บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทางวิจัย

อัลจิเนท (alginate) เป็นเอกโซโพลิแซคคาไลด์ (exopolysacchcaride, EPS) ชนิดหนึ่งที่ประกอบไปด้วยหน่วยย่อยจำนวน 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. นอกจากนั้นยังพบว่ามีแบคทีเรีย 2 กลุ่มที่สามารถผลิตอัลจิเนทได้ด้วย ได้แก่แบคทีเรียในกลุ่มตรึงไนโตรเจนอิสระที่ไม่ก่อให้เกิดโรค ได้แก่ *Azotobacter vinelandii* และแบคทีเรียกลุ่มที่ก่อให้เกิดโรค ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa* เป็นต้น ปริมาณและคุณสมบัติของอัลจิเนทได้ได้จากสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดจะแตกต่างกันตามชนิดและสภาพแวดล้อมโดยเฉพาะจากพืชที่ยากแก่การควบคุมสภาพแวดล้อม อีกทั้งการจัดเก็บสาหร่ายในทะเลยังเป็นการทำลายสิ่งแวดล้อมและแหล่งที่อยู่อาศัยของสัตว์น้ำเป็นจำนวนมาก และขั้นตอนการสกัดที่ใช้กรดซึ่งมีค่าใช้จ่ายในการบำบัดของเสียเป็นจำนวนมาก เมื่อพิจารณาคุณสมบัติของอัลจิเนทพบว่าอัลจิเนทที่ผลิตได้จากเชื้อ *A. vinelandii* จะมีการเรียงลำดับ monomer เหมือนในสาหร่าย อีกทั้งขั้นตอนการผลิตสามารถควบคุมการเลี้ยงเชื้อได้โดยไม่ทำลายสภาวะแวดล้อมทางธรรมชาติ

อัลจิเนทถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในทางอุตสาหกรรม โดยเฉพาะในทางอุตสาหกรรมอาหาร ซึ่งเมื่อนำอัลจิเนทไปละลายหรือกระจายตัวในน้ำจะทำให้มีความหนืดสูง หรือมีลักษณะเป็นเจล นอกจากนั้นยังทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเป็น emulsifier, stabilizer, encapsulating agent และหน้าที่อื่นๆ ในผลิตภัณฑ์อาหารโดยจะช่วยให้ผลิตภัณฑ์อาหารมีคุณภาพดีขึ้น เช่น ลักษณะเนื้อสัมผัส ลักษณะปรากฏ และสามารถยืดอายุของอาหาร เป็นต้น นอกจากอุตสาหกรรมอาหารแล้วอัลจิเนทยังถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมสิ่งทอ กระดาษ และการแพทย์อีกด้วย เช่น ใช้เป็นส่วนผสมในการทำฟันปลอม (prosthetics dentistry) ใช้ในการทำอวัยวะเทียม (artificial organs) Chang (2003) ได้สรุปการนำอัลจิเนทไปใช้เป็นเซลล์และอวัยวะเทียม โดยใช้อัลจิเนทไปทำ crosslink กับโพลีเมอร์ชนิดอื่นๆ ได้แก่ alginate-polylysine-alginate สร้างเป็น microcapsules ภายในบรรจุอินซุลินเพื่อใช้ในการควบคุมระดับน้ำตาลเพื่อทำหน้าที่เป็นตับเทียม ใช้ทำเป็นเซลล์เทียมเรียนแบบเซลล์ *Escherichia coli* DH5 เพื่อใช้งานทางพันธุวิศวกรรม ใช้ทำเป็นเซลล์เม็ดเลือดแดงเทียมภายในบรรจุฮีโมโกลบิน ใช้เคลือบยา ออกฤทธิ์ช้าและเฉพาะที่ เป็นต้น นอกจากนี้ยังใช้เป็นสารดูดซับสารพิษ (detoxifier) ซึ่งจะมีความสามารถในการดูดซับสารพิษประเภทโลหะออกจากเลือด และยังถูกนำมาใช้ในการเป็นสารดูดซับของเหลวในการพยาบาลฉุกเฉิน เนื่องมาจากคุณสมบัติในการดูดซับน้ำได้อย่างรวดเร็ว สำหรับทางอุตสาหกรรมมีการใช้อัลจิเนทเป็นส่วนประกอบในเครื่องสำอาง (cosmetic) ใช้ตรึง

เอนไซม์ในอุตสาหกรรมเพื่อให้มีอายุเอนไซม์ยาวนานขึ้น อีกทั้งยังช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานและสามารถนำเอนไซม์กลับมาใช้ใหม่ได้อีกหลายครั้ง เป็นต้น โดยการตรึงเอนไซม์อาจใช้ร่วมกับโพลีเมอร์ชนิดอื่นๆอาทิ ไคโตแซน (chitosan) โปรทามีน (protamine) และคาร์บอซี่เมทธิลเซลลูโลส (carboxymethylcellulose) เป็นต้น (Taqieddin และคณะ, 2002; Taqieddin และ Amiji, 2004; Shu และ Zhu, 2002)

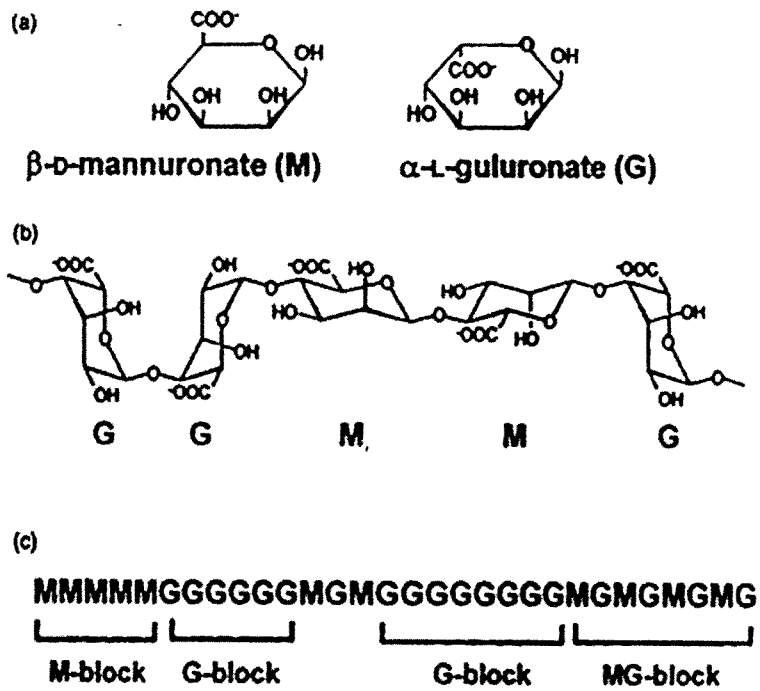
A. vinelandii เป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในดินโดยพบว่ามีความใกล้ชิดกับแบคทีเรียในกลุ่มอัลฟาโปรทิโอแบคทีเรีย (alpha-proteobacteria) มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนในอากาศได้อย่างอิสระโดยไม่ต้องอาศัยอยู่ร่วมกับพืชเหมือนกลุ่มไรโซเบียม การตรึงไนโตรเจนจะเกิดเมื่อสภาพแวดล้อมรอบเซลล์อยู่ในสภาวะที่ขาดไนโตรเจนโดยจะไปเพิ่มอัตราการหายใจ และยังพบว่าแบคทีเรียชนิดนี้สามารถที่จะผลิตสารเคมีจำพวกโพลิแซคคาไลด์ได้เมื่อนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม

โครงสร้างทางเคมีของอัลจิเนท (Alginate)

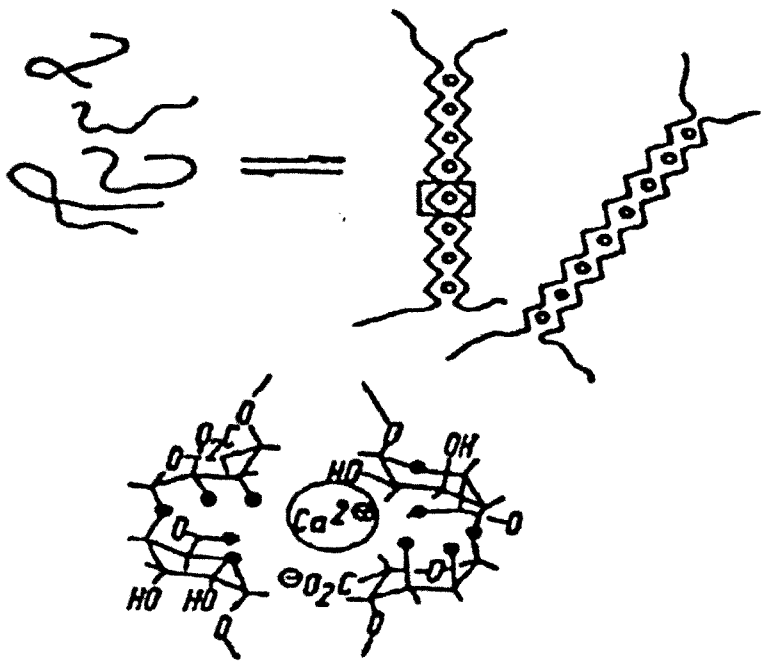
อัลจิเนทเป็นสารสกัดได้จากสาหร่ายทะเลสีน้ำตาล (Phaeophyceae) ในการผลิตอัลจิเนทเป็นอุตสาหกรรมสาหร่ายทะเลที่ใช้ได้แก่ *Macrocystis pyrifera* มีอัลจิเนทประมาณ 14-19%, *Laminaria cloustoni* และ *Laminaria digitata* มีอัลจิเนทประมาณ 15-40% ปริมาณที่พบจะขึ้นอยู่กับชนิดของสาหร่าย ฤดูกาลและแหล่งที่สาหร่ายเจริญเติบโต สาหร่ายเหล่านี้พบได้ทั่วๆไปในโลก ประเทศที่ผลิตอัลจิเนทมากคือ อเมริกา อังกฤษ ฝรั่งเศส สเปน นอร์เวย์ แคนาดา และญี่ปุ่น

อัลจิเนทเป็น unbranched binary copolymer ของ 1,4- β -D-manuronic acid (M) และL-guluronic acid (G) ในโมเลกุลประกอบด้วย homopolymeric regions ของ M และ G ที่เรียกว่า G- และ M-blocks ตามลำดับและยังมีบางส่วนของโมเลกุลเป็น MG-blocks ดังรูปที่ 1.1 สัดส่วนของ copolymer และโครงสร้างเหล่านี้จะเป็นตัวกำหนดสมบัติของอัลจิเนทเช่น ถ้าโพลิเมอร์มี G ในปริมาณที่สูงจะมีสมบัติเป็นเจลที่แข็งที่ความเข้มข้นของโลหะประจุบวกเฉพาะ (polyvalent metal cation) แต่ถ้าโพลิเมอร์มี M ปริมาณสูงจะมีแนวโน้มที่จะเกิดเจลที่อ่อนนุ่มและมีสภาวะในการเกิดเจลที่กว้างกว่า อัลจิเนทที่ผลิตจำหน่ายเป็นการค้ามีหลายอนุพันธ์จึงมีสมบัติในการละลายน้ำที่แตกต่างกัน เช่น อนุพันธ์ของเกลือ Ca^{2+}, K^{+}, Na^{+}, NH_4^{+}และยังผลิตในรูปของ propylene glycol alginate ซึ่งได้จากปฏิกิริยาของ alginic acid กับ propylene oxide ภายใต้ความดัน อนุพันธ์เหล่านี้จะละลายได้ทั้งในน้ำร้อนและน้ำเย็น ความหนืดของสารละลายอัลจิเนทที่ได้ขึ้นอยู่กับ อุณหภูมิ ความเข้มข้น น้ำหนักโมเลกุล และการมีโลหะประจุบวก

อัลจิเนทบางชนิดมีสมบัติเป็นเจลและจะเกิดเจลได้เมื่อทำปฏิกิริยากับ Ca^{2+} โครงสร้างของเจลมีลักษณะคล้ายกล่องไข่ (egg box) โดยมี Ca^{2+} เกาะอยู่กับสายโพลิเมอร์ดังรูปที่ 1.2 สมบัติที่ดีของอัลจิเนทคือทำให้เกิด Irreversible gel ในน้ำเย็นเมื่อมี Ca^{2+} รวมอยู่ด้วย ซึ่งสมบัติในการเกิดเจลที่อุณหภูมิต่ำนี้ทำให้อัลจิเนทแตกต่างจากไฮโดรคอลลอยด์ชนิดอื่นๆที่ได้จากสาหร่ายสีแดง



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

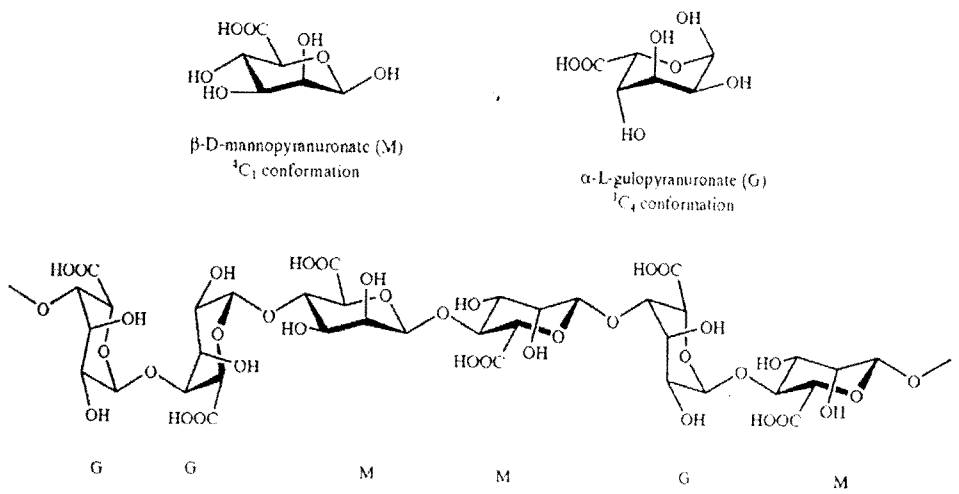


รูปที่ 1.2 กลไกการเกิดเจลของ calcium alginate (Egg-box model) (ที่มา : Steinbuchel และคณะ, 2001)

อัลจิเนทสามารถสกัดได้จากทั้งสาหร่ายและแบคทีเรียดิน เช่น *A. vinelandii* และ *A. crococcum* และหลายสปีชีส์ของ *Pseudomonas* อัลจิเนทที่ได้สามารถนำมาใช้ประโยชน์อย่างมากมาย อาทิ ใช้ผสมในอาหาร เป็นเครื่องปรุงยาสีฟัน เครื่องสำอาง และผลิตภัณฑ์เกี่ยวกับอุตสาหกรรมอื่นๆ เช่น ใช้เป็นไฮโดรเจล (hydrogel) เป็นสารแขวนลอย อีเล็คโตรไลท์ สารเพิ่มความหนืด เป็นต้น ซึ่งเจลอัลจิเนทมีความปลอดภัยสูง และเป็นที่ยอมรับกันในวงการอาหารและยาทั่วโลก (Amiji, 1999) ในปัจจุบันใช้สาหร่ายสีน้ำตาลมาผลิตในเชิงพาณิชย์ แต่ด้วยปัญหาด้านการจัดเก็บรวบรวมสาหร่ายในทะเลมีทั้งค่าใช้จ่าย อันตราย และทำลายสภาวะแวดล้อมทางธรรมชาติที่เป็นที่อยู่ของสัตว์น้ำ อีกทั้งกรรมวิธีในการสกัดอัลจิเนทต้องใช้กรดซึ่งได้ก่อให้เกิดปัญหาทางสิ่งแวดล้อม และเสียค่าใช้จ่ายในการบำบัดของเสียเหล่านี้ค่อนข้างสูง นอกจากนี้ยังไม่สามารถควบคุมคุณภาพของอัลจิเนทที่ได้เนื่องจากสภาพการเจริญเติบโตของสาหร่ายขึ้นกับสภาพของน้ำทะเล

อัลจิเนทจากเชื้อ *A. vinelandii* เป็นโพลิแซคคาไลด์ชนิดที่เซลล์ปล่อยออกมา 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

สายโพลีเมอร์อัลจิเนทจะเป็น 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 ก็จะเรียกว่า MG-blocks หรือการสลับกัน ตามรูปที่ 1.4



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

MMMMMMMGGGGGGGGMGMGMGMGGGGGGGG

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

รูปที่ 1.4 แสดงแบบแผนการเรียงตัวของโครงสร้างอัลจิเนท (ที่มา : Avella และคณะ, 2007)

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

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

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

Azotobacter vinelandii เป็นเชื้ออาศัยอยู่ในดินถูกค้นพบมามากกว่า 90 ปี ต้องการอากาศมีอัตราการหายใจสูง สามารถเจริญได้ดีในน้ำตาล แอลกอฮอล์ และกรดอินทรีย์ ได้อย่างหลากหลายชนิด สามารถผลิตเอนไซม์ nitrogenase ในสภาวะที่ไม่มีก๊าซไนโตรเจน สามารถนำธาตุโมลิบดีนัม ธาตุวานาเดียมหรือเหล็กมาเป็น cofactors ช่วยทำงานในกระบวนการตรึงไนโตรเจน (nitrogen fixation) ให้กลายเป็นแอมโมเนียม (NH_4^+) ได้ เชื้อนี้สามารถสร้างโพลีเมอร์ของคาร์บอนเพื่อใช้เก็บเป็นพลังงาน ได้แก่ อัลจิเนท และ poly-β-hydroxybutyric acid (PHB) สามารถใช้ทำเป็นพลาสติกชนิดย่อยสลายได้ (biodegradable plastics) แบคทีเรียชนิดนี้สามารถสร้างถุงน้ำ (cyst) เพื่อใช้สารอาหารในสภาวะแห้งแล้ง 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% เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลซูโคสเพียง 50 กรัมต่อลิตร และมีไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียหรือยูเรียอีก 0.1 กรัมต่อลิตร เท่านั้น ต่อมาภายหลังจึงทราบว่าโพลี

แซดคาไรด์นี้เป็นอัลคาจิเนท Clementi และคณะ (1998) ได้ศึกษาคุณสมบัติด้านความหนืดของอัลจิเนทความเข้มข้นต่างๆ ที่ผลิตจากเชื้อ *A. vinelandii* DSM576 พบว่ามีค่า shear rate อยู่ระหว่าง 1.1 – 1400 s^{-1} เมื่ออัลจิเนทมีความเข้มข้นระหว่าง 0.3-1.5 %w/v และแสดงพฤติกรรมเป็น Pseudoplastics ซึ่งมีคุณสมบัติคล้ายกับอัลจิเนทที่ได้จากสาหร่าย Parente และคณะ (1998) ได้ศึกษาการผลิตอัลจิเนทโดยใช้เชื้อ *A. vinelandii* DSM576 ในการหมักแบบ batch พบว่าการผลิตอัลจิเนทจะมีปริมาณมากที่สุดเมื่อไม่มีการควบคุมค่าการละลายของออกซิเจน (Dissolved oxygen concentration : DO) โดยดูผลจาก molecular weight ของอัลจิเนทซึ่งมีค่า 11-17.6 x 10^4 เมื่อค่า specific growth rate เท่ากับ 0.02-0.04 h^{-1} และยังพบว่าปริมาณ residual nitrogen source มีค่าลดลงเรื่อยๆ Parente และคณะ (2000) ได้ศึกษาผลของแอมโมเนียมซัลเฟตและความเร็วรอบของใบพัดที่มีต่อผลิตอัลจิเนทโดยใช้เชื้อ *A. vinelandii* DSM576 พบว่า ค่า specific growth rate และ molecular weight จะมีค่ามากที่สุดเมื่อเพิ่มค่าความเร็วรอบของใบพัด (500-600 rpm) และความเข้มข้นของ ammonium sulphate ที่ 0.75-0.90 gl^{-1} Pena และคณะ (2000) ได้ศึกษาถึงผลของค่าการละลายของออกซิเจน (Dissolved oxygen tension : DOT) และค่าความเร็วในการหมุนของใบพัดในถังหมักต่อการผลิตอัลจิเนท พบว่าที่ค่า DOT สูงๆจะมีปริมาณการผลิตอัลจิเนทมากกว่าที่ค่า DOT ต่ำ โดยใช้ความเร็วของใบพัด 300 rpm และพบว่าเมื่อให้ค่า DOT คงที่ที่ 3% และใช้ความเร็วรอบของใบพัดสูงๆ จะให้ค่า specific growth และปริมาณอัลจิเนทมากที่สุด แต่จะมีค่า molecular weight ต่ำลง

Saude และคณะ (2002) ได้ทดลองผลิตอัลจิเนทจากเชื้อ *A. vinelandii* ในระบบถังหมักเมเบรน รูพรุนขนาด 0.20 – 1.4 ไมครอน พบว่าสามารถแยกบริสุทธิ์อัลจิเนทได้ประมาณ 70-80% โดยมีอัตราการผลิต 0.09 กรัมต่อชั่วโมง ให้ yield 0.21 กรัมต่อกรัมน้ำตาลซูโคส ซึ่งค่อนข้างต่ำมาก Reyes และคณะ (2003) ได้ศึกษาการผลิตอัลจิเนทในถังหมักได้น้ำหนักโมเลกุล 1.1x10^6 ดาลตัน น้อยกว่าการเลี้ยงใน flask เล็กน้อย (1.9x10^6 ดาลตัน) เนื่องจากระบบการกวนในถังหมักที่แรงกว่าและใช้พลังงานในการกวนมากกว่าใน flask เกือบสิบเท่า

Joint Genome Institute สหรัฐอเมริกา ได้ให้ความสำคัญของเชื้อนี้มาก และได้บรรจุอยู่ในโครงการการหาลำดับเบสโดยร่วมมือกับ Oak Ridge National Laboratories เพื่อหาการเรียงลำดับเบสขนาดประมาณ 5.3 Mb ซึ่งปัจจุบันสามารถค้นพบโปรตีนแล้วมากกว่า 5 หมื่นชนิดจากเชื้อตัวนี้ (http://ava.biosci.arizona.edu/index.html) ซึ่งมีกลุ่มยีน (gene cluster) ควบคุมการผลิตอัลจิเนทอยู่ด้วย ยีนที่ใช้สร้างอัลจิเนทจะประกอบ 6 ยีนใน operator เดียวกัน ได้แก่ *algD, alg8, alg44, algK, algJ* และ *algG* โดยมียีน *algK* เป็นยีนหลักในการผลิตอัลจิเนท 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* แต่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์อัลจิเนทและยังมีส่วนเกี่ยวข้องกับการสร้างโพลีแซคคาไรด์ที่มีไขมัน (lipopolysaccharide) อีกด้วย

จากการทดลองของผู้วิจัยและทีมงานวิจัยของโครงการการผลิตปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพเพื่อการพาณิชย์ ภายใต้สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) สามารถแยกเชื้อแบคทีเรีย *Azotobacter vinelandii* ได้และได้ศึกษากระบวนการหมักเพื่อการเพิ่มปริมาณเซลล์ภายใต้การควบคุมปริมาณอากาศ พบว่าเชื้อนี้สามารถผลิตอัลจิเนทได้ปริมาณมากในสภาวะที่มีน้ำตาลสูงและปริมาณอากาศสูง แต่ยังไม่มีการศึกษาอย่างจริงจังในแง่การผลิตอัลจิเนท จึงเห็นว่าโครงการวิจัยนี้จะสามารถช่วยพัฒนาการผลิตอัลจิเนทแล้วนำไปต่อยอดเพื่อการประยุกต์ใช้ในทางอุตสาหกรรมในด้านการตรึงเอนไซม์ โดยจะใช้เอนไซม์อะไมเลสเป็นโมเดลในการศึกษา

1.3 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.3.1 ทราบสภาวะที่เหมาะสมและกลไกการทำงานทางจลพลศาสตร์ต่อการผลิตอัลจิเนทโดยใช้เชื้อ *Azotobacter vinelandii.* ในถังหมักขนาดเล็ก

1.3.2 เพื่อขยายขนาดกำลังการผลิตอัลจิเนทในถังหมักขนาด 5 ลิตร

1.3.3 เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการตรึงเอนไซม์ร่วมกับโพลีเมอร์ชนิดอื่น

1.3.4 เพื่อทำการพัฒนาประยุกต์ใช้อัลจิเนทในการตรึงเอนไซม์เพื่อการอุตสาหกรรม

1.4 สมมติฐานของงานวิจัย

เชื้อ *Azotobacter vinelandii* สามารถผลิตอัลจิเนทโดยมีคุณภาพเทียบเท่ากับอัลจิเนทจากสาหร่าย และสามารถนำอัลจิเนทที่ได้มาใช้ประโยชน์ในการตรึงเอนไซม์บีต้าอะไมเลส

1.5 ขอบเขตและข้อจำกัดของงานวิจัย

สภาวะที่เหมาะสมของการผลิตอัลจิเนทเช่น ความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส แหล่งอาหารไนโตรเจน ความเข้มข้นของไนโตรเจน และปริมาณออกซิเจนที่ใช้ในผลิตอัลจิเนทจากเชื้อ *Azotobacter vinelandii* โดยทำการทดลองในถังหมักขนาด 2 ลิตรโดยใช้อาหารปริมาตร 1.5 ลิตร และเพิ่มการผลิตเป็น 5 ลิตร โดยใช้ปริมาตรอาหาร 3 ลิตร ทำการทดสอบประสิทธิภาพของอัลจิเนทโดยใช้ในการตรึงเอนไซม์บีต้าอะไมเลส

1.6 ผลการวิจัยที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถผลิตอัลจิเนทที่มีประสิทธิภาพสูงจากเชื้อ *Azotobacter vinelandii* และสามารถแสดงประสิทธิภาพในการตรึงเอนไซม์บีต้าอะไมเลสได้อย่างมีประสิทธิภาพ