สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ.....ก
บทคัดย่อภาษาไทย.....ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....ง
สารบัญ.....ฉ
สารบัญตาราง.....ฌ
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
การวัดความเข้มข้นของอัลจิเนท.....9
การหาน้ำหนักโมเลกุล.....10
2.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตอัลจิเนทในระดับฟลาส์ก.....10
แหล่งคาร์บอนและความเข้มข้น.....10
อุณหภูมิ.....10
ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น.....10
แหล่งไนโตรเจน.....11
2.4 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตอัลจิเนทในระดับถังหมัก.....11
ปริมาณออกซิเจน.....11
การกวน.....11

หน้า

2.5 การเพิ่มคุณสมบัติของการผลิตอัลจิเนท....11
การเติมกรดอินทรีย์ในระดับฟลาส์ก....11
กรดอินทรีย์ต่อการผลิตอัลจิเนทในถังหมักขนาด 2 ลิตร....12
2.6 การผลิตอัลจิเนทในถังหมักขนาด 5 ลิตร....12
2.7 การตรึงเอนไซม์บีต้าอะไมเลสโดยใช้อัลจิเนท....12
การตรึงเอนไซม์....12
การประเมินกิจกรรมของเอนไซม์....13
ความสามารถในการนำเอนไซม์กลับมาใช้ใหม่....13
บทที่ 3 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง
3.1 สภาวะของการผลิตอัลจิเนทด้วยเชื้อ *Azotobacter vinelandii* ในระดับฟลาส์ก....14
แหล่งอาหารคาร์บอนและความเข้มข้น....14
อุณหภูมิ....16
ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น....17
แหล่งอาหารไนโตรเจนและความเข้มข้น....18
3.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตอัลจิเนทโดยการหมัก 1.5 ลิตร....20
ความเร็วในการกวน....20
การให้อากาศ....22
3.3 การเพิ่มคุณสมบัติบางประการของการผลิตอัลจิเนทด้วยกรดอินทรีย์....27
แหล่งและความเข้มข้นของกรดอินทรีย์....26
การผลิตอัลจิเนทในถังหมักขนาด 2 ลิตร
โดยใช้อาหาร LG ร่วมกับกรดอินทรีย์....29
ลักษณะของอัลจิเนทที่ผลิตได้จาก *Azotobacter vinelandii*
ลักษณะโครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (SEM)....30
น้ำหนักโมเลกุลของอัลจิเนท....33
พฤติกรรมของไหลของอัลจิเนท....34
3.4 การผลิตอัลจิเนทในถังหมักขนาด 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 ผลผลิตอัลจิเนทที่ผลิตได้สุงสุด น้ำตาลที่ใช้ไปและแรงเค้นเฉือนของ *Azotobacter vinelandii* ในถังหมักขนาด 2 ลิตร (ความเร็วในการกวนแตกต่างกัน) โดยให้อัตราการไหลของอากาศ 2.5 vvm ในอาหาร LG pH 6.8ที่อุณหภูมิ 30°ซ.....22

3.2 ค่าจลพลศาสตร์ของอัตราการเจริญสูงสุด ผลผลิตอัลจิเนทที่ผลิตได้สุงสุด และปริมาณน้ำตาลซูโครสที่ใช้ไปของ *Azotobacter vinelandii* ในถังหมักขนาด 2 ลิตร (การให้อากาศแตกต่างกัน) ที่ความเร็วในการกวน 500 rpm ในอาหาร LG pH 6.8 ที่อุณหภูมิ 30°ซ.....25

3.3 ค่าจลพลศาสตร์ของอัตราการเจริญสูงสุด ผลผลิตอัลจิเนทที่ผลิตได้สุงสุด ปริมาณน้ำตาลซูโครสที่ใช้ไปและความหนืดปรากฏของ *Azotobacter vinelandii* ในถังหมักขนาด 2 ลิตรในอาหาร LG ประกอบไปด้วยกรดซัคซินิกความเข้มข้น 0.15% (w/v) ที่ความเร็วในการกวน 500 rpm การให้อากศ 2.5 vvm pH 6.8 ที่อุณหภูมิ 30°ซ.....30

3.4 ค่าจลพลศาสตร์ของอัตราการเจริญสูงสุด ผลผลิตอัลจิเนทสูงสุด การใช้น้ำตาลซูโครส การใช้กรดซัคซินิก และค่าความหนืดปรากกฏของเชื้อ *Azotobactar vinelandii* ในถังหมักขนาด 2 ลิตรซึ่งไม่ได้เติมกรดซัคซินิกความเข้มข้น 0.15% (w/v) ถังหมักขนาด 2 ลิตรซึ่งเติมกรดซัคซินิกความเข้มข้น 0.15% (w/v) และถังหมักขนาด 5 ลิตรซึ่งเติมกรดซัคซินิกความเข้มข้น 0.15% (w/v) ที่ความเร็ว ในการกวน 500 rpm อัตราการให้อากาศ 2.5 vvm ในอาหาร LG ควบคุม pH 6.8 ที่อุณหภูมิ 30°ซ.....36

สารบัญรูปภาพ

รูป		หน้า
1.1	โครงสร้างของอัลจิเนท (Alginate) ชนิดต่างๆ	3
1.2	กลไกการเกิดเจลของ calcium alginate (Egg-box model)	3
1.3	แสดงโครงสร้างหน่วยย่อยของน้ำตาลประเภท uronic acids 2 ชนิด และการจัดเรียงสายโพลีเมอร์	4
1.4	แสดงแบบแผนการเรียงตัวของโครงสร้างอัลจิเนท	5
3.1	ผลของแหล่งอาหารคาร์บอนต่อการผลิตอัลจิเน่ท (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	14
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	15
3.3	ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตอัลจิเนท (alginate production) ความหนืดปรากฏ (apparent viscosity) และการเจริญของเชื้อ *Azotobacter vinelandii* (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-ด่างเริ่มต้นต่อการผลิตอัลจิเนท (alginate production) ความหนืดปรากฏ (apparent viscosity) และการเจริญของเชื้อ *Azotobacter vinelandii* (cell growth) ในอาหาร LG โดยใช้น้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 1% (w/v) เติมหัวเชื้อที่ 1% ควบคุมอุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 72 ชม. โดยทำการเขย่าที่ 200 rpm	17
3.5	ผลของแหล่งอาหารไนโตรเจนชนิดต่างๆที่มีผลต่อการผลิตอัลจิเนท (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	19

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูป **หน้า**

3.6 การเปลี่ยนแปลงของการใช้น้ำตาล ความเข้มข้นของอัลจิเนทที่ผลิตได้ 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 เติมหัวเชื้อ 10% ควบคุมค่า pH เริ่มต้นที่ 6.8 อุณหภูมิ 30 °ซ 21

3.7 ผลของอัตราการให้อากาศต่อการใช้น้ำตาลซูโครส ความเข้มข้นของอัลจิเนท ความหนืดปรากฏและการเจริญของเซลล์ *Azotobacter vinelandii* ในอาหาร LG ในถังหมักขนาด 2 ลิตร เติมหัวเชื้อ 10% ควบคุมค่า pH เริ่มต้นที่ 6.8 อุณหภูมิ 30 °ซ อัตราการให้อากาศแตกต่างกันตั้งแต่ 0-5 vvm; (a) 0 vvm, (b) 2.5 vvm, and (c) 5 vvm 24

3.8 ผลของกรดอินทรีย์ที่มีต่อการผลิตอัลจิเนท การเจริญของเซลล์แบคทีเรียและความหนืดปรากฏของการผลิตอัลจิเนทในอาหาร LG โดยใช้น้ำตาลซูโครส 1% (w/v) เป็นแหล่งอาหารคาร์บอน เติมหัวเชื้อ 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) การผลิตอัลจิเนทในอาหาร LG โดยใช้น้ำตาลซูโครส 1% (w/v) เป็นแหล่งอาหารคาร์บอนเติมหัวเชื้อ 1% ปรับค่า pH ที่ 6.8 อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 72 ชม 28

3.10 การเปลี่ยนแปลงของการใช้น้ำตาล ความเข้มข้นของอัลจิเนท ความหนืดปรากฏในอาหาร LG ที่ประกอบไปด้วยน้ำตาลซูโครสและกรดซัคซินิกความเข้มข้น 0.15% (w/v) เป็นแหล่งอาหารคาร์บอนที่อัตราการให้อากาศ 5 vvm เติมหัวเชื้อ 10 % ค่า pH ที่ 6.8 อุณหภูมิ 30 °ซ 29

3.11 ลักษณะโครงสร้างของ *Azotobacter vinelandii* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (SEM) ที่กำลังขยาย 12,000 เท่า 31

3.12 ลักษณะโครงสร้างของ *Azotobacter vinelandii* และอัลจิเนทในอาหาร LG ที่ประกอบไปด้วยกรดซัคซินิกความเข้มข้น 0.15% (w/v) ที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 3 วัน (Scale bars = 1μm) 31

3.13 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของเชื้อ *Azotobacter vinelandii* ที่มีการสร้างอัลจิเนทในอาหาร LG ประกอบไปด้วยกรดซัคซินิกความเข้มข้น 0.15% (w/v) ที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 3 วัน 32

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูป **หน้า**

3.14 ลักษณะทางโครงสร้างของอัลจิเนทภายใต้กล้อง SEM a) อัลจิเนทแห้งที่ได้จาก *Azotobacter vinelandii* โดยใช้อาหาร LG ประกอบไปด้วยกรดซัคซินิกความเข้มข้น 0.15% (w/v) b) อัลจิเนทจากสาหร่าย....32

3.15 กราฟ chromatograms ของน้ำหนักโมเลกุลของ a) pullulan ที่ใช้เป็นมาตรฐาน b) อัลจิเนทจาก *Azotobacter vinelandii* และ c) อัลจิเนทจากสาหร่าย....33

3.16 ค่าความหนืดปรากฏของสาหร่ายจากอัลจิเนทและอัลจิเนทจาก *Azotobacter vinelandii* ที่อัตราเฉือนแตกต่างกัน....34

3.17 การเปลี่ยนแปลงของการใช้น้ำตาลซูโครส การผลิตอัลจิเนท การใช้กรดซัคซินิก ความหนืดปรากฏและการเจริญของเชื้อ *Azotobacter vinelandii* ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้ปริมาตรอาหาร LG 3 ลิตรด้วยน้ำตาลซูโครสและกรดซัคซินิก....35

3.18 เอนไซม์ที่ถูกตรึงในเม็ด bead หลังจากหยดลงในสารละลาย $CaCl_2$ ความเข้มข้น 2% a) อัลจิเนทความเข้มข้น 2.5% (w/v) ที่ผลิตโดย *Azotobactar vinelandii* หลังเติมกรดซัคซินิกความเข้มข้น 0.15% (w/v) b) อัลจิเนทจากสาหร่ายความเข้มข้น 2% (w/v)....37

3.19 ความสัมพันธ์ของกิจกรรมเอนไซม์ของการนำเอนไซม์ที่ถูกตรึงด้วยอัลจิเนทจาก *Azotobactar vinelandii* และอัลจิเนทจากสาหร่ายกลับมาใช้ใหม่ใน 8 รอบเปรียบเทียบกับเอนไซม์อิสระ....38