

การผลิตโปรตีนเอสจาก Bacillus subtilis TISTR 25

โดยกระบวนการหมักร่วมกับไมโครฟิลเตรชัน



นาย นันทพล สุขมงคล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

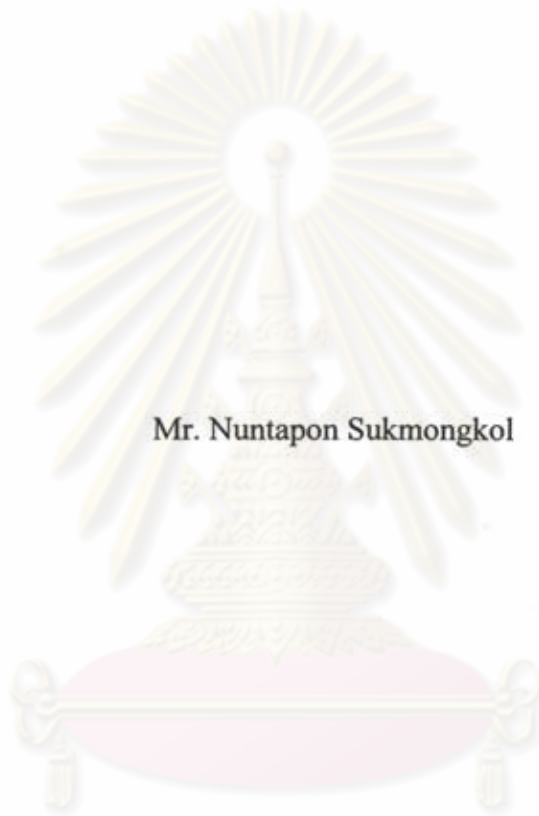
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2539

ISBN 974-636-631-9

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PRODUCTION OF PROTEASE FROM Bacillus subtilis TISTR 25  
BY FERMENTATION PROCESS WITH MICROFILTRATION



Mr. Nuntapon Sukmongkol

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Engineering

Department of Chemical Engineering

Graduate School

Chulalongkorn University


Academic year 1996

ISBN 974-636-631-9


Thesis Title            Production of Protease from Bacillus subtilis  
                                 TISTR 25 by Fermentation Process  
                                 with Microfiltration  
By                            Mr. Nuntapon Sukmongkol  
Department            Chemical Engineering  
Advisor                 Associate Professor Chirakarn Muangnapoh, Dr. Ing.

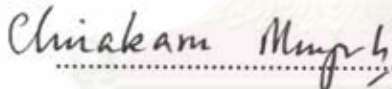
---


Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment  
of the Requirements for the Master's Degree.


  
..... Dean of Graduate School  
(Professor Supawat Chutivongse, M.D.)

Thesis Committee

  
..... Chairman  
(Professor Wiwut Tanthapanichakoon, Ph.D.)

  
..... Advisor  
(Associate Professor Chirakarn Muangnapoh, Dr. Ing.)

  
..... Member  
(Assistant Professor Prasart Foo-trakul, Ph.D.)

  
..... Member  
(Suttichai Assabumrungrat, Ph.D.)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสี่เหลี่ยมนี้เพียงแผ่นเดียว



นันทพล สุขมงคล : การผลิตโปรตีนเอสจาก Bacillus subtilis TISTR 25 โดยกระบวนการหมักร่วมกับ ไมโครฟิลเตรชัน (PRODUCTION OF PROTEASE FROM Bacillus subtilis TISTR 25 BY FERMENTATION PROCESS WITH MICROFILTRATION).อ. ที่ปรึกษา : รศ.ดร.จิรกานต์ เมืองนาโพธิ์, 143 หน้า. ISBN 974-636-631-9

ในปัจจุบันนี้ โปรตีนเอสที่ผลิตโดยบาซิลลัสถูกใช้กันอย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมเบียร์ ผงซักฟอก อาหาร และ เครื่องหนัง โปรตีนเอสสามารถครองส่วนแบ่งตลาดได้ประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ ของเอนไซม์ที่มีการซื้อขายกันทั้งหมด โดยที่สองในสามของโปรตีนเอสถูกผลิตโดยจุลชีพ สารอาหารสำหรับการผลิตโปรตีนเอสที่มีประสิทธิภาพประกอบด้วย แป้งที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ โปรตีนที่ถูกย่อยสลายแล้ว และแร่ธาตุต่างๆ จากการศึกษา การหมักแบบไม่ต่อเนื่องที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้อัตราการให้อากาศสูงสุด พบว่า ค่าความเป็นกรดต่าง และค่าความเข้มข้นเริ่มต้นของกลูโคสที่ได้จากการย่อยสลายแป้ง คือ 7.0 และ 1.8 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ Bacillus subtilis TISTR 25 มีอัตราการเจริญสูงสุดเท่ากับ 0.52 ต่อชั่วโมง และจะแสดงพฤติกรรมการผลิตโปรตีนเอสแบบผสมกับอัตราการเจริญเติบโต พบว่า อัตราผลผลิตของโปรตีนเอสในระบบการหมักแบบต่อเนื่องร่วมกับ ไมโครฟิลเตรชันน้อยกว่าการหมักแบบไม่ต่อเนื่องเพราะว่า การปรับอัตราการเจือจางสูงสุดไม่สามารถทำได้ ยิ่งไปกว่านั้น เซลล์ที่ถูกกักไว้แก่เกินที่จะผลิตโปรตีนเอส พบว่าการหมักแบบต่อเนื่องร่วมกับไมโครฟิลเตรชันที่มีการดึง เซลล์ออกสองครั้งสามารถจัดปัญหาเซลล์แก่ได้บางส่วน และสามารถเพิ่มอัตราผลผลิตของโปรตีนเอสได้ถึง 1.53 เท่าเมื่อเทียบกับการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา .....วิศวกรรมเคมี.....

สาขาวิชา .....วิศวกรรมเคมี.....

ปีการศึกษา .....2539.....

ลายมือชื่อนิติคน *Witame Sine*

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา *Dr. Jirakanth*

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

# # - C717045 : MAJOR CHEMICAL ENGINEERING  
KEY WORD: PROTEASE / Bacillus subtilis / FERMENTATION / MICROFILTRATION  
NUNTAPON SUKMONGKOL : PRODUCTION OF PROTEASE FROM  
Bacillus subtilis TISTR 25 BY FERMENTATION PROCESS WITH MICROFILTRATION.  
THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. CHIRAKARN MUANGNAPOH, Dr. Ing.  
143 pp. ISBN 974-636-631-9

Nowadays, the major applications of proteases produced by Bacillus species are found in brewing, detergent, food and leather industries. Proteases account for nearly 60% of the total enzyme sales in which two-thirds of them were produced commercially by microbial. The medium for effective protease production comprises enzymatically hydrolyzed starch hydrolysed protein, and mineral sources. From the studies of batch fermentation at 37 °C with maximum aeration rate, the optimum pH and optimum concentration of initial glucose from starch hydrolysatation are 7.0 and 1.8 g/l, respectively. Bacillus subtilis TISTR 25, with maximum specific growth rate of 0.52 hr<sup>-1</sup>, performs the mixed growth association with protease. The protease productivity in the continuous fermentation coupling with microfiltration is lower than that of the batch fermentation because the high dilution rate cannot be achieved. Moreover, the retained cells are too old to produce protease. The twice cell bleeding continuous fermentation coupling with microfiltration, which partially eliminates the age problem, can improve 1.53-fold protease productivity comparing to the batch fermentation.

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา วิศวกรรมเคมี

ลายมือชื่อนิสิต Home of

สาขาวิชา วิศวกรรมเคมี

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา วิวัฒน์ มุ่งมั่น

ปีการศึกษา 2539

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

## ACKNOWLEDGEMENTS

The author would like to express his deepest gratitude to Associate Professor Dr. Chirakarn Muangnapoh, his advisor, for her continuous guidance, enormous number of invaluable discussion, helpful suggestions and warm encouragement. He wishes to give his gratitude to Professor Dr. Wiwut Tanthapanichakoon who serves as the chairman of the thesis committee. In addition, he is also grateful to Assistant Professor Dr. Prasart Foo-trakul and Dr. Suttichai Assabumrungrat for serving as warm members whose comments are especially helpful.

Sincere thanks are made to Cinnamon Co., Ltd. and Bangkok Feed Meal Co., Ltd for their overwhelming help as kind raw material supporters together with all members of Biochemical Engineering Laboratory for their collaborations.

Finally, the author would like to express his sincere thanks to his parents and everyone in his family for their unfailing understandings and affectionate encouragement.

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## CONTENTS

	Page
ABSTRACT IN THAI.....	iv
ABSTRACT IN ENGLISH.....	v
ACKNOWLEDGEMENT.....	vi
LIST OF TABLES.....	x
LIST OF FIGURES.....	xii
NOMENCLATURES.....	xviii
CHAPTER	
I    INTRODUCTION.....	1
1.1 Thesis objectives.....	2
1.2 Thesis scopes.....	3
II   LITERATURE REVIEW.....	4
2.1 Protease production.....	4
2.2 The application of microfiltration to continuous fermentation....	9
III  THEORY.....	10
3.1 Protease.....	10
3.2 Starch.....	23
3.3 Principle of Microfiltration.....	25
3.4 Fermentation process and mathematical analysis.....	36
IV  EXPERIMENTS.....	42
4.1 Apparatus.....	42
4.2 Chemical reagents.....	43

	Page
4.3 Strain.....	44
4.4 Medium.....	44
4.5 Strain storage.....	48
4.6 Experimental procedures.....	48
4.7 Analysis.....	59
V RESULTS AND DISCUSSION.....	62
5.1 Morphology.....	62
5.2 The effect of controlled pH on growth and protease production batch fermentation.....	64
5.3 The effect of initial glucose concentration on growth and protease production in batch fermentation.....	74
5.4 The study of micro filtration characteristics.....	83
5.5 The effect of dilution rate on growth and protease production in continuous fermentation coupling with microfiltration.....	91
5.6 The stability of protease production at constant suitable dilution rate.....	97
5.7 Protease productivity comparison between batch fermentation and continuous fermentation coupling with microfiltration.....	99
VI CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS.....	102
6.1 Conclusions.....	102
6.2 Recommendations.....	103
REFERENCES.....	104



	Page
APPENDIX.....	107
APPENDIX A.....	108
APPENDIX B.....	140
BIOGRAPHY.....	143



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## LIST OF TABLES

		Page
Table 1-1	Value and market share of proteases in many industries.....	1
Table 3-1	The value and market share of protease in 1986.....	23
Table 4-1	The operating condition of microfiltration system for the study the effects of pressure, recirculation flow rate, and cell concentration on permeate flux.....	55
Table 5-1	Maximun protease concentration and productivity.....	68
Table 5-2	Protease activity and productivity comparison between batch fermentation and continuous fermentation coupling with microfiltration.....	100
Table A-1	Data of <u>Bacillus subtilis</u> TISTR 25 standard curve.....	116
Table A-2	Data of tyrosine standard curve.....	118
Table A-3	Experimental data of controlled pH of 6.0 in batch fermentation.....	120
Table A-4	Experimental data of controlled pH of 6.5 in batch fermentation.....	121
Table A-5	Experimental data of controlled pH of 7.0 in batch fermentation.....	122
Table A-6	Experimental data of controlled pH of 7.5 in batch fermentation.....	123
Table A-7	Experimental data of controlled pH of 8.0 in batch fermentation.....	124

	Page	
Table A-8	Experimental data of initial glucose concentration of 1.0 g/l in batch fermentation.....	126
Table A-9	Experimental data of initial glucose concentration of 1.8 g/l in batch fermentation.....	127
Table A-10	Experimental data of initial glucose concentration of 3.2 g/l in batch fermentation.....	128
Table A-11	Experimental data of initial glucose concentration of 4.5 g/l in batch fermentation.....	129
Table A-12	Experimental data of initial glucose concentration of 7.5 g/l in batch fermentation.....	130
Table A-13	Maximum specific growth rate, specific consumption rate, and specific product rate among various initial glucose concentration.....	133
Table A-14	Results of the effects of pressure, recirculation flow rate and cell concentration on permeate flux at operating temperature of 37 ° C.....	134
Table A-15	Experimental data of continuous fermentation coupling with microfiltration.....	136
Table A-16	Experimental data of twice cell bleeding continuous fermentation coupling with microfiltration.....	138

## LIST OF FIGURES

		Page
Figure 2-1	Flow diagram of commercial production of microbial protease.....	8
Figure 3-1	Reduction of activation energy by enzymes.....	11
Figure 3-2	Effect of temperature, pH, enzyme, and substrate concentration on reaction rate.....	11
Figure 3-3	Enzyme hydrolysis.....	12
Figure 3-4	Sporulation of <u>Bacillus</u> sp.....	19
Figure 3-5	The synthesis of protease.....	20
Figure 3-6	Glycolysis and Krebs's cycle.....	21
Figure 3-7	A general flow diagram for production of enzymes.....	22
Figure 3-8	A glucose unit.....	23
Figure 3-9	Amylose .....	24
Figure 3-10	Amylopectin.....	24
Figure 3-11	Spectrum of application of membrane separation processes in the industry.....	25
Figure 3-12	The examples of different membrane configurations.....	27
Figure 3-13	The schematics of dead-end filtration and cross-flow filtration .....	28
Figure 3-14	Concentration gradient in microfiltration process.....	31
Figure 3-15	Cross-flow microfiltration model.....	32
Figure 3-16	Cross-flow filtration principle.....	33

	Page
Figure 3-17	Continuous fermentation coupling with microfiltration..... 39
Figure 4-1	Enzymes for starch hydrolysis..... 45
Figure 4-2	Hydrolyzed starch ..... 45
Figure 4-3	Materials and end product of protein hydrolysis ..... 47
Figure 4-4	Culture slants of <u>Bacillus subtilis</u> TISTR 25..... 49
Figure 4-5	A culture seed flask of <u>Bacillus subtilis</u> TISTR 25..... 50
Figure 4-6	Schematic diagram of the batch system applied for the protease production..... 50
Figure 4-7	Photograph of batch fermentation process..... 51
Figure 4-8	Ceramic filter ( type 1M-1 )..... 53
Figure 4-9	Cross-flow filtration in a multichannel element..... 54
Figure 4-10	Schematic diagram of microfiltration system applied for the protease production ..... 56
Figure 4-11	Schematic diagram of the cell recycling system applied for the protease production ..... 58
Figure 5-1	Colony forming of <u>Bacillus subtilis</u> TISTR 25..... 62
Figure 5-2	Microscopic observation of <u>Bacillus subtilis</u> TISTR 25..... 63
Figure 5-3	Batch fermentation of <u>Bacillus subtilis</u> TISTR 25 at controlled pH of 6.0..... 65
Figure 5-4	Batch fermentation of <u>Bacillus subtilis</u> TISTR 25 at controlled pH of 6.5..... 65

	Page
Figure 5-5 Batch fermentation of <u>Bacillus subtilis</u> TISTR 25 at controlled pH of 7.0.....	66
Figure 5-6 Batch fermentation of <u>Bacillus subtilis</u> TISTR 25 at controlled pH of 7.5.....	66
Figure 5-7 Batch fermentation of <u>Bacillus subtilis</u> TISTR 25 at controlled pH of 8.0.....	67
Figure 5-8 Maximum cell concentration and maximum activity of protease among experimental pH range.....	69
Figure 5-9 Protease productivity based on maximum protease comparison between various experimental pH range.....	71
Figure 5-10 $Y_{X/S}$ , $Y_{P/S}$ , and $Y_{P/X}$ based on maximum protease production among experimental pH range.....	72
Figure 5-11 Specific growth rate, specific product rate, and specific consumption rate at pH 7.0 .....	73
Figure 5-12 Cell concentration comparison among various initial glucose concentration.....	75
Figure 5-13 Protease comparison among various initial glucose concentration.....	76
Figure 5-14 $Y_{X/S}$ , $Y_{P/S}$ , and $Y_{P/X}$ among various initial glucose concentration.....	78
Figure 5-15 Cell productivity and product productivity among various initial glucose concentration.....	79

	Page
Figure 5-16 Specific product rate, specific growth rate, and specific consumption rate among various initial glucose concentration.....	80
Figure 5-17 The Lineweaver-Burk plot of <i>Bacillus subtilis</i> TISTR 25 growth.....	81
Figure 5-18 The growth curve of <i>Bacillus subtilis</i> TISTR 25.....	82
Figure 5-19 The effect of applied pressure on permeate flux of distilled water and fermentation broth.....	84
Figure 5-20 Permeate flux of fermentation broth as a function of applied pressure .....	85
Figure 5-21 Permeate flux of fermentation broth as a function of recirculation flow rate .....	88
Figure 5-22 Permeate flux of fermentation broth as a function of cell concentration.....	89
Figure 5-23 Permeate flux of fermentation broth as a function of $\ln C_b$ .....	90
Figure 5-24 The effect of dilution rate on growth and protease production.....	93
Figure 5-25 The effect of dilution rate on concentration and productivity of cell and protease.....	94
Figure 5-26 The effect of dilution rate on $Y_{P/S}$ , $Y_{P/X}$ , and $Y_{X/S}$ .....	95

	Page
Figure 5-27	The effect of dilution rate on specific growth rate, specific product rate, and specific consumption rate..... 96
Figure 5-28	The effect of twice cell bleeding effect on growth and protease production at dilution rate of $3.0 \text{ hr}^{-1}$ ..... 98
Figure 5-29	Protease productivity comparison between batch fermentation and continuous fermentation coupling with microfiltration..... 101
Figure A-1	Standard curve of <u>Bacillus subtilis</u> TISTR 25..... 117
Figure A-2	Standard curve of tyrosine..... 119
Figure A-3	Comparison of controlled pH on growth and protease production..... 125
Figure A-4	Batch fermentation of <u>B. subtilis</u> TISTR 25 at 1.0 g/l initial glucose concentration..... 131
Figure A-5	Batch fermentation of <u>B. subtilis</u> TISTR 25 at 1.8 g/l initial glucose concentration..... 131
Figure A-6	Batch fermentation of <u>B. subtilis</u> TISTR 25 at 3.2 g/l initial glucose concentration..... 132
Figure A-7	Batch fermentation of <u>B. subtilis</u> TISTR 25 at 4.5 g/l initial glucose concentration..... 132
Figure A-8	Batch fermentation of <u>B. subtilis</u> TISTR 25 at 7.5 g/l initial glucose concentration..... 133
Figure A-9	Two-step enzymatic hydrolysis of 30% w/w starch..... 141



Figure A-10 The effect of agitation speed on dissolved oxygen..... 142



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## NOMENCLATURES

A	: Constant number (-)
B	: Constant number (-)
C	: Macromolecule concentration at x position (g/l)
$C_b$	: Macromolecule concentration in bulk fluid (g/l)
$C_g$	: Macromolecule concentration in gel layer (g/l)
$C_p$	: Macromolecule concentration at permeate side (g/l)
$C_w$	: Macromolecule concentration in water (g/l)
$C_1, C_2, C_3, C_4$	: Channel shape factors (-)
D	: Macromolecule diffusivity ( $m^2/hr$ )
d	: Fluid channel height over membrane (m)
F	: Volumetric flow rate (l/hr)
f	: Fanning factor (-)
J	: Water flux or permeate flux ( $m^3/m^2.hr$ )
K	: Product destruction rate ( $hr^{-1}$ )
$K_s$	: Monod constant (g/l)
k	: Mass transfer coefficient (m/s)
L	: Length of filter (m)
m	: Maintenance factor ( $hr^{-1}$ )
$P_i$	: Inlet pressure ( $kg_f/m^2$ )
$P_f$	: Permeate pressure ( $kg_f/m^2$ )
$P_o$	: Outlet pressure ( $kg_f/m^2$ )

$\Delta P$	: Pressure drop ( $\text{kg}_f/\text{m}^2$ )
$\Delta P_{TM}$	: Transmembrane pressure drop ( $\text{kg}_f/\text{m}^2$ )
$Q$	: Feed flow rate ( $\text{m}^3/\text{hr}$ )
$Re$	: Renold number (-)
$R_G$	: Hydraulic resistant of gel layer (-)
$R_M$	: Hydraulic resistant of membrane (-)
$Sc$	: Schmidt number (-)
$Sh$	: Sherwood number (-)
$S$	: Substrate concentration (g-substrate/l)
$t$	: Time (hr)
$t_d$	: Doubling time (hr)
$v$	: Recirculation flow rate ( $\text{m}^3/\text{hr}$ )
$U$	: Velocity of feed fluid (m/hr)
$V$	: Working volume (l)
$x$	: Fluid boundary layer thickness (m)
$X$	: Cell concentration (g-cell/l)
$Y_{X/S}$	: Cell yield over substrate (g-cell/g-substrate)
$Y_{P/S}$	: Product yield over substrate (g-product/g-substrate)
$Y_{P/X}$	: Product yield over cell (g-product/g-cell)
$\alpha$	: Recycle ratio (-)
$\beta$	: Viscosity of feed fluid (g/m.s)
$\delta$	: Film thickness (m)
$\rho$	: Density of feed fluid ( $\text{g}/\text{m}^3$ )

$\mu$	:	Specific growth rate ( $\text{hr}^{-1}$ )
$\mu_{\text{max}}$	:	Maximum specific growth rate ( $\text{hr}^{-1}$ )
$\gamma$	:	Specific dead rate ( $\text{hr}^{-1}$ )
$\nu$	:	Specific product rate (g-product/g-cell-hr)
$\nu_s$	:	Specific consumption rate (g-substrate/g-cell-hr)



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย