อัญญาณี พรหมปภากร : การผลิตอัลจิเนทโดยเชื้อ *AZOTOBACTER* SP. และการประยุกต์ใช้ในการตรึงเอนไซม์ (ALGINATE PRODUCTION BY *AZOTOBACTER* SP. AND ITS APPLICATION IN ENZYME IMMOBILIZATION) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.โชคชัย วนภู, 104 หน้า

อัลจิเนทสามารถสกัดได้จากผนังเซลล์ของสาหร่ายทะเลสีน้ำตาลแต่ปริมาณการลดลงของสาหร่ายและความกังวลทางด้านความปลอดภัยในการสกัดที่ทำให้เกิดการสะสมของโลหะหนักจากสารเคมีที่ทำให้น้ำทะเลเป็นพิษ รวมไปถึงราคาที่สูงในกระบวนการสกัดรวมไปถึง การทำให้บริสุทธิ์ เป็นเหตุผลหลักที่ทำให้เกิดความสนใจที่จะหันมาผลิตอัลจิเนทจากเชื้อแบคทีเรียแทน อัลจิเนทจากเชื้อ *Azotobacter* sp.จึงกลายเป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย เพราะปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม ไม่เป็นเชื้อแบคทีเรียก่อโรค และมีโครงสร้างคล้ายกับอัลจิเนทที่ผลิตได้จากสาหร่าย วัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้ เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตอัลจิเนทและประยุกต์ในการตรึงเอนไซม์บีต้าอะไมเลส ในการดำเนินงานครั้งนี้จะทำการศึกษาหาแหล่งคาร์บอน ค่าพีเอช แหล่งไนโตรเจน และอุณหภูมิที่เหมาะสมในอาหาร LG medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในการทดลองระดับฟลาสก์พบว่า *Azotobacter* sp. จะให้ปริมาณการผลิตอัลจิเนทสูงที่สุดประมาณ 5-6 กรัมต่อลิตร ที่ค่าพีเอช 6.5-7 เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียล น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน ความเข้มข้น 1% โดยปริมาตรและไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจนลงไปใน LG medium จากนั้นศึกษาการผลิตอัลจิเนทในถังหมักขนาด 2 ลิตรที่มีปริมาตรอาหาร 1.5 ลิตร โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตอัลจิเนทที่ได้จากการศึกษาในขั้นต้นเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของอัตราการให้อากาศและความเร็วของใบกวน โดยพบว่าอัลจิเนทที่ผลิตได้กับการเจริญของเซลล์จะมีความสัมพันธ์ที่เกี่ยวข้องกัน การเจริญของเซลล์และการผลิตอัลจิเนทจะให้ค่าสูงที่สุดที่ความเร็วรอบของใบกวนเป็น 500 รอบต่อนาที ที่อัตราการให้อากาศ 2.5 ปริมาตรของอากาศต่อปริมาตรของน้ำหมักต่อนาที ใน LG medium (μ = 0.295 ต่อชั่วโมงและY_{ps} of 0.503 กรัมของอัลจิเนทต่อกรัมของน้ำตาลซูโครส) ภายใน 24 ชั่วโมงแรกและจะมีค่าลดลงอย่างช้าๆ และความหนืดของอัลจิเนทที่ผลิตได้จะมีค่าเพิ่มขึ้นตามเวลา ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอัลจิเนทที่ผลิตได้ค่าพฤติกรรมของของไหลเป็นแบบนันนิวโตเนียนเนื่องจากความหนืดเพิ่มขึ้น(จาก77.52 เซนติพอยต์ ถึง 252.5 เซนติพอยต์) เมื่ออัตราเฉือนเพิ่มขึ้น (1.29 ถึง 24.81 เซนติพอยต์ต่อนาที)

กรดอินทรีย์ทั้ง 9 ชนิด เช่น กรดซัลซินิก กรดฟูมาริก กรดโพพิโอนิก กรดไฟติก กรดมาลิก กรดอะดิปิก กรดอะมิโนเบนโซอิก กรดแลคติก และกรดทาร์ทาริกจะถูกนำมาใช้ในการเพิ่มประสิทธิภาพของอัลจิเนทที่ผลิตได้ พบว่าความหนืดของอัลจิเนทที่ผลิตได้ในถังหมักขนาด 2 ลิตรเพิ่มขึ้น เมื่อเติมกรดซัลซินิก ความเข้มข้น 0.15% โดยปริมาตร (ความหนืด = 432.52 เซนติพอยต์,

μ = 0.297 ต่อชั่วโมง, Y_{ps} = 0.505 กรัมของอัลจิเนทต่อกรัมของน้ำตาลซูโครส) ลงไป นอกจากนี้ได้พัฒนาการผลิตอัลจิเนท จาก *Azotobacter* sp.ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ซึ่งพบว่าอัลจิเนทที่ผลิตได้มีค่าน้อยกว่าในถังหมักขนาด 2 ลิตร ประมาณ 2.5 เท่า (ความหนืด = 168.78 เซนติพอยต์, μ = 0.221 ต่อชั่วโมง, Y_{ps} = 0.397 กรัมของอัลจิเนทต่อกรัมของน้ำตาลซูโครส) ดังนั้นในการผลิตเชิงอุตสาหกรรมเพื่อให้ได้ปริมาณมาก จึงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม ลักษณะสัณฐานวิทยาของอัลจิเนทและเชื้อ *Azotobacter* sp. ถูกศึกษาภายใต้กล้อง SEM พบว่าเซลล์มีรูปร่างเป็นแท่งขนาดประมาณ 1 ไมโครเมตร และอัลจิเนทที่ถูกนำไปละลายและทำการอบแห้งที่ได้จาก *Azotobacter* sp และอัลจิเนทที่ผลิตได้จากสาหร่ายนั้นจะมีลักษณะเป็นโครงร่างตาข่ายเหมือนกัน น้ำหนักโมเลกุลของอัลจิเนทที่ผลิตได้จาก *Azotobacter* sp. และ สาหร่ายนั้นจะถูกวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC พบว่าขนาดน้ำหนักโมเลกุลของอัลจิเนททั้งสองแหล่งที่มาเป็น 2.87 x 10^3 and 2.88 x 10^3 Da ตามลำดับ อัลจิเนททั้งสองแหล่งที่มาจะถูกนำมาใช้ในการตรึงเอนไซม์บีต้าอะไมเลสเพื่อเปรียบเทียบกับการใช้บีต้าอะไมเลสแบบไม่ถูกตรึงในอัลจิเนท พบว่าประสิทธิภาพในการนำกลับมาใช้ใหม่ของบีต้าอะไมเลสที่ถูกตรึงในอัลจิเนทในการย่อยแป้งนั้นจะลดลงจาก 36.4 และ 42.4 ตามในรอบที่ 8 ลำดับ ขณะที่บีต้าอะไมเลสที่ไม่ถูกตรึงในอัลจิเนทนั้นจะมีประสิทธิภาพในการย่อยแป้งค่อนข้างคงที่เนื่องมาจากบีต้าอะไมเลสบางส่วนที่ถูกตรึงไว้หลุดหายออกไปจากอัลจิเนท

ผลการวิจัยในครั้งนี้พบว่า อัลจิเนทสามารถผลิตได้จากแบคทีเรียและมีคุณภาพทัดเทียมกับที่ผลิตจากสาหร่าย แต่การผลิตเชิงพาณิชย์ เพื่อให้ได้ปริมาณมากจึงจำเป็นจะต้องวิจัยการเพิ่มกำลังการผลิตเพิ่มเติม

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนักศึกษา _____

ปีการศึกษา 2551 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา _____

ANYANEE PROMPAPHAGORN : ALGINATE PRODUCTION BY *AZOTOBACTER* SP. AND ITS APPLICATION IN EMZYME IMMOBILIZATION. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. CHOKCHAI WANAPU, Ph.D., 104 PP.

ALGINATE PRODUCTION/ *AZOTOBACTER* SP.

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* sp. may become a major commercial product because of environmental 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* sp. 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 (μ

= 0.295 h^{-1}, Y_{ps} = 0.503 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 24.81cP·s^{-1}).

Nine organic acids such as succinic acid, fumaric acid, propionic acid, phytic acid, malic acid, adipic acid, 4-aminobenzoic acid, lactic acid and tartaric acid were used in increasing the efficiency of alginate. Visocosity of alginate produced in 2L fermenter was increased after adding 0.15% w/v of succinic acid (viscosity = 432.52 cP, μ = 0.297 h^{-1}, Y_{ps} = 0.505 g of alginate/g of sucrose). The alginate production from *Azotobacter* sp. 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, μ = 0.221 h^{-1}, Y_{ps} = 0.397 g of alginate/g of sucrose). The morphological characteristic of *Azotobacter* sp. and alginate were studied under SEM. The morphology of *Azotobacter* sp. cells had a rod shape with the size of about 1 μm. Dry form of both alginate from *Azotobacter* sp. and algae alginate had the same crosslinked-structure. The Molecular weights (MW) of alginate from *Azotobacter* sp. and algae were 2.87 x 10^3 and 2.88 x 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 8^{th} cycle while β-amylase enzyme would hydrolyze starch constantly due to the fact that some parts of the mobilized 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.

School of Biotechnology

Academic Year 2008

Student's Signature อัญญาณี พ่วงมงกาล

Advisor's Signature