การหมักควบคู่การสกัดแบบไม่ต่อเนื่องของอัลคาไลน์โปรตีเอสโดยใช้ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค

นายซวน ทัง เก้า

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี
คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2547

ISBN 947-17-6144-9

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

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

THESIS COMMITTEE

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

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

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

.....Member
(Artiwan Shotipruk, Ph.D)

.....Member
(Woraphat Arthayukti, Ph.D)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชวน ทัง เก้า: การหมักควบคู่การสกัดแบบไม่ต่อเนื่องของอัลคาไลน์โปรตีเอสโดยใช้ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค
(Batch Extractive Fermentation of Alkaline Protease Using Aqueous Two-phase System)
อ.ที่ปรึกษา: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สีรุ้ง ปรีชานนท์
อ.ที่ปรึกษาร่วม: รองศาสตราจารย์ นภา ศิวรังสรรค์, 75 หน้า. ISBN 974-17-6144-9

อัลคาไลน์โปรตีเอสเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญมากในเชิงอุตสาหกรรม เพราะถูกใช้งานได้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมผงซักฟอก ทำความสะอาดคราบสกปรก โปรตีนปนเปื้อน อุตสาหกรรมอาหาร เภสัชภัณฑ์ เครื่องหนัง และฟิล์ม รวมทั้งใช้ในกระบวนการกำจัดของเสีย แต่ปัญหาในการผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ยังอยู่ที่กระบวนการผลิตที่ให้ผลได้ต่ำ ปัญหาอันเกิดจากการยับยั้งปฏิกิริยาโดยผลิตภัณฑ์ และปัญหาในแง่ของความยุ่งยากในกระบวนการแยก ทำให้การผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสยังใช้การลงทุนสูง การหมักควบคู่การสกัดโดยใช้ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคจึงเป็นทางเลือกหนึ่งเพื่อการแก้ปัญหา และในโครงงานวิจัยนี้ได้สนใจศึกษาระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคของโพลิเอทธิลีนไกลคอล (PEG)/โปตัสเซียมฟอสเฟต โดยที่ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคนี้มีคุณสมบัติที่เป็นมิตรกับชีวโมเลกุล และช่วยทำให้เซลล์มีความเสถียร จากการวิจัยพบว่า PEG1000 เป็นองค์ประกอบที่ไม่เหมาะสมต่อ *Bacillus subtilis* TISTR25 ซึ่งตรงข้ามกับ PEG 4000 6000 และ 10 000 พบว่ายิ่งน้ำหนักโมเลกุลของ PEG มีค่ามากเท่าไรยิ่งมีผลทำให้อัตราการผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสน้อยลงเท่านั้น เฟสไดอะแกรมของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคซึ่งมีองค์ประกอบของ PEG ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกันไม่ได้ให้ลักษณะที่แตกต่างกันมากนัก แต่อย่างไรก็ตามเราพบว่าเฟสไดอะแกรมของระบบ PEG1000 มีระยะห่างจากจุดกำเนิดมากที่สุด และในเฟสล่างของระบบยังพบปริมาณของ PEG ละลายอยู่ในปริมาณพอสมควรเมื่อเปรียบเทียบกับระบบที่มี PEG น้ำหนักโมเลกุลสูงกว่า นอกไปจากนี้ยังพบว่ารูปร่างของเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงไปในทางที่ยาวขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ในน้ำหมักปกติ จากการศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของ PEG4000 และโปตัสเซียมฟอสเฟตพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นขององค์ประกอบเหล่านี้จะมีผลทำให้การผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสต่ำลง การศึกษาผลของอัตราส่วนโดยปริมาตรระหว่างเฟสชี้ให้เห็นว่ายิ่งมีอัตราส่วนเชิงปริมาตรมากยิ่งมีผลทำให้มีความเข้มข้นของเอนไซม์ในวัฏภาคบนน้อยลง อีกทั้งเมื่อมีอัตราส่วนเชิงปริมาตรระหว่างเฟสน้อยลงพบว่าเซลล์มีขนาดสั้นลงด้วยเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ในสภาพน้ำหมักปกติ องค์ประกอบที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสโดย *B.subtilis* TISTR25 คือ PEG4000 10.2% โดยน้ำหนัก และโปตัสเซียมฟอสเฟต 9.36% โดยน้ำหนัก ซึ่งจะทำให้ได้ปัจจัยความบริสุทธิ์และความเข้มข้นจำเพาะของอัลคาไลน์โปรตีเอสในเฟสบนถึง 4.38 และ 56.29
ยูนิต/มิลลิกรัม ตามลำดับ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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.....

ACKNOWLEDMENTS

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 Univesity.

My special thanks to Associate Prof. Chirakarn Muangnopoh, 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

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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 82.057x 10^{-3} m^3.atm/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	

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย