Thesis Title Microbial Conversion Study of Nitrate to Nitrite by Modern Liquid Chromatography

Author Mr. Jirasak Threeprom

Ph.D. Chemistry

Examining Committee

Associate Professor Dr. Surasak Watanesk	Chairman
Associate Professor Dr. Ruangsri Watanesk	Member
Associate Professor Dr. Pairote Wiriyacharee	Member
Dr. Pairoje Kijjanapanich	Member
Professor Dr. Richard L. Deming	Member

ABSTRACT

Three types of nitrate reducing bacteria (*Micrococcus varians, Staphyllococcus saprophyticus* and *S. epidermis*) were studied on their reduction ability of nitrate to nitrite. Ion interaction chromatographic technique was used for separating and detecting both analyte anions. The colony color of *M. varians* was yellow, meanwhile those of *S. saprophyticus* and *S. epidermis* were gray and grayish white, respectively. After 48 hours of fermentation in the broth, the amount of the colonies of *M. varians, S. saprophyticus* and *S. epidermis* were $3.0x10^7$, $4.0x10^7$ and $3.3x10^6$ cfu/ml, respectively. The effects of the inoculated conditions (heat, acid, base, alcohol and the cell breakage by sonication) on their growth were investigated. It was found that heating, acidity and sonication resulted in the perfect inhibition, meanwhile incomplete inhibition occurred as the effects of basicity and alcohol.

The amount of remaining nitrate and nitrite produced in the fermented broth containing nitrate reducing bacteria were determined successfully by using ion interaction chromatographic technique. It was carried out by using octylammonium-o-

phosphate as the ion interaction reagent (IIR) and C-18 column as the separating column. In order to obtain the optimum condition for determining nitrite and nitrate in the fermented cultured broths (BHI broth and S. broth), the effects of the chromatographic variables (i.e. wavelength, pH, IIR concentration, ACN concentration and types of the separating column) on separation were studied. Under the optimum conditions, the method provided good accuracy (100±10 % recovery), high precision (<5% RSD of peak area), wide linearity range (0.05-200 ppm) and high sensitivity (ppb level) for determining the analyte anions. Therefore, the simultaneous determination of nitrite and nitrate in fermented broth was done with high reliability which, in turn, created an understanding of the real happening on the reduction of nitrate to nitrite.

The reduction characteristics of nitrate to nitrite by these bacteria were evaluated. It was found that both of *M. varians* and *S. epidermis* could reduce nitrate to nitrite (nitrate reductase enzyme was produced), while *S. saprophyticus* did not show any reduction behavior. In the case of *M. varians*, nitrate was slowly reduced to nitrite in the period of the first 6-36 hours of fermentation, then the enzyme activity was inhibited by the acidity which was produced in the fermented broth with the final pH of about 6.8. For *S. epidermis*, nitrate was rapidly reduced to nitrite within the first 12 hours of fermentation. Then, the enzyme activity was stopped due to the low pH of fermented system with the final pH of about 6.0.

The appropriate conditions for the function of nitrate reductase enzyme were studied. It was found that the optimal temperature and pH of the solution were 50 °C and 6.5±0.5, respectively and the specific activity of enzyme produced by *S. epidermis* was more than *M. varians* did, in either case of with or without nitrate addition.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การศึกษาการเปลี่ยนสภาพไนเตรตเป็นไนไตรต์ด้วยจุลินทรีย์โดยโครมาโทกราฟีของเหลวสมัยใหม่

ชื่อผู้เขียน นายจิรศักดิ์ ตรีพรหม

วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

รองศาสตราจารย์ ดร. สุรศักดิ์ วัฒเนสก์	ประธานกรรมการ
รองศาสตราจารย์ ดร. เรืองศรี วัฒเนสก์	กรรมการ
รองศาสตราจารย์ ดร. ไพโรจน์ วิริยจารี	กรรมการ
ดร. ไพโรจน์ กิจจนะพานิช	กรรมการ
ศาสตราจารย์ ดร. ริชาร์ด แอล. เดมมิง	กรรมการ

บทคัดย่อ

ได้ศึกษาความสามารถของเชื้อไนเตรตรีดิวซิงแบคทีเรีย 3 ชนิด (ไมโครคอคคัสแวเรียนส์, สแทฟิลโลคอคคัสซาโพรไฟติคัส และ สแทฟิลโลคอคคัสเอพิเดอร์มิส) ในการเปลี่ยนไนเตรตไปเป็นไนไตรต์ โดยใช้เทคนิคไอออนอินเตอร์แอ็คชันโครมาโทกราฟีในการแยกและตรวจวัดไอออนทั้งสอง เชื้อไมโครคอคคัสแวเรียนส์มีโคโลนีสีเหลืองในขณะที่สีของสแทฟิลโลคอคคัสซาโพรไฟติคัสและสแทฟิลโลคอคคัสเอพิเดอร์มิสเป็นสีเทาและสีเทาปนขาว ตามลำดับ หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมงในระบบอาหารเหลวแล้วนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น พบว่าจำนวนเชื้อของไมโครคอคคัสแวเรียนส์, สแทฟิลโลคอคคัสซาโพรไฟติคัส และ สแทฟิลโลคอคคัสเอพิเดอร์มิส เท่ากับ $3.0x10^7$, $4.0x10^7$ และ $3.3x10^6$ ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ได้ศึกษาผลของสภาวะการเลี้ยงต่อการเจริญของเชื้อทั้งสาม พบว่า ความเป็นกรด ความร้อน และ การให้คลื่นความถี่สูงมีผลยับยั้งการเจริญได้อย่างสมบูรณ์ ในขณะที่ความเป็นเบสและการเติมอัลกอฮอล์มีผลน้อยลง

ได้วิเคราะห์หาปริมาณไนไตรต์ที่เกิดขึ้นและไนเตรตที่เหลืออยู่ในระบบบอาหารเหลวหมักที่มีเชื้อไนเตรตรีดิวซิงแบคทีเรียผสมอยู่โดยใช้เทคนิคไอออนอินเตอร์แอ็คชันโครมาโทกราฟี ซึ่งมีออกทิลแอมโมเนียมออร์โทฟอสเฟตเป็นไอออนอินเตอร์แอ็คชันรีเอเจนต์ (ไอไออาร์) และคอลัมน์ซี-18เป็นคอลัมน์สำหรับการแยก เพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ไนไตรต์และไนเตรตในอาหารเหลวหมัก (อาหารเหลวแบบบีเอชไอและแบบเอส) ได้ศึกษาผลของพารามิเตอร์ (ความยาวคลื่น, พีเอช, ความเข้มข้นของไอไออาร์, ความเข้มข้นของอะซีโตไนไตรล์ และชนิดของคอลัมน์แยก) ที่มีต่อการแยก เมื่อใช้สภาวะที่เหมาะสมในการหาปริมาณไนไตรต์และไนเตรตพบว่าให้ความถูกต้องที่ดี (100±10 เปอร์เซ็นต์ของการกลับคืน), ความแม่นยำดี (<5 เปอร์เซ็นต์อาร์เอสดีของพื้นที่พีค), ความเป็นเส้นตรงในช่วงกว้าง (0.05-200 พีพีเอ็ม) และ ความไวที่สูง (ระดับพีพีบี) ดังนั้น ปริมาณของไนไตรต์และไนเตรตที่ตรวจพบในตัวอย่างอาหารเหลวหมัก จึงเป็นข้อมูลที่น่าเชื่อถือและทำให้เข้าใจสิ่งที่เกิดขึ้นจริงของการรีดิวซ์ไนเตรตเป็นไนไตรต์

จากการประเมินลักษณะเฉพาะของการรีดิวซ์ไนเตรตเป็นไนไตรต์โดยเชื้อทั้งสาม พบว่า ทั้งไมโครคอคคัสแวเรียนส์ และสแทฟิลโลคอคคัสเอพิเดอร์มิส สามารถเปลี่ยนไนเตรตเป็นไนไตรต์ (เอนไซม์ไนเตรตรีดักเตสถูกผลิต) ในขณะที่สแทฟิลโลคอคคัสซาโพรไฟติคัส ไม่ได้แสดงพฤติกรรมการเกิดรีดักชัน กรณีของไมโครคอคคัสแวเรียนส์ พบว่าไนเตรตเริ่มถูกเปลี่ยนเป็นไนไตรต์อย่างช้าๆในช่วง 6-36 ชั่วโมงแรกของการหมัก หลังจากนั้นเอนไซม์จะถูกยับยั้งด้วยความเป็นกรดซึ่งถูกผลิตขึ้นในระบบการหมัก ค่าพีเอชสุดท้ายอยู่ประมาณ 6.8 สำหรับเชื้อสแทฟิลโลคอคคัสเอพิเดอร์มิส พบว่าไนเตรตถูกเปลี่ยนเป็นไนไตรต์อย่างรวดเร็วในช่วง 12 ชั่วโมงแรกของการหมัก หลังจากนั้นเอนไซม์จะถูกยับยั้งด้วยความเป็นกรดในระบบอาหารหมัก ค่าพีเอชสุดท้ายอยู่ประมาณ 6.0

ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเตส พบว่าที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และ พีเอช 6.5±0.5 เป็นสภาวะที่เหมาะสม โดยค่าแอ็คติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ที่ผลิตโดยเชื้อสแทฟิลโลคอคคัสเอพิเดอร์มิส มีค่ามากกว่าของเชื้อไมโครคอคคัสแวเรียนส์ ทั้งในระบบที่มีการเติมและไม่เติมไนเตรตในอาหารเลี้ยงเชื้อ