

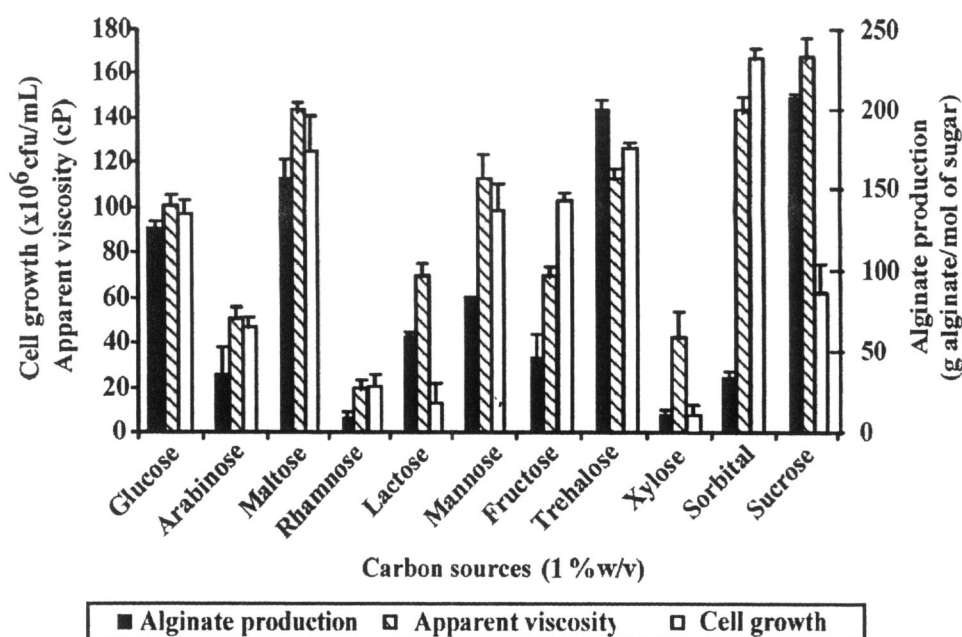
บทที่ 3

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

3.1 สถานะของการผลิตอัลจินเนตด้วยเชื้อ *Azotobacter vinelandii* ในระดับฟลasks

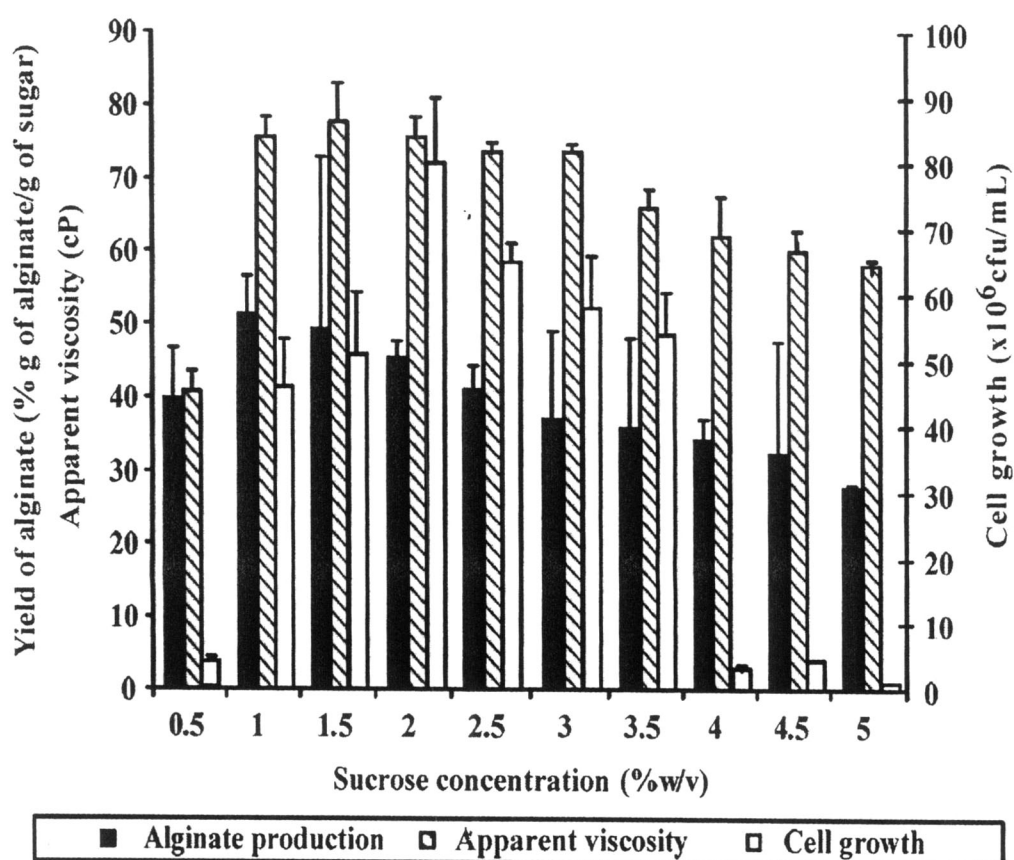
3.1.1 แหล่งอาหารคาร์บอน และความเข้มข้น

การเจริญของเชื้อและการผลิต EPS โดยปกติจะขึ้นอยู่กับแหล่งอาหารคาร์บอนซึ่งจะส่งผลกระทบต่อคุณภาพ องค์ประกอบของน้ำตาล และ/หรือน้ำหนักโมเลกุลของ EPS (Wachenheim และ Patterson, 1992) แหล่งอาหารคาร์บอนที่ใช้ในการศึกษา คือ กลูโคส, อะราบินโนส, แรมโนส, แลคโตส, มอลโตส, แมนโนส, ฟรุคโตส, ทรีฮาโลส, ซาโคส, ซอลบิทอล และ ซูโครส ผลของแหล่งอาหารคาร์บอนต่อการผลิตอัลจินเนต ความหนืด และการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแสดงดังในรูปที่ 3.1 การใช้แหล่งคาร์บอนที่มีความเข้มข้น 1% ในการผลิตอัลจินเนตจากเชื้อ *Azotobacter vinelandii* พบว่า น้ำตาลทรีฮาโลสและซูโครสให้ค่า ผลผลิตของอัลจินเนตที่ใกล้เคียงกันที่ 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 เนื่องจากมีราคาถูกกว่าทรีฮาโลสและให้ผลผลิตของอัลจินเนตสูง



รูปที่ 3.1 ผลของแหล่งอาหารคาร์บอนต่อการผลิตอัลจินเนต (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

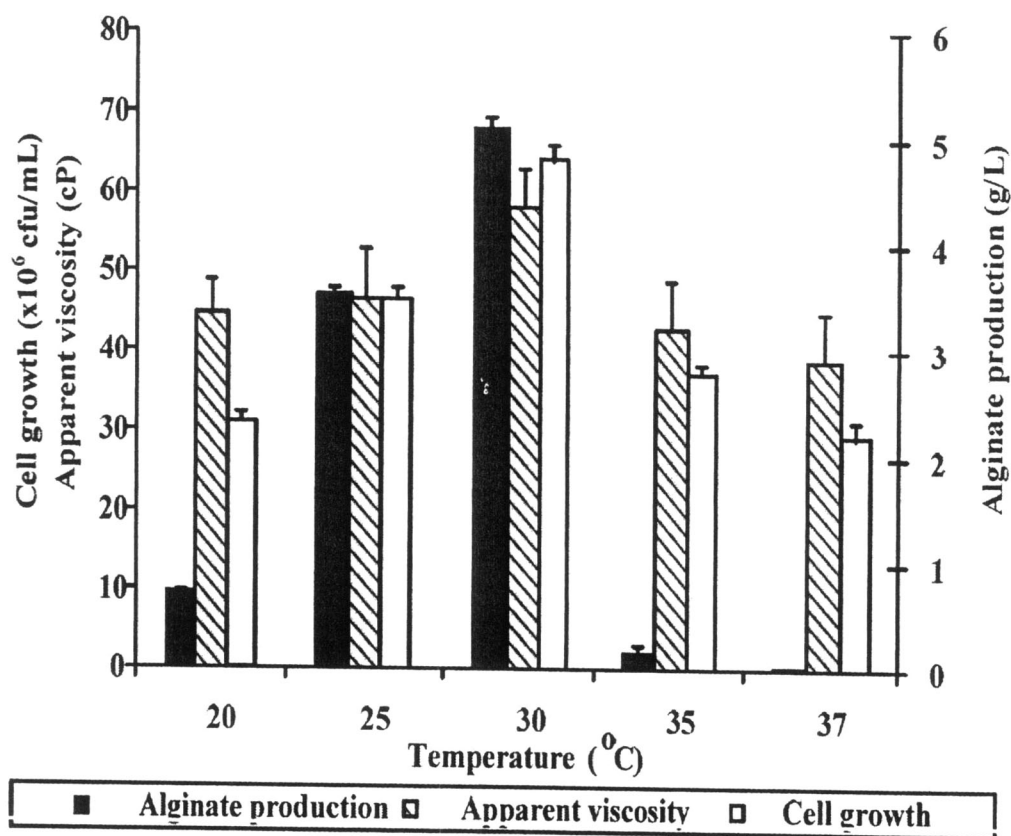
ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่เหมาะสมสำหรับการผลิตอัลจิเนทด้วยเชื้อ *Azotobacter vinelandii* อยู่ที่ 1% w/v และถ้าใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลที่สูงขึ้นจะทำให้การผลิตอัลจิเนทลดลง ในรูปที่ 3.2 แสดงการเจริญของแบคทีเรียและความเข้มข้นของอัลจิเนทที่ผลิตได้ การเจริญและการผลิตอัลจิเนทของแบคทีเรียจะเพิ่มขึ้น เมื่อทำการเพิ่มความเข้มข้นของซูโครสที่ 1% w/v และเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสมากกว่า 1% w/v จะพบว่าการผลิตอัลจิเนทและการเจริญของเชื้อ *Azotobacter vinelandii* จะลดลง จากการวิเคราะห์หาค่าความหนืดพบว่า การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียโดยใช้ น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งอาหารคาร์บอนมีประสิทธิภาพในการผลิตอัลจิเนท จากผลการทดลองพบว่า น้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้นสูงจะมีผลยับยั้งการผลิตอัลจิเนท ซึ่งอาจเป็นผลมาจากแรงดันออสโมติก และให้ผลการศึกษาเช่นเดียวกับ Prasertan และคณะ (2008) คือซูโครสที่ความเข้มข้นสูงจะมีผลยับยั้ง การเจริญของเชื้อ *Azotobacter vinelandii* และยับยั้งการผลิตอัลจิเนท ซึ่งผลของการยับยั้งนี้เป็นผลมาจากแรงดันออสโมติกที่สูงเกินไป



รูปที่ 3.2 ผลความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่มีต่อการผลิตอัลจิเนท (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

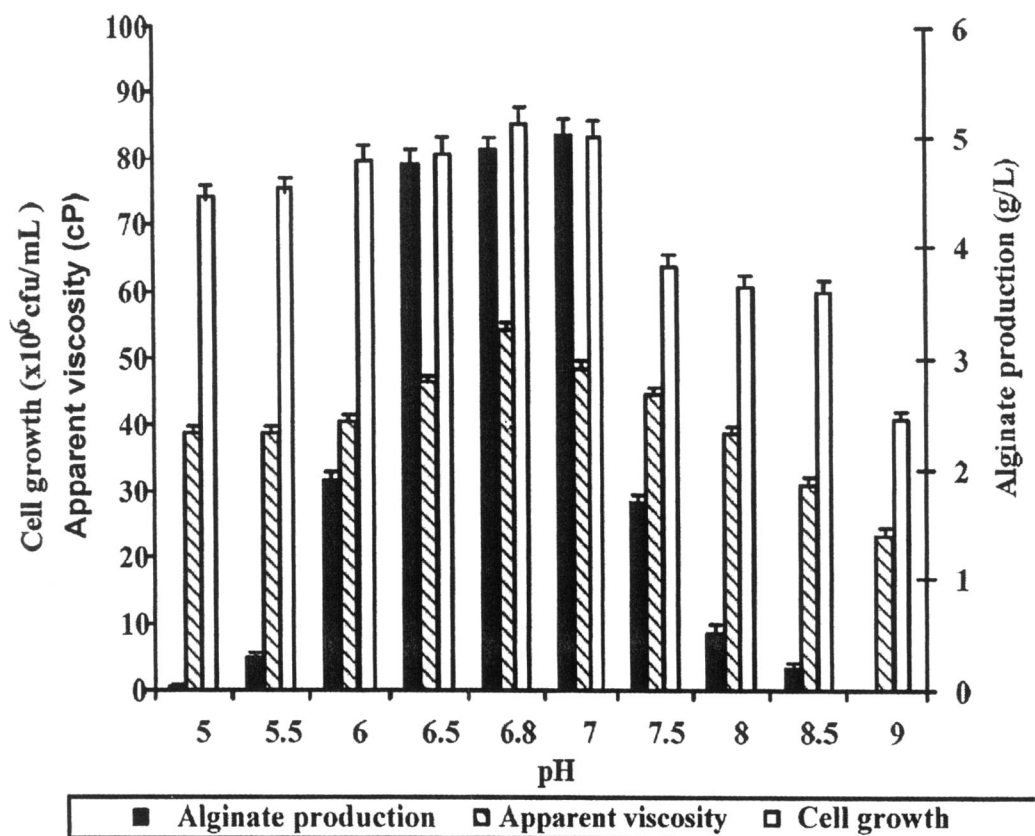
อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มมีผลอย่างยิ่งต่อการสังเคราะห์ทางชีวภาพของโพลีแซคคาไรด์ จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตโพลีแซคคาไรด์ในอุตสาหกรรมทั้งหมดจะอยู่ในกลุ่มของ mesophile (Lawson และ Sutherland, 1978) อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการผลิตโพลีแซคคาไรด์ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ จะอยู่ในช่วง 25-30 °ซ ขณะที่อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการผลิตอัลจิเนทจะอยู่ที่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



รูปที่ 3.3 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตอัลจิเนท (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 การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเพื่อใช้ในการผลิตอัลจิเนทให้ได้ผลผลิตสูงเมื่อทำการเลี้ยงในอาหาร LG ที่มีซูโครสเป็นแหล่งอาหารคาร์บอนที่ความเข้มข้น 1% (w/v) ในการทดลองหาค่าความเป็นกรด-ด่าง เริ่มต้นที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเชื้อและการผลิตอัลจิเนทพบว่า ค่า ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตอัลจิเนทของเชื้อ *Azotobacter vinelandii* อยู่ในช่วง 6.5-7.0 ดังแสดงในรูปที่ 3.4 จากรายงานของ Pace (1981) พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่าง จะมีผลต่อการผลิตอัลจิเนทมากกว่าการเจริญของเชื้อและค่า ความเป็นกรด-ด่าง จำเพาะจะมีผลโดยตรงกับการทำงานเอนไซม์ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์อัลจิเนท (Lawson และ Sutherland, 1978)

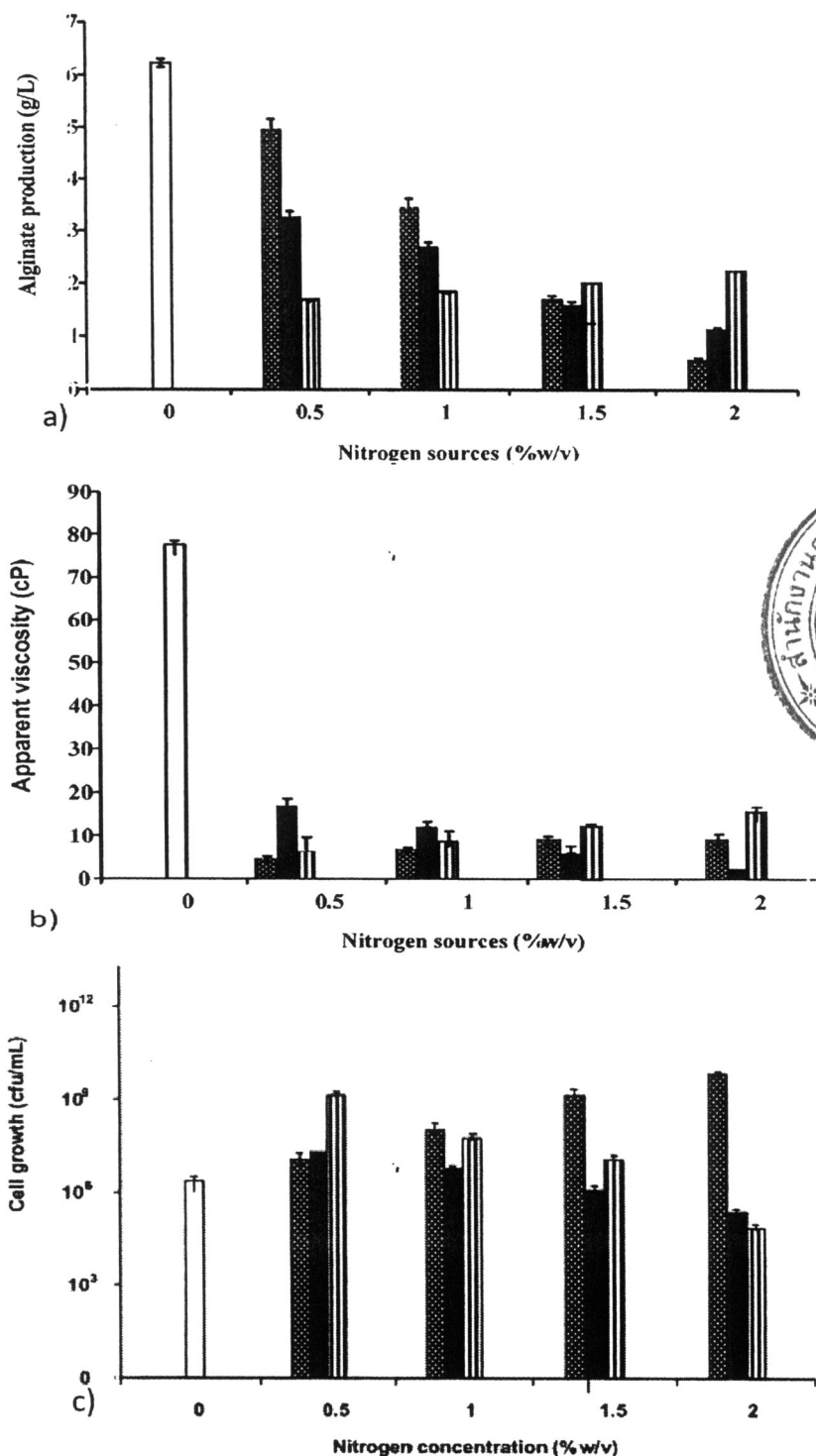


รูปที่ 3.4 ผลของความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นต่อการผลิตอัลจิเนท (alginate production) ความหนืดปรากฏ (apparent viscosity) และการเจริญของเชื้อ *Azotobacter vinelandii* (cell growth) ในอาหาร LG โดยใช้น้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 1% (w/v) เติมห้วเชื้อที่ 1% ความอุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 72 ชม. โดยทำการเขย่าที่ 200 rpm

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 จากผลการทดลองการผลิตอัลจินเตจะลดลงเมื่อทำการเพิ่มความเข้มข้นของแหล่งอาหารไนโตรเจน

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) โดยไนโตรเจนมีผลต่อกระบวนการตรึงไนโตรเจน ซึ่งจะส่งผลขัดขวางการผลิตอัลจินเต จากรายงานของ Page และคณะ (1997) รายงานว่าเซลล์ที่มีการตรึงไนโตรเจนจะมีปริมาณของอัลจินตน้อยมากและการเติมแหล่งอาหารไนโตรเจนที่เป็นสารอนินทรีย์ลงไป เซลล์จะเก็บไว้ใช้ในการตรึงไนโตรเจนและช่วยปกป้องการหายใจของเซลล์จากออกซิเจนซึ่งมีผลต่อโครงสร้างของเอนไซม์ไนโตรจิเนส และ Acetyl Co-A ที่ได้จากกระบวนการเผาผลาญน้ำตาลยังนำมาใช้ในการผลิตอัลจินเตด้วย สอดคล้องกับรายงานของ Pal et al. (1998) ที่ทำการทดลองกับสายพันธุ์ *A. chroococcum*



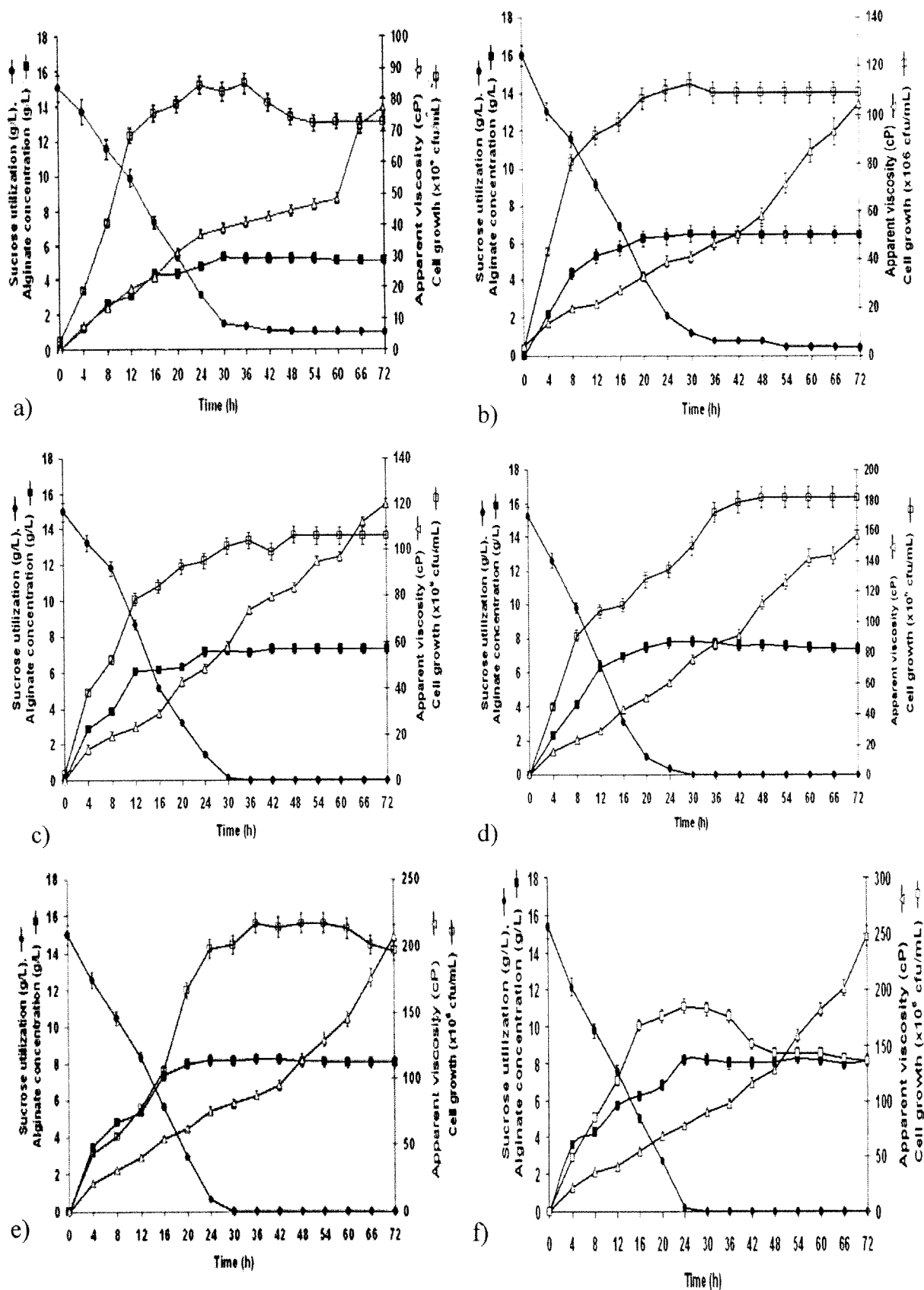
รูปที่ 3.5 ผลของแหล่งอาหารไนโตรเจนชนิดต่างๆที่มีผลต่อการผลิตอัลจิเนต (alginate production) (a) ความหนืดปรากฏ (apparent viscosity) (b) และการเจริญของเชื้อ *Azotobacter vinelandii* (cell growth) (c) ในอาหาร LG โดยใช้น้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 1% (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน เดิมหัวเชื้อที่ 1% ควบคุมค่า pH ที่ 6.8 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 ลิตรซึ่งจะใช้น้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 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) การสร้างรูปร่างของอัลจินทบางส่วนเกี่ยวข้องกับการเจริญเนื่องจากทั้งความเข้มข้นของอัลจินทและการเจริญของเชื้อที่เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเร็วในการกวนให้สูงที่ 100-500 rpm (ตารางที่ 3.1) และจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อเพิ่มความเร็วเป็น 500 rpm ภายใน 24 ชม. และเพิ่มขึ้นอีกเล็กน้อยหลังผ่าน 24 ชม. ในขณะที่พบว่าค่าความหนืดปรากฏเพิ่มขึ้นตลอดจนกระทั่งสิ้นสุดการหมัก ส่วนค่าจลพลศาสตร์ (Kinetic parameter) เช่น อัตราการเจริญจำเพาะ อัตราการเจริญสูงสุด อัตราการใช้น้ำตาลซูโครส ผลผลิตอัลจินทสูงสุด และแรงเค้นเฉือน แสดงผลในตารางที่ 3.1 ดังนั้นที่ความเร็วในการกวน 500 rpm จะเป็นค่าความเร็วที่ถูกละเอามาใช้ในการทดลองต่อไปเนื่องจากประหยัดพลังงานและให้ค่าผลผลิตอัลจินทไม่แตกต่างกับการใช้ความเร็ว 600 rpm โดยการใช้ความเร็วในการกวนที่มากเกินไปจะส่งผลให้การผลิตอัลจินทลดลงเนื่องจากจะไปทำลายเซลล์และมีข้อจำกัดเกี่ยวกับการเคลื่อนย้ายสารผ่านเนื้อเยื่อที่อัตราเฉือนสูงจะส่งผลให้มีพื้นที่ผิวเซลล์เหลือน้อยลง ซึ่งให้ค่าต่ำสุดอยู่ที่ 8.9 μm^2 ที่ความเร็ว 800 rpm เปรียบเทียบกับค่าสูงสุดที่ 33.8 μm^2 ที่ความเร็ว 300 rpm (Sabra และคณะ, 1999) การที่พื้นที่ผิวเซลล์ต่อปริมาณเซลล์ลดลง Post และคณะ (1982) ได้รายงานไว้ว่าเป็นผลมาจากกระบวนการป้องกันออกซิเจนของเอนไซม์ไนโตรจินีส โดยค่าความหนืดปรากฏของอัลจินทแสดงให้เห็นว่าอัลจินทที่ผลิตได้ให้ค่าพฤติกรรมของไหลเป็นแบบนูนนิวโตเนียน (non-Newtonian) เนื่องจากความหนืดเพิ่มขึ้นเมื่ออัตราเฉือนเพิ่มขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 3.1



รูปที่ 3.6 การเปลี่ยนแปลงของการใช้น้ำตาล ความเข้มข้นของอัลจินตที่ผลิตได้ 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 เติมหั้วเชื้อ 10% ควบคุมค่า pH เริ่มต้นที่ 6.8 อุณหภูมิ 30 °ซ

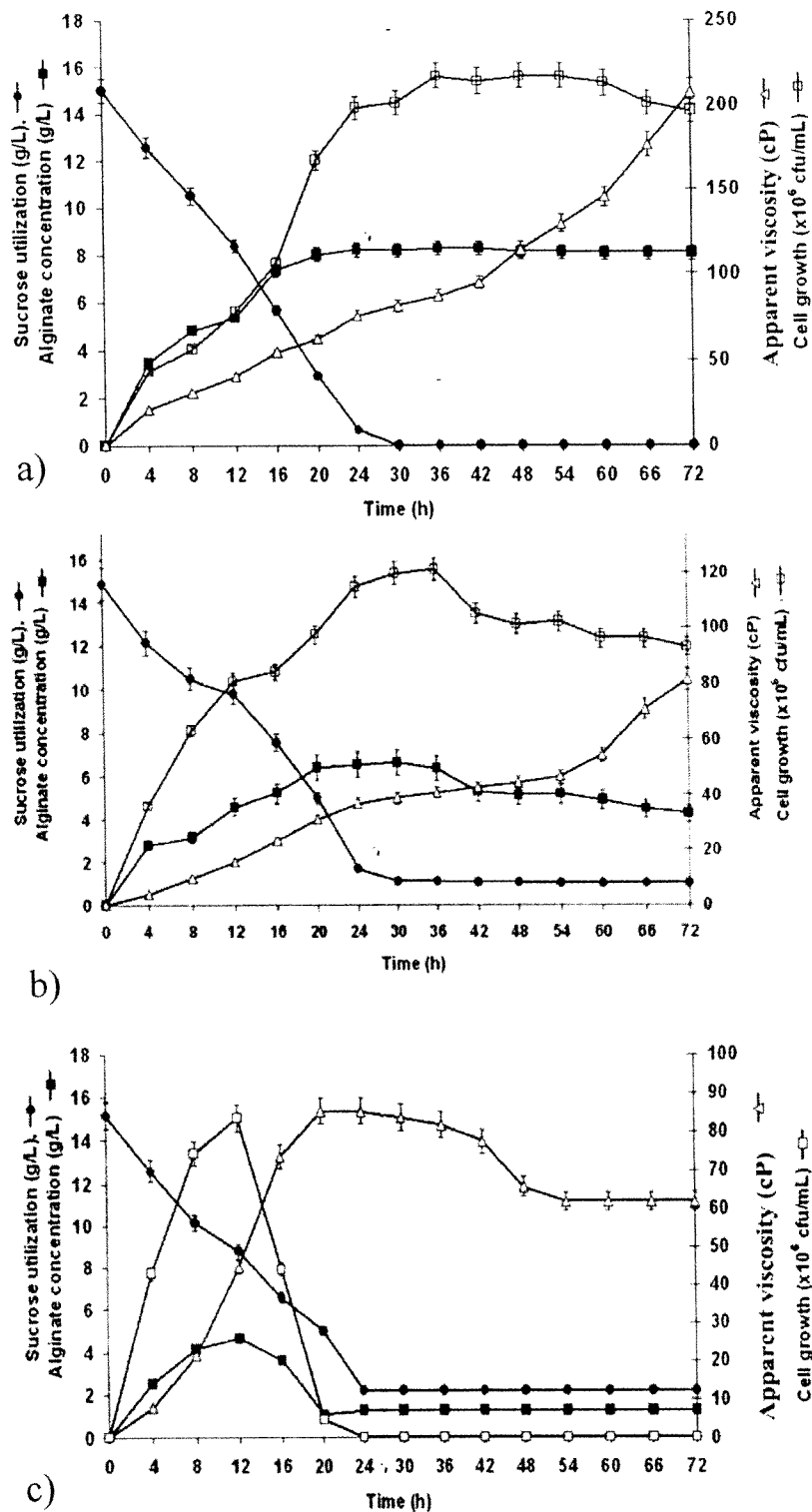
ตารางที่ 3.1 ค่าจลพลศาสตร์ของอัตราการเจริญสูงสุด ผลผลิตอัลจินทที่ผลิตได้สูงสุด น้ำตาลที่ใช้ไป และแรงเค้นเฉือนของ *Azotobacter vinelandii* ในถังหมักขนาด 2 ลิตร (ความเร็วในการกวนแตกต่างกัน) โดยให้อัตราการไหลของอากาศ 2.5 vvm ในอาหาร LG pH 6.8 ที่อุณหภูมิ 30°C

ค่าจลพลศาสตร์	ความเร็วในการกวน (rpm)					
	100	200	300	400	500	600
อัตราการเจริญสูงสุด, $\mu_{\max}$ (h^{-1})	0.205	0.242	0.257	0.278	0.295	0.301
ผลผลิตอัลจินทสูงสุด, $Y_{p/s}$ ($\text{g}_{\text{alg}}/\text{g}_{\text{suc}}$)	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 ($\text{Pa}\cdot\text{s}^{-1}$)	1.29	3.48	6.01	10.47	16.59	24.81

3.2.2 การให้อากาศ

ปริมาณอากาศเปลี่ยนแปลงตั้งแต่ 0, 2.5 และ 5 ผลของความเข้มข้นอัลจินทที่ผลิตได้ การเจริญของเชื้อ ความหนืดปรากฏ และปริมาณน้ำตาลซูโครสที่เหลือในการหมักโดย *Azotobacter vinelandii* แสดงในรูปที่ 3.7 (a-c) ค่า Kinetic parameter เช่น อัตราการเจริญจำเพาะ อัตราการเจริญสูงสุด อัตราการใช้น้ำตาลซูโครส ผลผลิตอัลจินทสูงสุดและแรงเค้นเฉือนแสดงในตารางที่ 3.2 จากผลการทดลองพบว่าการสร้างรูปร่างของอัลจินทบางส่วนเกี่ยวข้องกับการเจริญเนื่องจากทั้งการผลิตอัลจินทและการเจริญของเชื้อเพิ่มขึ้นที่เวลาเดียวกันภายในเวลา 24 ชม. และเพิ่มขึ้นเล็กน้อยจะกระทั่งเสร็จสิ้นกระบวนการหมัก ที่อัตราการให้อากาศ 2.5 vvm ให้ค่าการเจริญของเซลล์และการผลิตอัลจินทสูง ในขณะที่เมื่อเพิ่มอัตราการให้อากาศเป็น 5 vvm ทุกค่าลดลงเนื่องจากการเติมสาร antifungal ในอาหารเพื่อลดฟองอากาศที่เกิดขึ้นและที่ปริมาณออกซิเจนสูงการเจริญของเชื้อจะค่อยๆ ลดลงซึ่งขึ้นจนถึงผลของออกซิเจนที่มีต่อการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจิเนส ดังนั้นที่อัตราการไหลของอากาศ 2.5 vvm จะถูกเลือกนำมาใช้ในการทดลองต่อไปเพื่อหลีกเลี่ยงการใช้สาร antifungal ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อผนังเซลล์ของแบคทีเรียและความหนืดของอัลจินท (รูปที่ 3.7c) ในการตรึงไนโตรเจนของเซลล์ขึ้นอยู่กับปริมาณออกซิเจนโดยออกซิเจนสูงจะส่งผลกระทบต่อโครงสร้างของเอนไซม์ไนโตรจิเนส (Linkerhagner และ Oelze, 1997) สำหรับการเอาชีวิตรอดของ *Azotobacter vinelandii* ในสภาพที่มีอากาศหนึ่งในเมตาบอลิซึมเริ่มต้นคือการปกป้องเอนไซม์ไนโตรจิเนสจากการเข้าทำลายโดยออกซิเจน โดยการปกป้องเอนไซม์จากออกซิเจนที่เกิดใน *Azotobacter vinelandii* จะผ่านกลไกหลักๆ 2 อย่างคือ 1) ผ่านกิจกรรมการหายใจสูงที่จะเคลื่อนย้ายเอาออกซิเจนไปสู่ผิวเซลล์ 2) การย้อนกลับของเอนไซม์สู่

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



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

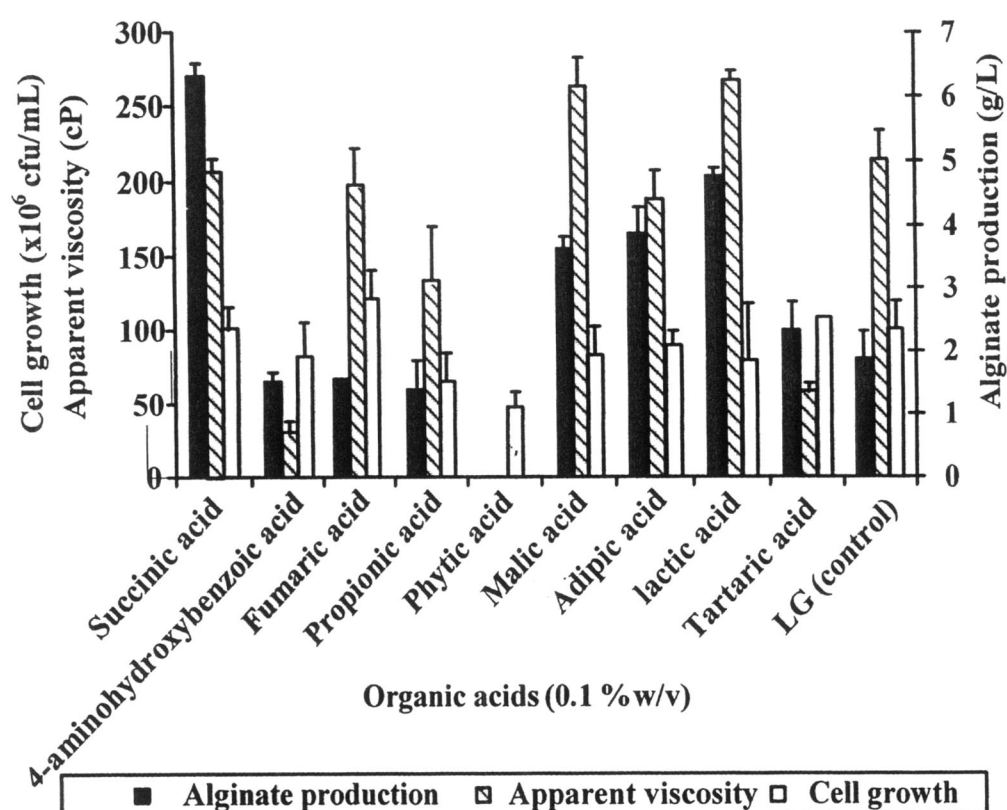
ตารางที่ 3.2 ค่าจลพลศาสตร์ของอัตราการเจริญสูงสุด ผลผลิตอัลจินทที่ผลิตได้สูงสุด และปริมาณน้ำตาลซูโครสที่ใช้ไปของ *Azotobacter vinelandii* ในถังหมักขนาด 2 ลิตร (การให้อากาศแตกต่างกัน) ที่ความเร็วในการกวน 500 rpm ในอาหาร LG pH 6.8 ที่อุณหภูมิ 30°C

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

3.3 การเพิ่มคุณสมบัติบางประการของการผลิตอัลจิเนทด้วยกรดอินทรีย์

3.3.1 แหล่งและความเข้มข้นของกรดอินทรีย์

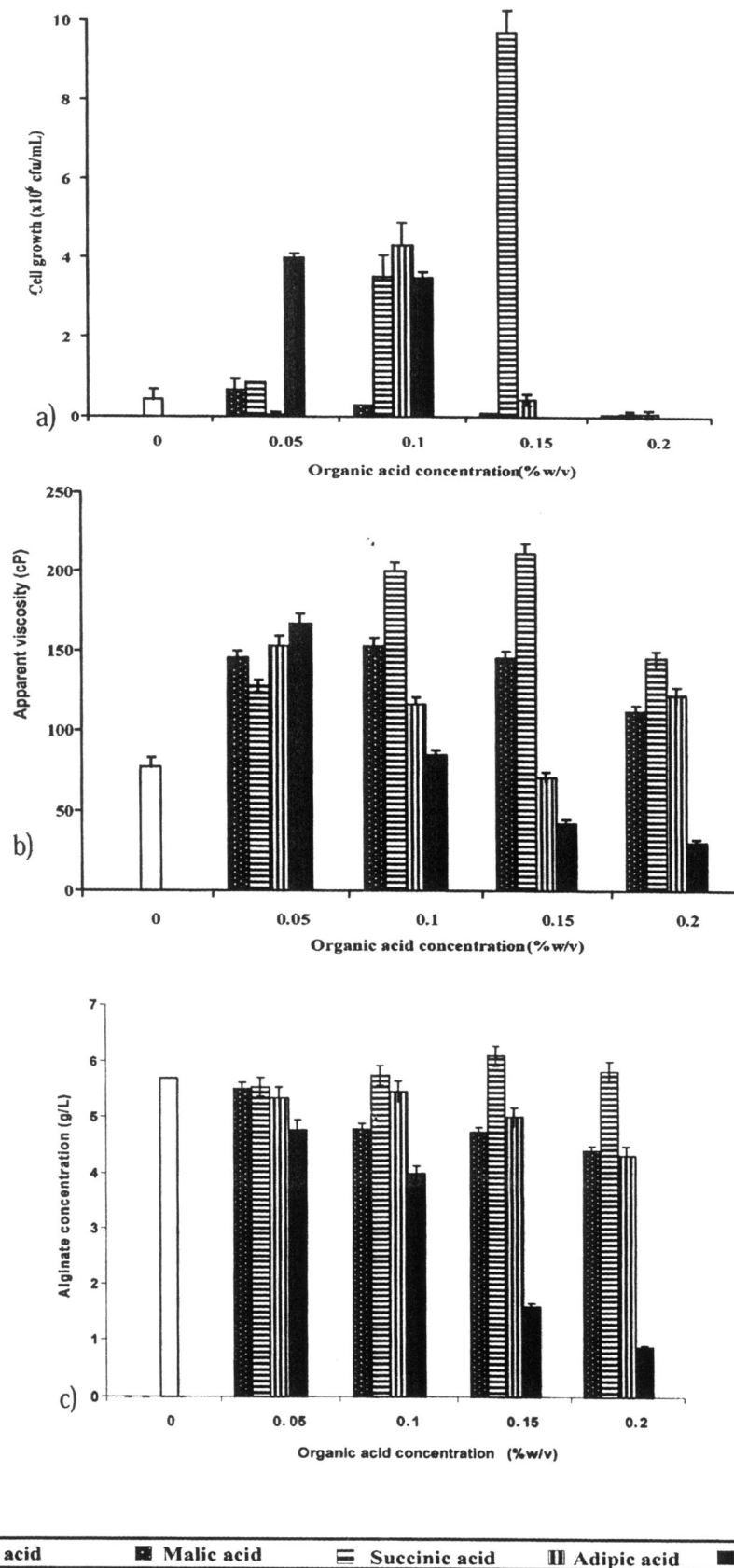
ผลของการทดลองในระดับเขย่าฟลาस्कแสดงในรูปที่ 3.8 แสดงผลของการผลิตอัลจิเนท ความหนืดปรากฏและการเจริญของเชื้อ โดยในการทดลองเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของอัลจิเนทโดยใช้ กรดซัคซินิก กรดฟูมาริก กรดไพรูวิก กรดไฟติก กรดมาลิก กรดอะดิปิก กรดโฟ-อะมิโนไฮดรอกซีเบนโซอิก กรดแลคติก และกรดทาร์ทาริก จากผลการทดลองพบว่าการใช้กรดอินทรีย์ 4 ชนิดคือ กรดซัคซินิก กรดมาลิก กรดแลคติกและกรดอะดิปิก จะมีค่าความหนืดปรากฏและความเข้มข้นของอัลจิเนทเพิ่มขึ้นในขณะที่การใช้กรดไฟติกพบเพียงค่าการเจริญของเซลล์เท่านั้น



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

ความเข้มข้นของกรดอินทรีย์แต่ละชนิด (กรดซักซินิก กรดมาลิก กรดแลคติกและกรดอะดิปิก) ทำการเปลี่ยนแปลงจาก 0-0.2 % (w/v) ขยับระยะห่างความเข้มข้นทุกๆ 0.05 % (w/v) จากผลการทดลองพบว่าการใช้กรดซักซินิกที่ความเข้มข้น 0.15% (w/v) จะให้ค่าการผลิตอัลจินท การเจริญของเซลล์สูงที่สุดและเพิ่มค่าความหนืดปรากฏเมื่อเปรียบเทียบกับอาหาร LG ที่ปราศจากการเติมกรดอินทรีย์ (รูปที่ 4.9) จากผลการทดลองอาจกล่าวได้ว่ากรดซักซินิกถูกนำมาใช้เป็นแหล่งอาหารคาร์บอนในวัฏจักร TCA (tricarboxylic acid)

Vargas-Garcia และคณะ (2001) สรุปว่า EPS ที่ผลิตโดย *Azotobacter* sp. เมื่อเติมกรดโฟ-อะมิโนเบนโซอิก (4-aminohydroxybenzoic acid) เพื่อเป็นแหล่งอาหารคาร์บอนจะทำให้ค่าความหนืดสูงขึ้นในขณะที่ Chan (1986) ได้ทำการทดลองพบว่า *Azotobacter vinelandii* ให้ระดับการเจริญของเชื้อดีขึ้นเมื่อใช้สารประกอบฟีนอลิกเป็นแหล่งอาหารคาร์บอน

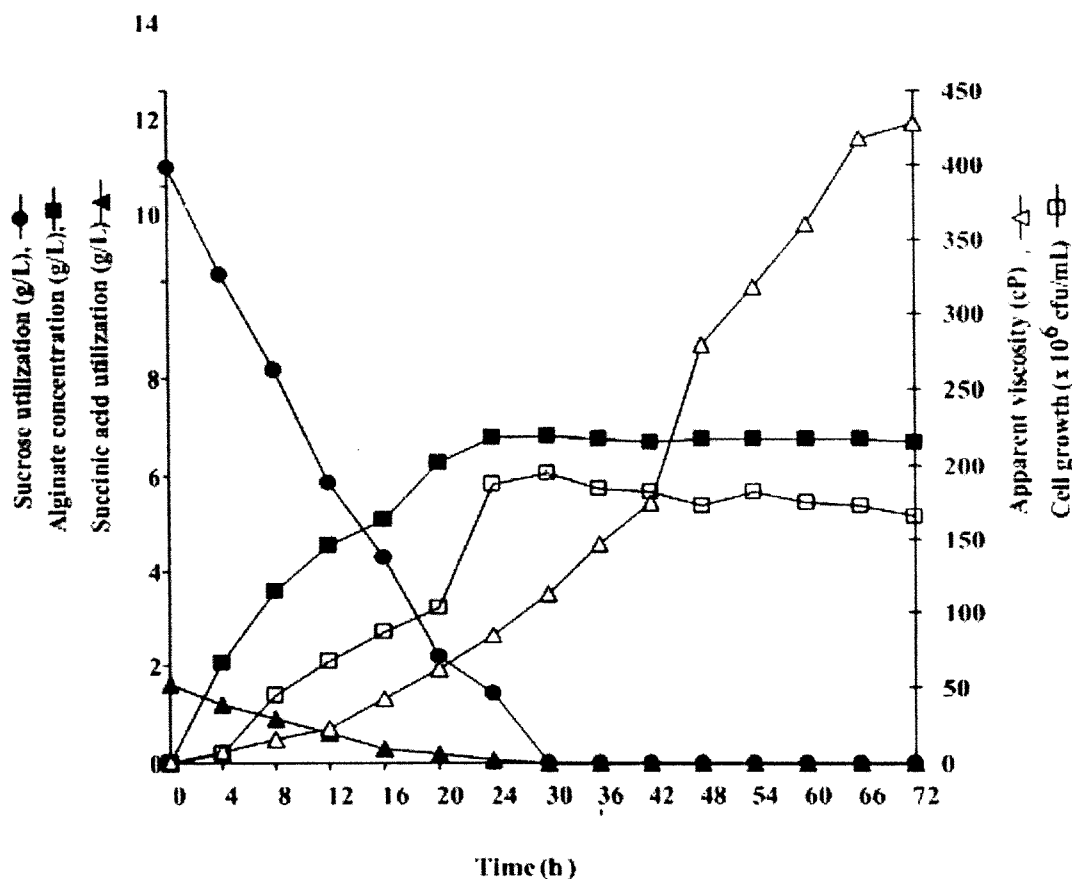


รูปที่ 3.9 ผลความเข้มข้นของกรดอินทรีย์ที่มีต่อ (a) การเจริญของเซลล์แบคทีเรีย (b) ความหนืดปรากฏ และ (c) การผลิตอัลจิเนตในอาหาร LG โดยใช้น้ำตาลซูโครส 1% (w/v) เป็นแหล่งอาหารคาร์บอน เดิมหัวเชื้อ 1% ปรับค่า pH ที่ 6.8 อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 72 ชม.

3.3.2 การผลิตอัลจิเนทในถังหมักขนาด 2 ลิตรโดยใช้อาหาร LG ร่วมกับกรดอินทรีย์

ทำการหมักในถังหมักขนาด 2 ลิตรอีกครั้งเพื่อเพิ่มความหนืดปรากฏและการผลิตอัลจิเนทโดยใช้ *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 การผลิตอัลจิเนท ค่าความหนืดปรากฏ และการเจริญของเซลล์แสดงผลในรูปที่ 3.10 ค่าการผลิตอัลจิเนทและการเจริญของเซลล์เพิ่มขึ้นภายในเวลา 24 ชม. และคงที่ไปจนกระทั่งเสร็จการหมัก ในขณะที่น้ำตาลซูโครสและกรดซัคซินิกถูกใช้หมดไปภายใน 24 ชม. การเติมกรดซัคซินิกความเข้มข้น 0.15% (w/v) ลงในอาหาร LG ช่วยเพิ่มค่าการผลิตอัลจิเนท การเจริญของเซลล์และค่าความหนืดปรากฏเมื่อเปรียบเทียบกับกรณีที่ไม่เติม จากผลการทดลองอาจยืนยันได้ว่ากรดซัคซินิกเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตอัลจิเนทด้วย *Azotobacter vinelandii* ค่าจลพลศาสตร์แสดงในตารางที่ 3.3



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

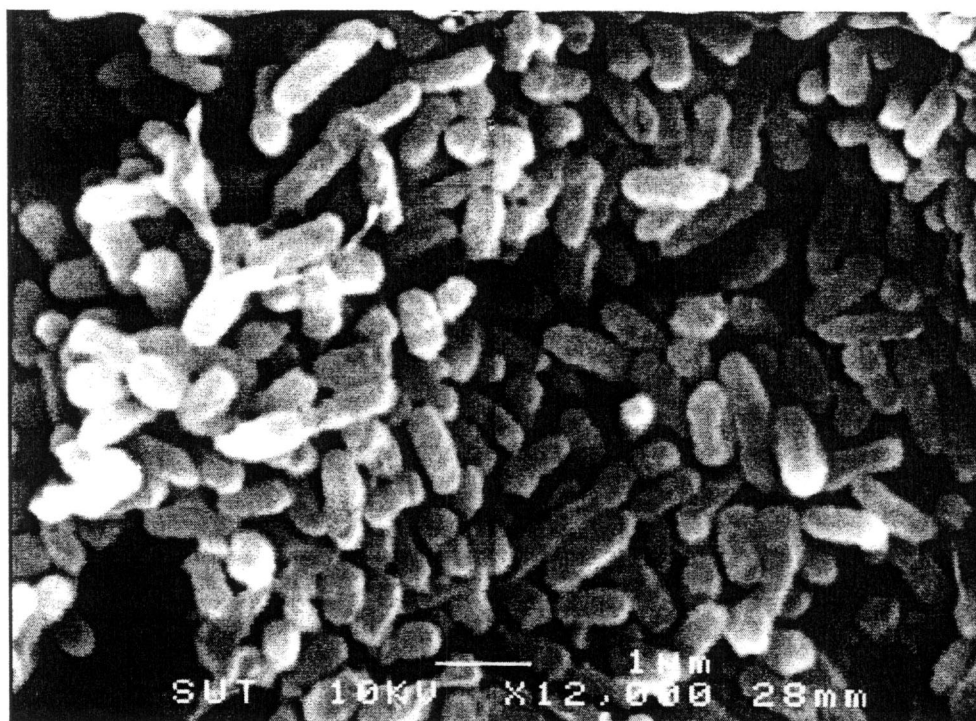
ตารางที่ 3.3 ค่าจลพลศาสตร์ของอัตราการเจริญสูงสุด ผลผลิตอัลจินที่ผลิตได้สูงสุด ปริมาณน้ำตาลซูโครสที่ใช้ไปและความหนืดปรากฏของ *Azotobacter vinelandii* ในถังหมักขนาด 2 ลิตรในอาหาร LG ประกอบไปด้วยกรดซัคซินิกความเข้มข้น 0.15% (w/v) ที่ความเร็วในการกวน 500 rpm การให้อากาศ 2.5 vvm pH 6.8 ที่อุณหภูมิ 30°C

Kinetic Parameter	การเติมกรดซัคซินิกความเข้มข้น 0.15% (w/v)
อัตราการเจริญสูงสุด, $\mu_{\max}$ (h^{-1})	0.297
ผลผลิตอัลจินสูงสุด, $Y_{p/s}$ ($\text{g}_{\text{alg}}/\text{g}_{\text{suc}}$)	0.505
ปริมาณน้ำตาลซูโครสที่ใช้ไป (g/L/h)	0.566
ปริมาณกรดซัคซินิกที่ใช้ไป (g/L/h)	0.327
ความหนืดปรากฏ (cP)	428.28

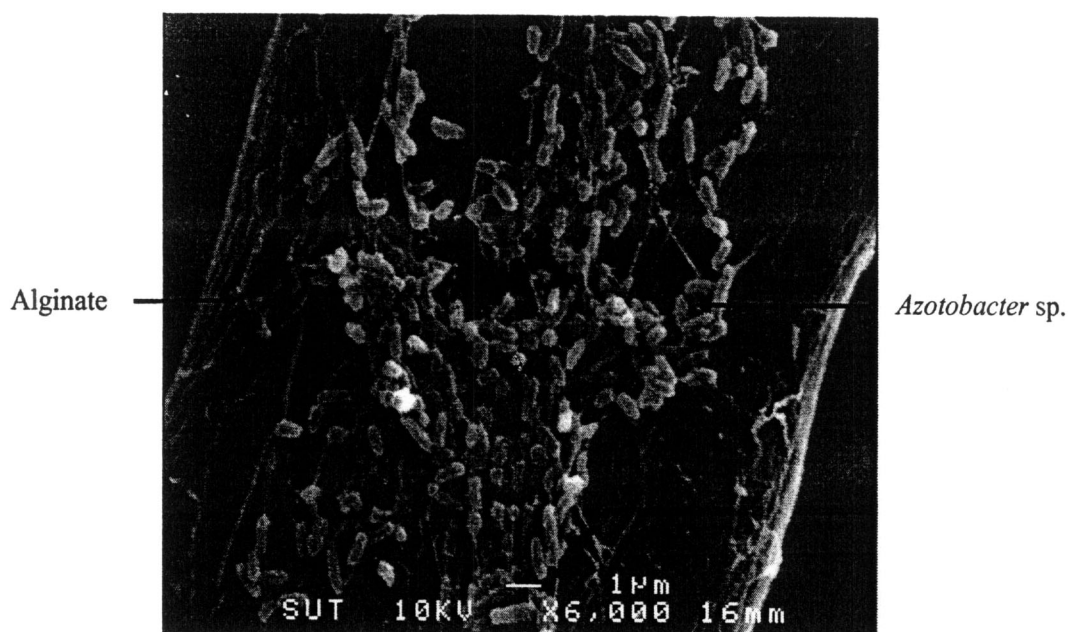
3.3.3 ลักษณะของอัลจินที่ผลิตได้จาก *Azotobacter vinelandii*

3.3.3.1 ลักษณะโครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (SEM)

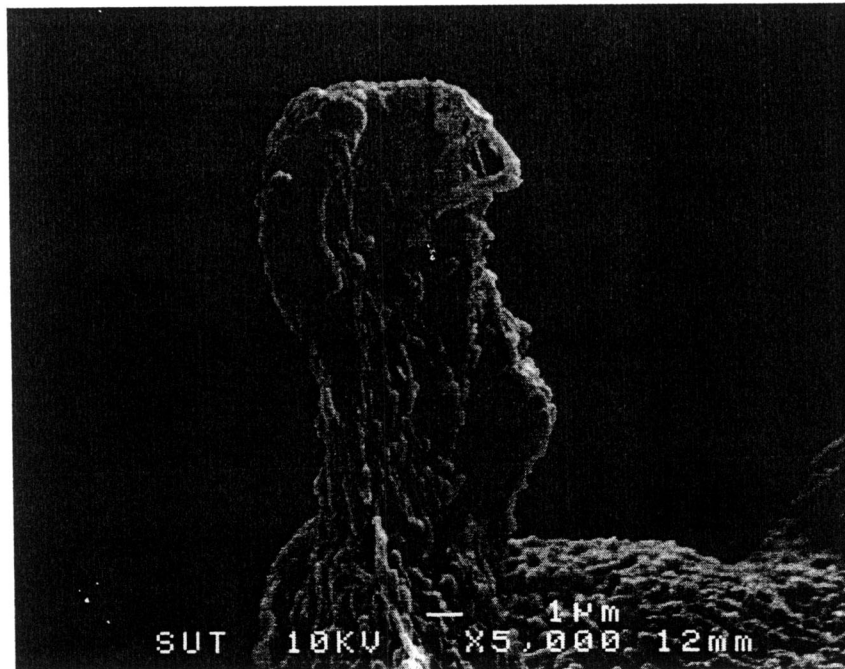
ทำการศึกษาโครงสร้างเซลล์ของ *Azotobacter vinelandii* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน โดยโครงสร้างเซลล์ของ *Azotobacter vinelandii* มีรูปร่างเป็นแท่ง ขนาดประมาณ 1 μm (รูปที่ 3.11) และมีการสร้างอัลจิน (รูปที่ 3.12-3.13) การผลิตของอัลจินหรือของเหลวเหนียวๆที่ฝังรวมตัวกันเป็นโคโลนีขนาดเล็ก รูปที่ 3.14 แสดงอัลจินแท่งที่ผลิตได้จาก *Azotobacter vinelandii* และอัลจิน (ทางการค้า) มีโครงสร้างเชื่อมโยง (cross-link) เหมือนกันแต่จำนวนของสายเชื่อมโยงของอัลจินที่ผลิตด้วย *Azotobacter vinelandii* น้อยกว่าอัลจินที่ผลิตได้จากสาหร่าย อย่างไรก็ตามอัลจินจากสาหร่ายเป็นพอลิเมอร์ที่มีความคงตัวและมีโครงสร้างที่ตายตัวมากกว่าอัลจินที่ผลิตจาก *Azotobacter vinelandii*



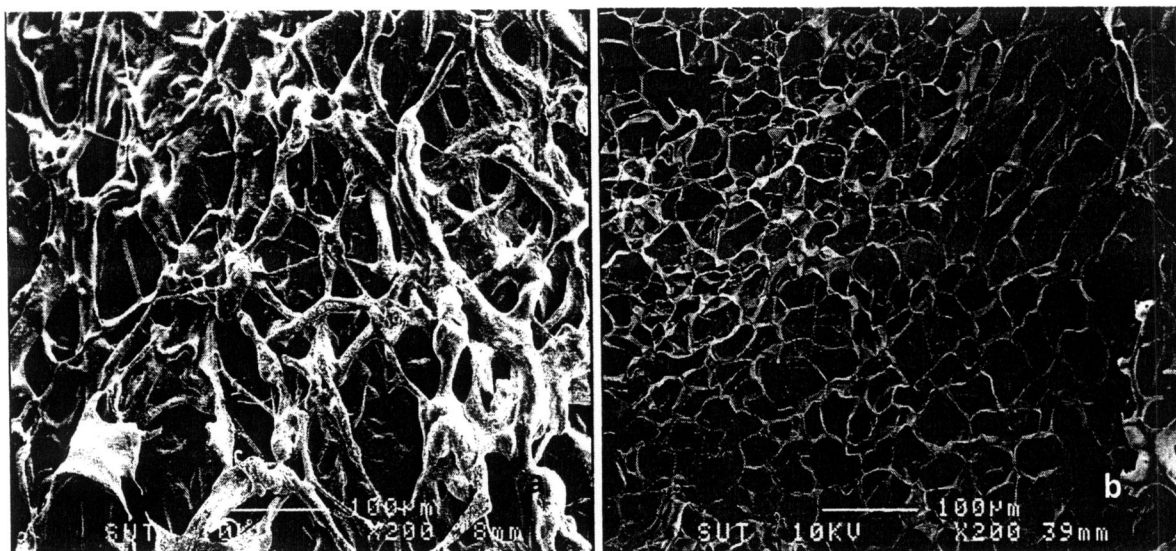
รูปที่ 3.11 ลักษณะโครงสร้างของ *Azotobacter vinelandii* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (SEM) ที่กำลังขยาย 12,000 เท่า



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



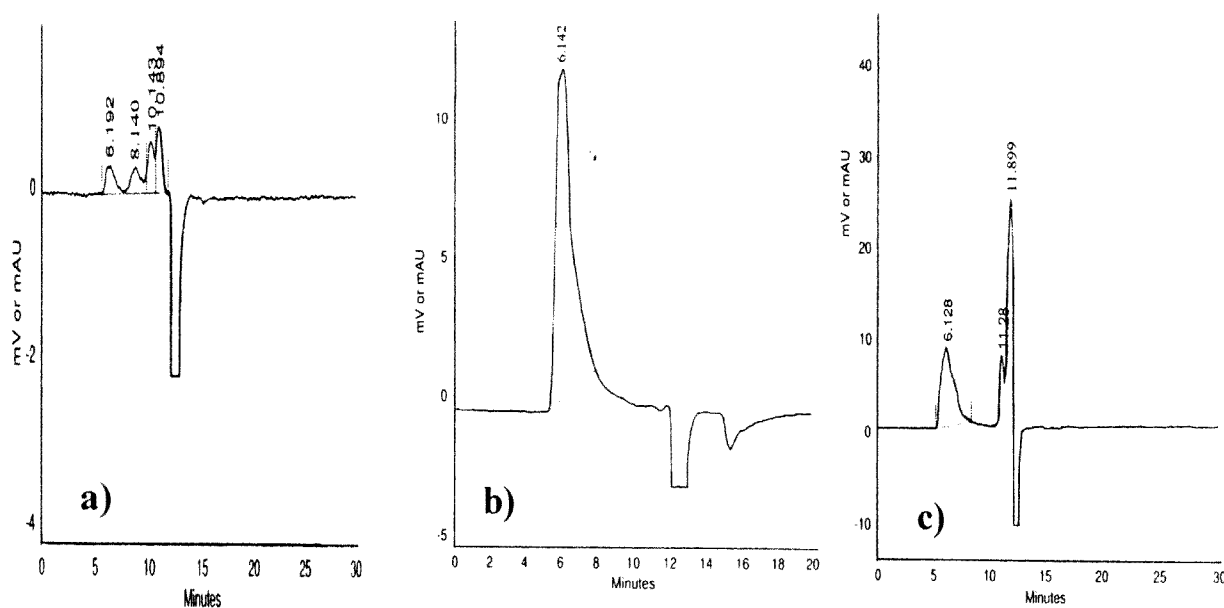
รูปที่ 3.13 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของเชื้อ *Azotobacter vinelandii* ที่มีการสร้างอัลจินทในอาหาร LG ประกอบไปด้วยกรดซัคซินิกความเข้มข้น 0.15% (w/v) ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 3 วัน



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 ขอบกราฟของน้ำหนักโมเลกุลแต่ละตัวคือ $.9 \times 10^3$, 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) ขอบกราฟของอัลจินทจาก *Azotobacter vinelandii* พบที่เวลา 6.13, 11.29 และ 11.9 นาที (รูปที่ 3.15b) ในขณะที่อัลจินทจากสาหร่ายพบขอบกราฟเพียงยอดเดียวคือที่เวลา 6.14 นาที (รูปที่ 3.15c) จากผลการทดลอง น้ำหนักโมเลกุลของอัลจินทจาก *Azotobacter vinelandii* คล้ายคลึงกับอัลจินทจากสาหร่ายเพราะเกิดขอบกราฟที่เวลาเดียวกัน (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

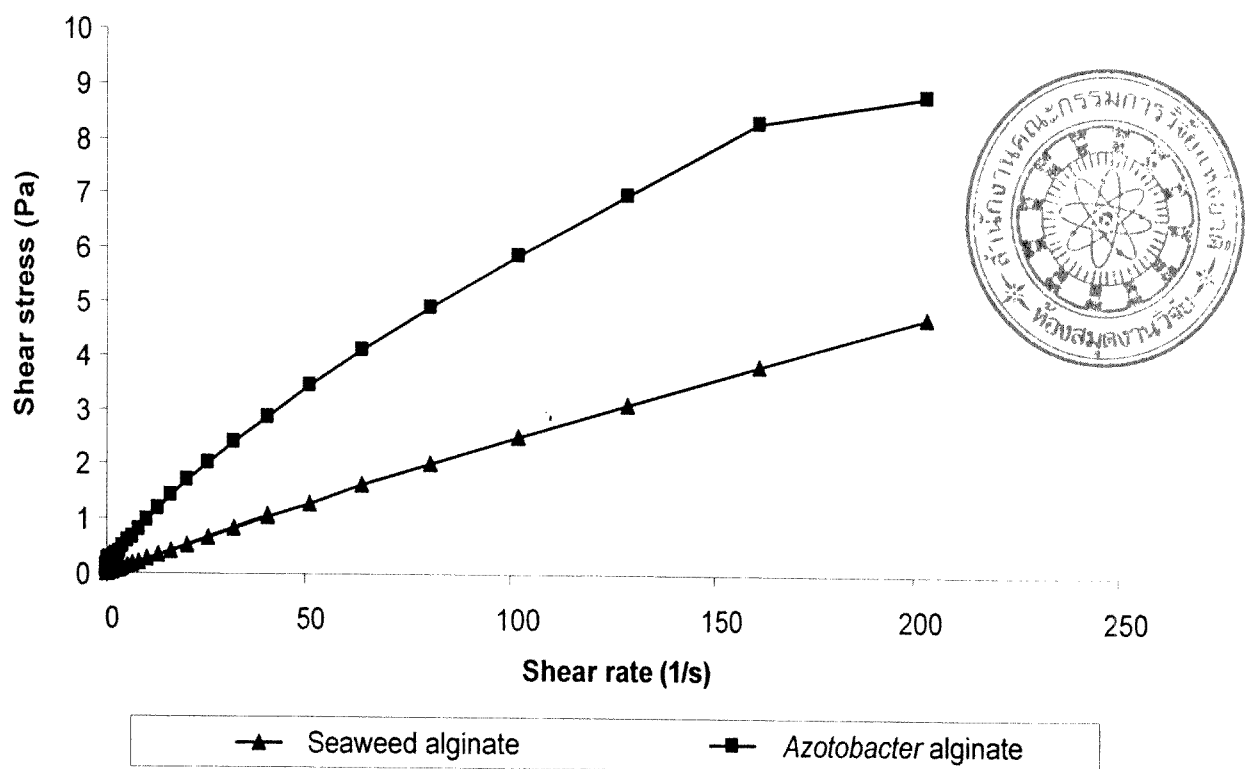


รูปที่ 3.15 กราฟ chromatograms ของน้ำหนักโมเลกุลของ a) pullulan ที่ใช้เป็นมาตรฐาน

b) อัลจินทจาก *Azotobacter vinelandii* และ c) อัลจินทจากสาหร่าย

3.3.3.3 พฤติกรรมของไหลของอัลจิเนท

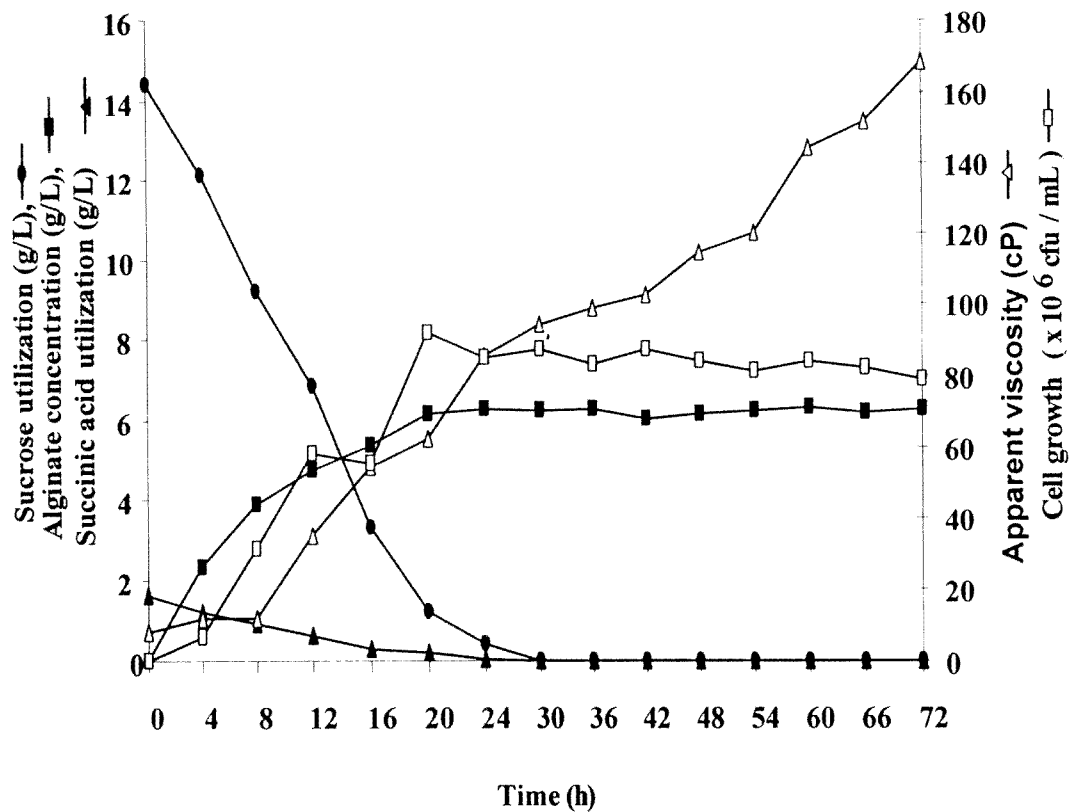
พฤติกรรมของไหลของอัลจิเนทจากสาหร่ายและอัลจิเนทจาก *Azotobacter vinelandii* ทำการทดลองโดยใช้เครื่องวัดแรงเฉือน (rheometer) ซึ่งใช้ din conical concentric cylinder เป็นตัวหมุนที่อุณหภูมิ 25 °ซ และอัตราแรงเฉือน 0-300 1/s รูปที่ 3.16 แสดงพฤติกรรมของไหลของอัลจิเนทจากสาหร่ายและอัลจิเนทจาก *Azotobacter vinelandii* 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

สภาวะที่เหมาะสมของการผลิตอัลจิเนทที่ได้จากการทดลองในระดับฟลัสก์และการหมักในถังหมักขนาด 2 ลิตร เช่น ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น ความเร็วในการกวนและความเข้มข้นของกรดอินทรีย์ถูกนำมาใช้ในการขยายระดับการผลิตอัลจิเนท ผลของค่าความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส ปริมาณการใช้กรดซัคซินิก ความเข้มข้นของอัลจิเนท ความหนืดปรากฏและการเจริญของเชื้อแสดงในรูปที่ 3.17 จากผลการทดลองพบว่าน้ำตาลซูโครสและกรดซัคซินิกถูกใช้หมดไปภายใน 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 การใช้กรดซัคซินิกความหนืดปรากฏและการเจริญของเชื้อ *Azotobacter vinelandii* ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้ปริมาณอาหาร LG 3 ลิตรด้วยน้ำตาลซูโครสและกรดซัคซินิก

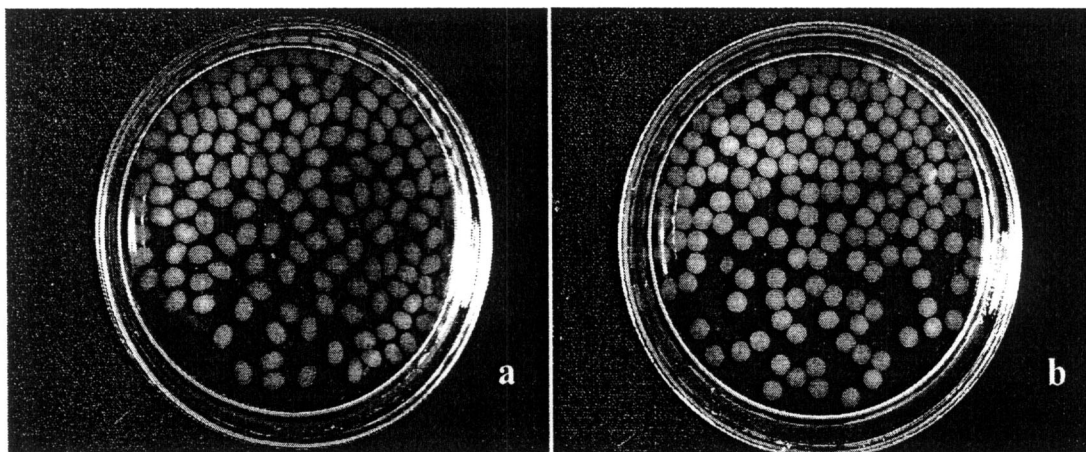
ตารางที่ 3.4 ค่าจลพลศาสตร์ของอัตราการเจริญสูงสุด ผลผลิตอัลจินทสูงสุด การใช้น้ำตาลซูโครส การใช้กรดซัลฟิวริก และค่าความหนืดปรากฏของเชื้อ *Azotobacter vinelandii* ในถังหมักขนาด 2 ลิตรซึ่งไม่ได้เติมกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 0.15% (w/v) ถังหมักขนาด 2 ลิตรซึ่งเติมกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 0.15% (w/v) และถังหมักขนาด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

ค่าจลพลศาสตร์	ถังหมัก		
	2 ลิตร		
	ไม่เติมกรดซัลฟิวริก 0.15% (w/v)	เติมกรดซัลฟิวริก 0.15% (w/v)	เติมกรดซัลฟิวริก 0.15% (w/v)
อัตราการเจริญสูงสุด $\mu_{\max}$ (h ⁻¹)	0.295	0.297	0.221
ผลผลิตอัลจินทสูงสุด Yp/s (g _{alg} /g _{suc})	0.503	0.505	0.397
การใช้น้ำตาลซูโครส (g/L/h)	0.582	0.566	0.514
การใช้กรดซัลฟิวริก (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) เนื่องจากความบริสุทธิ์และน้ำหนักโมเลกุลที่ต่างกัน (รูปที่ 3.18)

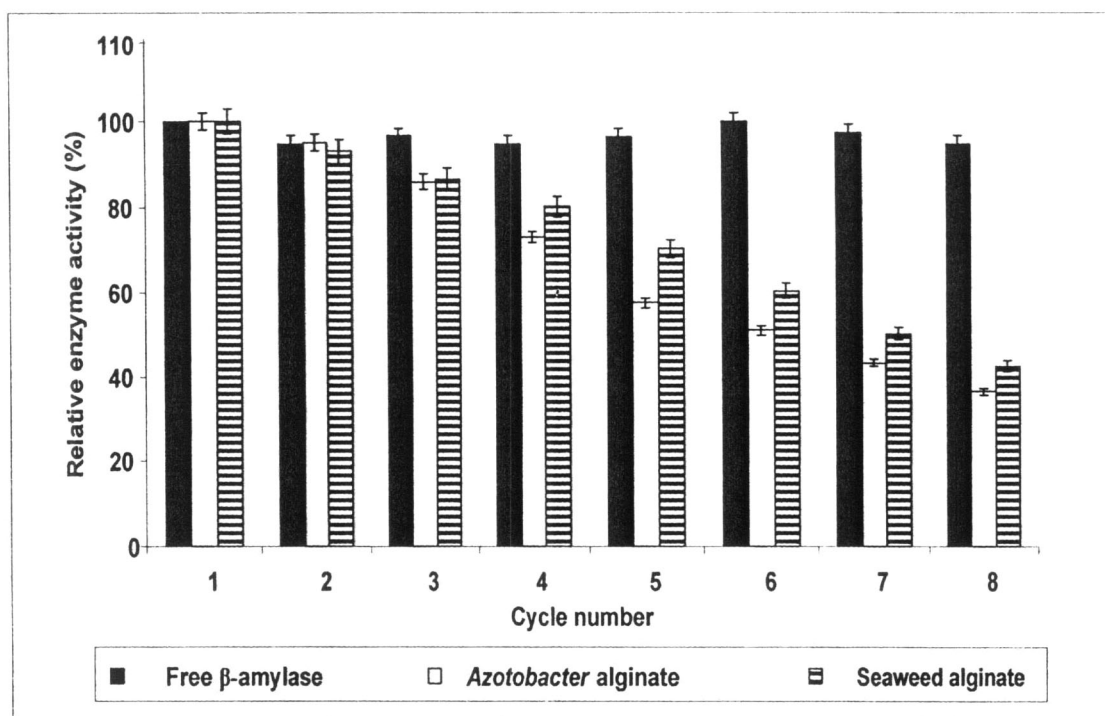


รูปที่ 3.18 เอนไซม์ที่ถูกตรึงในเม็ด bead หลังจากหยดลงในสารละลาย CaCl_2 ความเข้มข้น 2% a) อัลจินทความเข้มข้น 2.5% (w/v) ที่ผลิตโดย *Azotobacter vinelandii* หลังเติมกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 0.15% (w/v) b) อัลจินทจากสาหร่ายความเข้มข้น 2% (w/v)

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 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ความสัมพัทธ์ของกิจกรรมของเอนไซม์เป็นหน้าที่ของจำนวนเอนไซม์อิสระที่นำกลับมาใช้ใหม่ ทั้งในอัลจินทจาก *Azotobacter vinelandii* และจากสาหร่ายที่เคลือบเอนไซม์บีต้าอะไมเลสที่ถูกตรึงแล้วพบว่าประสิทธิภาพในการย่อยสารละลายแป้งลดลงเช่นเดียวจำนวนของการวิเคราะห์ ในเวลา 8 ครั้งของการทดสอบซ้ำกิจกรรมของเอนไซม์อิสระไม่เปลี่ยนแปลงในขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์ที่ถูกตรึงมีค่าลดลงมากกว่า 50% จากการทดสอบในครั้งแรก แนวโน้มของกิจกรรมเอนไซม์บีต้าอะไมเลสที่ถูกตรึงในเม็ด bead ระหว่างอัลจินทจาก *Azotobacter vinelandii* และจากสาหร่ายจะลดลงทั้งคู่และมีค่าแตกต่างกันอยู่เล็กน้อยประมาณ 5-6% ที่ครั้งที่ 8 อย่างไรก็ตามจากการทดลองพบว่าการนำเอนไซม์ที่ถูกตรึงแล้วกลับมาใช้ใหม่ได้จนถึง 8 ครั้งเนื่องจากเอนไซม์หายออกไปจากอัลจินท การรั่ว

ในเม็ด bead สามารถเกิดขึ้นได้ซึ่งเป็นผลมาจากความเข้มข้นอัลจินทเริ่มต้น กลไกการสร้างเม็ด bead และการเข้าในกระบวนการสร้างเม็ด bead (Smidsrod และ Skjak-Braek, 1990) อย่างไรก็ตามความเสถียรของเอนไซม์ที่ถูกตรึงน้อยกว่าเอนไซม์อิสระแต่เอนไซม์ที่ถูกตรึงมีข้อดีมากกว่าเอนไซม์อิสระ เช่น ง่ายต่อการควบคุม สะดวกในการแยกเอนไซม์ ช่วยป้องกันการชะล้างออก ลดความเสี่ยงในการปนเปื้อน(Konsoula และ Kyriakides, 2006; Laca และคณะ., 1998)



รูปที่ 3.19 ความสัมพันธ์ของกิจกรรมเอนไซม์ของการนำเอนไซม์ที่ถูกตรึงด้วยอัลจินทจาก *Azotobacter* sp. และอัลจินทจากสาหร่ายกลับมาใช้ใหม่ใน 8 รอบเปรียบเทียบกับเอนไซม์อิสระ