การผลิตแบคทีเรียสังเคราะห์แสง *Rhodocyclus gelatinosus* R7 จากน้ำนึ่งปลาทูน่าด้วยกระบวนการแบบขั้นตอนเดียวและสองขั้นตอน

Production of Photosynthetic Bacteria *Rhodocyclus gelatinosus* R7 from Tuna Condensate by One and Two-Stage Processes

รพีพร แสงศรี

Rapeeporn Sangsri

เลขหมู่ QR 88.5 .S31 2540 ร.2

Order Key.....

Bib Key 201682

25 ส.ค. 2543

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Biotechnology

Prince of Songkla University

2540

ชื่อวิทยานิพนธ์ การผลิตแบคทีเรียสังเคราะห์แสง *Rhodocyclus gelatinosus* R7 จากน้ำนึ่งปลาทูน่าด้วยกระบวนการแบบขั้นตอนเดียวและสองขั้นตอน

ผู้เขียน นางสาวรพีพร แสงศรี

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2539

พลตรี จุลพันธ์ อรรถกระวีนนทร
ได้รับพระราชทาน
วันที่ 2 ส.ค. 2543

บทคัดย่อ

น้ำนึ่งปลาทูน่าเป็นของเหลวที่ได้จากการนึ่งปลาทูน่าที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง ในการทดลองนี้ใช้น้ำนึ่งปลาทูน่าจากปลาทูน่าพันธุ์ท้องแถบ (*Katsuwonus pelamis*) โดยมีค่าเฉลี่ยของคุณลักษณะต่างๆ ดังนี้ พีเอช 6.1 ซีโอดี 49,476 มิลลิกรัมต่อลิตร โปรตีนที่ละลายได้ 22,044 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลรีดิวซ์ 1,976 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำมันและกรีส 1,887 มิลลิกรัมต่อลิตร เกลือ (โซเดียมคลอไรด์) ร้อยละ 2.8 และแร่ธาตุต่างๆ ได้แก่ เหล็ก แมกนีเซียม แคลเซียม และ โปตัสเซียม เท่ากับ 1.54, 85.11, 33.88 และ 1,156 พีพีเอ็ม ตามลำดับ

ในการผลิตแบบขั้นตอนเดียวเป็นการศึกษาความเข้มข้นของสารอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Rhodocyclus gelatinosus* R7 ในน้ำนึ่งปลาทูน่า เลี้ยงภายใต้สภาวะไร้อากาศ-มีแสง (3,000 ลักซ์) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 8 วัน พบว่าค่าซีโอดีที่เหมาะสมของน้ำนึ่งปลาทูน่าเท่ากับ 15,000 มิลลิกรัมต่อลิตร การเติมแหล่งไนโตรเจน (ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรท) 0.1-1.5 กรัมต่อลิตร ลงในน้ำนึ่งปลาทูน่าเจือจางที่มีค่าไนโตรเจน 2.59 กรัมต่อลิตร มีผลให้การเจริญของเชื้อลดลง การเติมแมกนีเซียม (Mg^{2+}) ในปริมาณ 5, 10 และ 20 มิลลิโมลาร์ ให้ผลของการเจริญที่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนการเติมโคบอลท์ (Co^{2+}) (1-20 ไมโครโมลาร์) และเหล็ก (Fe^{2+}) ที่ความเข้มข้นสูงกว่า 10 ไมโครโมลาร์ มีผลให้การเจริญของเชื้อลดลง ความเข้มข้นที่เหมาะสมของยีสต์สกัด เท่ากับ 3 กรัมต่อลิตร ภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นของสารอาหารที่เหมาะสมได้ปริมาณมวลชีวภาพ 5.48 กรัมต่อลิตร ประกอบด้วย

โปรตีนร้อยละ 52 เซลล์มีปริมาณแคโรทีนอยด์และแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์ 2.37 และ 21.18 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ และมีวิตามินบี12 เท่ากับ 0.045 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าซีโอดีลดลงร้อยละ 78 สารละลายส่วนใสมีแอคติวิตี้ของโปรติเอส 1.23 - 1.36 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และไม่พบแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไลเปส

ในกระบวนการแบบสองขั้นตอน ขั้นแรกเป็นการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ในน้ำนึ่งปลาทูน่าที่ไม่เจือจาง พบว่า *Bacillus subtilis, Candida tropicalis* F-129 และ *C. utilis* IFO 0396 สามารถเจริญได้และลดค่าซีโอดีของน้ำนึ่งปลาทูน่าจาก 49,476 มิลลิกรัมต่อลิตร เหลือ 29,383, 32,778 และ 35,148 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งคิดเป็นค่าซีโอดีที่ลดลงร้อยละ 40, 33 และ 28 ตามลำดับ *R. gelatinosus* R7 ไม่สามารถเจริญได้ที่ความเข้มข้นสูงๆเหล่านี้ การเลี้ยงเชื้อในขั้นตอนที่สอง จึงใช้สารละลายส่วนใสของน้ำนึ่งปลาทูน่าที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ตามด้วย *Candida tropicalis* F-129 และเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีค่าซีโอดีประมาณ 15,000 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า *R. gelatinosus* R7 เจริญได้เล็กน้อย ให้มวลชีวภาพเพียง 1.1 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 20 ของค่าที่ได้ (3.41 กรัมต่อลิตร) จากการเลี้ยงเชื้อแบบขั้นตอนเดียวในน้ำนึ่งปลาทูน่าที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ค่าซีโอดี 15,000 มิลลิกรัมต่อลิตร และไม่เติมสารอาหาร

ดังนั้นจึงคัดเลือกการผลิตมวลชีวภาพแบบขั้นตอนเดียว และจากการใช้อาหารที่ผสมแบคทีเรียสังเคราะห์แสงปริมาณร้อยละ 5 ในการเลี้ยงอาร์ทีเมีย พบว่าอาร์ทีเมียมีอัตราการรอดชีวิตและการเจริญสูงกว่าชุดควบคุมประมาณร้อยละ 18 - 20 หลังการเลี้ยงเป็นเวลา 6 วัน

Thesis Title Production of Photosynthetic Bacteria *Rhodocyclus gelatinosus* R7 from Tuna Condensate by One and Two-Stage Processes

Author Miss Rapeeporn Sangsri

Major Program Biotechnology

Academic Year 1996

Abstract

Tuna condensate is the effluent discharged from a steam cooker after precooking the tuna at 100° C about 1 h. The tuna condensate from skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) was used in this experiment. Its characteristics had the following average values : COD, 49,476 mg/l; soluble protein, 22,044 mg/l; reducing sugars, 1,976 mg/l; oil and grease, 1,887 mg/l; 2.8 % salt (NaCl), and 1.54, 85.11, 33.88 and 1,156 ppm of Fe^{2+}, Mg^{2+}, Ca^{2+} and K^{+} respectively.

In one-stage process, the optimum nutrient concentrations for the growth of *Rhodocyclus gelatinosus* R7 in tuna condensate cultivated under anaerobic - light (3,000 lux) condition at room temperature for 8 days were studied. The optimal COD concentration of the tuna condensate used was 15,000 mg/l. The supplementation of nitrogen source [$(NH_4)_2HPO_4$, $(NH_4)_2SO_4$, NH_4NO_3] 0.1-0.5 g/l into the diluted tuna condensate containing 2.59 g/l nitrogen led to a decrease of biomass. The addition of magnesium (Mg^{2+}) at 5, 10 and 20 mM had no significant effect on growth while cobalt (Co^{2+}) (1-20 μM) and ferrous (at higher than 10 μM Fe^{2+}) caused the decrease of biomass. The optimum concentration for yeast extract was 3 g/l. Using the optimal concentrations of all nutrient, 5.48 g/l of biomass with 52 % protein content was obtained. The cells contained carotenoid and bacteriochlorophyll of 2.37 and 21.18 mg/g dry cell weight, respectively, and 0.045 μg/g dry cell weight of vitamin B 12.

The COD removal was 78 %. The culture filtrate possessed a protease activity of 1.23 - 1.36 Unit / ml. Lipase activity was not detected.

In a two-stage process, the first stage was used for the selection of microorganisms capable of growing in the original tuna condensate. *Bacillus subtilis*, *Candida tropicalis* F-129 and *C. utilis* IFO 0396 were able to grow and reduce the COD of the tuna condensate from 49,476 mg/l to 29,383, 32,778 and 35,148 mg/l which represented COD reduction of 40, 33 and 28 %, respectively. *R. gelatinosus* R7 was not able to grow at these high COD levels. The filtrate after the growth of *Bacillus subtilis* followed by *Candida tropicalis* F-129 and diluted with distilled water to reach a COD of 15,000 mg/l was used in the second stage. *R. gelatinosus* R7, however, did not develop very well, producing a biomass of 1.1 g/l, only 20 % of the value (3.41 g/l) obtained from the one-stage process in tuna condensate diluted with distilled water to reach COD of 15,000 mg/l and without any nutrient added.

The one-stage process was therefore selected for the production of biomass. Use of a medium containing 5 % of the photosynthetic bacterial biomass for feeding artemia, results showed that the survival rate and the growth of artemia was 18 -20 % higher compared to the control after 6 days cultivation.