

SUT3-304-51-24-02



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การผลิตอัลจิเนทโดยเชื้อ *Azotobacter vinelandii* และการประยุกต์ใช้ในการตรึง
เอนไซม์เพื่อการอุตสาหกรรม

(Alginate production by *Azotobacter vinelandii* and application uses in
enzymes immobilization for industries)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

SUT3-304-51-24-02



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การผลิตอัลจิเนทโดยเชื้อ *Azotobacter vinelandii* และการประยุกต์ใช้ในการตรึง
เอนไซม์เพื่อการอุตสาหกรรม

(Alginate production by *Azotobacter vinelandii* and application uses in
enzymes immobilization for industries)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. โชคชัย วนภู

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ.

2550

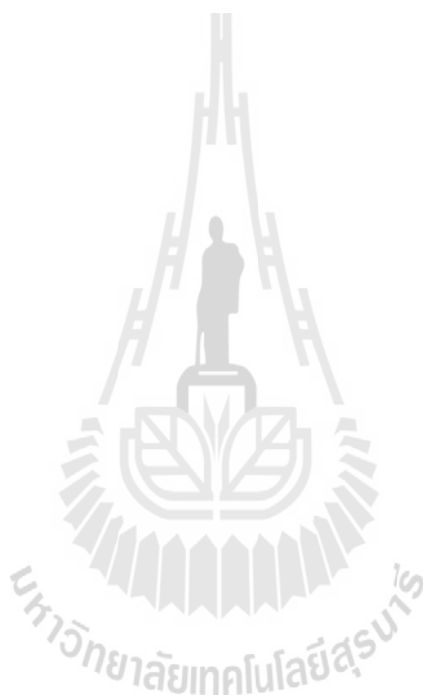
ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

สิงหาคม 2554

กิตติกรรมประกาศ

กระผมขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีและสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ที่สนับสนุนทุนวิจัยรวมถึงได้ให้การสนับสนุนด้านอุปกรณ์ เครื่องมือ บุคลากรและสถานที่ในการดำเนินการวิจัย ขอขอบคุณ นางสาวอัญญาณี พรหมปภากร ที่ช่วยทำให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี และขอขอบคุณ นางสาว รัศมี หวะสุวรรณ ที่ช่วยจัดทำรายงานฉบับนี้ให้สมบูรณ์

ผศ.ดร. โชคชัย วนภู



บทคัดย่อ

การผลิตอัลจินท โดยเชื้อ *Azotobacter vinelandii* และการประยุกต์ใช้ในการตรึงไนโตรเจนเพื่อการ อุตสาหกรรม

การผลิตอัลจินท/ *Azotobacter vinelandii*

อัลจินทสามารถสกัดได้จากผนังเซลล์ของสาหร่ายทะเลสีน้ำตาลแต่ปริมาณการลดลงของสาหร่ายและความกังวลทางด้านความปลอดภัยในการสกัดที่ทำให้เกิดการสะสมของโลหะหนักจากสารเคมีที่ทำให้ทะเลเป็นพิษ รวมไปถึงค่าใช้จ่ายที่สูงในกระบวนการการสกัด การทำให้บริสุทธิ์อีกด้วยเป็นเหตุผลหลักที่ทำให้เกิดความสนใจที่จะหันมาผลิตอัลจินทจากเชื้อแบคทีเรียแทน อัลจินทที่ได้จากเชื้อ *Azotobacter vinelandii* อาจกลายเป็นผลิตภัณฑ์ทดแทน เพราะปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อมไม่เป็นเชื้อแบคทีเรียก่อโรคและมีโครงสร้างคล้ายกับอัลจินทที่ได้จากสาหร่าย วัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตอัลจินทและประยุกต์ในการตรึงไนโตรเจนบีต้าอะไมเลส ในการดำเนินงานครั้งนี้จะทำการศึกษาค้นหาแหล่งคาร์บอน ค่าพีเอช แหล่งไนโตรเจน และอุณหภูมิที่เหมาะสมในอาหาร LG medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในการทดลองระดับพลาสติกพบว่า *Azotobacter vinelandii* จะให้ปริมาณการผลิตอัลจินทสูงที่สุดประมาณ 5-6 กรัมต่อลิตร ที่ค่าพีเอช 6.5-7 เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน ความเข้มข้น 1% โดยปริมาตรและไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจนลงใน LG medium จากนั้นศึกษาการผลิตอัลจินทในถังหมักขนาด 2 ลิตรที่มีปริมาตรอาหาร 1.5 ลิตร โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตอัลจินทที่ได้จากการศึกษาในขั้นต้นเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของอัตราการให้อากาศและความเร็วของใบกวน โดยพบว่าอัลจินทที่ผลิตได้กับการเจริญของเซลล์จะมีความสัมพันธ์ที่เกี่ยวข้องกัน การเจริญของเซลล์และการผลิตอัลจินทจะให้ค่าสูงที่สุดที่ความเร็วรอบของใบกวนเป็น 500 รอบต่อนาที ที่อัตราการให้อากาศ 2.5 ปริมาตรของอากาศต่อปริมาตรของน้ำหมักต่อนาทีใน LG medium ($\mu = 0.295$ ต่อชั่วโมง และ Yps ของ 0.503 กรัมของอัลจินทต่อกรัมของน้ำตาลซูโครส) ภายใน 24 ชั่วโมงแรกและจะมีค่าลดลงอย่างช้าๆและความหนืดของอัลจินทที่ผลิตได้จะมีค่าเพิ่มขึ้นตามเวลา ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอัล

จินเนทที่ผลิตได้ค่าพฤติกรรมของไหลเป็นแบบนั้นนิวโตเนียนเนื่องจากความหนืดเพิ่มขึ้น (จาก 77.52 เซนติพอยต์ ถึง 252.5 เซนติพอยต์) เมื่ออัตราเฉือนเพิ่มขึ้น (1.29 ถึง 24.81 เซนติพอยต์ต่อวินาที)

ในการทดลองได้เติมกรดอินทรีย์ 9 ชนิดเพื่อทดสอบการเพิ่มประสิทธิภาพ การสังเคราะห์อัลจินเนท ได้แก่ กรดซัลซินิก กรดฟูมาริก กรดโพฟิโอนิก กรดไฟติก กรดมาลิก กรดอะดิปิก กรดโฟ-อะมิโนไฮดรอกซีเบนโซอิก กรดแลคติก และกรดทาร์ทาริก พบว่าความหนืดของอัลจินเนทที่ผลิตในถังหมักขนาด 2 ลิตรมีเพิ่มขึ้น เมื่อเติมกรดซัลซินิก ความเข้มข้น 0.15% โดยปริมาตร (ความหนืด = 432.52 เซนติพอยต์, $\mu = 0.297$ ต่อชั่วโมง และ $Y_{ps} = 0.505$ กรัมของอัลจินเนทต่อกรัมของน้ำตาลซูโครส) นอกจากนี้ได้พัฒนาการผลิตอัลจินเนทจาก *Azotobacter vinelandii* ในถังหมักขนาด 5 ลิตร พบว่าอัลจินเนทที่ผลิตได้มีค่าน้อยกว่าในถังหมักขนาด 2 ลิตร ประมาณ 2.5 เท่า (ความหนืด = 168.78 เซนติพอยต์, $\mu = 0.221$ ต่อชั่วโมง, $Y_{ps} = 0.397$ กรัมของอัลจินเนทต่อกรัมของน้ำตาลซูโครส) ลักษณะพื้นฐานวิทยาของอัลจินเนทและเชื้อ *Azotobacter vinelandii* ถูกศึกษาภายใต้กล้อง SEM พบว่าเซลล์มีรูปร่างเป็นแท่งขนาดประมาณ 1 ไมโครเมตร และอัลจินเนทที่ถูกนำไปละลายและการทำอบแห้งที่ได้จาก *Azotobacter vinelandii* และอัลจินเนทที่ผลิตได้จากสาหร่ายนั้นจะมีลักษณะเป็นโครงร่างตาข่ายเหมือนกัน น้ำหนักโมเลกุลของอัลจินเนทที่ผลิตได้จาก *Azotobacter vinelandii* และสาหร่ายนั้นจะถูกวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC พบว่าขนาดน้ำหนักโมเลกุลของอัลจินเนททั้งสองแหล่งที่มาเป็น 2.87×10^3 และ 2.88×10^3 Da ตามลำดับ อัลจินเนททั้งสองแหล่งถูกนำมาใช้ในการตรึงเอนไซม์บีต้าอะไมเลสเพื่อเปรียบเทียบกับการใช้บีต้าอะไมเลสแบบไม่ถูกตรึงในอัลจินเนท พบว่าประสิทธิภาพในการนำกลับมาใช้ใหม่ของบีต้าอะไมเลสที่ถูกตรึงในอัลจินเนทในการย่อยแป้งนั้นจะลดลงเหลือ 36.4 และ 42.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับในรอบที่ 8

ผลการวิจัยในครั้งนี้พบว่า อัลจินเนทสามารถผลิตได้จากแบคทีเรียและมีคุณภาพทัดเทียมกับที่ผลิตจากสาหร่าย แต่การผลิตเชิงพาณิชย์เพื่อให้ได้ปริมาณมากจึงจำเป็นต้องวิจัยการเพิ่มกำลังการผลิตเพิ่มเติม

ABSTRACT

ALGINATE PRODUCTION BY *AZOTOBACTER VINELANDII* AND APPLICATION USES IN ENZYME IMMOBILIZATION FOR INDUSTRIES

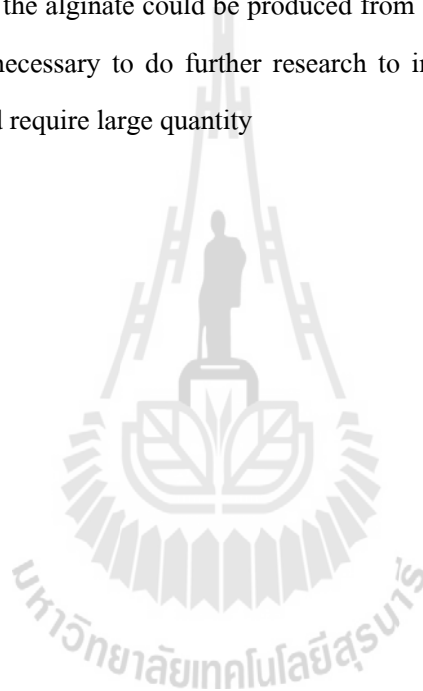
ALGINATE PRODUCTION/ *AZOTOBACTER VINELANDII*

Commercial alginate is extracted from the cell wall of brown seaweed. However, the decreasing of seaweed, the safety concerning extraction (that are potential accumulators of the heavy metal from reagent present in polluted seawater) and high cost for extraction-purification processes were the main reasons for the present interest towards the microbial production of alginate. Alginate from *Azotobacter vinelandii* may become a major commercial product because of environment safety, non-pathogen bacteria and was similar in structure to the algae alginate. The aim of this research was to optimize conditions in alginate production and apply β -amylase immobilization. The optimization of carbon sources, pH, nitrogen sources and temperature for alginate production were conducted in LG medium. In shake flask experiment, *Azotobacter vinelandii* produced the highest alginate (5-6 g/L) at pH 6.5-7 when incubated at 30°C in LG medium with 1% w/v sucrose and without nitrogen source. The optimum condition in shake flask experiments was also conducted in 2L fermenter for studying the optimum aeration rate and agitation speed. It was found that the alginate production was growth-associated. Growth and alginate production were highest at 500 rpm of agitation speed with 2.5 vvm of aeration in LG medium ($\mu = 0.295 \text{ h}^{-1}$, $Y_{ps} = 0.503 \text{ g of alginate/ g of sugar}$) within the first 24 hours and gradually decreased. The viscosity of alginate was increased as time passed which exhibited non-Newtonian behavior because viscosity increased (77.52 to 252.5 cP) with the shear rate increased (1.29 to 24.81 $\text{cP}\cdot\text{s}^{-1}$).

Nine organic acids such as succinic acid, fumaric acid, propionic acid, phytic acid, malic acid, adipic acid, 4-aminohydroxybenzoic acid, lactic acid and tartaric acid were used in increasing the efficiency of alginate. Viscosity of alginate produced in 2L fermenter was increased after adding 0.15% w/v of succinic acid (viscosity = 432.52 cP, $\mu = 0.297 \text{ h}^{-1}$, $Y_{ps} = 0.505 \text{ g of alginate/ g of sucrose}$). The alginate production from *Azotobacter vinelandii* was scaled up to 5L fermenter. The production in 5L fermenter was lower than in 2L fermenter about 2.5 times (viscosity = 186.67 cP, $\mu = 0.221 \text{ h}^{-1}$, $Y_{ps} = 0.397 \text{ g of alginate/ g of sucrose}$). The morphological characteristic of *Azotobacter*

vinelandii and alginate were studied under SEM. The morphology of *Azotobacter vinelandii* cells had a rod shape with the size of about 1 μ m. Dry form of both alginate from *Azotobacter vinelandii* and algae alginate had the same crosslinked-structure. The molecular weights (MW) of alginate from *Azotobacter vinelandii* and algae were 2.87×10^3 and 2.88×10^3 Da, respectively when detected by HPLC. Both of the alginate were used for immobilizing β -amylase and compared with free enzymes. It was found that the efficiency of reusing of β -amylase immobilized bead (*Azotobacter* alginate and seaweed alginate) for starch hydrolysis decreased by 36.4% and 42.4%, respectively at 8th cycle while β -amylase enzyme would hydrolyze starch constantly due to the fact that some parts of the immobilized β -amylase were removed from alginate.

The study found that the alginate could be produced from bacteria and had the same quality as seaweed. However, it is necessary to do further research to increase more productivity as the commercial production would require large quantity



สารบัญ

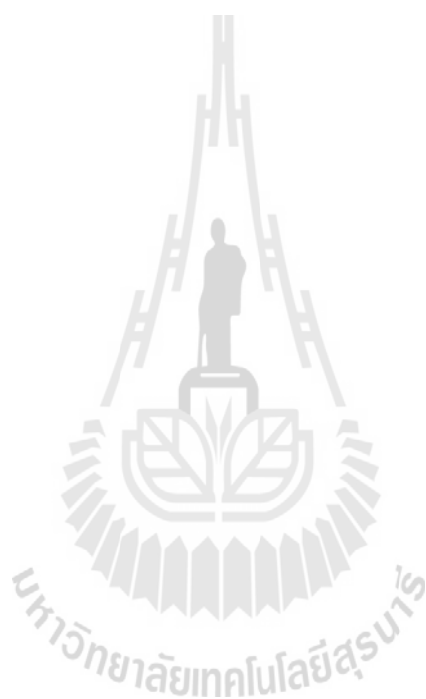
หน้า

กิตติกรรมประกาศ.....	ก
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูปภาพ.....	ญ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย.....	1
1.2 การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....	5
1.3 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย.....	7
1.4 สมมติฐานของงานวิจัย.....	7
1.5 ขอบเขตของงานวิจัย.....	7
1.6 ผลการวิจัยที่คาดว่าจะได้รับ.....	7
บทที่ 2 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง	
2.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย.....	8
2.2 วิธีการวิเคราะห์.....	8
การวัดความหนืด.....	8
การวัดการเจริญของเซลล์.....	8
การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด.....	9
การวิเคราะห์กรดอินทรีย์.....	9
การวัดความเข้มข้นของอัลจินท.....	9
การหาน้ำหนักโมเลกุล.....	10
2.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตอัลจินทในระดับฟลาस्क.....	10
แหล่งคาร์บอนและความเข้มข้น.....	10
อุณหภูมิ.....	10
ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น.....	10
แหล่งไนโตรเจน.....	11
2.4 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตอัลจินทในระดับถังหมัก.....	11
ปริมาณออกซิเจน.....	11
การกวน.....	11

หน้า

2.5 การเพิ่มคุณสมบัติของการผลิตอัลจินท.....	11
การเติมกรดอินทรีย์ในระดับฟลาस्क.....	11
กรดอินทรีย์ต่อการผลิตอัลจินทในถังหมักขนาด 2 ลิตร.....	12
2.6 การผลิตอัลจินทในถังหมักขนาด 5 ลิตร.....	12
2.7 การตรึงเอนไซม์บีต้าอะไมเลสโดยใช้อัลจินท.....	12
การตรึงเอนไซม์.....	12
การประเมินกิจกรรมของเอนไซม์.....	13
ความสามารถในการนำเอนไซม์กลับมาใช้ใหม่.....	13
บทที่ 3 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	
3.1 สภาวะของการผลิตอัลจินทด้วยเชื้อ <i>Azotobacter vinelandii</i> ในระดับฟลาस्क..	14
แหล่งอาหารคาร์บอนและความเข้มข้น.....	14
อุณหภูมิ.....	16
ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น.....	17
แหล่งอาหารไนโตรเจนและความเข้มข้น.....	18
3.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตอัลจินทโดยการหมัก 1.5 ลิตร.....	20
ความเร็วในการกวน.....	20
การให้อากาศ.....	22
3.3 การเพิ่มคุณสมบัติบางประการของการผลิตอัลจินทด้วยกรดอินทรีย์.....	27
แหล่งและความเข้มข้นของกรดอินทรีย์.....	26
การผลิตอัลจินทในถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยใช้อาหาร LG ร่วมกับกรดอินทรีย์.....	29
ลักษณะของอัลจินทที่ผลิตได้จาก <i>Azotobacter vinelandii</i> ลักษณะโครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (SEM).....	30
น้ำหนักโมเลกุลของอัลจินท.....	33
พฤติกรรมของไหลของอัลจินท.....	34
3.4 การผลิตอัลจินทในถังหมักขนาด 5 ลิตร.....	35
3.5 การตรึงเอนไซม์.....	37
การสร้างตัวเป็นเม็ด bead.....	37
กิจกรรมของเอนไซม์บีต้าอะไมเลส.....	37

บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง.....	39
เอกสารอ้างอิง.....	41
ประวัติผู้แต่ง.....	45



สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
3.1	ค่าจลพลศาสตร์ของอัตราการเจริญสูงสุด ผลผลิตอัลจินะที่ผลิตได้สูงสุด น้ำตาลที่ใช้ไปและแรงเค้นเฉือนของ <i>Azotobacter vinelandii</i> ในถังหมักขนาด 2 ลิตร (ความเร็วในการกวนแตกต่างกัน) โดยให้อัตราการไหลของอากาศ 2.5 vvm ในอาหาร LG pH 6.8 ที่อุณหภูมิ 30°C.....22
3.2	ค่าจลพลศาสตร์ของอัตราการเจริญสูงสุด ผลผลิตอัลจินะที่ผลิตได้สูงสุด และปริมาณน้ำตาลซูโครสที่ใช้ไปของ <i>Azotobacter vinelandii</i> ในถังหมักขนาด 2 ลิตร (การให้อากาศแตกต่างกัน) ที่ความเร็วในการกวน 500 rpm ในอาหาร LG pH 6.8 ที่อุณหภูมิ 30°C.....25
3.3	ค่าจลพลศาสตร์ของอัตราการเจริญสูงสุด ผลผลิตอัลจินะที่ผลิตได้สูงสุด ปริมาณน้ำตาลซูโครสที่ใช้ไปและความหนืดปรากฏของ <i>Azotobacter vinelandii</i> ในถังหมักขนาด 2 ลิตรในอาหาร LG ประกอบไปด้วยกรดซัคซินิกความเข้มข้น 0.15% (w/v) ที่ความเร็วในการกวน 500 rpm การให้อากาศ 2.5 vvm pH 6.8 ที่อุณหภูมิ 30°C.....30
3.4	ค่าจลพลศาสตร์ของอัตราการเจริญสูงสุด ผลผลิตอัลจินะสูงสุด การใช้น้ำตาลซูโครส การใช้กรดซัคซินิก และค่าความหนืดปรากฏของเชื้อ <i>Azotobacter vinelandii</i> ในถังหมักขนาด 2 ลิตรซึ่งไม่ได้เติมกรดซัคซินิกความเข้มข้น 0.15% (w/v) ถังหมักขนาด 2 ลิตรซึ่งเติมกรดซัคซินิกความเข้มข้น 0.15% (w/v) และถังหมักขนาด 5 ลิตรซึ่งเติมกรดซัคซินิกความเข้มข้น 0.15% (w/v) ที่ความเร็วในการกวน 500 rpm อัตราการให้อากาศ 2.5 vvm ในอาหาร LG ควบคุม pH 6.8 ที่อุณหภูมิ 30°C.....36

สารบัญรูปภาพ

รูป	หน้า
1.1	โครงสร้างของอัลจิเนต (Alginate) ชนิดต่างๆ.....3
1.2	กลไกการเกิดเจลของ calcium alginate (Egg-box model).....3
1.3	แสดงโครงสร้างหน่วยย่อยของน้ำตาลประเภท uronic acids 2 ชนิด และการจัดเรียงสายโพลีเมอร์.....4
1.4	แสดงแบบแผนการเรียงตัวของโครงสร้างอัลจิเนต.....5
3.1	ผลของแหล่งอาหารคาร์บอนต่อการผลิตอัลจิเนต (alginate production) ความหนืดปรากฏ (apparent viscosity) และการเจริญของเชื้อ <i>Azotobacter vinelandii</i> (cell growth) ในอาหาร LG โดยทำการเติมหัวเชื้อที่ 1% ควบคุมค่า pH ที่ 6.8 อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 72 ชม. โดยทำการเขย่าที่ 200 rpm.....14
3.2	ผลความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่มีต่อการผลิตอัลจิเนต (alginate production) ความหนืดปรากฏ (apparent viscosity) และการเจริญของเชื้อ <i>Azotobacter vinelandii</i> (cell growth) ในอาหาร LG โดยทำการเติมหัวเชื้อที่ 1% ควบคุมค่า pH ที่ 6.8 อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 72 ชม. โดยทำการเขย่าที่ 200 rpm.....15
3.3	ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตอัลจิเนต (alginate production) ความหนืดปรากฏ (apparent viscosity) และการเจริญของเชื้อ <i>Azotobacter vinelandii</i> (cell growth) ในอาหาร LG โดยใช้น้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 1% (w/v) เติมหัวเชื้อที่ 1% ควบคุมค่า pH ที่ 6.8 อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 72 ชม. โดยทำการเขย่าที่ 200 rpm.....16
3.4	ผลของความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นต่อการผลิตอัลจิเนต (alginate production) ความหนืดปรากฏ (apparent viscosity) และการเจริญของเชื้อ <i>Azotobacter vinelandii</i> (cell growth) ในอาหาร LG โดยใช้น้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 1% (w/v) เติมหัวเชื้อที่ 1% ควบคุมอุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 72 ชม. โดยทำการเขย่าที่ 200 rpm.....17
3.5	ผลของแหล่งอาหารไนโตรเจนชนิดต่างๆที่มีผลต่อการผลิตอัลจิเนต (alginate production) (a) ความหนืดปรากฏ (apparent viscosity) (b) และการเจริญของเชื้อ <i>Azotobacter vinelandii</i> (cell growth) (c) ในอาหาร LG โดยใช้น้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 1% (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอนเติมหัวเชื้อที่ 1% ควบคุมค่า pH ที่ 6.8 อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 72 ชม. โดยทำการเขย่าที่ 200 rpm.....19

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูป	หน้า
3.6	การเปลี่ยนแปลงของการใช้น้ำตาล ความเข้มข้นของอัลจินทที่ผลิตได้ ค่าความหนืดปรากฏ ปริมาณน้ำตาลที่เหลือและการเจริญของเชื้อในถังหมัก ที่ใช้ความเร็วในการกวนที่แตกต่างกัน a) 100 rpm, b) 200 rpm, c) 300 rpm, d) 400 rpm, e) 500 rpm, และ f) 600 rpm โดยให้อากาศ 2.5 vvm เติมหิวเชื้อ 10% ควบคุมค่า pH เริ่มต้นที่ 6.8 อุณหภูมิ 30 °ซ.....21
3.7	ผลของอัตราการให้อากาศต่อการใช้น้ำตาลซูโครส ความเข้มข้นของอัลจินท ความหนืด ปรากฏและการเจริญของเซลล์ <i>Azotobacter vinelandii</i> ในอาหาร LG ในถังหมักขนาด 2 ลิตร เติมหิวเชื้อ 10% ควบคุมค่า pH เริ่มต้นที่ 6.8 อุณหภูมิ 30 °ซ อัตราการให้อากาศ แตกต่างกันตั้งแต่ 0-5 vvm; (a) 0 vvm, (b) 2.5 vvm, and (c) 5 vvm.....24
3.8	ผลของกรดอินทรีย์ที่มีต่อการผลิตอัลจินท การเจริญของเซลล์แบคทีเรียและ ความหนืดปรากฏของการผลิตอัลจินทในอาหาร LG โดยใช้น้ำตาลซูโครส 1% (w/v) เป็นแหล่งอาหารคาร์บอน เติมหิวเชื้อ 1% ปรับค่า pH ที่ 6.8 อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 72 ชม. ใช้ความเร็วในการเขย่า 200 rpm.....26
3.9	ผลความเข้มข้นของกรดอินทรีย์ที่มีต่อ (a) การเจริญของเซลล์แบคทีเรีย (b) ความหนืดปรากฏ และ (c) การผลิตอัลจินทในอาหาร LG โดยใช้น้ำตาลซูโครส 1% (w/v) เป็นแหล่งอาหารคาร์บอนเติมหิวเชื้อ 1% ปรับค่า pH ที่ 6.8 อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 72 ชม.....28
3.10	การเปลี่ยนแปลงของการใช้น้ำตาล ความเข้มข้นของอัลจินท ความหนืดปรากฏในอาหาร LG ที่ประกอบไปด้วยน้ำตาลซูโครสและกรดซัคซินิกความเข้มข้น 0.15% (w/v) เป็นแหล่งอาหารคาร์บอนที่อัตราการให้อากาศ 5 vvm เติมหิวเชื้อ 10 % ค่า pH ที่ 6.8 อุณหภูมิ 30 °ซ.....29
3.11	ลักษณะ โครงสร้างของ <i>Azotobacter vinelandii</i> ภายใต้อุปกรณ์จุลทรรศน์อิเล็กตรอน (SEM) ที่กำลังขยาย 12,000 เท่า.....31
3.12	ลักษณะ โครงสร้างของ <i>Azotobacter vinelandii</i> และอัลจินทในอาหาร LG ที่ประกอบ ไปด้วยกรดซัคซินิกความเข้มข้น 0.15% (w/v) ที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 3 วัน (Scale bars = 1µm).....31
3.13	ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของเชื้อ <i>Azotobacter vinelandii</i> ที่มีการสร้างอัลจินท ในอาหาร LG ประกอบไปด้วยกรดซัคซินิกความเข้มข้น 0.15% (w/v) ที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 3 วัน.....32

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูป	หน้า
3.14	ลักษณะทางโครงสร้างของอัลจินทภายใต้กล้อง SEM a) อัลจินทแห้งที่ได้จาก <i>Azotobacter vinelandii</i> โดยใช้อาหาร LG ประกอบไปด้วยกรดซัคซินิกความเข้มข้น 0.15% (w/v) b) อัลจินทจากสาหร่าย.....32
3.15	กราฟ chromatograms ของน้ำหนักโมเลกุลของ a) pullulan ที่ใช้เป็นมาตรฐาน b) อัลจินทจาก <i>Azotobacter vinelandii</i> และ c) อัลจินทจากสาหร่าย.....33
3.16	ค่าความหนืดปรากฏของสาหร่ายจากอัลจินทและอัลจินทจาก <i>Azotobacter vinelandii</i> ที่อัตราเงื่อนไขแตกต่างกัน.....34
3.17	การเปลี่ยนแปลงของการใช้น้ำตาลซูโครส การผลิตอัลจินท การใช้กรดซัคซินิก ความหนืดปรากฏและการเจริญของเชื้อ <i>Azotobacter vinelandii</i> ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้ปริมาตรอาหาร LG 3 ลิตรด้วยน้ำตาลซูโครสและกรดซัคซินิก.....35
3.18	เอนไซม์ที่ถูกตรึงในเม็ด bead หลังจากหยดลงในสารละลาย $CaCl_2$ ความเข้มข้น 2% a) อัลจินทความเข้มข้น 2.5% (w/v) ที่ผลิตโดย <i>Azotobacter vinelandii</i> หลังเติมกรดซัคซินิกความเข้มข้น 0.15% (w/v) b) อัลจินทจากสาหร่ายความเข้มข้น 2% (w/v).....37
3.19	ความสัมพัทธ์ของกิจกรรมเอนไซม์ของการนำเอนไซม์ที่ถูกตรึงด้วยอัลจินทจาก <i>Azotobacter vinelandii</i> และอัลจินทจากสาหร่ายกลับมาใช้ใหม่ใน 8 รอบเปรียบเทียบกับ เอนไซม์อิสระ.....38

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทางวิจัย

อัลจิเนต (alginate) เป็นเอกโซโพลิแซคคาไรด์ (exopolysaccharide, EPS) ชนิดหนึ่งทีประกอบไปด้วยหน่วยย่อยจำนวน 50 – 200,000 หน่วยของน้ำตาล 2 โมเลกุล คือ mannuronic acid (M) และ guluronic acid (G) ที่เชื่อมกันด้วยพันธะ β -1,4 D-mannuronic acid และ α -1, 4 C-5 epimer α -L-guluronic acid โดยสามารถสกัดได้จากพืช โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่บริเวณผนังเซลล์ของสาหร่ายทะเล (seaweed) เช่น *Laminaria digitata*, *L. hyperborean* และ *Macrocystis pyrifera* หรือ สาหร่ายสีน้ำตาล (brown algae) เช่น *Phaeophyceae* sp. นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรีย 2 กลุ่มที่สามารถผลิตอัลจิเนตได้ด้วย ได้แก่แบคทีเรียในกลุ่มตรึงไนโตรเจนอิสระที่ไม่ก่อให้เกิดโรค ได้แก่ *Azotobacter vinelandii* และแบคทีเรียกลุ่มที่ก่อให้เกิดโรค ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa* เป็นต้น ปริมาณและคุณสมบัติของอัลจิเนตที่ได้ได้จากสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดจะแตกต่างกันตามชนิดและสภาพแวดล้อม โดยเฉพาะจากพืชที่ยากแก่การควบคุมสภาพแวดล้อม อีกทั้งการจัดเก็บสาหร่ายในทะเลยังเป็นการทำลายสิ่งแวดล้อมและแหล่งที่อยู่อาศัยของสัตว์น้ำเป็นจำนวนมาก และขั้นตอนการสกัดที่ใช้กรดซึ่งมีค่าใช้จ่ายในการบำบัดของเสียเป็นจำนวนมาก เมื่อพิจารณาคุณสมบัติของอัลจิเนตพบว่าอัลจิเนตที่ผลิตได้จากเชื้อ *A. vinelandii* จะมีการเรียงลำดับ monomer เหมือนในสาหร่าย อีกทั้งขั้นตอนการผลิตสามารถควบคุมการเลี้ยงเชื้อได้โดยไม่ทำลายสภาวะแวดล้อมทางธรรมชาติ

อัลจิเนตถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในทางอุตสาหกรรม โดยเฉพาะในทางอุตสาหกรรมอาหาร ซึ่งเมื่อนำอัลจิเนตไปละลายหรือกระจายตัวในน้ำจะทำให้มีความหนืดสูง หรือมีลักษณะเป็นเจล นอกจากนี้ยังทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเป็น emulsifier, stabilizer, encapsulating agent และหน้าที่อื่นๆ ในผลิตภัณฑ์อาหาร โดยจะช่วยให้ผลิตภัณฑ์อาหารมีคุณภาพดีขึ้น เช่น ลักษณะเนื้อสัมผัส ลักษณะปรากฏ และสามารถยืดอายุของอาหาร เป็นต้น นอกจากนี้อุตสาหกรรมอาหารแล้วอัลจิเนตยังถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมสิ่งทอ กระดาษ และการแพทย์อีกด้วย เช่น ใช้เป็นส่วนผสมในการทำฟันปลอม (prosthetics dentistry) ใช้ในการทำอวัยวะเทียม (artificial organs) Chang (2003) ได้สรุปการนำอัลจิเนตไปใช้เป็นเซลล์และอวัยวะเทียม โดยใช้อัลจิเนตไปทำ crosslink กับโพลีเมอร์ชนิดอื่นๆ ได้แก่ alginate-polylysine-alginate สร้างเป็น microcapsules ภายในบรรจุอินซูลินเพื่อใช้ในการควบคุมระดับน้ำตาลเพื่อทำหน้าที่เป็นตับเทียม ใช้ทำเป็นเซลล์เทียมเลียนแบบเซลล์ *Escherichia coli* DH5 เพื่อใช้งานทางพันธุวิศวกรรม ใช้ทำเป็นเซลล์เม็ดเลือดแดงเทียมภายในบรรจุฮีโมโกลบิน ใช้เคลือบยา ออกฤทธิ์ช้าและเฉพาะที่ เป็นต้น นอกจากนี้ยังใช้เป็นสารดูดซับสารพิษ (detoxifier) ซึ่งจะมีความสามารถในการดูดซับสารพิษประเภทโลหะออกจากเลือด และยังถูกนำมาใช้ในการเป็นสารดูด

ซึบของเหลวในการพยาบาลฉุกเฉิน เนื่องมาจากคุณสมบัติในการดูดซับน้ำได้อย่างรวดเร็ว สำหรับทางอุตสาหกรรมมีการใช้อัลจินทเป็นส่วนประกอบในเครื่องสำอาง (cosmetic) ใช้ตรึงเอนไซม์ในอุตสาหกรรมเพื่อให้มีอายุเอนไซม์ยาวนานขึ้น อีกทั้งยังช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานและสามารถนำเอนไซม์กลับมาใช้ใหม่ได้อีกหลายครั้ง เป็นต้น โดยการตรึงเอนไซม์อาจใช้ร่วมกับโพลีเมอร์ ชนิดอื่นๆ อาทิ ไคโตแซน (chitosan) โพรทามีน (protamine) และคาร์บอซีเมทิลเซลลูโลส (carboxymethylcellulose) เป็นต้น (Taqieddin และคณะ, 2002; Taqieddin และ Amiji, 2004; Shu และ Zhu, 2002)

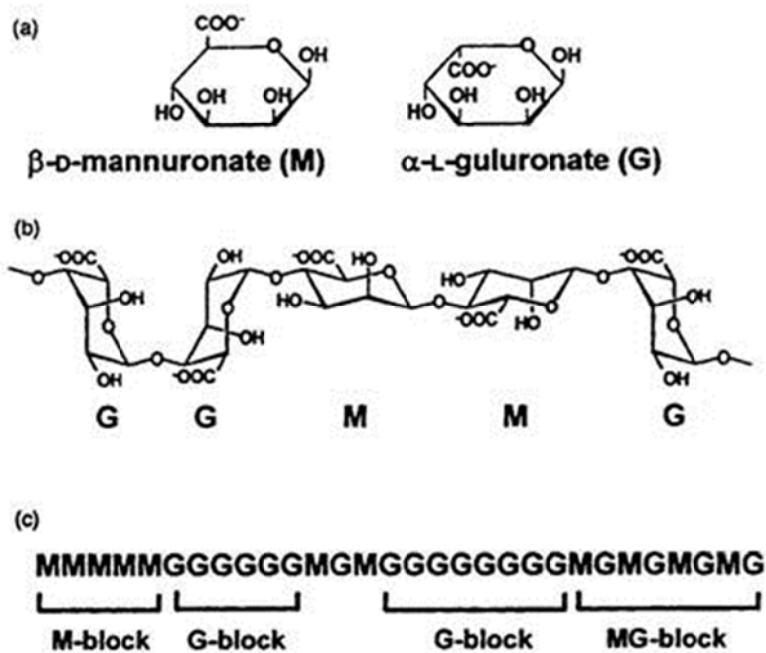
A. vinelandii เป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในดินโดยพบว่ามีความใกล้เคียงกับแบคทีเรียในกลุ่มอัลฟาโปรทีโอแบคทีเรีย (alpha-proteobacteria) มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนในอากาศได้อย่างอิสระโดยไม่ต้องอาศัยอยู่ร่วมกับพืชเหมือนกลุ่มไรโซเบียม การตรึงไนโตรเจนจะเกิดเมื่อสภาพแวดล้อมรอบเซลล์อยู่ในสภาวะที่ขาดไนโตรเจนโดยจะไปเพิ่มอัตราการหายใจ และยังพบว่าแบคทีเรียชนิดนี้สามารถที่จะผลิตสารเคมีจำพวกโพลีแซคคาไรด์ได้เมื่อนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม

โครงสร้างทางเคมีของอัลจินท (Alginate)

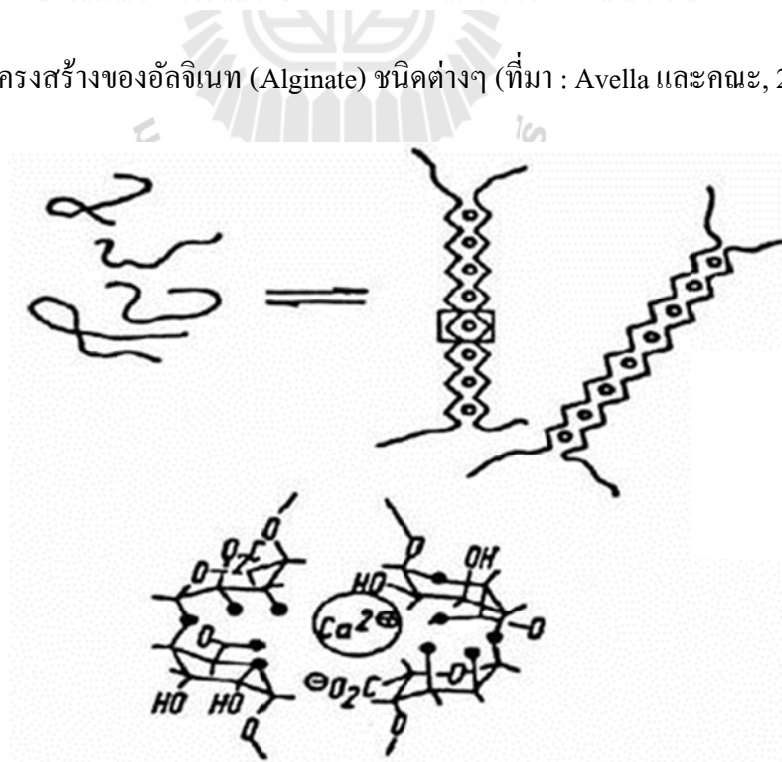
อัลจินทเป็นสารสกัดได้จากสาหร่ายทะเลสีน้ำตาล (Phaeophyceae) ในการผลิตอัลจินทเป็นอุตสาหกรรมสาหร่ายทะเลที่ใช้ได้แก่ *Macrocystis pyrifera* มีอัลจินทประมาณ 14-19%, *Laminaria cloustoni* และ *Laminaria digitata* มีอัลจินทประมาณ 15-40% ปริมาณที่พบจะขึ้นอยู่กับชนิดของสาหร่าย ถูฤดูกาลและแหล่งที่สาหร่ายเจริญเติบโต สาหร่ายเหล่านี้พบได้ทั่วยุโรปใน โลก ประเทศที่ผลิตอัลจินทมากคือ อเมริกา อังกฤษ ฝรั่งเศส สเปน นอร์เวย์ แคนาดา และญี่ปุ่น

อัลจินทเป็น unbranched binary copolymer ของ 1,4- β -D-manuronic acid (M) และ L-guluronic acid (G) ในโมเลกุลประกอบด้วย homopolymeric regions ของ M และ G ที่เรียกว่า G- และ M-blocks ตามลำดับและยังมีบางส่วนของโมเลกุลเป็น MG-blocks ดังรูปที่ 1.1 สัดส่วนของ copolymer และโครงสร้างเหล่านี้จะเป็นตัวกำหนดสมบัติของอัลจินทเช่น ถ้าโพลีเมอร์มี G ในปริมาณที่สูงจะมีสมบัติเป็นเจลที่แข็งที่ความเข้มข้นของโลหะประจุบวกเฉพาะ (polyvalent metal cation) แต่ถ้าโพลีเมอร์มี M ปริมาณสูงจะมีแนวโน้มที่จะเกิดเจลที่อ่อนนุ่มและมีสภาวะในการเกิดเจลที่กว้างกว่า อัลจินทที่ผลิตจำหน่ายเป็นการค้ามีหลายอนุพันธ์จึงมีสมบัติในการละลายน้ำที่แตกต่างกัน เช่น อนุพันธ์ของเกลือ Ca^{2+} , K^+ , Na^+ , NH_4^+ และยังผลิตในรูปของ propylene glycol alginate ซึ่งได้จากปฏิกิริยาของ alginic acid กับ propylene oxide ภายใต้อุณหภูมิ ความดัน อนุพันธ์เหล่านี้จะละลายได้ทั้งในน้ำร้อนและน้ำเย็น ความหนืดของสารละลายอัลจินทที่ได้ขึ้นอยู่กับ อุณหภูมิ ความเข้มข้น น้ำหนักโมเลกุล และการมีโลหะประจุบวก

อัลจินทบางชนิดมีสมบัติเป็นเจลและจะเกิดเจลได้เมื่อทำปฏิกิริยากับ Ca^{2+} โครงสร้างของเจลมีลักษณะคล้ายกล่องไข่ (egg box) โดยมี Ca^{2+} เกาะอยู่กับสายโพลิเมอร์ดังรูปที่ 1.2 สมบัติที่ดีของอัลจินทคือ ทำให้เกิด Irreversible gel ในน้ำเย็นเมื่อมี Ca^{2+} รวมอยู่ด้วย ซึ่งสมบัติในการเกิดเจลที่อุณหภูมิต่ำนี้ทำให้อัลจินทแตกต่างจากไฮโดรคอลลอยด์ชนิดอื่นๆที่ได้จากสาหร่ายสีแดง



รูปที่ 1.1 โครงสร้างของอัลจินท (Alginate) ชนิดต่างๆ (ที่มา : Avella และคณะ, 2007)

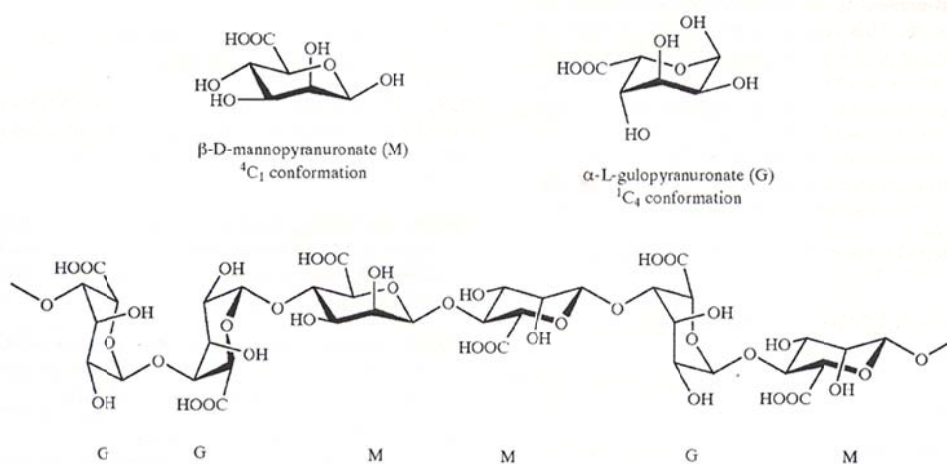


รูปที่ 1.2 กลไกการเกิดเจลของ calcium alginate (Egg-box model) (ที่มา : Steinbuechel และคณะ, 2001)

อัลจินเนทสามารถสกัดได้จากทั้งสาหร่ายและแบคทีเรียดิน เช่น *A. vinelandii* และ *A. crococcum* และหลายสปีชีส์ของ *Pseudomonas* อัลจินเนทที่ได้สามารถนำมาใช้ประโยชน์อย่างมากมาย อาทิ ใช้ผสมในอาหาร เป็นเครื่องปรุงยาสีฟัน เครื่องสำอาง และผลิตภัณฑ์เกี่ยวกับอุตสาหกรรมอื่นๆ เช่น ใช้เป็นไฮโดรเจล (hydrogel) เป็นสารแขวนลอย อิเล็กโตรไลต์ สารเพิ่มความหนืด เป็นต้น ซึ่งเจลอัลจินเนทมีความปลอดภัยสูงและเป็นที่ยอมรับกันในวงการอาหารและยาทั่วโลก (Amiji, 1999) ในปัจจุบันใช้สาหร่ายสีน้ำตาลมาผลิตในเชิงพาณิชย์ แต่ด้วยปัญหาด้านการจัดเก็บรวบรวมสาหร่ายในทะเลมีทั้งค่าใช้จ่าย อันตราย และทำลายสภาวะแวดล้อมทางธรรมชาติที่เป็นที่อยู่ของสัตว์น้ำ อีกทั้งกรรมวิธีในการสกัดอัลจินเนทต้องใช้กรดซึ่งได้ก่อให้เกิดปัญหาทางสิ่งแวดล้อม และเสียค่าใช้จ่ายในการบำบัดของเสียเหล่านี้ค่อนข้างสูง นอกจากนี้ยังไม่สามารถควบคุมคุณภาพของอัลจินเนทที่ได้เนื่องจากสภาพการเจริญเติบโตของสาหร่ายขึ้นกับสภาพของน้ำทะเล

อัลจินเนทจากเชื้อ *A. vinelandii* เป็นโพลิแซ็กคาไรด์ชนิดที่เซลล์ปล่อยออกมา ซึ่งแตกต่างจากสาหร่ายที่ต้องมีกรรมวิธีการสกัด ประกอบไปด้วยหน่วยย่อยของน้ำตาลประเภท uronic acids 2 ชนิด ได้แก่ mannuronic acid (M) และ guluronic acid (G) ที่เชื่อมกันด้วยพันธะ β -1,4 D-mannuronic acid และ α -1, 4 C-5 epimer α -L-guluronic acid ตามรูปที่ 1.3 จำนวนระหว่าง 50 ถึง 200,000 หน่วย

สายโพลิเมอร์อัลจินเนทจะเป็น heteropolymer ที่มีหน่วยย่อย (block) วางเรียงแตกต่างกันไป แต่ละหน่วยย่อยอาจมีโมเลกุลน้ำตาลวางเรียงตัวกัน 3-30 หน่วย หน่วยย่อยใดที่มี mannuronic acid จะเรียกว่า M-blocks หน่วยย่อยใดเป็น guluronic acid จะเรียกว่า G-blocks และอาจมีการผสมกันระหว่าง mannuronic acid และ guluronic acid ก็จะใช้เรียกว่า MG-blocks หรือการสลับกัน ตามรูปที่ 1.4



รูปที่ 1.3 แสดงโครงสร้างหน่วยย่อยของน้ำตาลประเภท uronic acids 2 ชนิดและการจัดเรียงสายโพลีเมอร์ (ที่มา : Avella และคณะ, 2007)

MMMMMMGGGGGGGGMGMGMGMGGGGGGGG

M-block G-block MG-block G-block

รูปที่ 1.4 แสดงแบบแผนการเรียงตัวของโครงสร้างอัลจินต (ที่มา : Avella และคณะ, 2007)

การเรียงตัวของน้ำตาลในแต่ละหน่วยย่อยจะขึ้นกับประเภทของสาหร่าย อายุ และชิ้นส่วนของสาหร่าย อาทิ ก้านสาหร่ายจะมี guluronic acid มากกว่าในใบค่อนข้างมาก หากอายุของสาหร่ายมากขึ้นปริมาณของ guluronic acid ก็จะเปลี่ยนแปลง นอกจากนี้ยังขึ้นกับสภาพแวดล้อมของน้ำเป็นอย่างมาก พบว่าในฤดูร้อนสาหร่ายจะผลิตอัลจินตที่มี mannuronic acid เพิ่มมากขึ้น (Hjelland, 2005)

เชื้อ *A. vinelandii* จะสามารถสร้าง exopolysaccharide หรืออัลจินตออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งสามารถแยกสกัดอัลจินตได้โดยการแยกเซลล์ด้วยการปั่นเหวี่ยง เซลล์ที่ได้สามารถนำไปใช้เป็นปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพได้เป็นอย่างดีเพื่อช่วยในการตรึงไนโตรเจนให้กับพืช โดยนำสารอาหารเลี้ยงเชื้อมาทำการตกตะกอนในแอลกอฮอล์แล้วจึงล้างตะกอน จากนั้นทำการแยกบริสุทธิ์ด้วยแอลกอฮอล์อีก 1-2 ครั้ง แอลกอฮอล์ที่ใช้ก็สามารถนำมากลับมาใช้ใหม่ได้ด้วยการกลั่น ตะกอนที่ได้นำมาอบสุดท้ายจะได้ผงอัลจินต ซึ่งวิธีการแยกสกัดนี้จะไม่มีปัญหาต่อสิ่งแวดล้อม อีกทั้งกระบวนการผลิตก็ไม่มีการปล่อยทิ้งเห็นได้ว่าการผลิตอัลจินตจากเชื้อ *A. vinelandii* นอกจากจะสามารถควบคุมการผลิตได้ด้วยหลักการ Bioprocess แล้วยังสามารถผลิตด้วยเทคโนโลยีสะอาด (Green Technology) อีกด้วย

1.2 การทบทวนวรรณกรรม (reviewed literature) / สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

Azotobacter vinelandii เป็นเชื้ออาศัยอยู่ในดินถูกค้นพบมากกว่า 90 ปี ต้องการอากาศมีอัตราการหายใจสูง สามารถเจริญได้ดีในน้ำตาล แอลกอฮอล์ และกรดอินทรีย์ ได้อย่างหลากหลายชนิด สามารถผลิตเอนไซม์ nitrogenase ในสถานะที่ไม่มีก๊าซไนโตรเจน สามารถนำธาตุโมลิบดีนัม ธาตุวานาเดียมหรือเหล็ก มาเป็น cofactors ช่วยทำงานในกระบวนการตรึงไนโตรเจน (nitrogen fixation) ให้กลายเป็นแอมโมเนียม(NH_4^+) ได้ เชื้อนี้สามารถสร้างโพลีเมอร์ของคาร์บอนเพื่อใช้เก็บเป็นพลังงานได้แก่ อัลจินต และ poly- β -hydroxybutyric acid (PHB) สามารถใช้ทำเป็นพลาสติกชนิดย่อยสลายได้ (biodegradable plastics) แบคทีเรียชนิดนี้สามารถสร้างถุงน้ำ (cyst) เพื่อใช้สารอาหารในสถานะแห้งแล้ง ทำให้สามารถทนทานต่อสภาพแห้งแล้งในดินได้เป็นอย่างดี ภายในถุงน้ำเหล่านี้จะบรรจุด้วย 5-

alkylresorcinols ซึ่งเป็น phenolic lipids โดยทั่วไปจะพบเฉพาะในพืชและสัตว์เท่านั้น จะมีเพียงแบคทีเรียชนิดนี้เท่านั้นที่มีความสามารถในการสร้างนี้ได้ (http://genome.jgi-psf.org/draft_microbes/azovi/azovi.home.html)

Vermani และคณะ (1997) สามารถคัดแยกเชื้อ *A. vinelandii* MTCC2459 ได้จากลำต้นของดอกบัว และพบว่าสามารถสร้างโพลีแซคคาไรด์ได้สูงถึง 16.5% เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครสเพียง 50 กรัมต่อลิตร และมีไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียหรือยูเรียอีก 0.1 กรัมต่อลิตร เท่านั้น ต่อมาภายหลังจึงทราบว่าโพลีแซคคาไรด์นี้เป็นอัลจินเนท Clementi และคณะ (1998) ได้ศึกษาคุณสมบัติด้านความหนืดของอัลจินเนทความเข้มข้นต่างๆ ที่ผลิตจากเชื้อ *A. vinelandii* DSM576 พบว่ามีค่า shear rate อยู่ระหว่าง $1.1 - 1400 \text{ s}^{-1}$ เมื่ออัลจินเนทมีความเข้มข้นระหว่าง 0.3-1.5 %w/v และแสดงพฤติกรรมเป็น Pseudoplastics ซึ่งมีคุณสมบัติคล้ายกับอัลจินเนทที่ได้จากสาหร่าย Parente และคณะ (1998) ได้ศึกษาการผลิตอัลจินเนทโดยใช้เชื้อ *A. vinelandii* DSM576 ในการหมักแบบ batch พบว่าการผลิตอัลจินเนทจะมีปริมาณมากที่สุดเมื่อไม่มีการควบคุมค่าการละลายของออกซิเจน (Dissolved oxygen concentration : DO) โดยดูผลจาก molecular weight ของอัลจินเนท ซึ่งมีค่า $11-17.6 \times 10^4$ เมื่อค่า specific growth rate เท่ากับ $0.02-0.04 \text{ h}^{-1}$ และยังพบว่าปริมาณ residual nitrogen source มีค่าลดลงเรื่อยๆ Parente และคณะ (2000) ได้ศึกษาผลของแอมโมเนียมซัลเฟตและความเร็วรอบของใบพัดที่มีต่อผลิตอัลจินเนทโดยใช้เชื้อ *A. vinelandii* DSM576 พบว่า ค่า specific growth rate และ molecular weight จะมีค่ามากที่สุดเมื่อเพิ่มค่าความเร็วรอบของใบพัด (500-600 rpm) และความเข้มข้นของ ammonium sulphate ที่ $0.75-0.90 \text{ g l}^{-1}$ Pena และคณะ (2000) ได้ศึกษาถึงผลของค่าการละลายของออกซิเจน (Dissolved oxygen tension : DOT) และค่าความเร็วในการหมุนของใบพัดในถังหมักต่อการผลิตอัลจินเนท พบว่าที่ค่า DOT สูงๆจะมีปริมาณการผลิตอัลจินเนทมากกว่าที่ค่า DOT ต่ำ โดยใช้ความเร็วของใบพัด 300 rpm และพบว่าเมื่อให้ค่า DOT คงที่ที่ 3% และใช้ความเร็วรอบของใบพัดสูงๆ จะให้ค่า specific growth และ ปริมาณอัลจินเนทมากที่สุด แต่จะมีค่า molecular weight ต่ำลง

Saude และคณะ (2002) ได้ทดลองผลิตอัลจินเนทจากเชื้อ *A. vinelandii* ในระบบถังหมักแบบหมุน รูปุนขนาด 0.20 – 1.4 ไมครอน พบว่าสามารถแยกบริสุทธิ์อัลจินเนทได้ประมาณ 70-80% โดยมีอัตราการผลิต 0.09 กรัมต่อชั่วโมง ให้ yield 0.21 กรัมต่อกรัมน้ำตาลซูโครส ซึ่งค่อนข้างต่ำมาก Reyes และคณะ (2003) ได้ศึกษาการผลิตอัลจินเนทในถังหมักได้น้ำหนักโมเลกุล 1.1×10^6 ดาลตัน น้อยกว่าการเลี้ยงใน flask เล็กน้อย (1.9×10^6 ดาลตัน) เนื่องจากระบบการกวนในถังหมักที่แรงกว่าและใช้พลังงานในการกวนมากกว่าใน flask เกือบสิบเท่า

Joint Genome Institute สหรัฐอเมริกา ได้ให้ความสำคัญของเชื้อนี้มาก และได้บรรจุอยู่ในโครงการการหาลำดับเบสโดยร่วมมือกับ [Oak Ridge National Laboratories](http://www.oakridge.gov.uk) เพื่อหาการเรียงลำดับเบสขนาดประมาณ 5.3 Mb ซึ่งปัจจุบันสามารถค้นพบโปรตีนแล้วมากกว่า 5 หมื่นชนิดจากเชื้อตัวนี้ (<http://ava.biosci.arizona.edu/index.html>) ซึ่งมีกลุ่มยีน (gene cluster) ควบคุมการผลิตอัลจินเนทอยู่ด้วย

ยีนที่ใช้สร้างอัลจินเทจะประกอบ 6 ยีนใน operator เดียวกัน ได้แก่ *algD*, *alg8*, *alg44*, *algK*, *algJ* และ *algG* โดยมียีน *algK* เป็นยีนหลักในการผลิตอัลจินเท กลุ่มยีนนี้จะทำหน้าที่สังเคราะห์เอนไซม์ O-acetylase และ C-5-epimerase เพื่อเปลี่ยน GDP-mannuronic acid (ได้มาจากการเปลี่ยน fructose-6-P) เป็น polymannuronic acid (Mejia-Ruiz และคณะ, 1997) นอกจากนี้ Gaona และคณะ (2004) ยังพบว่า ยีน *algC* ไม่ได้อยู่ในกลุ่มยีนเดียวกับ *algK* แต่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์อัลจินเทและยังมีส่วนเกี่ยวข้องกับการสร้างโพลีแซคคาไรด์ที่มีไขมัน (lipopolysaccharide) อีกด้วย

จากการทดลองของผู้วิจัยและทีมงานวิจัยของโครงการการผลิตปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพเพื่อการพาณิชย์ ภายใต้สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) สามารถแยกเชื้อแบคทีเรีย *Azotobacter vinelandii* ได้และได้ศึกษากระบวนการหมักเพื่อการเพิ่มปริมาณเซลล์ภายใต้การควบคุมปริมาณอากาศ พบว่าเชื้อนี้สามารถผลิตอัลจินเทได้ปริมาณมากในสภาวะที่มีน้ำตาลสูงและปริมาณอากาศสูง แต่ยังไม่มีการศึกษาอย่างจริงจังในแง่การผลิตอัลจินเท จึงเห็นว่าโครงการวิจัยนี้จะสามารถช่วยพัฒนาการผลิตอัลจินเทแล้วนำไปต่อยอดเพื่อการประยุกต์ใช้ในทางอุตสาหกรรมในด้านการตรึงเอนไซม์ โดยจะใช้เอนไซม์อะไมเลสเป็นโมเดลในการศึกษา

1.3 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1.3.1 ทราบสภาวะที่เหมาะสมและกลไกการทำงานทางจุลพลศาสตร์ต่อการผลิตอัลจินเทโดยใช้เชื้อ *Azotobacter vinelandii* ในถังหมักขนาดเล็ก
- 1.3.2 เพื่อขยายขนาดกำลังการผลิตอัลจินเทในถังหมักขนาด 5 ลิตร
- 1.3.3 เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการตรึงเอนไซม์ร่วมกับ โพลีเมอร์ชนิดอื่น
- 1.3.4 เพื่อทำการพัฒนาประยุกต์ใช้อัลจินเทในการตรึงเอนไซม์เพื่อการอุตสาหกรรม

1.4 สมมติฐานของงานวิจัย

เชื้อ *Azotobacter vinelandii* สามารถผลิตอัลจินเทโดยมีคุณภาพเทียบเท่ากับอัลจินเทจากสาหร่ายและสามารถนำอัลจินเทที่ได้มาใช้ประโยชน์ในการตรึงเอนไซม์บีต้าอะไมเลส

1.5 ขอบเขตและข้อจำกัดของงานวิจัย

สภาวะที่เหมาะสมของการผลิตอัลจินเทเช่น ความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส แหล่งอาหารไนโตรเจน ความเข้มข้นของไนโตรเจน และปริมาณออกซิเจนที่ใช้ในการผลิตอัลจินเทจากเชื้อ *Azotobacter vinelandii* โดยทำการทดลองในถังหมักขนาด 2 ลิตรโดยใช้อาหารปริมาตร 1.5 ลิตร และเพิ่มการผลิตเป็น 5 ลิตร โดยใช้ปริมาตรอาหาร 3 ลิตร ทำการทดสอบประสิทธิภาพของอัลจินเทโดยใช้ในการตรึงเอนไซม์บีต้าอะไมเลส

1.6 ผลการวิจัยที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถผลิตอัสจินที่มีประสิทธิภาพสูงจากเชื้อ *Azotobacter vinelandii* และสามารถแสดงประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนในพืชไร่ได้อย่างมีประสิทธิภาพ



บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

2.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

ทำการเลี้ยงเชื้อ *Azotobacter vinelandii* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LG โดยในอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร ประกอบด้วย น้ำตาลซูโครส (sucrose) 10 กรัม, KH_2PO_4 0.15 กรัม, yeast extract 0.2 กรัม, K_2HPO_4 0.05 กรัม, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02 กรัม, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.002 กรัม, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.002 กรัม และ $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.002 กรัม เติมน้ำ DI 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH เท่ากับ 6.8 ด้วย 1M NaOH นำเชื้อไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 °ซ ในเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

2.2 วิธีการวิเคราะห์

2.2.1 การวัดความหนืด

ทำการวัดความหนืดของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวด้วยเครื่องวัดความหนืด (viscometer) และเครื่องวัดแรงเฉือน (rheometer) ทำการวัดความหนืดและแรงเฉือนที่อุณหภูมิห้อง (25 °ซ) กำหนดให้อัตราเฉือนอยู่ที่ 12 s^{-1} และความเร็วรอบที่ 12.90 rpm โดยใช้ cone C-21 (Pena และคณะ, 1997) ความเค้นเฉือน (shear stress; τ) คำนวณ โดยใช้สูตร (1)

$$\text{ความเค้นเฉือน } (\tau) = \text{ค่าความหนืดปรากฏ } (\mu) \times \text{อัตราเฉือน } (\gamma) \quad (1)$$

โดยที่: ความเค้นเฉือน (shear stress) = แรงเฉือนปกติต่อหน่วยพื้นที่ของ plate ($\text{cP} \cdot \text{s}^{-1}$)
อัตราเฉือน (shear rate) = การเปลี่ยนแปลงความเร็วของไหลต่อระยะทาง (s^{-1})

ความหนืดปรากฏ (Apparent viscosity) = ความสามารถในการต้านทานการไหลของของไหล (cP)

2.2.2 การวัดการเจริญของเซลล์

ทำการวัดการเจริญของเชื้อโดยวิธีการนับจำนวนเซลล์มีชีวิตบนอาหาร LG โดยนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 48 ชม.

อัตราการเจริญจำเพาะ (μ, h^{-1}) คำนวณ โดยใช้สูตร (2)

$$\ln x = \ln x_0 + \mu t \quad (2)$$

โดยที่:	x	=	จำนวนเซลล์ที่เวลาสุดท้าย
	x_0	=	จำนวนเซลล์ที่เวลาเริ่มต้น
	t	=	เวลา
	μ	=	อัตราการเจริญจำเพาะ (t^{-1})

ตามสมการที่ (2) นำค่าที่ได้ไปพลอตกราฟระหว่าง $\ln x$ กับเวลา (t) ซึ่งจะได้กราฟเส้นตรงซึ่งมีค่าความชัน (μ) การพลอตกราฟโดยใช้สมการนี้ นิยมนำมาใช้ในการหาค่าอัตราการเจริญจำเพาะ ซึ่งจะให้ค่าที่ค่อนข้างคงที่

2.2.3 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

ทำการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้เครื่อง High Performance Liquid Chromatographic (HPLC) โดยใช้ RI-1530 detector (Jasco, Japan) ใช้ Phenomenex® Rozex RPM-Monosaccharide column (300 x 7.8 mm) ควบคุมอุณหภูมิที่ 75 °C ในการทำการทดลองใช้น้ำ DI (deionized water) เป็น mobile phase ที่อัตราการไหล 0.6 มล./นาที

อัตราการใช้น้ำตาล (sugar utilization rate; g/L/h) คำนวณโดยใช้สูตร (3)

$$S = S_0 \times e^{\text{Sugar utilization rate} \times t} \quad (3)$$

โดยที่:	S	=	ความเข้มข้นของน้ำตาล ณ เวลา (กรัม/ลิตร)
	S_0	=	ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น (กรัม/ลิตร)
	t	=	เวลา (ชม.)

2.2.4 การวิเคราะห์กรดอินทรีย์

ทำการวิเคราะห์หากรดอินทรีย์บางชนิดโดยใช้เครื่อง High Performance Liquid Chromatographic (HPLC) โดยใช้ UV 6000 LP detector กำหนดค่าความยาวคลื่นที่ 210 nm ใช้ The Phenomenex® Rozex ROA organic acid column (300 x 7.8 mm) ควบคุมอุณหภูมิที่ 55 °C ในการทดลองใช้ 0.005 N of H₂SO₄ เป็น mobile phase ที่อัตราการไหล 0.5 มล./นาที

2.2.5 การวัดความเข้มข้นของอัลจินท

การหาความเข้มข้นของอัลจินททำตามวิธีดังต่อไปนี้ โดยคัดตัวอย่างเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเหลวปริมาณ 10 มล. นำมาผสมกับ EDTA (0.1 M) 1 มล. และ NaCl (1.0 M) 1 มล. ต่อจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสที่ได้มาเติมด้วย isopropanol 30 มล. นำมาเขย่าให้ผสมเข้ากัน หลังจากทิ้งไว้ 10 นาทีนำตัวอย่างที่ได้มากรองด้วยกระดาษกรอง (เบอร์ 1) อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 24 ชม. แล้วนำไปชั่งน้ำหนัก (Pena *et al.*, 1997)

ผลผลิตอัลจิเนต (yield of alginate; Yp/s, g/g) คำนวณโดยใช้สูตร (4)

$$Yp/s = P / S \quad (4)$$

โดยที่: P = ผลผลิตอัลจิเนตที่ผลิตได้ (กรัม)
S = สารตั้งต้นที่ใช้ไป (กรัม)

2.2.6 การหาน้ำหนักโมเลกุล

การหาน้ำหนักโมเลกุลของอัลจิเนตจะใช้วิธี gel permeation chromatography (GPC) โดยใช้เครื่อง HPLC ซึ่งจะใช้ RI -1530 detector และ Water® Ultrahydrogel 500 column (300 x 7.8 mm) ควบคุมอุณหภูมิที่ 40 °ซ โดยใช้ 0.1 M NaNO₃ เป็น mobile phase ที่อัตราการไหล 0.9 มล./นาที โดยใช้ pullulans ของ *Aureobasidium pullulans* เป็นน้ำหนักโมเลกุลมาตรฐาน (Shodex, Japan; Pena และคณะ, 1997)

2.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตอัลจิเนตในระดับพลาสต์

2.3.1 แหล่งคาร์บอนและความเข้มข้น

สูตรอาหารที่ใช้ในการทดลองคือสูตรอาหาร LG ดังที่ได้กล่าวมาแล้วในข้อ 2.1 โดยจะนำมาเพิ่มแหล่งคาร์บอนและความเข้มข้นที่แตกต่างกันไป โดยในการทดลองจะใช้คาร์บอนจากทั้งหมด 11 แหล่งประกอบไปด้วย กลูโคส (glucose), อะราบินโนส (arabinose), มอลโตส (maltose), แรมโนส (rhamnose), แลคโตส (lactose), แมนโนส (mannose), ฟรุคโตส (fructose), ทรีฮาโลส (trehalose), ไชโลส (xylose) ซอร์บิทอล (sorbital) และซูโครส (sucrose) โดยจะใช้แหล่งคาร์บอนเหล่านี้มาแทนที่แหล่งคาร์บอนเดิมในสูตรอาหาร LG โดยทำการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของคาร์บอนแต่ละชนิดจากตั้งแต่ 0-40% (w/v) ขยับระยะห่างความเข้มข้นทุกๆ 5% จากหนึ่งพลาสต์ไปยังพลาสต์อื่นๆ นำมาทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 2.2 (ยกเว้นข้อ 2.2.6) แหล่งคาร์บอนและความเข้มข้นที่เหมาะสมจะถูกนำมาใช้ในการทดลองต่อไป

2.3.2 อุณหภูมิ

ในการวิเคราะห์หาอุณหภูมิที่เหมาะสมที่มีต่อการผลิตอัลจิเนตจะใช้สูตรอาหาร LG ในการทดลอง โดยทำการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิตั้งแต่ 20-37 °ซ ตามวิธีของ Clementi และคณะ (1999) นำมาทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 2.2 (ยกเว้นข้อ 2.2.6) แหล่งคาร์บอนและความเข้มข้นที่เหมาะสมจะถูกนำมาใช้ในการทดลองต่อไป อุณหภูมิที่เหมาะสมจะถูกนำมาใช้ในการทดลองต่อไป

2.3.3 ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น

สูตรอาหาร LG และวิธีการวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 2.1 และ 2.2 (ยกเว้นข้อ 2.2.6) ตามลำดับ โดยค่าความเป็นกรด-ด่างจะปรับให้อยู่ในช่วงตั้งแต่ 5-9 ด้วย 1N HCl หรือ 1N NaOH ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมจะถูกนำมาใช้ในการทดลองต่อไป

2.3.4 แหล่งไนโตรเจน

ในการหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่มีต่อการผลิตอัลจินทะใช้อาหาร LG ในการทดลอง โดยในการทดลองจะใช้ไนโตรเจนจากทั้งหมด 3 แหล่ง ประกอบไปด้วย แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl), ได-แอมโมเนียมฟอสเฟต (DAP) และแอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) โดยจะใช้แหล่งไนโตรเจนเหล่านี้มาแทนที่แหล่งไนโตรเจนเดิมในสูตรอาหาร LG โดยทำการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไนโตรเจนแต่ละชนิดจาก 0-20 กรัม/ลิตร ขยับระยะห่างความเข้มข้นทุกๆ 5 กรัม/ลิตร จากหนึ่งพลาสติกไปยังพลาสติกอื่นๆ นำมาทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 2.2 (ยกเว้นข้อ 2.2.6) แหล่งไนโตรเจนและความเข้มข้นที่เหมาะสมจะถูกนำมาใช้ในการทดลองต่อไป

2.4 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตอัลจินทในระดับถึงหมัก

2.4.1 ปริมาณออกซิเจน

ทำการวิเคราะห์หาอัตราการไหลของอากาศที่เหมาะสมต่อการผลิตอัลจินทในระดับถึงหมัก โดยจะทำการเปลี่ยนแปลงอัตราการไหลของอากาศจาก 0 - 5 vvm (ปริมาตรของอากาศ/ปริมาตรของของเหลว/ นาที) ในถึงหมักขนาด 2 ลิตร (micro DCU-300, B. Braun Biotech international, Germany) โดยใช้ปริมาณในการทำงานที่ 1.5 ลิตรและใช้สภาวะที่เหมาะสม (แหล่งคาร์บอน อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และแหล่งไนโตรเจน) ที่ได้จากการทดลองในระดับพลาสติกมาใช้ในการทดลอง ในระหว่างกระบวนการหมักจะทำการเก็บตัวอย่างภายใน 24 ชม. ทุกๆ 4 ชม. และหลังจาก 24 ชม. ผ่านไปแล้วจะทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 6 ชม. นำตัวอย่างที่ได้มาทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 2.2 (ยกเว้นข้อ 2.2.6) อัตราการไหลของอากาศที่เหมาะสมจะถูกเลือกมาใช้ในการทดลองต่อไป

2.4.2 การกวน

ทำการวิเคราะห์หาความเร็วในการกวนที่เหมาะสมต่อการผลิตอัลจินทโดยเริ่มต้นทำการทดลองในถึงหมัก โดยจะทำการเปลี่ยนแปลงความเร็วในการกวนตั้งแต่ 100-600 rpm ในถึงหมักขนาด 2 ลิตร โดยใช้ปริมาณในการทำงานที่ 1.5 ลิตร แหล่งคาร์บอน อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจะถูกนำมาใช้ในการทดลองต่อไป นำตัวอย่างที่ได้มาทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 2.2 (ยกเว้นข้อ 2.2.6)

2.5 การเพิ่มคุณสมบัติของการผลิตอัลจิเนท

2.5.1 การเติมกรดอินทรีย์ในระดับฟลาส์ก

การเติมกรดอินทรีย์ถูกนำมาใช้เพื่อเพิ่มคุณสมบัติของการผลิตอัลจิเนทหรือมวลเซลล์ ยกตัวอย่างเช่น การผลิตอัลจิเนท ความหนืดปรากฏ และการเจริญเติบโตของเซลล์แบคทีเรีย โดยสถานะที่เหมาะสมทั้งหมดที่ได้จากการทดลองในระดับฟลาส์กจะถูกนำมาใช้ในการทดลองโดยใช้กรดอินทรีย์ทั้งหมด 9 ชนิด ประกอบด้วย กรดซักซินิก (succinic acid), กรดฟูมาริก (fumaric acid), กรดโพรพิโอนิก (propionic acid), กรดไฟติก (phytic acid), กรดมาลิก (malic acid), กรดอะดิปิก (adipic acid), กรดแลคติก (lactic acid), กรดทาร์ทาริก (tartaric acid) และกรดโฟ-อะมิโนไฮดรอกซีเบนโซอิก (4-aminohydroxybenzoic acid) ที่ความเข้มข้น 0.1% w/v นำมาเติมในอาหาร LG กรดอินทรีย์ชนิดที่ผลิตอัลจิเนทได้สูงที่สุด รวมถึงความหนืดปรากฏ และการเจริญของเซลล์แบคทีเรีย จะถูกนำมาใช้ในการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมโดยเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของกรดอินทรีย์ตั้งแต่ 0.05, 0.1, 0.15 และ 0.2% (w/v) นำตัวอย่างที่ได้มาทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 2.2 (ยกเว้นข้อ 2.2.6) ชนิดกรดอินทรีย์และความเข้มข้นที่เหมาะสมจะนำไปใช้ในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตอัลจิเนท ความหนืดปรากฏ และการเจริญเติบโตของเซลล์แบคทีเรียในถังหมักขนาด 2 ลิตร

2.5.2 กรดอินทรีย์ต่อการผลิตอัลจิเนทในถังหมักขนาด 2 ลิตร

ทุกสถานะที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองในระดับฟลาส์ก (แหล่งและความเข้มข้นของคาร์บอน, อุณหภูมิ, ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น และแหล่งไนโตรเจน) และถังหมักขนาด 2 ลิตร (ความเร็วในการกวนและอัตราการไหลของอากาศ) จะถูกนำมาใช้ในการเพิ่มคุณภาพของอัลจิเนทในถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยใช้ปริมาณในการทำงานที่ 1.5 ลิตร ในระหว่างกระบวนการหมักทั้งหมดจะทำการเก็บตัวอย่างใน 24 ชม. ทุกๆ 4 ชม. และหลังจาก 24 ชม. ผ่านไปแล้วจะทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 6 ชม. นำตัวอย่างที่ได้มาวิเคราะห์ตามข้อ 2.2

2.6 การผลิตอัลจิเนทในถังหมักขนาด 5 ลิตร

แหล่งคาร์บอน อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น แหล่งไนโตรเจน ความเร็วในการกวน ปริมาณออกซิเจนและชนิดกรดอินทรีย์ที่เหมาะสมจะถูกนำมาใช้ในการผลิตอัลจิเนทในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้ปริมาณในการทำงานที่ 3 ลิตร เป็นเวลา 72 ชม. ทำการควบคุมความเป็นกรด-ด่างด้วย 0.1 N H₂SO₄ หรือ 1 N NaOH ลิตร ในระหว่างกระบวนการหมักทั้งหมดจะทำการเก็บตัวอย่างใน 24 ชม. ทุกๆ 4 ชม. และหลังจาก 24 ชม. ผ่านไปแล้วจะทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 6 ชม. นำตัวอย่างที่ได้มาวิเคราะห์ตามข้อ 2.2 ยกเว้นข้อ 3.2.6

2.7 การตรึงเอนไซม์บีต้าอะไมเลสโดยใช้อัลจินท

2.7.1 การตรึงเอนไซม์

นำอัลจินท (อัลจินทที่ผลิตจากเชื้อ *Azotobacter vinelandii* 2.5 % (w/v) และอัลจินทจากสาหร่าย 2% (w/v) มาผสมกับเอนไซม์บีต้าอะไมเลส 200 mg/L (Sigma, Singapore)) ส่วนผสมที่ได้ ออกมาโดยใช้พาสเจอร์ไรเปด (เส้นผ่านศูนย์กลาง 1 มม.) ใส่สารละลาย CaCl_2 5% (w/v) กวนเบาๆ เป็นเวลา 2 ชม. โดยจะได้เม็ดอัลจินทขนาดประมาณ 3 มม. เม็ดแคปซูลที่ได้จะถูกนำกลับมาใช้โดยการกรองผ่านกรวยบุชเนอร์ (Buchner funnel) แล้วนำไปล้างด้วย 0.02 M acetate buffer (pH 4.8) เพื่อนำเอา CaCl_2 และเอนไซม์ที่ตกค้างอยู่ออกไป นำอัลจินทที่ได้มาผึ่งให้แห้งบนกระดาษกรองเป็นเวลา 2 ชม. เม็ดอัลจินทที่ได้จะนำไปเก็บใน 0.02 M acetate buffer ที่อุณหภูมิ 4 °ซ (Konsoula และคณะ, 2006; Chang และ Juang, 2005)

2.7.2 การประเมินกิจกรรมของเอนไซม์

วิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์บีต้าอะไมเลสอิสระโดยใช้วิธีดังต่อไปนี้ (Bergmeyer, 1983) โดยใช้สารละลายแป้ง (starch solution; 0.5% v/v) ซึ่งเตรียมได้จากการใช้ soluble starch จาก potato (Sigma, Singapore) 0.25 กรัม ละลายลงใน 0.02 M ของ acetate buffer (pH 4.8) โดยให้ความร้อนเล็กน้อยเพื่อช่วยให้ละลาย หลังจากทิ้งไว้ให้เย็น นำตัวอย่างสารละลายที่ได้มา 37.5 มล. ชั่งสาร โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 0.073 กรัม เติมลงในตัวอย่างสารละลายทันที ส่วนการเตรียมสารละลายเอนไซม์จะทำการเติมเอนไซม์บีต้าอะไมเลสลงในน้ำ DI ที่มีส่วนผสมของ Lugol reagent (0.01 M I_2 and 0.08 M KI in 0.02 M HCl) และ 0.02 M acetate buffer (pH 4.8) ต่อจากนั้นดูดสารละลายเอนไซม์ที่เตรียมไว้มา 0.1 มล. และสารละลายแป้ง 0.5 มล. นำมาผสมกับน้ำ DI 0.9 มล. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 10 นาที ทำการหยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 0.02 M HCl 2 มล. นำตัวอย่างที่ได้มาเจือจางโดยการเติม Lugol reagent 0.5 มล. และน้ำ DI 1 มล. นำตัวอย่างที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 601 nm ด้วยเครื่อง UV/ Visible spectrophotometer (Ultraspec 2000 UV/Visible Spectrophotometer, Pharmacia Bitech, England) หน่วยของกิจกรรมเอนไซม์ (U) กล่าวคือ ปริมาณของเอนไซม์ที่ใช้ย่อยแป้ง 10 มก. ภายในเวลา 10 นาที

กิจกรรมของเอนไซม์ที่ถูกตรึงจะนำมาวิเคราะห์เช่นเดียวกับวิธีวิเคราะห์เอนไซม์อิสระ แต่มีการดัดแปลงวิธีเล็กน้อย โดยจะใช้เอนไซม์ที่ถูกตรึงโดยอัลจินทแล้ว 0.05 กรัมและสารละลายแป้ง 0.5 มล. ผสมกับน้ำ DI 1 มล. นำไปบ่มเป็นเวลา 15 นาที (Change และ Juang, 2005)

2.7.3 ความสามารถในการนำเอนไซม์กลับมาใช้ใหม่

เอนไซม์ที่ผ่านการตรึงด้วยอัลจินทแล้วจะถูกนำมาเก็บไว้ใน 0.02 M of acetate buffer (pH 4.8) ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 7 วันก่อนการนำมาใช้ โดยเอนไซม์ที่ถูกตรึงแล้วจะถูกนำกลับมาใช้ใหม่ 8 ครั้งในทุกๆ 3 วัน และทำการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ตามข้อ 2.7.2 หลังจากผ่านแต่ละขั้นตอนจะทำการล้างเม็ดอัลจินทด้วย 0.02 M of acetate buffer แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ

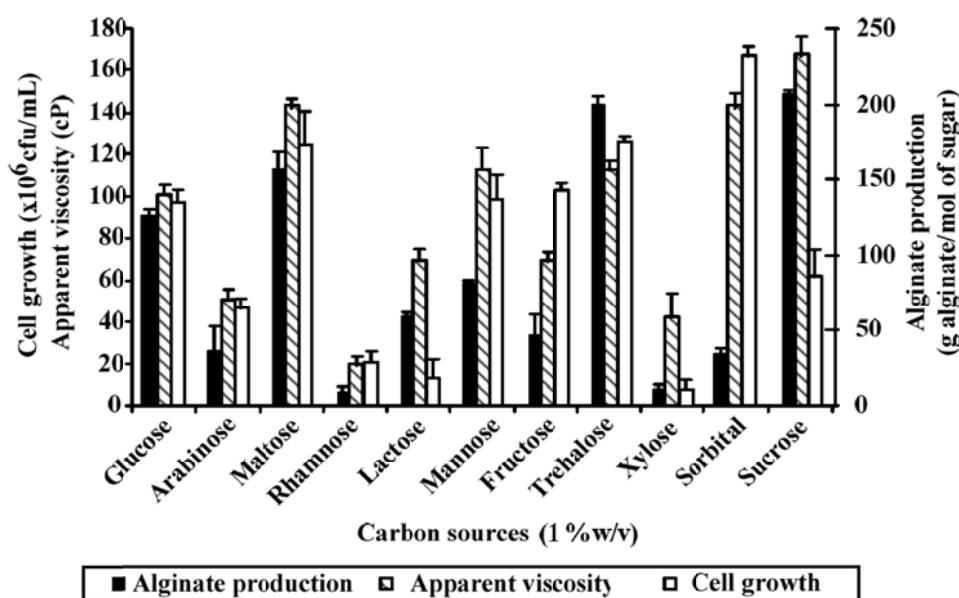
บทที่ 3

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

3.1 สภาพของการผลิตอัลจินเตด้วยเชื้อ *Azotobacter vinelandii* ในระดับฟ्लाส์ก

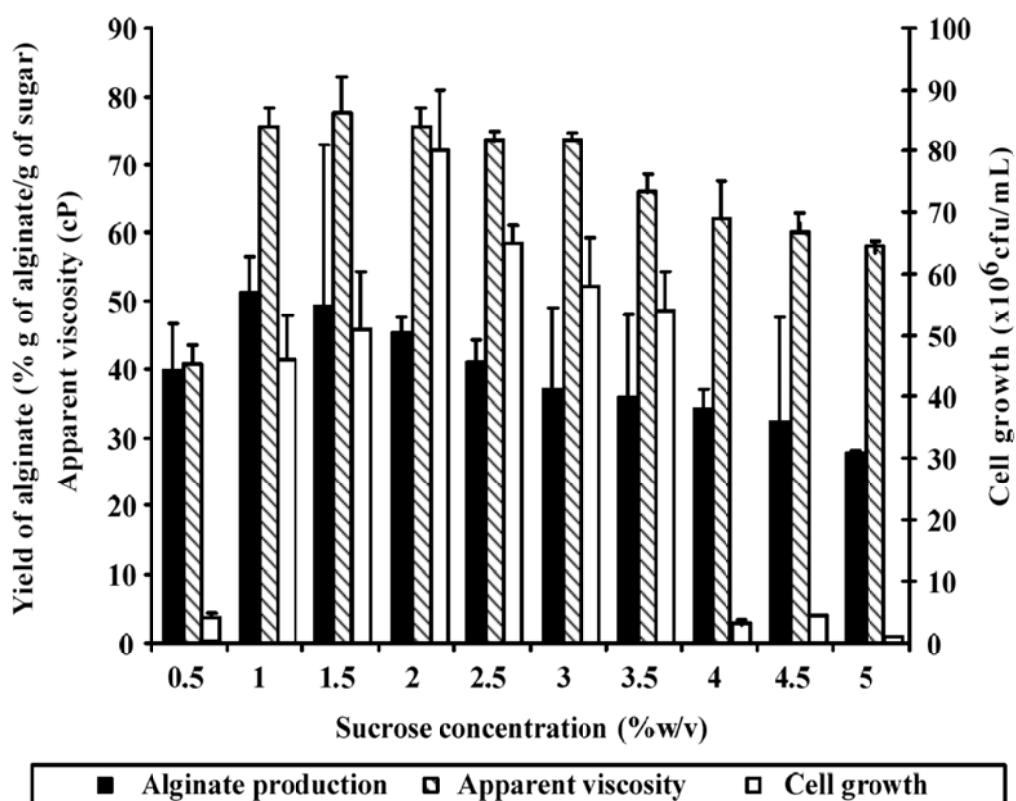
3.1.1 แหล่งอาหารคาร์บอน และความเข้มข้น

การเจริญของเชื้อและการผลิต EPS โดยปกติจะขึ้นอยู่กับแหล่งอาหารคาร์บอนซึ่งจะส่งผลต่อคุณภาพ องค์ประกอบของน้ำตาล และ/หรือน้ำหนักโมเลกุลของ EPS (Wachenheim และ Patterson, 1992) แหล่งอาหารคาร์บอนที่ใช้ในการศึกษาคือ กลูโคส, อะราบินโนส, แรมโนส, แลคโตส, มอลโตส, แมนโนส, ฟรุคโตส, ทรีฮาโลส, ไซโลส, ซอลบิทอล และ ซูโครส ผลของแหล่งอาหารคาร์บอนต่อการผลิตอัลจินเต ความหนืด และการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแสดงดังในรูปที่ 3.1 การใช้แหล่งคาร์บอนที่มีความเข้มข้น 1% ในการผลิตอัลจินเตจากเชื้อ *Azotobacter vinelandii* พบว่าน้ำตาลทรีฮาโลสและซูโครสให้ค่า ผลผลิตของอัลจินเตที่ใกล้เคียงกันที่ 156.67 กรัมต่อโมล และ 206.67 กรัมต่อโมล ตามลำดับ โดยให้ค่าความหนืดที่ 110 และ 295 cP ตามลำดับ และให้ค่าการเจริญของเชื้ออยู่ที่ 1.25×10^8 และ 9.1×10^7 cfu/mL ที่เวลา 72 ชั่วโมง อุณหภูมิ 30 °C อย่างไรก็ตามจากการทดลองนี้จะเลือกใช้ซูโครสในการทำการทดลอง เนื่องจากมีราคาถูกกว่าทรีฮาโลสและให้ผลผลิตของอัลจินเตสูง



รูปที่ 3.1 ผลของแหล่งอาหารคาร์บอนต่อการผลิตอัลจินเต (alginate production) ความหนืดปรากฏ (apparent viscosity) และการเจริญของเชื้อ *Azotobacter vinelandii* (Cell growth) ในอาหาร LG โดยทำการเติมหัวเชื้อที่ 1% ควบคุมค่า pH ที่ 6.8 อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 72 ชม. โดยทำการเขย่าที่ 200 rpm

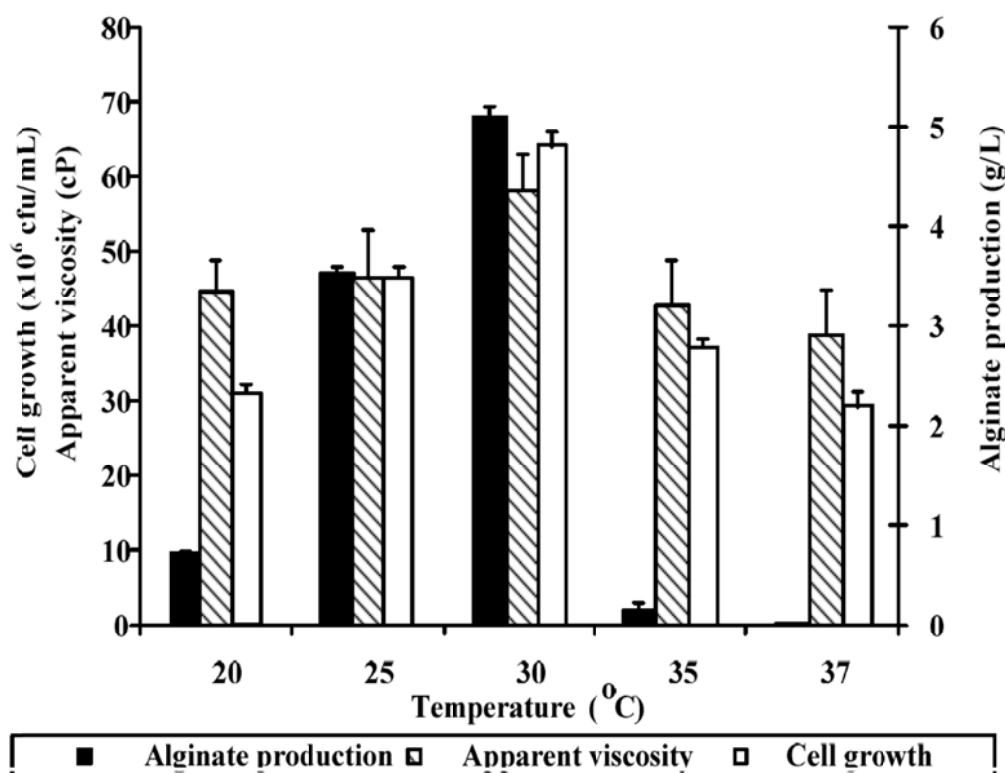
ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่เหมาะสมสำหรับการผลิตอัลจินเนทด้วยเชื้อ *Azotobacter vinelandii* อยู่ที่ 1% w/v และถ้าใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลที่สูงขึ้นจะทำให้การผลิตอัลจินเนทลดลง ในรูปที่ 3.2 แสดงการเจริญของแบคทีเรียและความเข้มข้นของอัลจินเนทที่ผลิตได้ การเจริญและการผลิตอัลจินเนทของแบคทีเรียจะเพิ่มขึ้น เมื่อทำการเพิ่มความเข้มข้นของซูโครสที่ 1% w/v และเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสมากกว่า 1% w/v จะพบว่าการผลิตอัลจินเนทและการเจริญของเชื้อ *Azotobacter vinelandii* จะลดลง จากการวิเคราะห์หาค่าความหนืดพบว่า การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียโดยใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งอาหารคาร์บอนมีประสิทธิภาพในการผลิตอัลจินเนท จากผลการทดลองพบว่า น้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้นสูงจะมีผลยับยั้งการผลิตอัลจินเนท ซึ่งอาจเป็นผลมาจากแรงดันออสโมติก และให้ผลการศึกษาเช่นเดียวกับ Prasertan และคณะ (2008) คือซูโครสที่ความเข้มข้นสูงจะมีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Azotobacter vinelandii* และยับยั้งการผลิตอัลจินเนท ซึ่งผลของการยับยั้งนี้เป็นผลมาจากแรงดันออสโมติกที่สูงเกินไป



รูปที่ 3.2 ผลความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่มีต่อการผลิตอัลจินเนท (alginate production) ความหนืดปรากฏ (apparent viscosity) และการเจริญของเชื้อ *Azotobacter vinelandii* (cell growth) ในอาหาร LG โดยทำการเติมหัวเชื้อที่ 1% ควบคุมค่า pH ที่ 6.8 อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 72 ชม. โดยทำการเขย่าที่ 200 rpm

3.1.2 อุณหภูมิ

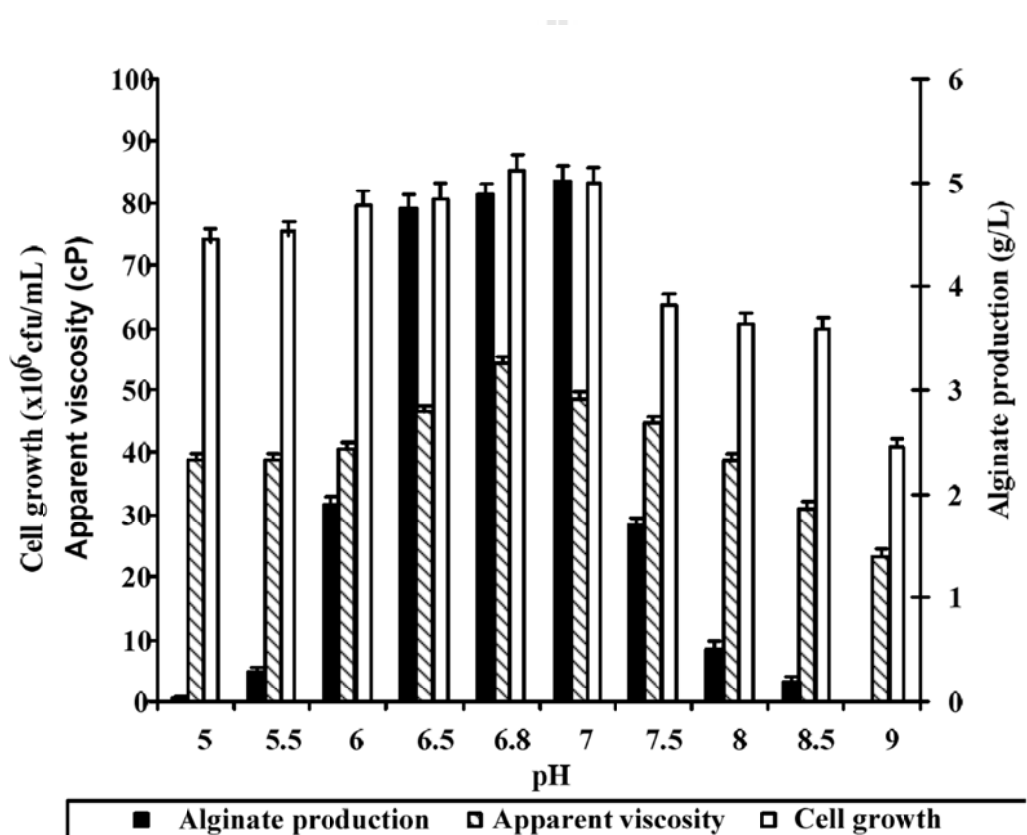
อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มมีผลอย่างยิ่งต่อการสังเคราะห์ทางชีวภาพของโพลีแซคคาไรด์ จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตโพลีแซคคาไรด์ในอุตสาหกรรมทั้งหมดจะอยู่ในกลุ่มของ mesophile (Lawson และ Sutherland, 1978) อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการผลิตโพลีแซคคาไรด์ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ จะอยู่ในช่วง 25-30 °ซ ขณะที่อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการผลิตอัลจิเนตจะอยู่ที่ 30 °ซ ดังแสดงในรูปที่ 3.3 ซึ่งใกล้เคียงการแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ เช่น แบคทีเรียสายพันธุ์ *Pseudomonads* ที่เป็นแบคทีเรียที่ก่อโรคนิพีซจะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญที่ 28-30 °ซ (Fett และคณะ, 1986)



รูปที่ 3.3 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตอัลจิเนต (alginate production) ความหนืดปรากฏ (apparent viscosity) และการเจริญของเชื้อ *Azotobacter vinelandii* (cell growth) ในอาหาร LG โดยใช้น้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 1% (w/v) เติมหั้วเชื้อที่ 1% ควบคุมค่า pH ที่ 6.8 อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 72 ชม. โดยทำการเขย่าที่ 200 rpm

3.1.3 ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น

จากผลการทดลองข้างต้น การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเพื่อใช้ในการผลิตอัลจิเนทให้ได้ผลผลิตสูง เมื่อทำการเลี้ยงในอาหาร LG ที่มีซูโครสเป็นแหล่งอาหารคาร์บอนที่ความเข้มข้น 1% (w/v) ในการทดลองหาค่าความเป็นกรด-ด่าง เริ่มต้นที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเชื้อและการผลิตอัลจิเนท พบว่า ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตอัลจิเนทของเชื้อ *Azotobacter vinelandii* อยู่ในช่วง 6.5-7.0 ดังแสดงในรูปที่ 3.4 จากรายงานของ Pace (1981) พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่าง จะมีผลต่อการผลิตอัลจิเนทมากกว่าการเจริญของเชื้อและค่าความเป็นกรด-ด่างจำเพาะจะมีผลโดยตรงกับการทำงานเอนไซม์ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์อัลจิเนท (Lawson และ Sutherland, 1978)

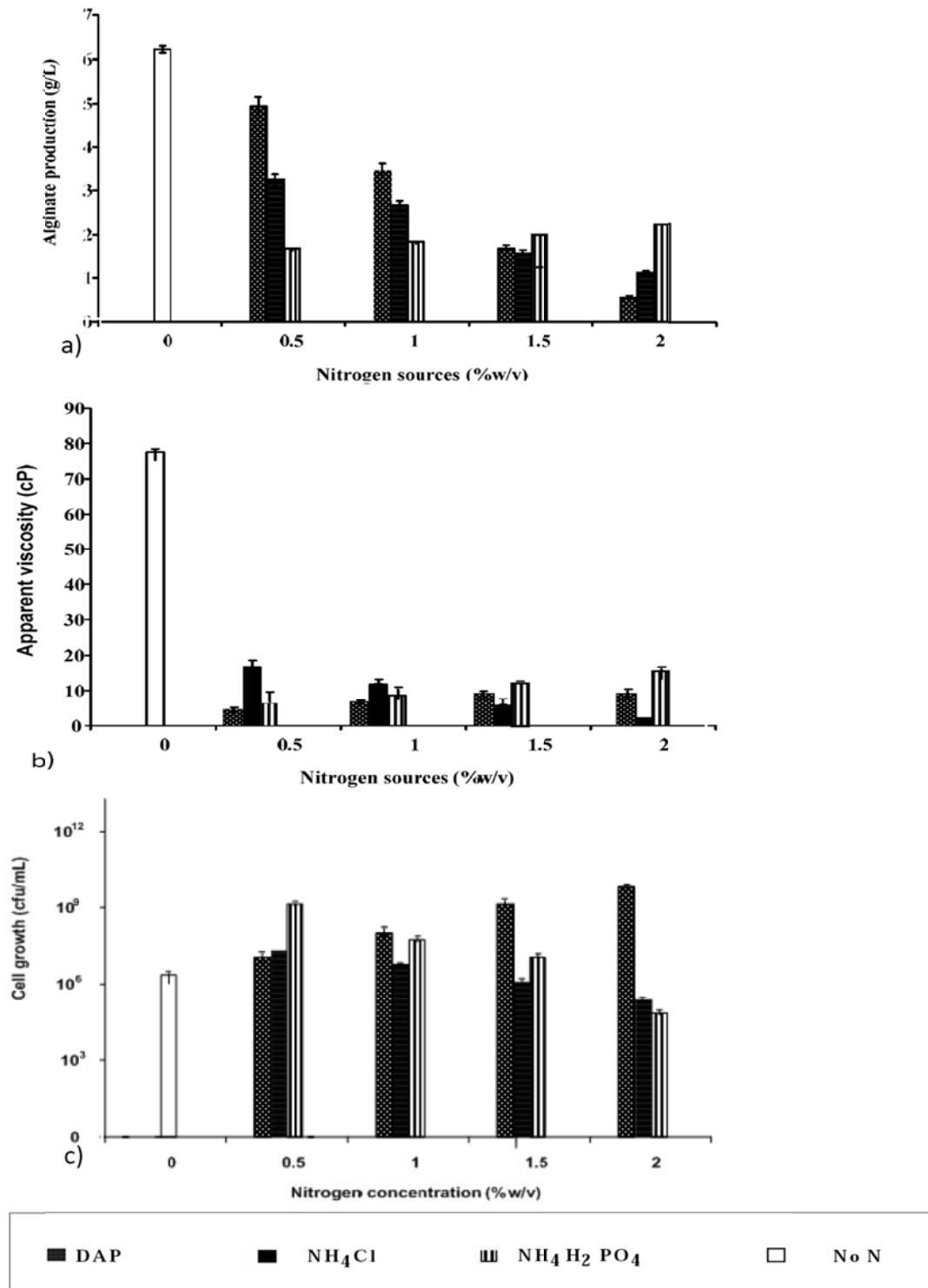


รูปที่ 3.4 ผลของความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นต่อการผลิตอัลจิเนท (alginate production) ความหนืดปรากฏ (apparent viscosity) และการเจริญของเชื้อ *Azotobacter vinelandii* (cell growth) ในอาหาร LG โดยใช้น้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 1% (w/v) เดิมหัวเชื้อที่ 1% ควบคุมอุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 72 ชม. โดยทำการเขย่าที่ 200 rpm

3.1.4 แหล่งอาหารไนโตรเจนและความเข้มข้น

ผลของแหล่งอาหารไนโตรเจนที่เป็นสารอนินทรีย์ ได้แก่ DAP, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ และ NH_4Cl ที่ความเข้มข้นต่างๆ ถูกใช้ในการศึกษา ในรูปที่ 3.5 แสดงให้เห็นว่าการเติมแหล่งอาหารไนโตรเจนไม่มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของการผลิตอัลจินเตและความหนืด จากผลการทดลองการผลิตอัลจินเตจะลดลง เมื่อทำการเพิ่มความเข้มข้นของแหล่งอาหารไนโตรเจน

การเติมแหล่งอาหารไนโตรเจน อนินทรีย์มีผลต่อการเจริญของเชื้อ *Azotobacter vinelandii* โดยเมื่อทำการเติม DAP ความเข้มข้น 0.5-2% (w/v) ในอาหาร LG พบว่าค่าการเจริญของเชื้อ *Azotobacter vinelandii* สูงสุดอยู่ที่ 2.15×10^7 , 2.31×10^8 , 5.3×10^9 และ 9.6×10^9 cfu/mL ตามลำดับ และเมื่อทำการเติม $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0.5% (w/v) ลงในอาหาร LG พบว่าค่าการเจริญของเชื้อ *Azotobacter vinelandii* สูงสุดอยู่ที่ 8.15×10^9 cfu/mL ส่วนการเติม NH_4Cl ในอาหาร LG ที่ใช้การผลิตอัลจินเตพบว่า การเติม NH_4Cl มีผลต่อการผลิตอัลจินเตและความหนืด จากการค้นคว้ารายงานวิจัย มีรายงานถึงผลของ NH_4^+ ว่าจะมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจิเนสในเชื้อ *Azotobacter vinelandii* (Hardy และคณะ, 1968) โดยไนโตรเจนมีผลต่อกระบวนการตรึงไนโตรเจนซึ่งจะส่งผลกระทบต่ออัตราการผลิตอัลจินเต จากรายงานของ Page และคณะ (1997) รายงานว่าเซลล์ที่มีการตรึงไนโตรเจนจะมีปริมาณของอัลจินเตที่น้อยมากและการเติมแหล่งอาหารไนโตรเจนที่เป็นสารอนินทรีย์ลงไป เซลล์จะเก็บไว้ใช้ในการตรึงไนโตรเจนและช่วยปกป้องการหายใจของเซลล์จากออกซิเจนซึ่งมีผลต่อโครงสร้างของเอนไซม์ไนโตรจิเนส และ Acetyl Co-A ที่ได้มาจากกระบวนการเผาผลาญน้ำตาลยังนำมาใช้ในการผลิตอัลจินเตด้วย สอดคล้องกับรายงานของ Pal et al. (1998) ที่ทำการทดลองกับสายพันธุ์ *A. chroococcum*



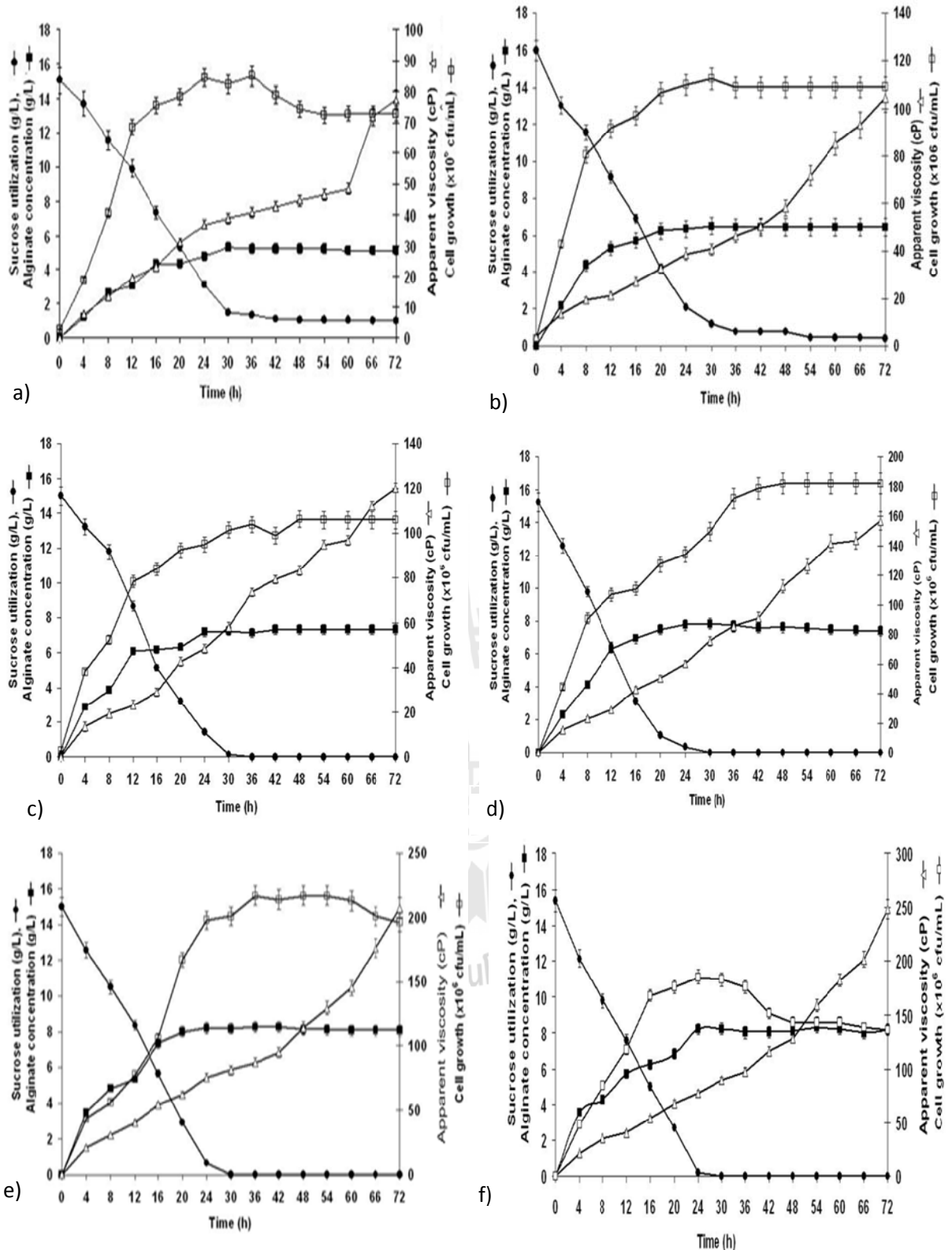
รูปที่ 3.5 ผลของแหล่งอาหารไนโตรเจนชนิดต่างๆที่มีผลต่อการผลิตอัลจิเนต (alginate production) (a) ความหนืดปรากฏ (apparent viscosity) (b) และการเจริญของเชื้อ *Azotobacter vinelandii* (cell growth) (c) ในอาหาร LG โดยใช้น้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 1% (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอนเติมหัวเชื้อที่ 1% ควบคุมค่า pH ที่ 6.8 อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 72 ชม. โดยทำการเขย่าที่ 200 rpm

3.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตอัลจินทโดยการหมัก 1.5 ลิตร

ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตอัลจินทโดยใช้ *Azotobacter vinelandii* จะทำการทดลองในถังหมักขนาด 2 ลิตร ในถังหมักจะใช้อาหาร LG ปริมาตร 1.5 ลิตรซึ่งจะใช้น้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 1 % (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน ทำการหมักโดยควบคุมอุณหภูมิที่ 30 °ซ และปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 6.8

3.2.1 ความเร็วในการกวน

ในการสังเคราะห์อัลจินทในอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำให้สภาวะที่แตกต่างกัน ดังในรูปที่ 3.6 (a-f) แสดงการผลิตอัลจินท ความหนืด ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ และการเจริญของเชื้อ *Azotobacter vinelandii* จากการหมักที่ความเร็วในการกวนที่แตกต่างกัน (100-600 rpm) การสร้างรูปร่างของอัลจินทบางส่วนเกี่ยวข้องกับการเจริญเนื่องจากทั้งความเข้มข้นของอัลจินทและการเจริญของเชื้อที่เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเพิ่มความเร็วในการกวนให้สูงที่ 100-500 rpm (ตารางที่ 3.1) และจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อเพิ่มความเร็วเป็น 500 rpm ภายใน 24 ชม. และเพิ่มขึ้นอีกเล็กน้อยหลังจาก 24 ชม. ในขณะที่พบว่าค่าความหนืดปรากฏเพิ่มขึ้นตลอดจนกระทั่งสิ้นสุดการหมัก ส่วนค่าจลพลศาสตร์ (Kinetic parameter) เช่น อัตราการเจริญจำเพาะ อัตราการเจริญสูงสุด อัตราการใช้น้ำตาลซูโครส ผลผลิตอัลจินทสูงสุด และแรงเค้นเฉือนแสดงผลในตารางที่ 3.1 ดังนั้นที่ความเร็วในการกวน 500 rpm จะเป็นค่าความเร็วที่ถูกเลือกมาใช้ในการทดลองต่อไปเนื่องจากประหยัดพลังงานและให้ค่าผลผลิตอัลจินทไม่แตกต่างกับการใช้ความเร็ว 600 rpm โดยการใช้ความเร็วในการกวนที่มากเกินไปจะส่งผลให้การผลิตอัลจินทลดลงเนื่องจากจะไปทำลายเซลล์และมีข้อจำกัดเกี่ยวกับการเคลื่อนย้ายสารผ่านเนื้อเยื่อที่อัตราเร็วสูงจะส่งผลให้มีพื้นที่ผิวเซลล์เฉลี่ยน้อยลง ซึ่งให้ค่าต่ำสุดอยู่ที่ 8.9 μm^2 ที่ความเร็ว 800 rpm เปรียบเทียบกับค่าสูงสุดที่ 33.8 μm^2 ที่ความเร็ว 300 rpm (Sabra และคณะ, 1999) การที่พื้นที่ผิวเซลล์ต่อปริมาณเซลล์ลดลง Post และคณะ (1982) ได้รายงานไว้ว่าเป็นผลมาจากกระบวนการป้องกันออกซิเจนของเอนไซม์ในโตรจินเนส โดยค่าความหนืดปรากฏของอัลจินทแสดงให้เห็นว่าอัลจินทที่ผลิตได้ให้ค่าพฤติกรรมของไหลเป็นแบบนินิวโตเนียน (non-Newtonian) เนื่องจากความหนืดเพิ่มขึ้นเมื่ออัตราเร็วเพิ่มขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 3.1



รูปที่ 3.6 การเปลี่ยนแปลงของการใช้น้ำตาล ความเข้มข้นของอัลจินัทที่ผลิตได้ ค่าความหนืดปรากฏ ปริมาณน้ำตาลที่เหลือและการเจริญของเชื้อในถังหมักที่ใช้ความเร็วในการกวนที่แตกต่างกัน a) 100 rpm, b) 200 rpm, c) 300 rpm, d) 400 rpm, e) 500 rpm, และ f) 600 rpm โดยให้อากาศ 2.5 vvm เดิมหัวเชื้อ 10% ควบคุมค่า pH เริ่มต้นที่ 6.8 อุณหภูมิ 30 °ซ

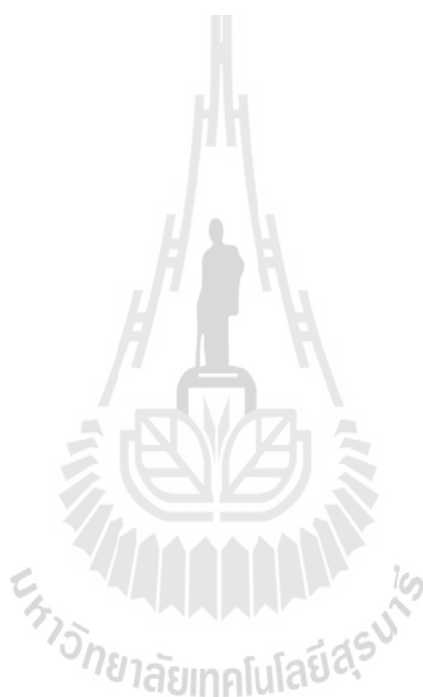
ตารางที่ 3.1 ค่าจลพลศาสตร์ของอัตราการเจริญสูงสุด ผลผลิตอัลจินเนทที่ผลิตได้สูงสุด น้ำตาลที่ใช้ไป และแรงเค้นเฉือนของ *Azotobacter vinelandii* ในถังหมักขนาด 2 ลิตร (ความเร็วในการกวนแตกต่างกัน) โดยให้อัตราการไหลของอากาศ 2.5 vvm ในอาหาร LG pH 6.8 ที่อุณหภูมิ 30°C

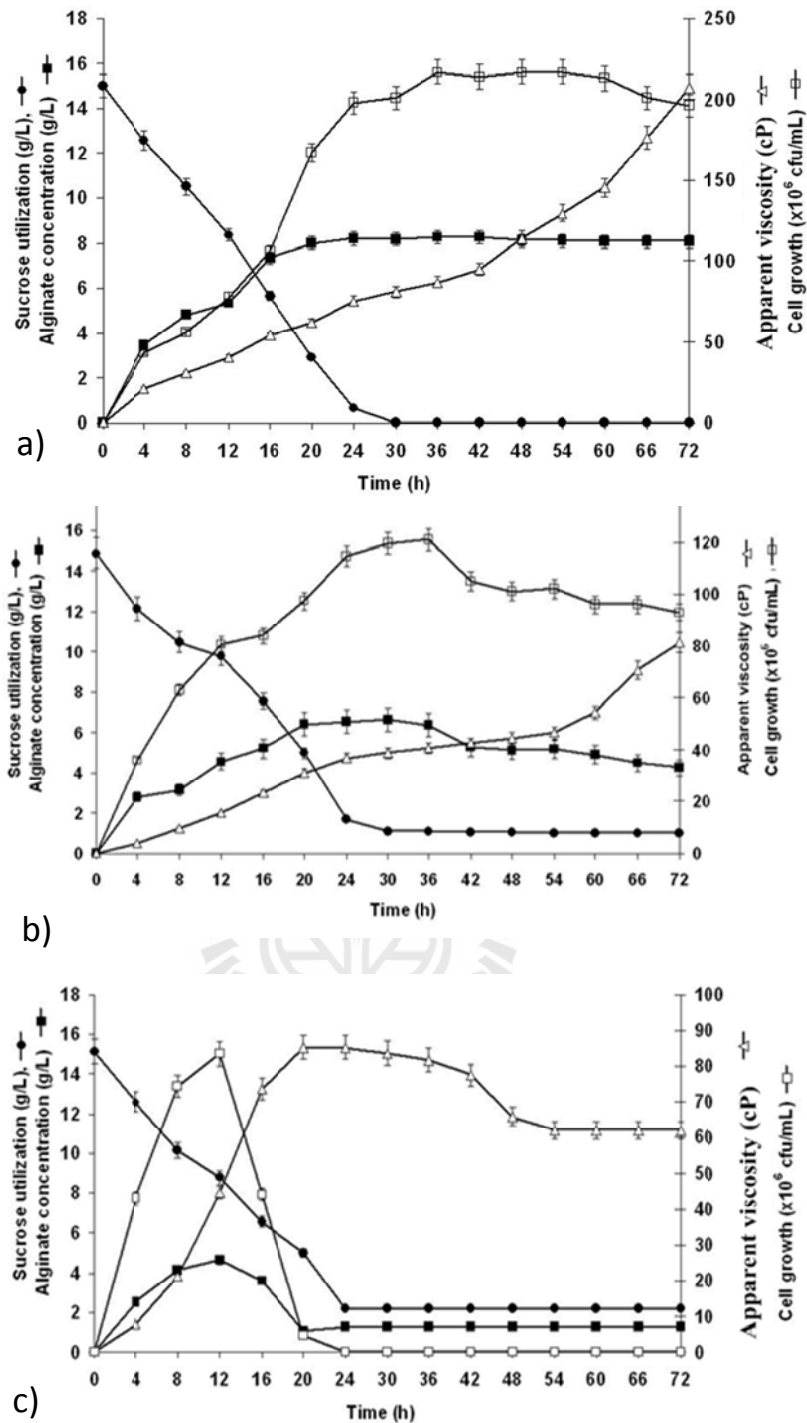
ค่าจลพลศาสตร์	ความเร็วในการกวน (rpm)						
	100	200	300	400	500	600	
อัตราการเจริญสูงสุด, μ_{max} (h^{-1})	0.205	0.242	0.257	0.278	0.295	0.301	
ผลผลิตอัลจินเนทสูงสุด, $Y_{p/s}$ (g_{alg}/g_{suc})	0.398	0.432	0.457	0.489	0.503	0.510	
ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไป ($g/L/h$)		0.361	0.428	0.470	0.533	0.582	0.602
แรงเค้นเฉือน, τ ($Pa \cdot s^{-1}$)		1.29	3.48	6.01	10.47	16.59	24.81

3.2.2 การให้อากาศ

ปริมาณอากาศเปลี่ยนแปลงตั้งแต่ 0, 2.5 และ 5 ผลของความเข้มข้นอัลจินเนทที่ผลิตได้ การเจริญของเชื้อ ความหนืดปรากฏ และปริมาณน้ำตาลซูโครสที่เหลือในการหมักโดย *Azotobacter vinelandii* แสดงในรูปที่ 3.7 (a-c) ค่า Kinetic parameter เช่น อัตราการเจริญจำเพาะ อัตราการเจริญสูงสุด อัตราการใช้น้ำตาลซูโครส ผลผลิตอัลจินเนทสูงสุดและแรงเค้นเฉือนแสดงในตารางที่ 3.2 จากผลการทดลองพบว่าการสร้างรูปร่างของอัลจินเนทบางส่วนเกี่ยวข้องกับการเจริญเนื่องจากการผลิตอัลจินเนทและการเจริญของเชื้อเพิ่มขึ้นที่เวลาเดียวกันภายในเวลา 24 ชม. และเพิ่มขึ้นเล็กน้อยจะกระทั่งเสร็จสิ้นกระบวนการหมัก ที่อัตราการให้อากาศ 2.5 vvm ให้ค่าการเจริญของเซลล์และการผลิตอัลจินเนทสูง ในขณะที่เมื่อเพิ่มอัตราการให้อากาศเป็น 5 vvm ทุกค่าลดลงเนื่องจากการเติมสาร antiform ลงในอาหารเพื่อลดฟองอากาศที่เกิดขึ้นและที่ปริมาณออกซิเจนสูงการเจริญของเชื้อจะค่อยๆ ลดลงซึ่งยืนยันถึงผลของออกซิเจนที่มีต่อการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส ดังนั้นที่อัตราการไหลของอากาศ 2.5 vvm จะถูกเลือกนำมาใช้ในการทดลองต่อไปเพื่อหลีกเลี่ยงการใช้สาร antiform ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อผนังเซลล์ของแบคทีเรียและความหนืดของอัลจินเนท (รูปที่ 3.7c) ในการตรึงไนโตรเจนของเซลล์ขึ้นอยู่กับปริมาณออกซิเจน โดยออกซิเจนสูงจะส่งผลกระทบต่อโครงสร้างของเอนไซม์ไนโตรจีเนส (Linkerhagner และ Oelze, 1997) สำหรับการเอาชีวิตรอดของ *Azotobacter vinelandii* ในสภาพที่มีอากาศหนึ่งในเมตาบอลิซึมเริ่มต้นคือการปกป้องเอนไซม์ไนโตรจีเนสจากการเข้าทำลายโดยออกซิเจน โดยการปกป้องเอนไซม์จากออกซิเจนที่เกิดใน *Azotobacter vinelandii* จะผ่านกลไกหลักๆ 2 อย่างคือ 1) ผ่านกิจกรรมการหายใจสูงที่จะเคลื่อนย้ายเอาออกซิเจนไปสู่ผิวเซลล์ 2) การย้อนกลับของเอนไซม์สู่

สภาพที่ไม่ถูกกระตุ้น (Linkerhagner และ Oelze., 1995; Liu และคณะ, 1995) สำหรับใน *Azotobacter vinelandii* การเพิ่มขึ้นของความหนืดปรากฏภายในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการเลี้ยงเชื้อเกิดขึ้นเพราะชีวมวลและความเข้มข้นของอัลจินที่เพิ่มขึ้นจะสามารถช่วยลดการเคลื่อนย้ายออกซิเจนจากสถานะแก๊สไปสถานะของเหลวและจากของเหลวไปยังผิวเซลล์ การหลีกเลี่ยงอัตราการเคลื่อนย้ายออกซิเจนที่สูงภายในเซลล์ สิ่งกีดขวางออกซิเจนบนผิวเซลล์ก็ยิ่งมีความสำคัญมาก (Sabra และคณะ, 1999)





รูปที่ 3.7 ผลของอัตราการให้อากาศต่อการใช้น้ำตาลซูโครส ความเข้มข้นของอัลจิเนต ความหนืดปรากฏและการเจริญของเซลล์ *Azotobacter vinelandii* ในอาหาร LG ในถังหมักขนาด 2 ลิตร เติมหิวเชื้อ 10% ควบคุมค่า pH เริ่มต้นที่ 6.8 อุณหภูมิ 30 °ซ อัตราการให้อากาศแตกต่างกันตั้งแต่ 0-5 vvm; (a) 0 vvm, (b) 2.5 vvm, and (c) 5 vvm

ตารางที่ 3.2 ค่าจลพลศาสตร์ของอัตราการเจริญสูงสุด ผลผลิตอัลจินที่ผลิตได้สูงสุด และปริมาณน้ำตาลซูโครสที่ใช้ไปของ *Azotobacter vinelandii* ในถังหมักขนาด 2 ลิตร (การให้อากาศแตกต่างกัน) ที่ความเร็วในการกวน 500 rpm ในอาหาร LG pH 6.8 ที่อุณหภูมิ 30°C

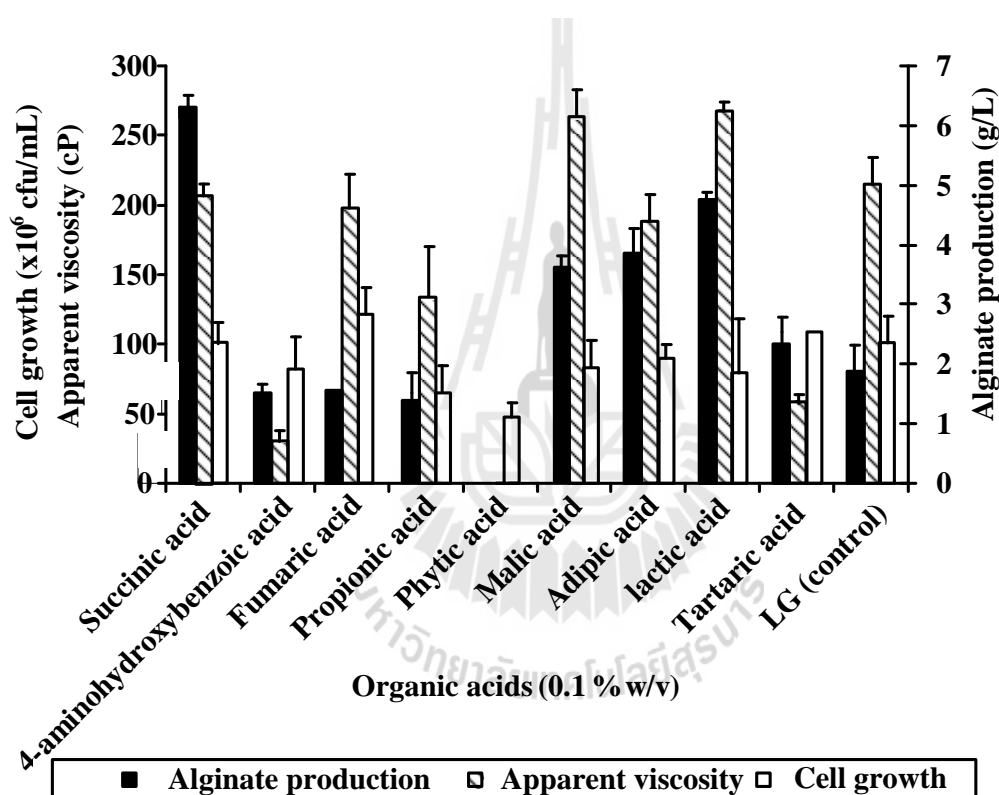
ค่าจลพลศาสตร์	อัตราการให้อากาศ (vvm)		
	0	2.5	5
อัตราการเจริญสูงสุด, μ_{\max} (h^{-1})	0.228	0.295	0.108
ผลผลิตอัลจินสูงสุด, $Y_{p/s}$ ($\text{g}_{\text{alg}}/\text{g}_{\text{suc}}$)	0.375	0.503	0.215
ปริมาณน้ำตาลซูโครสที่ใช้ไป ($\text{g}/\text{L}/\text{h}$)	0.287	0.583	0.242



3.3 การเพิ่มคุณสมบัติบางประการของการผลิตอัลจิเนทด้วยกรดอินทรีย์

3.3.1 แหล่งและความเข้มข้นของกรดอินทรีย์

ผลของการทดลองในระดับเขย่าพลาสติกแสดงในรูปที่ 3.8 แสดงผลของการผลิตอัลจิเนท ความหนืดปรากฏและการเจริญของเชื้อ โดยในการทดลองเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของอัลจิเนทโดยใช้กรดซัคซินิก กรดฟูมาริก กรดโพธิโอนิก กรดไฟติก กรดมาลิก กรดอะดิปิก กรดโพ-อะมิโนไฮดรอกซีเบนโซอิก กรดแลคติก และกรดทาร์ทาริก จากผลการทดลองพบว่าการใช้กรดอินทรีย์ 4 ชนิดคือ กรดซัคซินิก กรดมาลิก กรดแลคติกและกรดอะดิปิก จะมีค่าความหนืดปรากฏและความเข้มข้นของอัลจิเนทเพิ่มขึ้น ในขณะที่การใช้กรดไฟติกพบเพียงค่าการเจริญของเซลล์เท่านั้น



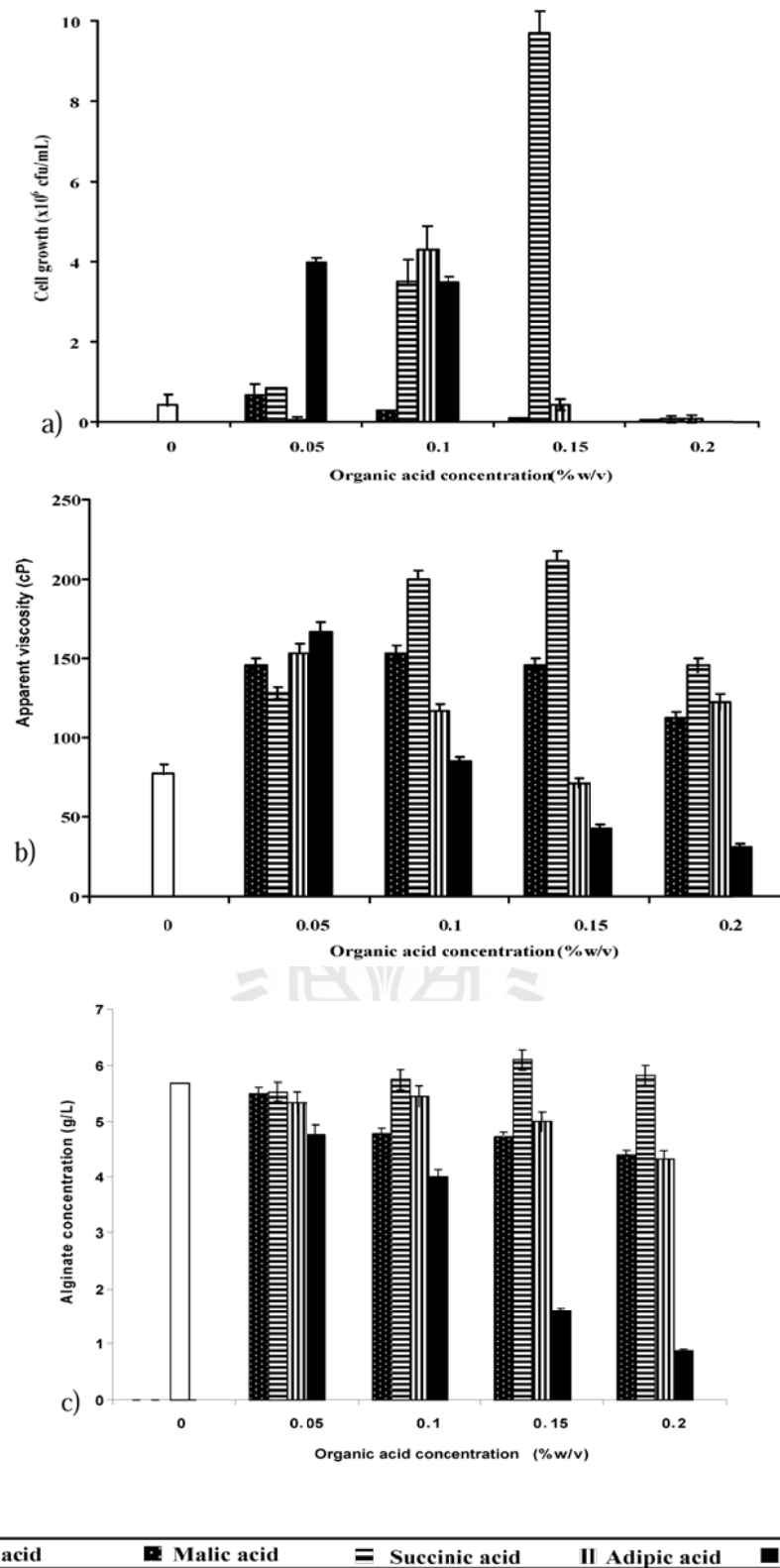
รูปที่ 3.8 ผลของกรดอินทรีย์ที่มีต่อการผลิตอัลจิเนท การเจริญของเซลล์แบคทีเรียและความหนืดปรากฏของการผลิตอัลจิเนทในอาหาร LG โดยใช้น้ำตาลซูโครส 1% (w/v) เป็นแหล่งอาหารคาร์บอน เดิมหัวเชื้อ 1% ปรับค่า pH ที่ 6.8 อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 72 ชม. ใช้ความเร็วในการเขย่า 200 rpm

ความเข้มข้นของกรดอินทรีย์แต่ละชนิด (กรดซัคซินิก กรดมาลิก กรดแลคติกและกรดอะดิปิก) ทำการเปลี่ยนแปลงจาก 0-0.2 % (w/v) ขยับระยะห่างความเข้มข้นทุกๆ 0.05 % (w/v) จากผลการ

ทดลองพบว่าการใช้กรดซัคซินิกที่ความเข้มข้น 0.15% (w/v) จะให้ค่าการผลิตอัลจินท การเจริญของ เซลล์สูงที่สุดและเพิ่มค่าความหนืดปรากฏเมื่อเปรียบเทียบกับอาหาร LG ที่ปราศจากการเติมกรด อินทรีย์ (รูปที่ 4.9) จากผลการทดลองอาจกล่าวได้ว่ากรดซัคซินิกถูกนำมาใช้เป็นแหล่งอาหารคาร์บอน ในวัฏจักร TCA (tricarboxylic acid)

Vargas-Garcia และคณะ (2001) สรุปว่า EPS ที่ผลิตโดย *Azotobacter* sp. เมื่อเติมกรดโฟ-อะมิ โนเบนโซอิก (4-aminohydroxybenzoic acid) เพื่อเป็นแหล่งอาหารคาร์บอนจะทำให้ค่าความหนืด สูงขึ้นในขณะที่ Chan (1986) ได้ทำการทดลองพบว่า *Azotobacter vinelandii* ให้ระดับการเจริญของ เชื้อดีขึ้นเมื่อใช้สารประกอบฟีนอลิกเป็นแหล่งอาหารคาร์บอน



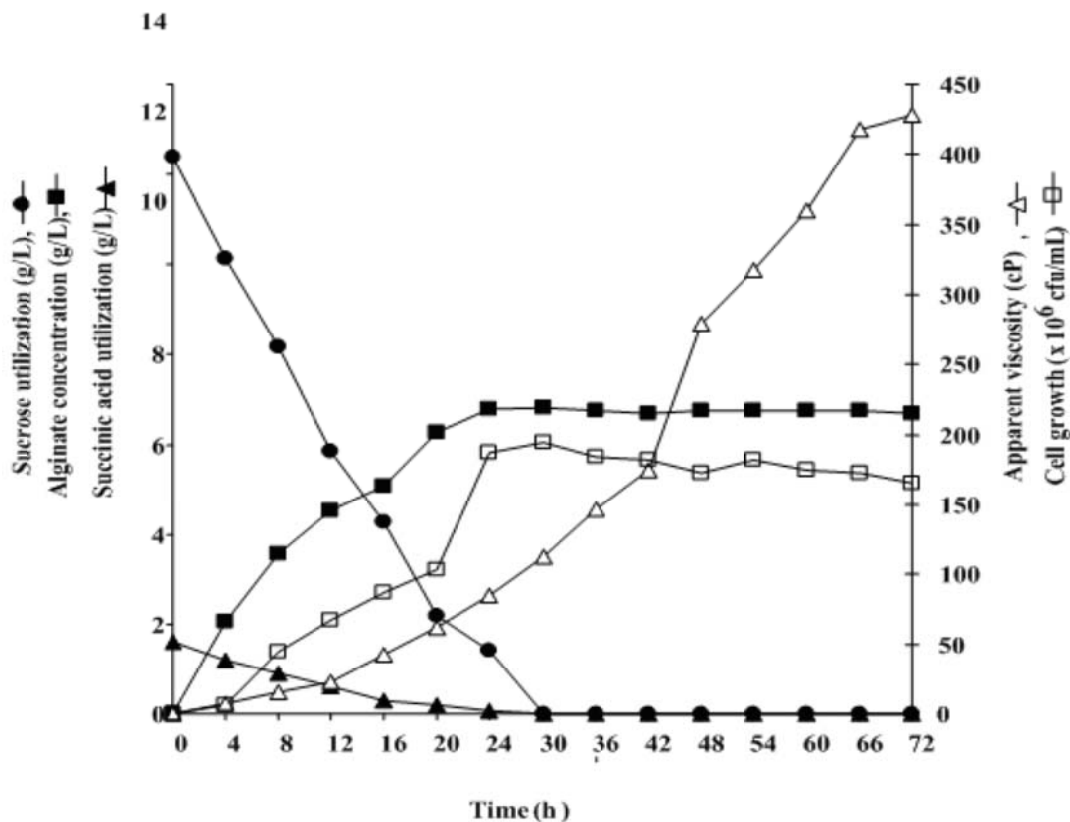


รูปที่ 3.9 ผลความเข้มข้นของกรดอินทรีย์ที่มีต่อ (a) การเจริญของเซลล์แบคทีเรีย (b) ความหนืดปรากฏ และ (c) การผลิตอัลจินทในอาหาร LG โดยใช้น้ำตาลซูโครส 1% (w/v) เป็นแหล่งอาหารคาร์บอน เติม หัวเชื้อ 1% ปรับค่า pH ที่ 6.8 อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 72 ชม.

3.3.2 การผลิตอัลจินเนทในถังหมักขนาด 2 ลิตรโดยใช้อาหาร LG ร่วมกับกรดอินทรีย์

ทำการหมักในถังหมักขนาด 2 ลิตรอีกครั้งเพื่อเพิ่มความหนืดปรากฏและการผลิตอัลจินเนทโดยใช้ *Azotobacter vinelandii* ใช้ปริมาณอาหาร LG 1.5 ลิตร โดยใช้น้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 1% (w/v) และกรดซัคซินิกความเข้มข้น 0.15% เป็นแหล่งคาร์บอน ทำการหมักโดยควบคุมอุณหภูมิ 30 °ซ ปรับค่า pH ที่ 6.8

การใช้น้ำตาลซูโครส ปริมาณกรดซัคซินิกที่ใช้ไป การผลิตอัลจินเนท ค่าความหนืดปรากฏ และการเจริญของเซลล์แสดงผลในรูปที่ 3.10 ค่าการผลิตอัลจินเนทและการเจริญของเซลล์เพิ่มขึ้นภายในเวลา 24 ชม. และคงที่ไปจนกระทั่งเสร็จการหมัก ในขณะที่น้ำตาลซูโครสและกรดซัคซินิกถูกใช้หมดไปภายใน 24 ชม. การเติมกรดซัคซินิกความเข้มข้น 0.15% (w/v) ลงในอาหาร LG ช่วยเพิ่มค่าการผลิตอัลจินเนท การเจริญของเซลล์และค่าความหนืดปรากฏเมื่อเปรียบเทียบกับการไม่เติม จากผลการทดลองอาจยืนยันได้ว่ากรดซัคซินิกเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตอัลจินเนทด้วย *Azotobacter vinelandii* ค่าจลพลศาสตร์แสดงในตารางที่ 3.3



รูปที่ 3.10 การเปลี่ยนแปลงของการใช้น้ำตาล ความเข้มข้นของอัลจินเนท ความหนืดปรากฏในอาหาร LG ที่ประกอบไปด้วยน้ำตาลซูโครสและกรดซัคซินิกความเข้มข้น 0.15% (w/v) เป็นแหล่งอาหารคาร์บอนที่อัตราการให้อากาศ 5 vvm เติมหั่วเชื้อ 10 % ค่า pH ที่ 6.8 อุณหภูมิ 30 °ซ

ตารางที่ 3.3 ค่าจลพลศาสตร์ของอัตราการเจริญสูงสุด ผลผลิตอัลจินะที่ผลิตได้สูงสุด ปริมาณน้ำตาลซูโครสที่ใช้ไปและความหนืดปรากฏของ *Azotobacter vinelandii* ในถังหมักขนาด 2 ลิตรในอาหาร LG ประกอบไปด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 0.15% (w/v) ที่ความเร็วในการกวน 500 rpm การให้อากาศ 2.5 vvm pH 6.8 ที่อุณหภูมิ 30°C

Kinetic Parameter	การเติมกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 0.15% (w/v)
อัตราการเจริญสูงสุด, μ_{max} (h^{-1})	0.297
ผลผลิตอัลจินะสูงสุด, $Y_{p/s}$ (g_{alg}/g_{suc})	0.505
ปริมาณน้ำตาลซูโครสที่ใช้ไป ($g/L/h$)	0.566
ปริมาณกรดซัลฟิวริกที่ใช้ไป ($g/L/h$)	0.327
ความหนืดปรากฏ (cP)	428.28

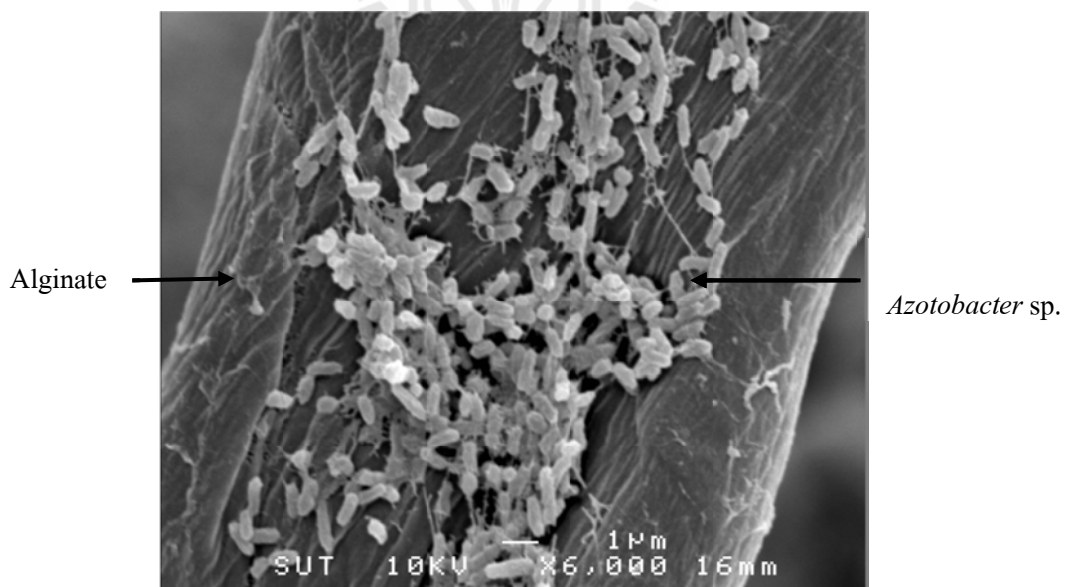
3.3.3 ลักษณะของอัลจินะที่ผลิตได้จาก *Azotobacter vinelandii*

3.3.3.1 ลักษณะโครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (SEM)

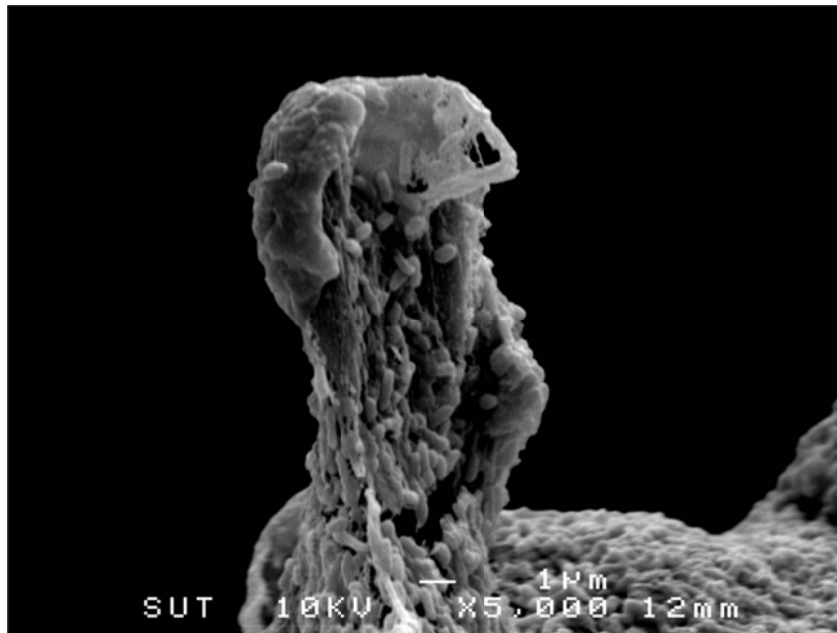
ทำการศึกษาโครงสร้างเซลล์ของ *Azotobacter vinelandii* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน โดยโครงสร้างเซลล์ของ *Azotobacter vinelandii* มีรูปร่างเป็นแท่ง ขนาดประมาณ 1 μm (รูปที่ 3.11) และมีการสร้างอัลจินะ (รูปที่ 3.12-3.13) การผลิตของอัลจินะหรือของเหลวเหนียวๆที่ฝังรวมตัวกันเป็นโคโลนีขนาดเล็ก รูปที่ 3.14 แสดงอัลจินะแห้งที่ผลิตได้จาก *Azotobacter vinelandii* และอัลจินะ (ทางการค้า) มีโครงสร้างเชื่อมโยง (cross-link) เหมือนกันแต่จำนวนของสายเชื่อมโยงของอัลจินะที่ผลิตด้วย *Azotobacter vinelandii* น้อยกว่าอัลจินะที่ผลิตได้จากสาหร่าย อย่างไรก็ตามอัลจินะจากสาหร่ายเป็นพอลิเมอร์ที่มีความคงตัวและมีโครงสร้างที่ตายตัวมากกว่าอัลจินะที่ผลิตจาก *Azotobacter vinelandii*



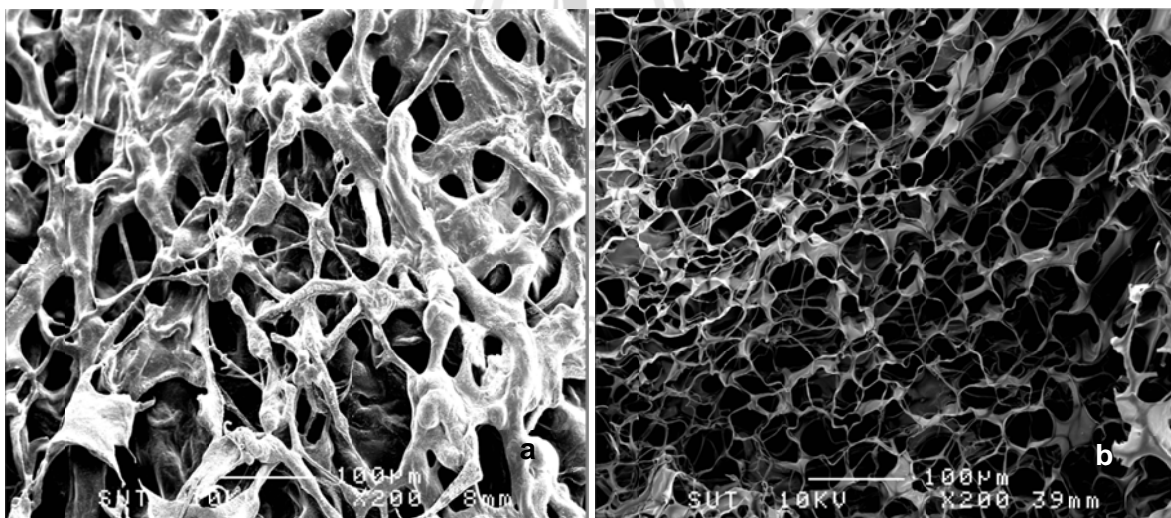
รูปที่ 3.11 ลักษณะโครงสร้างของ *Azotobacter vinelandii* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (SEM) ที่กำลังขยาย 12,000 เท่า



รูปที่ 3.12 ลักษณะโครงสร้างของ *Azotobacter vinelandii* และอัลจินทในอาหาร LG ที่ประกอบไปด้วยกรดซัลฟอนิกความเข้มข้น 0.15% (w/v) ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 3 วัน (Scale bars = 1µm)



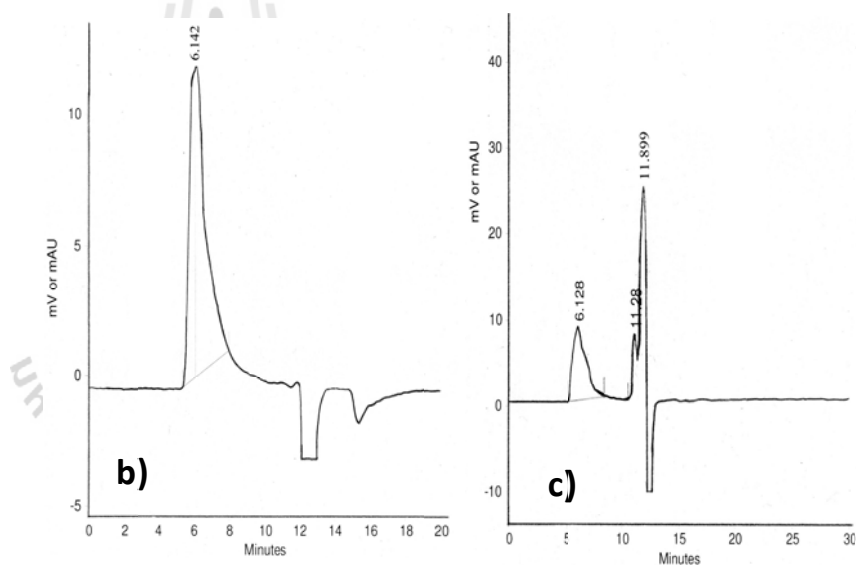
รูปที่ 3.13 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของเชื้อ *Azotobacter vinelandii* ที่มีการสร้างอัลจินทในอาหาร LG ประกอบไปด้วยกรดซัคซินิกความเข้มข้น 0.15% (w/v) ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 3 วัน



รูปที่ 3.14 ลักษณะทางโครงสร้างของอัลจินทภายใต้กล้อง SEM a) อัลจินทแห้งที่ได้จาก *Azotobacter vinelandii* โดยใช้อาหาร LG ประกอบไปด้วยกรดซัคซินิกความเข้มข้น 0.15% (w/v) b) อัลจินทจากสาหร่าย

3.3.3.2 น้ำหนักโมเลกุลของอัลจินท

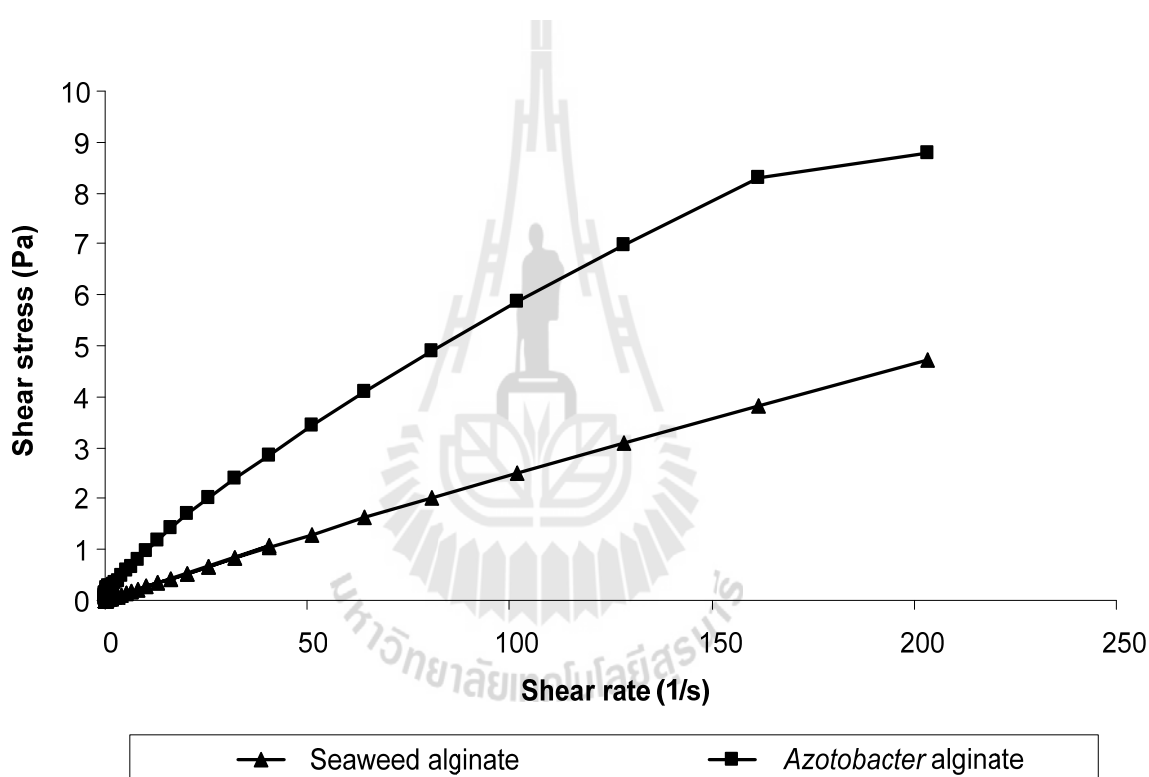
ทำการหาน้ำหนักโมเลกุลของอัลจินทจากแบคทีเรียและอัลจินทจากสาหร่ายเปรียบเทียบกับโดยใช้ pullulan kit เป็นมาตรฐานโดยใช้เทคนิค HPLC ยอดกราฟของน้ำหนักโมเลกุลแต่ละตัวคือ $.9 \times 10^3$, 2.04×10^3 , 6.75×10^3 และ 0.77×10^3 กิโลดาลตัน (kDa) ที่เวลา 6.19, 8.14, 10.143 และ 10.894 นาที ตามลำดับ (รูปที่ 3.15a) ยอดกราฟของอัลจินทจาก *Azotobacter vinelandii* พบที่เวลา 6.13, 11.29 และ 11.9 นาที (รูปที่ 3.15b) ในขณะที่อัลจินทจากสาหร่ายพบยอดกราฟเพียงยอดเดียวคือที่เวลา 6.14 นาที (รูปที่ 3.15c) จากผลการทดลอง น้ำหนักโมเลกุลของอัลจินทจาก *Azotobacter vinelandii* คล้ายคลึงกับอัลจินทจากสาหร่ายเพราะเกิดยอดกราฟที่เวลาเดียวกัน (6.13 และ 6.14 นาที) และที่เวลา 11.29 และ 11.9 นาทีซึ่งที่เวลาไม่เท่ากันอาจเป็นเพราะสารประกอบที่ได้จากกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ไม่บริสุทธิ์ มวลโมเลกุลของอัลจินทจาก *Azotobacter vinelandii* และอัลจินทจากสาหร่ายคือ 2.87×10^3 และ 2.88×10^3 ดาลตัน (Da) ตามลำดับ



รูปที่ 3.15 กราฟ chromatograms ของน้ำหนักโมเลกุลของ a) pullulan ที่ใช้เป็นมาตรฐาน
 b) อัลจินทจาก *Azotobacter vinelandii* และ c) อัลจินทจากสาหร่าย

3.3.3.3 พฤติกรรมของไหลของอัลจิเนท

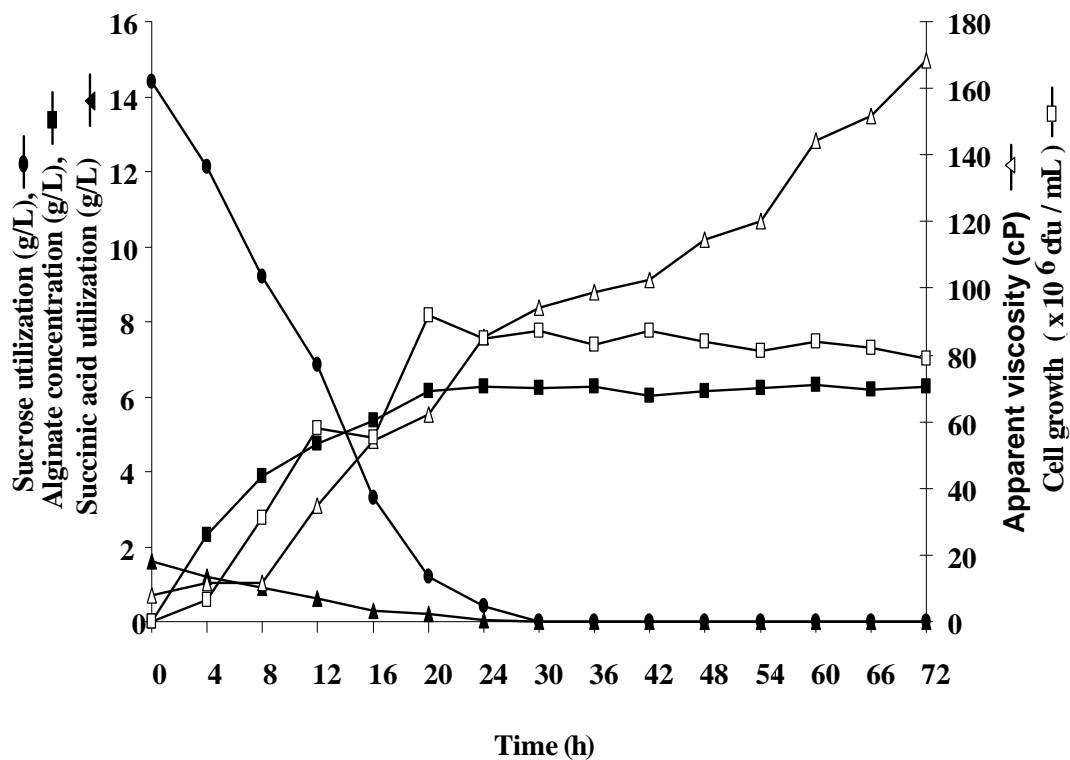
พฤติกรรมของไหลของอัลจิเนทจากสาหร่ายและอัลจิเนทจาก *Azotobacter vinelandii* ทำการทดลองโดยใช้เครื่องวัดแรงเฉือน (rheometer) ซึ่งใช้ din conical concentric cylinder เป็นตัวหมุนที่อุณหภูมิ 25 °ซ และอัตราแรงเฉือน 0-300 1/s รูปที่ 3.16 แสดงพฤติกรรมของไหลของอัลจิเนทจากสาหร่ายและอัลจิเนทจาก *Azotobacter vinelandii* พบว่าทั้งสองตัวแสดงพฤติกรรมเป็น pseudoplastic เนื่องจากมีค่าความหนืดปรากฏลดลงเมื่ออัตราเฉือนเพิ่มขึ้น ค่าความหนืดของของไหลพวกนี้จะขึ้นอยู่กับ Shear stress กับ Shear rate แต่จะไม่ขึ้นอยู่กับระยะเวลาที่ของไหลได้รับความเค้นเฉือน (Shear stress) แต่อย่างใด นั่นคือความสัมพันธ์ระหว่าง Shear stress และ Shear rate จะมีค่าคงที่ไม่ขึ้นอยู่กับเวลา



รูปที่ 3.16 ค่าความหนืดปรากฏของสาหร่ายจากอัลจิเนทและอัลจิเนทจาก *Azotobacter vinelandii* ที่อัตราเฉือนแตกต่างกัน

3.4 การผลิตอัลจิเนทในถังหมักขนาด 5 ลิตร

สภาวะที่เหมาะสมของการผลิตอัลจิเนทที่ได้จากการทดลองในระดับฟลาสก์และการหมักในถังหมักขนาด 2 ลิตร เช่น ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น ความเร็วในการกวนและความเข้มข้นของกรดอินทรีย์ถูกนำมาใช้ในการขยายระดับการผลิตอัลจิเนทผลของค่าความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส ปริมาณการใช้กรดซัลฟอนิก ความเข้มข้นของอัลจิเนท ความหนืดปรากฏและการเจริญของเชื้อแสดงในรูปที่ 3.17 จากผลการทดลองพบว่าน้ำตาลซูโครสและกรดซัลฟอนิกถูกใช้หมดไปภายใน 24 ชม. การเจริญของเชื้อและการผลิตอัลจิเนทเพิ่มขึ้นภายใน 24 ชม. รวมถึงค่าความหนืดปรากฏด้วย ค่าจลพลศาสตร์ในถังหมักขนาด 2 ลิตรและ 5 ลิตรแสดงในตารางที่ 3.4 อัตราการเจริญของ *Azotobacter vinelandii* และการผลิตอัลจิเนทในถังหมักขนาด 5 ลิตรมีค่าต่ำกว่าในถังหมักขนาด 2 ลิตร ซึ่งอาจเป็นผลมาจากหลายปัจจัยเช่น การผสม การให้อากาศ การออกแบบตัวหมุน เป็นต้น เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงขนาดของถังหมัก



รูปที่ 3.17 การเปลี่ยนแปลงของการใช้น้ำตาลซูโครส การผลิตอัลจิเนท การใช้กรดซัลฟอนิกความหนืดปรากฏและการเจริญของเชื้อ *Azotobacter vinelandii* ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้ปริมาณอาหาร LG 3 ลิตรด้วยน้ำตาลซูโครสและกรดซัลฟอนิก

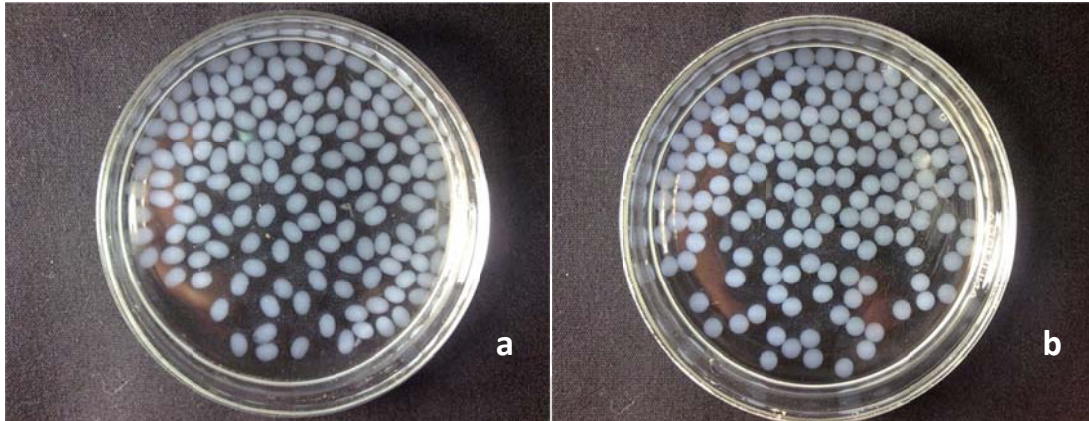
ตารางที่ 3.4 ค่าจลพลศาสตร์ของอัตราการเจริญสูงสุด ผลผลิตอัลจินทสูงสุด การใช้น้ำตาลซูโครส การใช้กรดซัลฟอนิก และค่าความหนืดปรากฏของเชื้อ *Azotobacter vinelandii* ในถังหมักขนาด 2 ลิตรซึ่งไม่ได้เติมกรดซัลฟอนิกความเข้มข้น 0.15% (w/v) ถังหมักขนาด 2 ลิตรซึ่งเติมกรดซัลฟอนิกความเข้มข้น 0.15% (w/v) และถังหมักขนาด 5 ลิตรซึ่งเติมกรดซัลฟอนิกความเข้มข้น 0.15% (w/v) ที่ความเร็วในการกวน 500 rpm อัตราการให้อากาศ 2.5 vvm ในอาหาร LG ควบคุม pH 6.8 ที่อุณหภูมิ 30°C

ค่าจลพลศาสตร์	ถังหมัก		
	2 ลิตร ไม่ได้เติมกรดซัลฟอนิก 0.15% (w/v)	2 ลิตร เติมกรดซัลฟอนิก 0.15% (w/v)	5 ลิตร เติมกรดซัลฟอนิก 0.15% (w/v)
อัตราการเจริญสูงสุด μ_{max} (h^{-1})	0.295	0.297	0.221
ผลผลิตอัลจินทสูงสุด $Y_{p/s}$ (g_{alg}/g_{suc})	0.503	0.505	0.397
การใช้น้ำตาลซูโครส ($g/L/h$)	0.582	0.566	0.514
การใช้กรดซัลฟอนิก ($g/L/h$)	-	0.327	0.370
ความหนืดปรากฏ (cP)	207.52	428.28	168.78
เวลาที่ใช้ในการหมัก (h)	72	72	72

3.5 การตรึงเอนไซม์

3.5.1 การสร้างตัวเป็นเม็ด bead

อัลจินทที่ผลิตโดย *Azotobacter vinelandii* ถูกนำมาใช้ในการตรึงเอนไซม์เปรียบเทียบกับอัลจินทที่ได้มาจากบริษัท Sigma-Aldrich (Germany) พบว่าที่อัลจินทความเข้มข้น 2.5% (w/v) สามารถสร้างตัวเป็นเม็ด bead ได้ในสารละลาย CaCl_2 ในขณะที่อัลจินทจากสาหร่ายจะใช้ที่ความเข้มข้น 2% (w/v) เนื่องจากความบริสุทธิ์และน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกัน (รูปที่ 3.18)

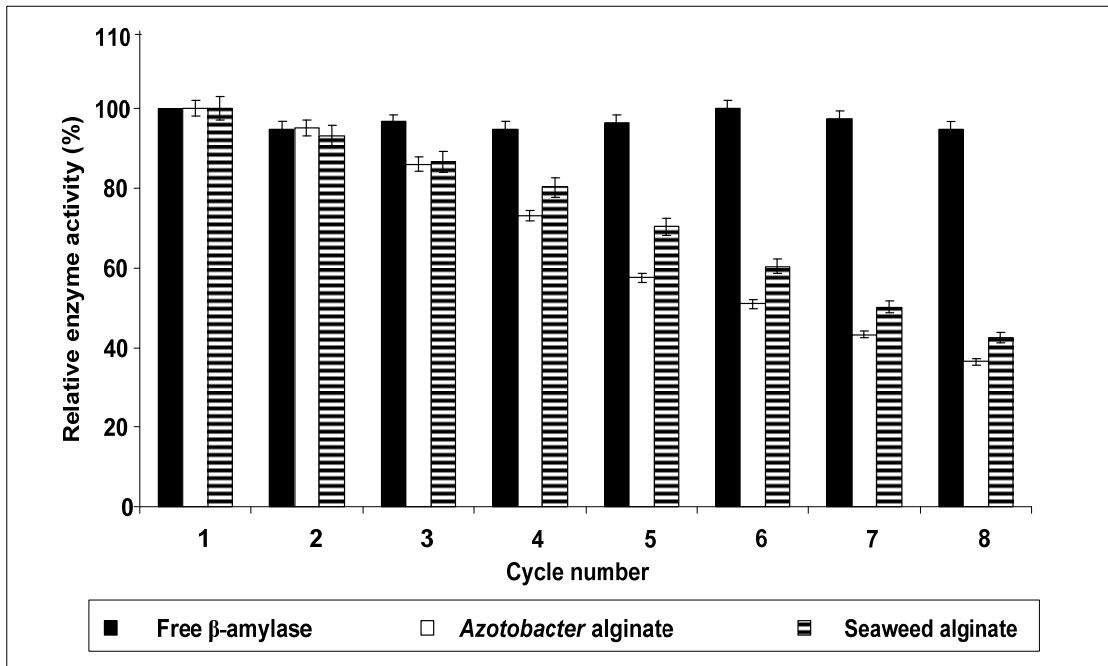


รูปที่ 3.18 เอนไซม์ที่ถูกตรึงในเม็ด bead หลังจากหยดลงในสารละลาย CaCl_2 ความเข้มข้น 2% a) อัลจินทความเข้มข้น 2.5% (w/v) ที่ผลิตโดย *Azotobacter vinelandii* หลังเติมกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 0.15% (w/v) b) อัลจินทจากสาหร่ายความเข้มข้น 2% (w/v)

3.5.2 กิจกรรมของเอนไซม์บีต้าอะไมเลส

ทั้งอัลจินทจาก *Azotobacter vinelandii* และจากสาหร่ายที่เคลือบเอนไซม์บีต้าอะไมเลสที่ถูกตรึงแล้วจะถูกเก็บไว้ใน 0.02 M acetate buffer (pH 4.8) ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 7 วัน ก่อนนำมาใช้ในการศึกษาความเสถียรของเม็ด bead ที่ใช้ตรึงเอนไซม์บีต้าอะไมเลส ในรูปที่ 3.19 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ความสัมพันธ์ของกิจกรรมของเอนไซม์เป็นหน้าที่ของจำนวนเอนไซม์อิสระที่นำกลับมาใช้ใหม่ ทั้งในอัลจินทจาก *Azotobacter vinelandii* และจากสาหร่ายที่เคลือบเอนไซม์บีต้าอะไมเลสที่ถูกตรึงแล้วพบว่าประสิทธิภาพในการย่อยสารละลายแป้งลดลงเช่นเดียวจำนวนของการวิเคราะห์ ในเวลา 8 ครั้งของการทดสอบซ้ำกิจกรรมของเอนไซม์อิสระไม่เปลี่ยนแปลงในขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์ที่ถูกตรึงมีค่าลดลงมากกว่า 50% จากการทดสอบในครั้งแรก แนวโน้มของกิจกรรมเอนไซม์บีต้าอะไมเลสที่ถูกตรึงในเม็ด bead ระหว่างอัลจินทจาก *Azotobacter vinelandii* และจากสาหร่ายจะลดลงทั้งคู่และมีค่าแตกต่างกันอยู่เล็กน้อย ประมาณ 5-6% ที่ครั้งที่ 8 อย่างไรก็ตามจากการทดลองพบว่าการนำเอนไซม์ที่ถูกตรึงแล้วกลับมาใช้ใหม่ได้ถึง 8 ครั้งเนื่องจากเอนไซม์หายออกไปจากอัลจินท การรั่วในเม็ด bead สามารถเกิดขึ้นได้ซึ่งเป็นผลมา

จากความเข้มข้นอัลจินเนเริ่มต้น กลไกการสร้างเม็ด bead และการเขย่าในกระบวนการสร้างเม็ด bead (Smidsrod และ Skjak-Braek, 1990) อย่างไรก็ตามความเสถียรของเอนไซม์ที่ถูกตรึงน้อยกว่าเอนไซม์อิสระ แต่เอนไซม์ที่ถูกตรึงมีข้อดีมากกว่าเอนไซม์อิสระเช่น ง่ายต่อการควบคุม สะดวกในการแยกเอนไซม์ ช่วยป้องกันการชะล้างออก ลดความเสี่ยงในการปนเปื้อน(Konsoula และ Kyriakides, 2006; Laca และคณะ., 1998)



รูปที่ 3.19 ความสัมพันธ์ของกิจกรรมเอนไซม์ของการนำเอนไซม์ที่ถูกตรึงด้วยอัลจินเนจาก *Azotobacter* sp. และอัลจินเนจากสาหร่ายกลับมาใช้ใหม่ใน 8 รอบเปรียบเทียบกับเอนไซม์อิสระ

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตอัลจินเทเริ่มต้นในการทดลองระดับเขย่าฟลาस्कเพื่อสังเกตหาแหล่งอาหารคาร์บอน อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง และแหล่งอาหารไนโตรเจนเพื่อใช้ในการผลิตอัลจินเทโดยใช้อาหาร LG น้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 1% (w/v) ถูกนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนที่อุณหภูมิ 30 °C และความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 6.8 ซึ่งสามารถผลิตอัลจินเทได้ประมาณ 4.5-5 กรัม/ลิตร และมีค่าความหนืดปรากฏคือ 62.2-79.15 cP ในอาหาร LG ซึ่งการเติมแหล่งอาหารไนโตรเจนไม่ได้ช่วยเพิ่มผลผลิตอัลจินเทแต่เพิ่มค่าการเจริญของเชื้อ โดยสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตอัลจินเทในการทดลองระดับฟลาस्कจะนำไปใช้ในการทดลองในถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยใช้อาหารปริมาตร 1.5 ลิตร ทำการสังเกตการให้อากาศและความเร็วในการกวนที่เหมาะสมต่อการผลิตอัลจินเท ซึ่งที่ความเร็วในการกวน 500 rpm และอัตราการให้อากาศ 5 vvm ให้ค่าความเข้มข้นของอัลจินเทและค่าความหนืดสูงที่สุด การผลิตอัลจินเทเพิ่มขึ้นภายในเวลา 24 ชม. และคงที่ไปจนกระทั่งสิ้นสุดกระบวนการหมัก อัลจินเทที่ผลิตจาก *Azotobacter vinelandii* จะแสดงพฤติกรรมของไหลเป็นแบบนินิวโตเนียน (non-Newtonian) เนื่องจากความหนืดเพิ่มขึ้นเมื่ออัตราเฉือนเพิ่มขึ้น ค่าความหนืดของของไหลพวกนี้จะขึ้นอยู่กับ Shear stress กับ Shear rate แต่จะไม่ขึ้นอยู่กับระยะเวลาที่ของไหลได้รับความเค้นเฉือน (Shear stress) แต่อย่างใด นั่นคือความสัมพันธ์ระหว่าง Shear stress และ Shear rate จะมีค่าคงที่ไม่ขึ้นอยู่กับเวลา ในถังหมักขนาด 2 ลิตร อัลจินเทที่ได้มากกว่าการทดลองในระดับฟลาस्कเนื่องจากการให้อากาศ ปริมาตรหัวเชื้อ และความเร็วในการกวน กรดซัคซินิกความเข้มข้น 0.15% (w/v) ถูกเลือกนำมาใช้เพื่อเพิ่มค่าความหนืดปรากฏของอัลจินเทจาก *Azotobacter vinelandii* โดยค่าความหนืดปรากฏเพิ่มขึ้นถึง 3 เท่า ขณะที่การเจริญของเซลล์และการผลิตอัลจินเทไม่ได้แตกต่างจากการใช้อาหาร LG (ไม่ได้เติมกรดซัคซินิก) โดยทุกปัจจัยที่ได้จากการทดลองระดับฟลาस्कและถังหมักขนาด 2 ลิตร จะถูกนำมาทดลองอีกครั้งในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้ปริมาตรอาหาร 3 ลิตร ค่าของการผลิตอัลจินเท ความหนืดปรากฏและการเจริญของเซลล์ *Azotobacter vinelandii* ที่ได้คล้ายคลึงกัน โดยจะเพิ่มขึ้นภายใน 24 ชม. การผลิตอัลจินเทในถังหมักขนาด 5 ลิตร อัลจินเทที่ได้ต่ำกว่าในถังหมักขนาด 2 ลิตร ยิ่งไปกว่านั้น น้ำหนักโมเลกุลของอัลจินเทจาก *Azotobacter vinelandii* ถูกนำมาเปรียบเทียบกับอัลจินเทที่ใช้ในการค้าที่ผลิตจากสาหร่ายโดยใช้เทคนิค HPLC พบว่าน้ำหนักโมเลกุลของอัลจินเทจาก *Azotobacter vinelandii* มีค่าใกล้เคียงกับอัลจินเทจากสาหร่าย อัลจินเทจาก *Azotobacter vinelandii* ที่ความเข้มข้น 2.5% (w/v) ถูกนำมาใช้ในการตรึงเอนไซม์บีต้าอะไมเลสในเม็ด bead ขณะที่อัลจินเทจากสาหร่ายใช้ความเข้มข้น 2% (w/v) ประสิทธิภาพของเอนไซม์บีต้าอะไมเลสที่ผ่านการตรึงโดยใช้อัลจินเทจากแบคทีเรียและสาหร่ายลดลงมากกว่า 50% เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์บีต้าอะไมเลสอิสระ ความสัมพันธ์ของกิจกรรมของเอนไซม์ที่ถูกตรึงก็ลดลงด้วย อัลจินเททั้งสองแหล่งถูกนำมาใช้ในการตรึงเอนไซม์บีต้าอะไมเลสเพื่อเปรียบเทียบกับ

การใช้บีต้าอะไมเลสแบบไม่ถูกตรึงในอัลจินท พบว่าประสิทธิภาพในการนำกลับมาใช้ใหม่ของบีต้าอะไมเลสที่ถูกตรึงในอัลจินทในการย่อยแป้งนั้นจะลดลงจาก 36.4 และ 42.4 ตามลำดับ ในรอบที่ 8 ผลการทดลองที่ได้จากงานวิจัยนี้ช่วยยืนยันว่าอัลจินทสามารถผลิตจากแบคทีเรียได้และคุณภาพของอัลจินทที่ได้ก็ใกล้เคียงกับอัลจินทที่ผลิตได้จากสาหร่าย ในการผลิตอัลจินทจากแบคทีเรียในทางการค้ามีความสำคัญมากที่ต้องมีการศึกษาต่อไปในอนาคตเพื่อขยายระดับการผลิตเป็นระดับอุตสาหกรรม



เอกสารอ้างอิง

- Amiji M.M. (1999) Drug delivery using pH-sensitive semi-interpenetrating network hydrogels. US Patent no: 5,904,927.
- Avella, M., Pace, E.D., Immirzi, B. and Impallomeni, G. (2007). Addition of glycerol plasticizer to seaweeds derived alginates: Influence of microstructure on chemical-physical properties. *Carbohydrate Polymer. Inpress.*
- Bergmeyer, H.U. (1983). *Methods of Enzymatic Analysis*, 3rd Ed. FL, USA: Verlag Chemis International.
- Chang, T.M.S. (2003) Artificial cells for cell and organ replacements. *Artificial Organs*. 28, 265-270.
- Chan, Y.K. (1986). Utilization of simple phenolics for dinitrogen fixation by soil diazotrophic bacterial. *Plants and Soil*. 90: 87-94.
- Chang, M.Y. and Juang, R.S. (2005). Activities, stabilities, and reaction kinetics of three free and chitosan-clay composite immobilized enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*. 36, 75-82.
- Clementi, F., Crudele, M.A., Oarente, E., Mancini, M. and Moresi, M. (1999). Production and characterization of alginate from *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Science Food and Agricultural*. 79: 602-610.
- Clementi, F., Mancini M. and Moresi, M. (1998) Rheology of alginate from *Aztobacter vinelandii* in aqueous dispersions. *J. Food Eng*. 36, 51-62.
- Fett, W.F., Osman, S.F., Fishman, M.L. and Siebles, T.S. (1986). Alginate production by plant-pathogenic *Pseudomonads*. *Applied Environmental and Microbiology*. 52: 466-473.
- Gaona, G., Nunez,C., Goldberg, J.B., Linford, A.S., Najera, R., Castaneda, M., Guzman, J., Espin, G. and Soberon-Chavez, G. (2004) Characterization of the *Azotobacter vinelandii algC* gene involved in alginate and lipopolysaccharide production. *FEMS Microbio. Letters*. 238, 199-206.
- Hardy, R. W. F., Holsten, R.D., Jackson, E.K. and Burns, R.C. (1968). The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiology*. 43: 1185-1207.
- Hjelland F. (2005) Process for the production of alginate having a high mannuronic acid-content. US Patent no: US2005/0038237 A1.
- <http://ava.biosci.arizona.edu/index.html>
- http://genome.jgi-psf.org/draft_microbes/azovi/azovi.home.html
- Konsoula, Z., Kyriakides, M.L. (2006). Starch hydrolysis by the action of an entrapped in alginate capsules α -amylase from *Bacillus subtilis*. *Enzyme and Microbial Technology*. 41: 343-349.

- Laca, A., Quiros, C., Garcia, L.A. and Diaz, M. (1998). Modelling and description of internal profiles in immobilized cell system. *Journal of Biochemical Engineering*.1: 225-232.
- Lawson, C.J and Sutherland, I.W. (1978). Polysaccharide. In *Economic microbiology; Primary products of metabolism* (Vol. II, pp.328-389). London, England: Academic Press Ltd.
- Linkerhagner, K. and Oelze, J. (1995). Cellular ATP level and nitrogenase switch off upon oxygen stress in chemostat cultures of *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*. 177: 5289-5293.
- Linkerhagner, K. and Oelze, J. (1997). Nitrogenase activity and regeneration of the cellular ATP pool in *Azotobacter vinelandii* adapted to different oxygen concentrations. *Journal of Bacteriology*. 179: 1362-1367.
- Liu, J.K., Lee, F.T., Lin, C.S., Yao, X.T., Davenport, J.W. and Wong, T.Y. (1995). Alternative function of the electron transport system in *Azotobacter vinelandii*: Removal of excess reductant by the cytochrome d pathway. *Applied and Environmental Microbiology*. 61: 3998-4003.
- Mejia-Ruiz, H., Moreno, S., Guzman, J., Najera, R., Leon, R., Soberon-Chavez, G. and Espin, G. (1997) Isolation and characterization of an *Azotobacter vinelandii algK* mutant. *FEMS Microbio. Letters* 156, 101-106.
- Pace, G.W. (1981). Microbial polysaccharides. In *Advance in biotechnology VIII* (pp.433-439). New York, Pergamon Press Ltd.
- Page, W.J., Bhanthumnavin, N., Manchak, J. and Ruman, M. (1997). Production of poly (β -hydroxybutyrate- β -hydroxyvalerate) copolymer from sugars by *Azotobacter salinestris*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 48: 88-93.
- Pal, S., Manna, A. and Paul, A.K. (1998). Nutritional and cultural conditions for production of poly-3-hydroxybutyric acid by *Azotobacter chroococcum*. *Folia Microbiologica*. 43: 171-176.
- Parente, E., Crudele, M.A., Aquino M. and Clementi, F. (1998) Alginate production by *Azotobacter vinelandii* DSM576 in batch fermentation. *Industrial microbiology and biotechnology* 20: 171-176.
- Parente, E., Crudele, M.A., Aquino M. and Clementi, F. (2000) Effect of ammonium sulphate concentration and agitation speed on the kinetics of alginate production by *Azotobacter vinelandii* DSM576 in batch fermentation. *Industrial microbiology and biotechnology* 25: 242-248.
- Pena, C., Campos, N. and Galindo, E. (1997). Change in alginate molecular mass distributions broth apparentand morphology of *Azotobacter vinelandii* cultured in shake flasks. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 48: 510-515.

- Pena, C., Mauricio, A.T. and Enrique, G. (2000) Influence of dissolved oxygen tension and agitation speed on alginate production and its molecular weight in cultures of *Azotobacter vinelandii*. *Enzyme and Microbial Tech.* 27: 390-398.
- Post, E., Kleiner, D. and Oelze, J. (1982) Whole cell respiration and nitrogenase activities in *Azotobacter vinelandii* growing in oxygen controlled continuous culture. *Archives of Microbiology.* 134: 68-72.
- Prasertsan, P., Wichienchot, S., Doelle, H. and Kennedy, J.F. (2008). Optimization for biopolymer production by *Enterobacter cloacae* WD7. *Journal of Carbohydrate Polymer.* 71: 468-475.
- Reyes, C., Pena, C. and Galindo, E. (2003) Reproducing shake flasks performance in stirred fermentors: production of alginates by *Azotobacter vinelandii*. *J. Biotech.* 105, 189-198.
- Sabra, W.A., Zeng, A.P., Sabry, S. Omar, S. and Deckwer, W.D. (1999). Effect of phosphate and oxygen concentrations on alginate production and stoichiometry of metabolism of *Azotobacter vinelandii* under microaerobic conditions. *Applied of Microbiology and Biotechnology.* 52: 773-780.
- Saude, N. and Junter, G-A. (2002). Production and molecular weight characteristics of alginate from free and immobilized cell cultures of *Azotobacter vinelandii*. *Process Biochemistry.* 37: 895-900.
- Shu, X.Z. and Zhu, K.J. (2002) The release behavior of brilliant blue from calcium-alginate gel beads coated by chitosan: the preparation method effect. *European J. Phar. Biophar.* 53, 193-201.
- Smidsrid, O. and Skjak-Braek, G. (1990). Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends of Biotechnology.* 8: 71-78.
- Steinbuechel, A., Vandamme, E.J. and De Baets, S. (2001). *Biopolymer.* Wiley-vch verlag GmbH, Weinheim, Germany, pp.179-180.
- Taqieddin, E. and Amiji, M. (2004) Enzyme immobilization in novel alginate-chitosan core-shell microcapsules. *Biomaterials* 25, 1937-1945.
- Taqieddin, E., Lee, C. and Amiji, M. (2002) Perm-selective chitosan-alginate hybrid microcapsules for enzyme immobilization technology. *Phar. Engineer.* 22, 1-3.
- Vargas-Garcia, M.C., Lopez, M.J., Elorrieta, M.A., Suarez, F. and Moreno, J. (2001). Influence of nutritional and environmental factors on polysaccharide production by *Azotobacter vinelandii* cultured on 4-hydroxybenzoic acid. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology.* 27: 5-10.
- Vermani, M.V., Kelkar, S.M. and Kamat, M.Y. (1997) Studies in polysaccharide production and growth of *Azotobacter vinelandii* MTCC 2459, a plant rhizosphere isolate. *Letters App. Microbio.* 24, 379-383.

Wachenheim, D.E. and Patterson, J.A. (1992). Anaerobic production of extracellular polysaccharide by *Butyrivibrio fibrisolvens* nux. Applied and Environmental. Microbiology. 58: 385-391.



ประวัติผู้แต่ง

Name: Chokchai Wanapu (ผศ. ดร. โชคชัย วณภู)
 [ชื่อนามสกุลเดิม: อินทพฤกษ์ (Intapruk)]

Sex: Male

Nationality: Thai

Religion: Buddhism

Date of Birth: September 15, 1959

Present Status: Assistant Professor in Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakonratchasima 30000, Thailand.

Education Background and Experience:

From 1978 - 1982: B.Sc. (Chemistry) from Department of Chemistry, Faculty of Science, Chiangmai University, Chiangmai, Thailand.

From 1982 - 1984: M.Sc. (Biochemistry) from Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand.

From 1991 - 1994: Ph.D. (Engineering in Biotechnology) from Department of Biotechnology, Faculty of Engineering, Osaka University, Osaka, Japan.

From 1996 – 1997: Head of Department of Biochemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hatyai, Songkla 90110, Thailand.

From 1997 – 1999: Director of Center of Scientific and Equipment, Walailak University, Nakonsritummarat 80000, Thailand.

From 1999 – 2001: Director of Technopolis, Suranaree University of Technology, Nakonratchasima 30000, Thailand.

Scientific Experiens:

Plant and microbial molecular genetics.

Fermentation Techniques.

Alcohol Beverage Production.

Scientific Publication:

Intapruk, C., Tirawanchai, N., Wilairat, P. and Panyim, S. (1984) Application of cloned malaria parasite DNA in strain identification. Mahidol University Annual Research Abstracts 11, 297.

Intapruk, C. (1984) in Manual for international laboratory workshop "Genetic engineering techniques in tropical diseases research" to be published by WHO special programme for research and training in tropical diseases, 195-204.

- Wilairat, P., Tirawanchai, N., **Intapruk, C.**, Tungpradubkul, S. and Panyim, S. (1984) Strain characterization of human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, by the use of a cloned parasite DNA probe. *Microbial utilization of renewable resources*. 4, 210-213.
- Tirawanchai, N., **Intapruk, C.**, Wilairat, P., Yuthavong, Y. and Panyim, S. (1985) Cloning of repetitive DNA from *Plasmodium falciparum* and its use in strain and species identification. *Mahidol University Annual Research Abstracts*, 12, 250.
- Intapruk, C.** (1985) in Manual for national laboratory workshop "DNA cloning techniques" (in Thai) to be published by the National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, the Ministry of Science and Technology, 172-188.
- Wilairat, P., Tirawanchai, N., **Intapruk, C.**, Tungpradabkul, S., Sertsrivanich, R., Panyim, S., Yuthavong, Y. (1985) Recombinant DNA techniques as potential diagnostic means. *Ann. Ist. Super. Sanita*. 21, 299-305.
- Sriroongrueng, W. and **Intapruk, C.** (1989) The prenatal diagnosis of thalassemias (in Thai). *Songkla Med J*. 6, 428-435.
- Intapruk C.**, Higashimura N, Yamamoto K, Okada N, Shinmyo A and Takano M (1991) Nucleotide sequences of two genomic DNAs encoding peroxidase of *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 98: 237-241.
- Intapruk C.**, Yamamoto K, Fujiyama K, Shinmyo A and Takano M (1993) Cloning of cDNAs encoding two peroxidases of *Arabidopsis thaliana*. *J Ferment Bioeng* 75: 166-172.
- Shinmyo A, Fujiyama K, Kawaoka A and **Intapruk C** (1993) Structure and expression of peroxidase isozyme genes in horseradish and *Arabidopsis*. *In: KG Welinder, SK Rasmussen, C Penel and H Greppin, eds, Plant Peroxidases Biochemistry and Physiology*. Univ Geneva, Switzerland, pp 222-228.
- Intapruk C.**, Yamamoto K, Sekine M, Shinmyo A and Takano M (1994) Regulatory sequences involved in the peroxidase gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Reports* 13: 123-129.
- Intapruk C.**, Takano M and Shinmyo A (1994) Nucleotide sequence of a new cDNA for peroxidase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*. 104: 285-286.
- Wanapu C** and Shinmyo A (1996) *cis*-Regulatory of the peroxidase gene in *Arabidopsis thaliana* involved in root specific expression and responsiveness to high-salt stress. *Ann New York Acad Sci*. 782 (12): 107-114.
- Rodtong, S.; **Wanapu, C.** and Ishizaki, A. (2000) Starch-utilizing bacteria for L-lactic acid production. The 12th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology. 52.
- Cheunkum, O. and **Wanapu, C.** (2002) Production of Lactic acid from cassava solid waste. The 3rd National Symposium on Graduate Research. 633-634.

- Sripo, T., Phongdara, A., **Wanapu, C.** and Caplan, A.B. (2002) Screening and characterization of aldehyde dehydrogenase gene from *Halomonas salina* strain AS11. *J. Biotech.* 95, 171-179.
- Kuapunyakoon, T. and **Wanapu, C.** (2003) Effects of diammonium phosphate (DAP) supplementation on growth rate and ethanol production of *Saccharomyces cerevisiae* K1-V1116 in tamarind wine. *Suranaree J. Sci. Technol.* 10: 147-151.
- Sripunya, P., **Wanapu, C.** and Boonkerd, N. (2004) Effect of β -glucosidase enzyme in *Saccharomyces cerevisiae* strains on aroma production mango (Chok-anan) wine fermentation. *Thai J. Biotech.* (accepted).

