alkaline proteases are very important industrial enzymes. They are used widely in detergent, cleaning stains and soils containing proteins, food, pharmaceutical, leather and film industries, as well as in waste processing companies. But problems still occurred regarding low production yield, product inhibition, and complexity of recovery system which inevitably result in high production cost. Extractive fermentation using aqueous two-phase system (ATPs), in current study was Polyethylene glycol/ potassium phosphate system, is a promising alternative to the conventional process, since it provides a non-denaturing natural environment for biomolecules, and stabilizes cells. PEG 1000 was not found suitable for *B. subtilis* TISTR 25 extractive fermentation, in contrast to PEG 4000, 6000 and 10 000. The higher PEG molecular weight, the lower total alkaline protease production obtained. The effect of PEG molecular weight on phase diagram was investigated and the results did not show significant variations. However, that of ATP with PEG1000 was found further off from the origin, in addition, its bottom phase contained measurable amounts of PEG while only trace amounts was found in other PEG systems. The shape of cell was changed from rod type to elongated rod type when fermentations were carried on in ATPs of PEG 4000, 6000 and 10000 with the same compositions of 18 %(w/w) of potassium phosphate and 12% (w/w) of PEG. Next, effects of potassium phosphate, and PEG 4000 concentrations on extractive fermentation were studied. It was discovered that increase in concentrations of PEG 4000 and potassium phosphate caused decreasing alkaline protease activity. The effect of volume ratio on extractive fermentation was also investigated. The results indicated that the higher volume ratio, the lower alkaline protease activity in the top phase. With the lower volume ratio, the shape of cells was found shorter than that in the conventional fermentation. The most suitable system for alkaline protease production by *B. subtilis* TISTR25 was PEG4000 10.2% (w/w), and potassium phosphate 9.36 % (w/w) which gave 4.38, and 56.29 unit/mg for purification factor, and specific alkaline protease in the top phase, respectively.

Department...Chemical Engineering..... Student's signature.....

Field of study...Chemical Engineering... Advisor's signature.....

Academic year.....2004.....Co-advisor's signature.....

ACKNOWLEDGMENTS

With the help and support from various organization and people, I could complete my study. Thus, I would like to express my appreciation and grateful thanks to the following:

First of all, I would like to express my deepest gratitude to my advisors: Asst. Prof. Seeroong Prichanont; Assoc. Prof. Napa Siwarungson who much care in guiding, assisting and supporting me devotedly and enthusiastically from beginning to the end of my work. And also to Dr. Muenduen Phisalaphong who was my first academic advisor for her kind help, invaluable encouragement, and comments. I am really so glad to be their advisee.

I am grateful for the scholarship and funding provided by JICA project for AUN/SEED-Net (ASEAN University Network/ Southeast Asian Engineering Education Development Network) program.

The International School of Engineering (ISE), Faculty of Engineering, Chulalongkorn University for giving me the chance to have the scholarship for studying in Chulalongkorn University.

I greatly appreciate all professors of the Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Chulalongkorn University for their guide and helps during the time I have studying in Chulalongkorn University.

My special thanks to Associate Prof. Chirakarn Muangnoph, Woraphat Artayukti, Ph.D, Artiwan Chotiruk, Ph.D who served as thesis committee.

My appreciation goes to my classmates for their enthusiasm and all what they done for me during my study in Thailand.

Last but not least, I would like to express my gratitude to all members of my family whose love, concern, encouragement and understanding played the greatest role to my success.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONTENTS

ABSTRACT IN THAI.....	iv
ABSTRACT IN ENGLISH.....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
NONMENCLATURE.....	x
CHAPTER 1 INTRODUCTION.....	1
1.1 General ideas.....	1
1.2 Objectives.....	3
1.3 Scope of work.....	3
1.4 Expected benefits from the research.....	4
1.5 Research procedures.....	4
CHAPTER 2 THEORY AND LITERATURE REVIEW.....	5
A. Theoretical review.....	5
2.1 Aqueous two phase system.....	5
2.1.1 Phase diagrams.....	5
2.1.2 Phase separation.....	6
2.1.3 Partition coefficient	7
2.1.4 Extraction factors.....	7
2.2 Fermentation.....	7
2.1.1 Fermentation in batch reactor.....	7
2.2.2 Batch extraction.....	8

B. Literature review	8
2.3 Parameter affecting phase diagram.....	8
2.4 Parameter affecting partition coefficient.....	10
2.5 Extractive fermentation by using ATPs	10
2.5.1 Extractive fermentation for other products.....	11
2.5.2 Extractive fermentation for alkaline protease production.....	12
CHAPTER 3 MATERIRALS AND METHODS	14
3.1Chemicals and equipment	14
3.1.1 Chemicals.....	14
3.1.2 Equipment.....	15
3.2 Methods	15
3.2.1 Microorganism, medium and culture conditions... ..	15
3.2.2 Analytical methods.....	17
CHAPTER 4 EXPERIMENTAL RESULTS AND DISCUSSION.....	22
4.1 Conventional fermentation.....	22
4.2 PEG 1000/ Potassium phosphate ATPs.....	24
4.2.1 Phase diagram	24
4.2.2 Extractive fermentation	25
4.3 PEG X (4000, 6000, and 10000)/ potassium phosphate aqueous two-phase system	28
4.3.1 Phase diagram	28
4.3.2 General system characteristics	29

4.3.3 Alkaline protease extractive fermentation in ATPs of varied PEG molecular weights	30
4.4 PEG 4000/ phosphate aqueous two-phase systems.....	38
4.4.1 Effect of PEG 4000 concentration on extractive fermentation	39
4.4.2 Effect of potassium phosphate concentration on extractive fermentation.....	42
4.4.3 Effect of volume ratio on extractive fermentation.	45
Chapter 5 CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS.....	59
5.1 Conclusions.....	59
5.2 Recommendations.....	60
REFERENCES.....	61
APPENDIX.....	64
BIOGRAPHY.....	75

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

NONMENCLATURE

List of symbols

C_T	concentration in top phase	(kg/m ³)
C_B	concentration in bottom phase	(kg/m ³)
C_S	concentration of substrate	(kg/ m ³)
C_P	concentration of product	(kg/ m ³)
d_d	droplet diameter	(m)
E_B	extraction factor	
h	height of the interphase	(m)
K_i	partition coefficient of component i	
K_0	partition coefficient of the solute at the pH corresponding to the solute isoelectric point.	
n	number of kg mol of solute	
pI	isoelectric point.	
q_p	apparent specific secretion rate	(h ⁻¹)
q_s	apparent specific uptake rate	(h ⁻¹)
R	gas law constant $82.057 \times 10^{-3} \text{ m}^3 \cdot \text{atm}/\text{kgmol.K}$	
Re	Renold number	
R_v	volume ratio	(m ³ / m ³)
t	time	(h)
T	temperature in degree Kelvin	
t_{sj}	completed separation time	(h)
t_m	time required for macromixing	(h)
V_B	volume of the bottom phase	(m ³)
V_C	volume of carrier	(m ³)
V_M	mixture volume	(m ³)
V_{ps}	volume of pure solvent water associated with n kg mol of solute	
V_s	volume of solvent	(m ³)
V_T	volume of top phase.	(m ³)
X	cell concentration	(kg/m ³)
x_i^1, x_i^2	concentration of component I in phase 1 and phase 2	(kg/m ³)
Z	net charge	
We	Weber number	

Greek letters

β_{ij}	relative selectivity of component I compared with component j
γ	factor that depends on the polymer composition of the system, the salt additive used and temperature.
σ	surface tension between two phases
μ_T	viscosity of the top phase
μ_B	viscosity of the bottom phase
μ	apparent specific growth rate (m^3/h)
π	osmosis pressure of solution
ρ_T	density of top phase (kg/m^3)
ρ_B	density of bottom phase (kg/m^3)
$\Delta\rho$	different between phases (kg/m^3)