

รายงานฉบับสมบูรณ์
การย่อยสลายพอลิแล็กไทด์ด้วยกระบวนการทางชีวภาพโดยแบคทีเรียชอบร้อน
เพื่อนำกลับมาใช้ใหม่

ภายใต้แผนงานวิจัยเรื่อง "การศึกษาเอนไซม์ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพโดยเชื้อแบคทีเรียชอบร้อน"

โดย
สุชมาภรณ์ สุขชุม

บทคัดย่อ

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายพอลิแลคไทด์นั้นยังไม่มีการรายงานมาก่อนหน้านี้ โดยปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการย่อยสลาย PLA โดยใช้เอนไซม์จากเชื้อ *Actinomadura keratinilytica* strain T16-1 คือ อุณหภูมิ ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา และปริมาณของเอนไซม์ ซึ่งวิธีการพื้นผิวตอบสนอง (Response surface method) โดยใช้หลักการคือวิธี central composite design สามารถนำมาใช้ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลาย PLA ได้ ซึ่งจากงานวิจัยนี้พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลาย PLA โดยใช้เอนไซม์คือ อุณหภูมิ 70 °C ระยะเวลาในการบ่มคือ 44 ชั่วโมง และปริมาณเอนไซม์ 100 mg/l ทำให้การย่อยสลาย PLA เกิดขึ้นได้ดีที่สุดโดยมีค่าทำนายปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นซึ่งก็คือปริมาณกรดแลคติก เป็น 721 mg/l ในขณะที่เมื่อทำการทดลองจริงพบว่าได้ปริมาณกรดแลคติก 750 mg/l ซึ่งสูงกว่าปริมาณกรดแลคติกที่ได้จากการทำนายโดยสมการทางสถิติถึง 4.1% ดังนั้นจะเห็นได้ว่าสภาวะที่เหมาะสมจากงานวิจัยนี้สามารถผลิตกรดแลคติกได้จากการย่อยสลาย PLA และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการนำขยะที่เป็นพลาสติกชนิด PLA กลับมาใช้ใหม่ได้อีกครั้งเพื่อเป็นการลดปัญหาสิ่งแวดล้อมของโลกได้ในอนาคต

Abstract

The study of optimal Poly(L-lactide) degradation condition have not been reported so far. The important factors such as temperature, incubation time and enzyme concentration affecting PLA degradation by using the enzyme from *Actinomadura keratinilytica* strain T16-1 were determined. The response surface methodology (RSM) was used to optimize the degradation condition by implementing the central composite design. The optimal condition for enzymatically degradation of PLA were temperature at 70°C, incubation time for 44h and enzyme concentration of 100 mg/l. Under this condition, the model predicted a degradation product (lactic acid) of 721 mg/l. Verification of the optimization showed 750 mg/l lactic acid which higher than predicted one about 4.1%. In summary, the optimized condition could be applied to recycle of plastic wastes especially PLA for decreasing the global environmental problem in the future.

ประกาศคุณูปการ

งานวิจัยนี้เสร็จสิ้นสมบูรณ์ได้ด้วยความอนุเคราะห์จากที่ปรึกษาโครงการวิจัย รองศาสตราจารย์ ดร. วิเชียร กิจปรีชาวนิช ที่ให้คำแนะนำและอำนวยความสะดวกในการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณกรดแลกติกด้วย เครื่อง HPLC รวมทั้งการวิเคราะห์หาปริมาณ oligomer ด้วยเครื่อง TOC ตลอดจนงานวิจัยครั้งนี้ นอกจากนี้นงานจะ สำเร็จลุล่วงไปไม่ได้หากไม่ได้รับความร่วมมือจากนิสิตปริญญาตรี สาขาจุลชีววิทยา และปริญญาโท สาขา การศึกษามหาบัณฑิต โดยงานวิจัยนี้ได้รับเงินสนับสนุนจากเงินรายได้ของคณะวิทยาศาสตร์ในปี 2554 ทำให้ สามารถผลิตผลงานวิจัยได้สำเร็จไปได้ด้วยดี



บัญชีภาพประกอบ

ภาพ	หน้า
1 แนวความคิดในการนำ PLA กลับมาใช้ใหม่	13
2 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณกรดแลกติกและ lactide oligomer ที่ผลิตได้ระหว่าง.....	19
กระบวนการย่อยสลาย PLA powder โดยใช้เอนไซม์ย่อยสลาย PLA จากเชื้อ <i>A.keratinilytica</i> ที่อุณหภูมิ 60°C โดยปริมาณของ PLA powder 0 mg/l (A), 2000 mg/l (B), 4000 mg/l ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ 55 U/ml	
3 ภาพพื้นผิวตอบสนอง (response surface plot) และคอนทัวร์ พล็อตของผลอุณหภูมิ.....	24
และปริมาณเอนไซม์ ต่อการย่อยสลาย PLA เป็นกรดแลกติก	

สารบัญ

บทที่

หน้า

1	บทนำ	
	ภูมิหลัง	7
2	เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	10
3	วิธีดำเนินการวิจัย	14
	การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายพลาสติกชนิด PLA.....	14
	การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์และการหาปริมาณโปรตีน.....	14
	การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยสลาย PLA โดยใช้การออกแบบการทดลองทางสถิติ.....	15
	การศึกษาผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลาย PLA.....	15
4	ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	19
	การศึกษาปริมาณ PLA ที่เหมาะสมในการย่อยสลายด้วยเอนไซม์จากเชื้อ <i>A. keratinilytica</i>	19
	ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมโดยวิธีพื้นผิวตอบสนอง.....	20
	การวิเคราะห์การถดถอย (Regression analysis)	21
	การหาจุดที่เหมาะสมของตัวแปรที่ศึกษาต่อการย่อยสลาย PLA เป็นกรดแลคติก.....	24
5	สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	25

บัญชีตาราง

ตาราง

หน้า

1	แสดงเชื้อจุลินทรีย์ ชนิดของเอนไซม์ และวิธีการวัดการย่อยสลายพอลิแลกไทด์.....	10
2	แสดงปัจจัยค่าของแต่ละระดับที่ใช้ในการออกแบบการทดลองตามวิธี.....	16
	Central composite design	
3	แบบการทดลองในการย่อยสลาย PLA ด้วยเอนไซม์จากเชื้อสายพันธุ์ T16-1.....	17
	โดยใช้วิธี Central composite design	
4	การออกแบบการทดลองแบบ Central composite design และผลของปริมาณ.....	20
	กรดแลกติก เมื่อปัจจัยที่ศึกษา 3 ปัจจัย คือ อุณหภูมิ เวลา และปริมาณเอนไซม์	
5	การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของการวิเคราะห์การถดถอยเชิงพหุคูณ.....	21
6	ค่าการวิเคราะห์สัมประสิทธิ์ของสมการการถดถอยและค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ.....	22

บทที่ 1

บทนำ

ในปัจจุบันอัตราการเกิดของจำนวนประชากรมนุษย์ มีเพิ่มมากขึ้น ประกอบกับวิวัฒนาการความก้าวหน้าของเทคโนโลยี พัฒนาการอย่างรวดเร็ว ส่งผลให้ความต้องการวัตถุดิบเพื่อมาใช้เป็นปัจจัยในการดำรงชีวิตเพิ่มปริมาณที่สูงขึ้น ซึ่งก่อให้เกิดปัญหาที่ตามมา คือ ปัญหาด้านสิ่งแวดล้อม อันเนื่องมาจาก มลพิษทางขยะ และหนึ่งในสาเหตุที่สำคัญนั้นคือ ขยะพลาสติก พลาสติก เป็นขยะที่ ย่อยสลายตามธรรมชาติได้ยาก ซึ่งก่อให้เกิดการสะสมของพลาสติกที่ใช้แล้วและเหลือใช้อยู่เป็นจำนวนมาก อีกทั้ง ยังก่อให้เกิดปัญหาในด้านการกำจัดพลาสติกรวมถึงปัญหาทางด้านสิ่งแวดล้อม เนื่องจากวิธีการกำจัดด้วยวิธีการต่างๆ ไม่ว่าจะเป็น การเผาทำลาย โดยจะเกิดก๊าซพิษ ซึ่งจะลอยขึ้นสู่ชั้นบรรยากาศของโลก ทำให้เกิดการสะสมของพลังงานความร้อนบนผิวโลก และในชั้นบรรยากาศเพิ่มขึ้น ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของชั้นบรรยากาศของโลกเกิดอย่างรวดเร็ว และเป็นสาเหตุหนึ่งของการเกิดภาวะโลกร้อน (global warming) นอกจากนี้ การปล่อยทิ้งตามพื้นดินรวมถึงกระบวนการในการผลิตพลาสติก ล้วนก่อให้เกิดปัญหาตามมา เช่น ขยะพลาสติกทำให้เกิดภาวะโลกร้อน เนื่องจากเกิดการปล่อยก๊าซเรือนกระจก (greenhouse gases) เช่น ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นเป็นจำนวนมาก เป็นต้น พลาสติกที่ใช้ในชีวิตประจำวันส่วนใหญ่เป็นพลาสติกสังเคราะห์จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี เป็นพลาสติกที่มีโครงสร้างทางเคมีที่ซับซ้อน โดยพลาสติกเหล่านี้ไม่สามารถย่อยสลายได้ภายในเวลาอันรวดเร็ว เนื่องจาก จุลินทรีย์ส่วนใหญ่ตามธรรมชาติไม่สามารถสร้างเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายได้ ดังนั้น จึงทำให้เกิดการสะสมของพลาสติกขึ้นในสิ่งแวดล้อม ปัจจุบันจึงนักวิทยาศาสตร์ได้มีการคิดค้นพลาสติกชนิดใหม่ขึ้นเพื่อใช้ทดแทนพลาสติกเดิม พลาสติกชีวภาพ (bioplastics) ซึ่งเป็นพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการพัฒนาเป็นวัสดุสำหรับใช้งานเพื่ออนุรักษ์สิ่งแวดล้อม ทั้งด้านวัตถุดิบ กระบวนการผลิต และกระบวนการทำลาย พลาสติกชีวภาพจึงเป็นที่สนใจของนักวิทยาศาสตร์ตลอดจนนักอุตสาหกรรมทั่วโลก

พลาสติกชีวภาพเป็นพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ (biodegradable plastics) ชนิดหนึ่งซึ่งจะมีการย่อยสลายโดย จุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติ เช่น แบคทีเรีย รา และแอคติโนมัยซีท โดยจุลินทรีย์จะสร้างเอนไซม์ และปล่อยสู่ภายนอกเซลล์ เพื่อทำการย่อย เมื่อถูกย่อยสลายหมดจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นมวลชีวภาพ (biomass) น้ำ ก๊าซมีเทน และ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ผลิตภัณฑ์เหล่านี้บางชนิดถูกนำไปใช้เป็นแหล่งสารอาหาร เพื่อใช้ในการกระบวนการเจริญเติบโต และการดำรงชีวิตของ จุลินทรีย์ และ พืช โดยไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ซึ่งพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ มีหลายชนิด ได้แก่ poly-L-lactide (PLA), poly- β -hydroxybutyrate (PHB) และ polycaprolactone (PCL) เป็นต้น ดังนั้นพลาสติกชีวภาพจึงสามารถนำมาใช้ประโยชน์ และมีคุณสมบัติในการนำมาใช้งานได้เทียบเท่ากับพลาสติกสังเคราะห์จากปิโตรเลียม แต่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ในปัจจุบันนี้ ในหลายประเทศได้มีการพัฒนาการวิจัย และพัฒนาอุตสาหกรรมการสร้างพลาสติกชีวภาพ เพื่อเร่งให้เกิดการทดแทนพลาสติกทั่วไป โดยปัจจุบันได้ เริ่มมีการนำมาใช้กันมากขึ้น และมีการศึกษาเพื่อที่จะลดต้นทุนในการผลิตให้ถูกลง นอกจากนี้ยังมีการศึกษาและวิจัยกระบวนการย่อยสลายของพลาสติกชีวภาพโดยจุลินทรีย์ ยังได้รับความสนใจจากนักวิทยาศาสตร์ เพื่อศึกษาหาสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่สามารถเกิดกระบวนการย่อยสลายของพลาสติกชีวภาพ ศึกษาสถานะในกระบวนการย่อยสลายของพลาสติกชีวภาพ ศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการย่อยสลายของพลาสติกชีวภาพ รวมถึง ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุดในการย่อยสลายของพลาสติกชีวภาพ

Poly(L-lactide) หรือ PLA เป็นพอลิเอสเทอร์สายตรง มีหน่วยย่อยเป็น L-lactic acid ซึ่งสามารถผลิตจากกระบวนการหมักผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร เช่น มันสำปะหลัง ข้าว ข้าวโพด แป้ง (Miura *et al.*, 2004) โดยใช้กระบวนการหมักจากเชื้อจุลินทรีย์ พลาสติกชนิดนี้มีรายงานว่าถูกย่อยสลายได้ด้วยเชื้อจุลินทรีย์หลากหลายชนิด เช่น *Bacillus brevis*, *B. stearothermophilus*, *B. licheniformis*, *Geobacillus thermocatenulatus*, *Micromonospora echinospora*, *M. viridifaciens*, *Nonomureae terrinata*, *N. fastidiosa*, *Laceyella sacchari*, *Thermoactinomyces vulgaris* และ *Actinomadura keratinilytica* (Tomita *et al.*, 1999, 2003, 2004; Sukkhum *et al.*, 2009a) เชื้อแอคติโนมัยซีทชอบร้อนในจีนัส *Actinomadura keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1 เป็นสายพันธุ์ที่มีรายงานว่า สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLA ได้สูง ซึ่งในระดับพลาสติกสามารถผลิตเอนไซม์ได้ 44.6 U/ml ในขณะที่ในระดับถังหมักแบบอากาศลอยตัว ผลิตเอนไซม์ได้ 150 U/ml (Sukkhum *et al.*, 2009b)

จากงานวิจัยจะเห็นได้ว่า จุลินทรีย์มีความสามารถในการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพได้หลายชนิดซึ่งมีทั้งแบคทีเรีย และเชื้อรา แต่การศึกษาการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพจากแบคทีเรียในกลุ่มแอคติโนมัยซีท (actinomycetes) รวมทั้งการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการนำเอนไซม์มาใช้ในการย่อยสลาย PLA ยังมีการศึกษาไม่แพร่หลายนัก ดังนั้นจึงเกิดความสนใจในการศึกษาการผลิตเอนไซม์ของเชื้อกลุ่มนี้ ซึ่งเอนไซม์ที่ได้ อาจเกิดประโยชน์ในการนำไปพัฒนาและ ประยุกต์ใช้ได้ในระดับอุตสาหกรรม นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์ ที่เกิดจากการบวกร่อยสลายอาจนำมาผ่านกระบวนการ polymerization เพื่อให้ได้เป็นพลาสติกอีกครั้งหนึ่ง (recycle) เพื่อกลับมาใช้ใหม่ได้ อีกด้วย



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Poly(L-lactide) หรือ PLA เป็นพอลิเอสเทอร์สายตรง มีหน่วยย่อยเป็น L-lactic acid ซึ่งสามารถผลิตจากกระบวนการหมักผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร เช่น มันสำปะหลัง ข้าว ข้าวโพด แป้ง (Miura *et al.*, 2004) โดยใช้กระบวนการหมักจากเชื้อจุลินทรีย์ พลาสติกชนิดนี้มีรายงานว่าถูกย่อยสลายได้ด้วยเชื้อจุลินทรีย์หลากหลายชนิด เช่น *Bacillus brevis*, *B. stearothermophilus*, *B. licheniformis*, *Geobacillus thermocatenulatus*, *Micromonospora echinospora*, *M. viridifaciens*, *Nonomurea terrinata*, *N. fastidiosa*, *Laceyella sacchari*, *Thermoactinomyces vulgaris* และ *Actinomadura keratinolytica* (Tomita *et al.*, 1999, 2003, 2004; Sukkhum *et al.*, 2009a) เชื้อแอคติโนมัยซีทชอบร้อนในจีนัส *Actinomadura keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1 เป็นสายพันธุ์ที่มีรายงานว่า สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLA ได้สูง ซึ่งในระดับฟอสฟอรัสสามารถผลิตเอนไซม์ได้ 44.6 U/ml ในขณะที่ในระดับถึงหมักแบบอากาศลอยตัว ผลิตเอนไซม์ได้ 150 U/ml (Sukkhum *et al.*, 2009b)

ตารางที่ 1 แสดงเชื้อจุลินทรีย์ ชนิดของเอนไซม์ และวิธีการวัดการย่อยสลายพอลิแลกไทด์

Strain	Type of enzyme	Detection method	Reference
		PLA degradation	
<i>Amycolatopsis</i> sp. Strain HT 32	Protease	Film-weight loss; monomer production	Pranamuda <i>et al.</i> , 1997
<i>Amycolatopsis</i> sp. Strain 3118	Protease	Film-weight loss; monomer production	Ikura and Kudo, 1999
<i>Amycolatopsis</i> sp. Strain KT-s-9	Protease	Clear zone method	Tokiwa <i>et al.</i> , 1999
<i>Amycolatopsis</i> sp. Strain 41	Protease	Film-weight loss; monomer production	Pranamuda <i>et al.</i> , 2001
<i>Amycolatopsis</i> sp. Strain K104-1	Protease	Turbidity method	Nakamura <i>et al.</i> , 2001
<i>Lentzea waywayandensis</i>	Protease	Film-weight loss; monomer production	Jararat <i>et al.</i> , 2003

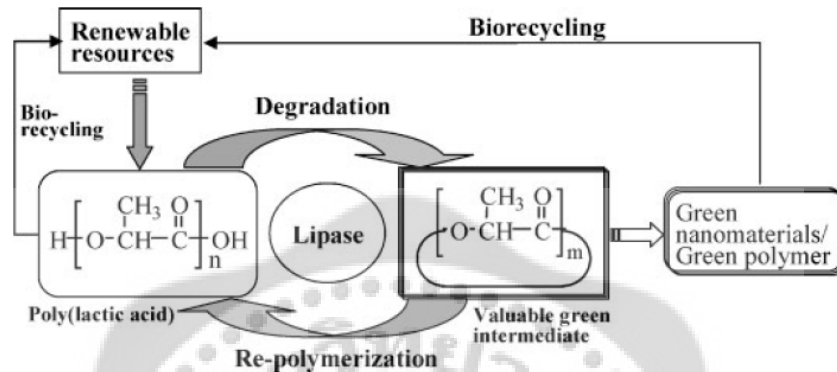
<i>Kibdelosporangium aridum</i>	Protease	Film-weight loss; Jarerat <i>et al.</i> , 2003	monomer production
<i>Tritirachium album</i> ATCC 22563	Protease	Film-weight loss; Jarerat and Tokiwa, 2001	monomer production
<i>Brevibacillus</i>	Protease	Change in molecular production and viscosity	Tomita <i>et al.</i> , 1999
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Protease	Change in molecular production and viscosity	Tomita <i>et al.</i> , 2003
<i>Bacillus smithii</i> strain PL 21	Lipase	Change in molecular production and viscosity	Tomita <i>et al.</i> , 2004
<i>Bacillus licheniformis</i> PLLA-2	-	Biodegradation test	Kim <i>et al.</i> , 2007
<i>Paenibacillus amylolyticus</i> strain TB-13	Lipase	Turbidity method	Shigeno <i>et al.</i> , 2003
<i>Bacillus clausii</i> strain pLA-M4	Lipase	Molecular technique	Mayumi <i>et al.</i> , 2008
<i>Bacillus cereus</i> pLA-M7	Lipase	Molecular technique	Mayumi <i>et al.</i> , 2008
<i>Treponema denticola</i> pLA-M9	Hydrolase	Molecular technique	Mayumi <i>et al.</i> , 2008
<i>Paecilomyces</i>	-	Molecular technique	Sangwan and Wu, 2008
<i>Thermomonospora</i>	-	Molecular technique	Sangwan and Wu, 2008
<i>Thermopolyspora</i>	-	Molecular technique	Sangwan and Wu, 2008
<i>Actinomadura keratinilytica</i> T16-1	Protease	Turbidity method	Sukkhum <i>et al.</i> , 2009ab

จากตารางที่ 1 แสดงเชื้อจุลินทรีย์ที่มีรายงานว่าสามารถย่อยสลาย PLA ได้ ซึ่งใช้วิธีการวัดการย่อยสลายที่หลากหลายวิธี เช่น การวัดน้ำหนักของฟิล์ม PLA ที่หายไป การวัดผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นหลังจากการย่อย เช่น กรดแลคติก การวัดการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักโมเลกุลของพลาสติก การวัดบริเวณไฮดรอกซิลโลน หรือการวัด

ความชุ่มชื้นที่ลดลงเมื่อใช้ PLA เป็นสับสเตรท เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีนักวิจัยหลายท่านพยายามคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลาย PLA ได้ จากตัวอย่างดินโดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล ทำให้สามารถแยกเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มอื่นได้หลายชนิด ชนิดของเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลาย PLA ได้ประกอบด้วย เอนไซม์ protease และเอนไซม์ lipase ซึ่งผลิตจากเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ โดยรายงานแรกเกี่ยวกับเอนไซม์ที่ย่อยสลาย PLA คือเอนไซม์ proteinase K ซึ่งผลิตจากเชื้อรา *Tritirachium album* (Williams, 1981) สาเหตุที่เอนไซม์ proteinase K สามารถย่อยสลายพลาสติกได้เนื่องจากพลาสติกชนิดนี้มีพันธะ ester จึงทำให้มีโครงสร้างคล้ายโปรตีน ทำให้เอนไซม์ protease สามารถย่อยสลายได้ แต่อย่างไรก็ตาม ไม่ใช่เอนไซม์ protease ทุกชนิดที่จะสามารถย่อย PLA ได้ ความจำเพาะของเอนไซม์ย่อยสลาย PLA นั้นเกิดจากการจดจำบริเวณ α -ester bond ของ PLA ที่เป็น substrate ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับการที่ proteinase ย่อยสลายโปรตีนบริเวณ α -amide bond จึงทำให้มีการย่อยสลายอย่างจำเพาะ (Pranamuda *et al.*, 2001, Jarerat *et al.*, 2001, Nakamura *et al.*, 2001) ตรงข้ามกับเอนไซม์ lipase ซึ่งจะตัดพันธะ ester อย่างสุ่มตลอดสายของ aliphatic polyester ในปัจจุบันนี้เอนไซม์ที่สามารถย่อยสลาย aliphatic polyester นั้นเป็นที่รู้จักกันอย่างกว้างขวางแต่อย่างไรก็ตามมีรายงานเพียงเล็กน้อยเท่านั้นที่เกี่ยวกับเอนไซม์ย่อยสลาย PLA

การศึกษาเกี่ยวกับสภาวะในการย่อยสลาย PLA โดยใช้เอนไซม์จากเชื้อจุลินทรีย์และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายเป็นสิ่งที่น่าศึกษา เนื่องจากยังมีผู้ศึกษาไม่มากนัก โดย Tomita *et al.* (2004) รายงานว่าใช้ crude enzyme จากเชื้อ *Geobacillus thermocatenulatus* ใช้ในการย่อยสลาย PLA ขนาดโมเลกุล 47,000 หน่วย ที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 20 วัน โดยวัดน้ำหนักโมเลกุลของ PLA ที่ลดลง พบว่าในช่วงแรกของการย่อยสลาย น้ำหนักโมเลกุลลดลงอย่างช้าๆ และจาก Gel permeation chromatograms พบว่าน้ำหนักโมเลกุลมีแนวโน้มลดลงเรื่อยๆ หลังจากการย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์ ในปีเดียวกัน Takahashi *et al.* (2004) ได้ศึกษาการย่อยสลาย PLA โดยใช้เอนไซม์ lipase ชนิดต่างๆ พบว่า พลาสติกชนิด poly(DL-lactic acid) หรือ PLLA ซึ่งมีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 84,000 หน่วย ถูกเปลี่ยนให้เป็นโอลิโกเมอร์ที่เป็นวง (cyclic oligomer) ในสารละลาย chloroform/hexane ที่อุณหภูมิ 60°C และ PLLA ซึ่งมีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 120,000 หน่วย ถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ lipase CA (Novozyme 435) ที่อุณหภูมิ 100 °C ในตัวทำละลาย o-xylene โดยโครงสร้างของโอลิโกเมอร์ที่ได้วิเคราะห์โดยใช้ ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy and MALDI-TOF (matrix assisted laser

desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry) และได้เสนอแนวคิดที่ใช้เอนไซม์ lipase ในการย่อยสลาย PLA และนำ cyclic oligomer กลับมาใช้ในการผลิต PLA อีกครั้ง แสดงดังรูปที่ 1



ภาพที่ 1 แนวความคิดในการนำ PLA กลับมาใช้ใหม่ (Takahashi *et al.*, 2004)

นอกจากนี้ Jarerat *et al.* (2006) ได้ศึกษาการย่อยสลาย PLA โดยเปรียบเทียบการย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์จากเชื้อ *Amycolatopsis orientalis* กับเอนไซม์ Proteinase K ทางการค้า พบว่า PLA ผง 2,000 mg/L ถูกย่อยสลายสมบูรณ์ ด้วยเอนไซม์บริสุทธิ์ 20 mg/l ที่ 40 °C เป็นเวลา 8 ชั่วโมง โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายเป็นกรดแลกติก 600 mg/l และผลิตภัณฑ์อื่นที่ละลายน้ำได้ ซึ่งวัดได้จากค่า total organic carbon (TOC)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายพลาสติกชนิด PLA

3.1.1 เชื้อจุลินทรีย์ และ เอนไซม์

ทำการเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLA นำเชื้อ *Actinomadura keratinilytica* strain T16-1 จาก glycerol stock มาทำกล้าเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-2 (Yeast extract, 4 กรัม Malt extract, 10 กรัม Dextrose, 4 กรัม agar, 20 กรัม) ในจานเพาะเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 4 วัน

ผลิตเอนไซม์จากเชื้อจุลินทรีย์ *Actinomadura keratinilytica* strain T16-1 ทำได้โดยนำกล้าเชื้อมาทำการ inoculums ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Basal medium (0.035% PLA, 0.238% gelatin, 0.4% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.4% K_2HPO_4 , 0.2% KH_2PO_4 , 0.02% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มล. ทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 4 วัน ที่อุณหภูมิ 50°C โดยทำการเขย่าที่ 200 rpm

เก็บเอนไซม์จากเชื้อจุลินทรีย์ *Actinomadura keratinilytica* strain T16-1 นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้มาทำการกรอง ด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 เพื่อแยกตะกอนเซลล์และ PLA ที่เหลือออก เก็บสารละลายเอนไซม์ที่ได้เพื่อใช้ในการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 4°C

3.2 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแล็กไทด์และการหาปริมาณโปรตีน

นำเอนไซม์ที่ได้มา 2.25 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับ 0.1% emulsified PLA ปริมาตร 225 ไมโครลิตร บ่มที่ 60°C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาลดอุณหภูมิ ในน้ำเย็น เป็นเวลา 5 นาทีและวัดการดูดกลืนคลื่นแสง (ความยาวคลื่นลดลง) ที่ความยาวคลื่นแสง 630 นาโนเมตร ตามวิธีของ Sukkhum et al., 2009a

วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โดยวัดปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Lowry method (Lowry et al., 1951) นำเอนไซม์ที่ได้มา 1 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับ alkali copper solution 5 มิลลิลิตร ที่ 25°C เป็นเวลา 10 นาที

จากนั้น เติม 1N folin reagent 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทำปฏิกิริยาที่ 25°C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาวัดการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่นแสง 770 นาโนเมตร สร้างกราฟมาตรฐาน

3.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยสลาย PLA โดยใช้การออกแบบการทดลองทางสถิติ

แผนการทดลองสำหรับการหาพื้นที่ผิวตอบสนองนั้นมีจุดประสงค์เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพการย่อยสลาย PLA กับกลุ่มของปัจจัยที่ศึกษา ในการศึกษารั้งนี้ได้ออกแบบการทดลองแบบ central composite design ที่มี 3 ปัจจัย ประกอบด้วยส่วนสำคัญ 3 ส่วนคือ จำนวนจุดของ factorial point มีจำนวนเท่ากับ 2^3 โดยแต่ละปัจจัยทั้งหมด 3 ปัจจัย จะทำการทดลอง 2 ระดับ ซึ่งใช้สัญลักษณ์ -1 แทนระดับต่ำ และ +1 แทนระดับสูง ดังนั้น การทดลองสำหรับ factorial point สามารถเขียนสัญลักษณ์ได้ดังนี้

$$(X_1, X_2, X_3) = (\pm 1, \pm 1, \pm 1)$$

จำนวนจุดของ center point (n_0) จะต้องมีการทำซ้ำมากกว่า 1 ครั้ง เพื่อคำนวณหา pure error ในการวิเคราะห์ การทดสอบความเหมาะสมของรูปแบบ การทดลองสำหรับ center point สามารถเขียนสัญลักษณ์ได้ดังนี้

$$(X_1, X_2, X_3) = (0, 0, 0)$$

จำนวนจุดของ star point มีจำนวนเท่ากับ 2(3) โดยแต่ละจุดห่างจาก center point ด้วยระยะเท่ากันคือระยะ α โดย $\alpha = \sqrt[4]{2^k}$ เมื่อศึกษา 3 ปัจจัยจึงมีค่า α เท่ากับ ± 1.68 การทดลองสำหรับ star point สามารถเขียนสัญลักษณ์ได้ดังนี้

$$(X_1, X_2, X_3) = (\pm 1.68, \pm 1.68, \pm 1.68)$$

สามารถออกแบบจำนวนจุดการทดลองได้จาก $2^k + 2k + n_0$ เมื่อ k คือ จำนวนตัวแปรที่ต้องการศึกษา และ n_0 คือ จำนวนซ้ำการทดลองที่จุดศูนย์กลาง (center point) ดังนั้นเมื่อศึกษา 3 ปัจจัย จึงเท่ากับ $2^3 + 2(3) + 3$ สามารถออกแบบการทดลองทั้งหมด 17 การทดลอง ซึ่งแต่ละการ ทดลองทำซ้ำ 3 ครั้ง ดังแสดงในตารางที่ 2

นำเอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อ สายพันธุ์ T16-1 มาศึกษาปัจจัยร่วมที่มีผลต่อการย่อยสลาย PLA ได้แก่ อุณหภูมิ เวลา และปริมาณเอนไซม์ ในศึกษานี้ได้ใช้รูปแบบการทดลองแบบ central composite design โดยแบ่งปัจจัยออกเป็น 5 ระดับ ($-\alpha, -1, 0, +1, +\alpha$) ดังแสดงในตารางที่

การกำหนดค่าของระดับแต่ละปัจจัยสามารถกำหนดได้จากสูตร

$$X_i = \frac{A_i - A_o}{\Delta A}$$

X_i คือ code ของระดับปัจจัย

A_i คือ ค่าระดับที่แท้จริงของปัจจัย (true level)

A_o คือค่าเฉลี่ยของระดับปัจจัย (average)

ΔA คือค่าช่วงกลางของระดับปัจจัย (center point) คิดจาก (ค่าสูงสุด- ค่าต่ำสุด)/2

ตารางที่ 2 แสดงปัจจัยค่าของแต่ละระดับที่ใช้ในการออกแบบการทดลองตามวิธี Central composite design

ปัจจัย	-1.68	-1	0	1	1.68
อุณหภูมิ (°C)	43	50	60	70	77
เวลา (h)	4	12	24	36	44
ปริมาณเอนไซม์ (mg/l)	16	50	100	150	184

ตารางที่ 3 แบบการทดลองในการย่อยสลาย PLA ด้วยเอนไซม์จากเชื้อสายพันธุ์ T16-1 โดยใช้วิธี Central composite design

การทดลอง	การทดลอง ที่	X_1	X_2	X_3	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (h)	ปริมาณเอนไซม์ mg/l
Factorial point	1	-1	-1	-1	50	12	50
	2	-1	-1	1	50	12	150
	3	-1	1	-1	50	36	50
	4	-1	1	1	50	36	150
	5	1	-1	-1	70	12	50
	6	1	-1	1	70	12	150
	7	1	1	-1	70	36	50
	8	1	1	1	70	36	150
Star point	9	-1.68	0	0	43	24	100
	10	0	-1.68	0	60	4	100
	11	0	0	-1.68	60	24	16
	12	1.68	0	0	77	24	100
	13	0	1.68	0	60	44	100
	14	0	0	1.68	60	24	184
Center point	15	0	0	0	60	24	100
	16	0	0	0	60	24	100
	17	0	0	0	60	24	100

นำเอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อทั้งสองสายพันธุ์มาทำการศึกษาการย่อยสลายตามแบบการทดลองที่ได้ออกแบบไว้ทั้ง 17 การทดลอง หลังจากนั้นเก็บสารละลายที่ได้ โดยการ centrifuge ที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที นำไปวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลาย

นำผลการทดลองที่ได้ไปวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้การหาสมการการถดถอยเชิงพหุคูณเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายและปัจจัยที่นำมาศึกษาทั้ง 3 ปัจจัยโดยใช้โปรแกรม SPSS PASW

statistics 18 for windows และตรวจสอบความเหมาะสมของแบบจำลองโดยทดสอบการแจกแจงแบบปกติ และทดสอบความคงที่ของความแปรปรวนของความคลาดเคลื่อน และนำแบบจำลองที่ได้ไปทำนายค่าของปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โดยใช้การหาพื้นที่ผิวดตอบสนองด้วยโปรแกรม statistica 5.0

3.4 การศึกษาผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลาย PLA

3.4.1 การหาปริมาณ total organic carbon (TOC)

วิธีการวัดปริมาณ total organic carbon ที่ละลายอยู่ใน reaction mixture โดยใช้เครื่อง TOC analyzer เนื่องจาก ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลาย PLA มีทั้งที่เป็น oligomer และกรดแลกติก ซึ่งจัดเป็นสารอินทรีย์ที่ละลายน้ำได้

3.4.2 การหาปริมาณกรดแลกติก

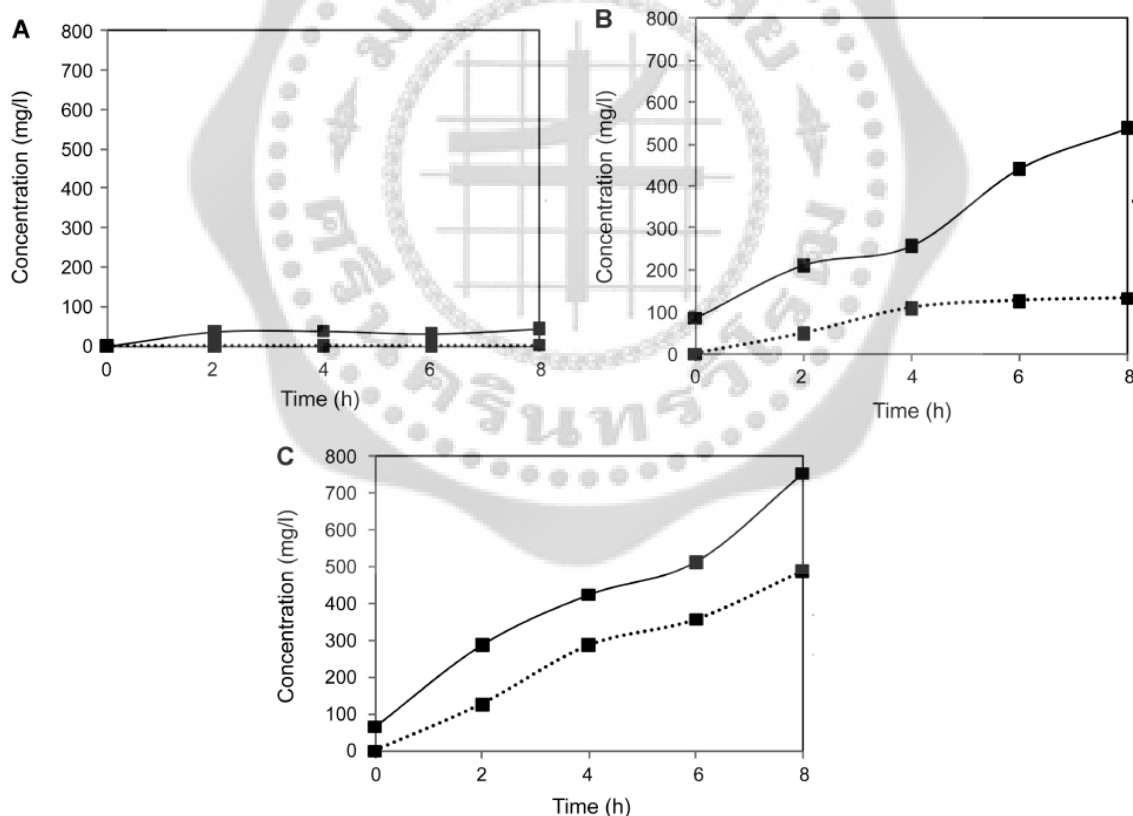
วัดหาปริมาณของผลิตภัณฑ์ กรดแลกติก ที่เกิดขึ้น โดยใช้เครื่อง HPLC

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

1. การศึกษาปริมาณ PLA ที่เหมาะสมในการย่อยสลายด้วยเอนไซม์จากเชื้อ *A. keratinilytica*

จากการทดลองหาปริมาณสับสเตรทที่ใช้ในการย่อยสลายด้วยเอนไซม์จากเชื้อ *A. keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1 พบว่าเมื่อใช้ PLA powder ปริมาณ 40 mg/l ทำให้เอนไซม์ย่อยสลาย PLA ได้ดีที่สุดเมื่อทำการย่อยสลายเป็นเวลา 8 ชั่วโมง โดยได้ผลิตภัณฑ์จากการย่อยทั้งหมดแสดงในค่า TOC รวมทั้งปริมาณกรดแลกติก สูงที่สุดคือ 750 และ 400 mg/l ตามลำดับ (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณกรดแลกติกและ lactide oligomer ที่ผลิตได้ระหว่างกระบวนการย่อยสลาย PLA powder โดยใช้เอนไซม์ย่อยสลาย PLA จากเชื้อ *A. keratinilytica* ที่อุณหภูมิ 60°C โดยปริมาณของ PLA powder 0 mg/l (A), 2000 mg/l (B), 4000 mg/l ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ 55 U/ml

2. ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมโดยวิธีพื้นผิวตอบสนอง

เมื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลาย PLA powder ด้วยเอนไซม์จากเชื้อ *A. keratinolytica* T16-1 ซึ่งได้แก่ อุณหภูมิ (X_1) ระยะเวลา (X_2) และปริมาณของเอนไซม์ (X_3) พบว่าการทดลองที่ 12 ประกอบด้วย อุณหภูมิ 77°C ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา 24 ชั่วโมง และปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ 100 mg/l มีปริมาณกรดแลกติกสูงสุดเท่ากับ 733 mg/l ตามลำดับดังแสดงในตารางที่ 4 นอกจากนี้ยังพบว่า การทดลองที่ 2, 11, 13 และ 14 มีปริมาณกรดแลกติกต่ำที่สุดโดยตรวจไม่พบปริมาณกรดแลกติกจากการย่อยสลายที่สภาวะนี้

ตารางที่ 4 การออกแบบการทดลองแบบ Central composite design และผลของปริมาณกรดแลกติก เมื่อปัจจัยที่ศึกษา 3 ปัจจัย คือ อุณหภูมิ เวลา และปริมาณเอนไซม์

การทดลอง	การทดลองที่	X_1	X_2	X_3	อุณหภูมิ	เวลา	ปริมาณเอนไซม์	Actual lactic acid	Predicted Lactic acid	TOC
					($^{\circ}\text{C}$)	(h)	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l
Factorial point	1	-1	-1	-1	50	12	50	298	151.9	460.4
	2	-1	-1	1	50	12	150	0	-7.3	354.5
	3	-1	1	-1	50	36	50	390	441.1	555.5
	4	-1	1	1	50	36	150	156	180.9	495.3
	5	1	-1	-1	70	12	50	155	49.7	286.9
	6	1	-1	1	70	12	150	282	150.4	586
	7	1	1	-1	70	36	50	482	408.9	577.4
	8	1	1	1	70	36	150	343	408.6	561.2

Star point	9	-1.68	0	0	43	24	100	118	125.3	95.2
	10	0	-1.68	0	60	4	100	124	230.7	266.8
	11	0	0	-1.68	60	24	16	0	193.6	408.2
	12	1.68	0	0	77	24	100	733	653.4	346.6
	13	0	1.68	0	60	44	100	0	124.0	701.5
	14	0	0	1.68	60	24	184	0	-10.0	704.5
Center point	15	0	0	0	60	24	100	186	163.9	589.3
	16	0	0	0	60	24	100	106	163.9	566.1
	17	0	0	0	60	24	100	220	163.9	736.6

3. การวิเคราะห์การถดถอย (Regression analysis)

3.1 การทดสอบสมมติฐานของสมการการถดถอยหรือสมการความสัมพันธ์

เมื่อนำผลการทดลองที่ได้ไปวิเคราะห์การถดถอยเชิงพหุคูณเพื่อประเมินผลของปัจจัยที่ศึกษาต่อการย่อยสลาย PLA เป็นกรดแลกติก จาก *A. keratinolytica* T16-1 ซึ่งจากผลการวิเคราะห์ที่แสดงในตารางที่ 5 มีค่าสถิติ F เท่ากับ 9.112 ด้วย degree of freedom (df) เท่ากับ (24, 33) มีค่านัยสำคัญของการทดสอบ (*p-value*) เท่ากับ 0.000 ซึ่งให้เห็นว่าปัจจัยที่ศึกษามีผลต่อการย่อยสลาย PLA เป็นกรดแลกติก อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์

ตารางที่ 5 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของการวิเคราะห์การถดถอยเชิงพหุคูณ

Model		Sum of squares	df	Mean square	F	Sig.
1	Regression	959554.634	9	106617.182	9.112	0.000
	Residual	280829.131	24	11701.214		
	Total	1240383.765	33			

a. predictors: (constant), X_1 , X_2 , X_3 , X_1^2 , X_2^2 , X_3^2 , X_1X_2 , X_1X_3 , X_2X_3

b. dependent variable: Lactic acid concentration

3.2 การประมาณสัมประสิทธิ์การถดถอยเชิงพหุคูณ

เมื่อ ประมาณค่าสัมประสิทธิ์ของปัจจัยที่ศึกษาซึ่งแสดงผลในตารางที่ 6 ทั้งนี้ เพื่อทดสอบความ มีนัยสำคัญของตัวแปรที่ศึกษาและทิศทางของอิทธิพลว่ามีอิทธิพลทางบวกหรือ ทางลบต่อการย่อยสลาย PLA เป็นกรดแลกติก

ตารางที่ 6 ค่าการวิเคราะห์สัมประสิทธิ์ของสมการการถดถอยและค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ

Model	Unstandardize coefficient		Standardize coefficient	t	Sig.
	B	Std. error	Beta		
Constant	163.916	44.068		3.720	0.001
X_1	31.373	20.707	0.147	1.515	0.143
X_2	136.861	20.707	0.642	6.609	0.000
X_3	-39.869	20.707	-0.187	-1.925	0.066
X_1X_2	17.500	27.043	0.063	0.647	0.524
X_1X_3	65.000	27.043	0.233	2.404	0.024
X_2X_3	-25.250	27.043	-0.091	-0.934	0.360
X_1^2	4.997	22.812	0.023	0.219	0.828
X_2^2	91.980	22.812	0.421	4.032	0.000
X_3^2	-37.874	22.812	-0.173	-1.660	0.110

A significant at 5% level ($p < 0.05$), $R^2 = 0.774$; and $R^2 \text{ adj} = 0.689$

จากตารางที่ 6 ตัวแปรอิสระที่มีอิทธิพลต่อการผลิตเอนไซม์ ซึ่งมีค่า p -value น้อยกว่าระดับนัยสำคัญ 0.05 คือ ระยะเวลา (X_2) พจน์อิทธิพลร่วมระหว่างอุณหภูมิ และปริมาณเอนไซม์ (X_1X_3) พจน์กำลังสองของ ระยะเวลา (X_2^2) ส่วนตัวแปรอิสระที่ไม่มีอิทธิพลต่อการย่อยสลาย PLA เป็นกรดแลกติกซึ่งมีค่า p -value มากกว่า ระดับนัยสำคัญ 0.05 คือ อุณหภูมิ (X_1) ปริมาณเอนไซม์ (X_3) พจน์อิทธิพลร่วมระหว่างอุณหภูมิและเวลา (X_1X_2) เวลาและปริมาณเอนไซม์ (X_2X_3) พจน์กำลังสองของอุณหภูมิ (X_1^2) และปริมาณเอนไซม์ (X_3^2) รูปแบบสมการ การถดถอยที่เหมาะสมแสดงในสมการที่ 1 จากการทดสอบมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 0.774 นั่น คือปริมาณกรดแลกติกที่ได้เป็นผลหรืออิทธิพลจากตัวแปรอิสระทั้ง 3 ตัวแปร 77.4 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่เหลืออีก 22.6 เปอร์เซ็นต์ เป็นผลจากตัวแปรอิสระอื่นที่ไม่สามารถควบคุมได้

$$Y (\text{Lactic acid}) = 163.916 + 31.373X_1 + 136.861 X_2 - 39.869 X_3 + 17.5 X_1X_2 + 65 X_1X_3 - 25.25 X_2X_3 \\ + 4.997 X_1^2 + 91.980 X_2^2 - 37.874 X_3^2 \quad \text{สมการที่ 1}$$

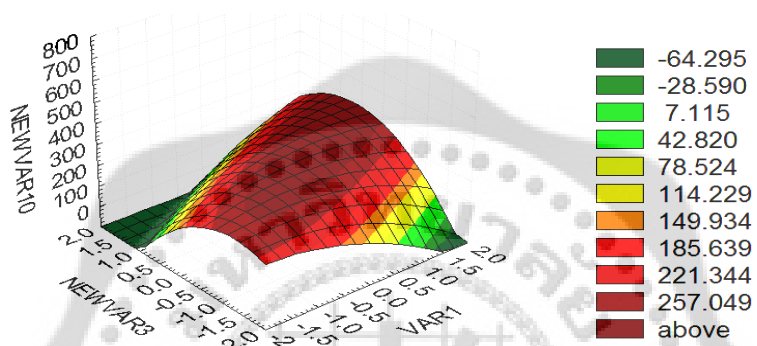
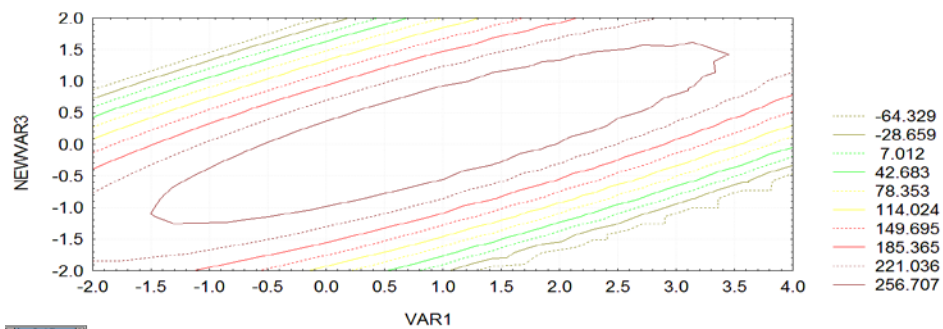
จากสมการที่ 1 สังเกตได้ว่าตัวแปรอิสระ X_1 และ X_2 มีอิทธิพลทางบวก (มีสัมประสิทธิ์เป็นบวก) ต่อค่า ตอบสนอง (Y) กล่าวคือ หากเพิ่มค่าของตัวแปรอิสระดังกล่าว ค่าปริมาณกรดแลกติกจะมีค่าเพิ่มสูงขึ้น

3.3 การเปรียบเทียบค่าจริงจากการทดลองและค่าทำนายปริมาณกรดแลกติกที่ได้จากการทดลอง

เมื่อนำสมการการถดถอยที่เหมาะสม (สมการที่ 1) ไปทำนายผลของอุณหภูมิ ระยะเวลา และปริมาณ เอนไซม์ ในระดับที่ศึกษาต่อการย่อยสลาย PLA โดยใช้เอนไซม์จาก *A. keratinilytica* T16-1 ผลการทำนายแสดง ในตารางที่ 1

4. การหาจุดที่เหมาะสมของตัวแปรที่ศึกษาต่อการย่อยสลาย PLA เป็นกรดแลกติก

ภาพที่ 2 แสดงผลของภาพพื้นผิวตอบสนอง (ภาพ 3 มิติ) และคอนทัวร์พล็อต (ภาพ 2 มิติ) ต่อผลของอุณหภูมิ และปริมาณเอนไซม์ ต่อการย่อยสลาย PLA เป็นกรดแลกติก โดยใช้เอนไซม์จาก *A. keratinilytica* T16-1 โดยกำหนดระยะเวลา ที่ระดับกลางของการทดลองซึ่งได้แก่ 24 ชั่วโมง พบว่าจุดที่ เหมาะสมต่อการย่อยสลาย PLA เป็นกรดแลกติก คือ การทำปฏิกิริยาการย่อยสลายที่อุณหภูมิ 70°C เป็น ระยะเวลา 44 ชั่วโมง และปริมาณเอนไซม์ที่ใช้คือ 100 mg/l ทำให้ได้ค่าปริมาณกรดแลกติกทำนายจากการใช้ สภาวะดังกล่าวเท่ากับ 719 mg/l และเมื่อทดลองจริงเพื่อยืนยันผลการทำนาย พบว่า เมื่อทำปฏิกิริยาการย่อยสลาย ที่อุณหภูมิ 70°C ระยะเวลา 44 ปริมาณเอนไซม์ 100 mg/l ทำให้ได้ค่าปริมาณกรดแลกติกจริงเท่ากับ 750 mg/l ดังแสดงในภาพที่ 2 ซึ่งมากกว่าค่าทำนาย 4.1 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 3 ภาพพื้นผิวตอบสนอง (response surface plot) และคอนทัวร์ พล็อตของผลอุณหภูมิและปริมาณเอนไซม์ต่อการย่อยสลาย PLA เป็นกรดแลกติก

บทที่ 5

สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

จากการทดลองการย่อยสลายพอลิแลกไทด์ด้วยกระบวนการทางชีวภาพโดยแบคทีเรียชอบร้อนเพื่อการนำกลับมาใช้ใหม่นั้น การหาสภาวะที่เหมาะสมโดยการใช้การออกแบบการทดลองทางสถิติวิธีพื้นผิวตอบสนอง โดยใช้หลักการของวิธี central composite design พบว่าสามารถได้ตัวแบบสมการในการทำนายผลการย่อยสลาย PLA และสภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายคือ การทำปฏิกิริยาการย่อยสลายที่อุณหภูมิ 70°C เป็นระยะเวลา 44 ชั่วโมง และปริมาณเอนไซม์ที่ใช้คือ 100 mg/l ทำให้ได้ค่าปริมาณกรดแลกติกทำนายจากการใช้สภาวะดังกล่าวเท่ากับ 719 mg/l และเมื่อทดลองจริงเพื่อยืนยันผลการทำนาย พบว่า เมื่อทำปฏิกิริยาการย่อยสลายที่อุณหภูมิ 70°C ระยะเวลา 44 ปริมาณเอนไซม์ 100 mg/l ทำให้ได้ค่าปริมาณกรดแลกติกจริงเท่ากับ 750 mg/l ซึ่งมากกว่าค่าทำนาย 4.1 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจากสภาวะที่กล่าวข้างต้นสามารถที่จะนำไปใช้ในการนำขยะที่เป็น PLA มาใช้ใหม่ได้หรือที่เรียกว่ากระบวนการ recycle ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายส่วนมากเป็นกรดแลกติก และ oligomer ชนิดอื่นๆ ซึ่งสามารถนำไปทำกระบวนการ re-polymerization ใหม่อีกครั้งหนึ่งได้

จากงานวิจัยนี้จึงเห็นได้ว่าเอนไซม์จากเชื้อ *A. keratinolytica* strain T16-1 สามารถย่อยสลายพลาสติกชนิดพอลิแลกไทด์ให้เป็น monomer คือกรดแลกติก และส่วนของ oligomer ได้ ในระยะเวลาอันสั้น และทำให้สามารถนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปใช้ประโยชน์ต่อไป ซึ่งจะช่วยให้ในอนาคตอันใกล้หากมีการนำพลาสติกชนิดนี้มาใช้กันอย่างแพร่หลาย สามารถนำกลับมา recycle เพื่อเป็นการลดขยะ ลดสภาวะโลกร้อนได้อีกทางหนึ่งด้วย

บรรณานุกรม

- Ikura, Y. and T. Kudo. 1999. Isolation of a microorganism capable of degrading poly(L-lactide). **J. Gen. Appl. Microbiol.** 45: 247–251.
- Jarerat, A. and Y. Tokiwa. 2001. Degradation of poly(L-lactide) by a fungus. **Macromol. Biosci.** 1: 136–140.
- Jarerat, A. and Y. Tokiwa. 2003. Degradation of poly(L-lactide) by *Saccharothrix waywayandensis*. **Biotechnol. Lett.** 25: 401–404.
- Jarerat, A. , Y. Tokiwa and H. Tanaka. 2003. Poly(L-lactide) degradation by *Kibdelosporangium aridum*. **Biotechnol. Lett.** 25: 2035–2038.
- Jarerat, A. , Y. Tokiwa and H. Tanaka. 2006. Production of poly(L-lactide)-degrading enzyme by *Amycolatopsis orientalis* for biological recycling of poly(L-lactide). **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 72:726-731.
- Kim, M. N., W. G. Kim, H. Y. Weon and S. H. Lee. 2007. Poly(L-lactide)-degrading activity of a newly isolated bacterium. **J. Appl. Polym. Sci.** 109: 234–239.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (November 1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent". *J. Biol. Chem.* **193** (1): 265–75.
- Mayumi, D., Y.A. Shigeno, H. Uchiyama, N. Nomura and T.N. Kambe. 2008. Identification and characterization of novel poly(DL-lactic acid) depolymerases from metagenome. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 79: 743–750.
- Miura, S., T. Arimura, N. Itoda, L. Dwiarti, J.B. Feng, C.H. Bin and M. Okabe. 2004. Production of L-Lactic acid from corncob. **J. Biosci. Bioeng.** 97 (3): 153-157.
- Nakamura, K., T. Tomita, N. Abe and Y. Kamio. 2001. Purification and characterization of an extracellular poly(L-lactic acid) depolymerase from a soil isolate, *Amycolatopsis* sp. strain K104-1. **Appl. Environ. Microb.** 67: 345–353.
- Takahashi, Y., S. Okajima, K. Toshima and S. Matsumura. 2004. Lipase-Catalyzed Transformation of Poly(lactic acid) into Cyclic Oligomers. **Macromol. Biosci.** 4: 346–353.
- Tomita, K., Y. Kuroki and K. Nakai. 1999. Isolation of thermophiles degrading poly(L-lactic acid). **J. Biosci. Bioeng.** 87: 752–755.

- Tomita, K., T. Nakajima, Y. Kikuchi and N. Miwa. 2004. Degradation of poly(L-lactic acid) by a newly isolated thermophile. **Polym. Degrad. Stab.** 84: 433-438.
- Tomita, K., H. Tsuji, T. Nakajima, Y. Kikuchi, K. Ikarashi and N. Ikeda. 2003. Degradation of poly(D-lactic acid) by a thermophile. **Polym. Degrad. Stab.** 81: 167-171.
- Pranamuda, H. and Y. Tokiwa. and H. Tanaka. 1997. Polylactide degradation by an *Amycolatopsis* sp. **Appl. Environ. Microbiol.** 63: 1637–1640.
- Pranamuda, A. Tsuchii and Y. Tokiwa. 2001. Poly (L-lactide)-degrading enzyme produced by *Amycolatopsis* sp. **Macromol. Biosci.** 1: 25–29.
- Sangwan, P. and D.Y. Wu. 2008. New insights into polylactide biodegradation from molecular ecological techniques. **Macromol. Biosci.** 8: 304–315.
- Shigeno, Y.A., T. Teeraphatpornchai, K. Teamtisong, N. Nomura, H. Uchiyama, T. Nakahara and T.N. Kambe. 2003. Cloning and sequencing of a poly(DL-Lactic Acid) depolymerase gene from *Paenibacillus amylolyticus* strain TB-13 and its functional expression in *Escherichia coli*. **Appl. Environ. Microb.** 69 (5): 2498–2504.
- Sukkhum, S., S. Tokuyama, T. Tamura and V. Kitpreechavanich. 2009a. A novel poly(L-lactide) degrading actinomycetes isolated from Thai forest soils, phylogenic relationship and enzyme characterization. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 55: 459-467.
- Sukkhum, S., S. Tokuyama and V. Kitpreechavanich. 2009b. Development of fermentation process for PLA-degrading enzyme production by a new thermophilic *Actinomadura* sp. T16-1. **Biotechnol. Bioprocess Eng.** 14: 302-306.
- Williams, D.F. 1981. Enzymatic hydrolysis of polylactic acid. **Eng. Med.** 10 (1): 5-7

ประวัติผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

1. ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาวสุขุมารณ์ สุขุม
ชื่อ-นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Miss Sukhumaporn Sukkhum
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน: 3-1506-00161-556
3. ตำแหน่งปัจจุบัน: อาจารย์
4. หน่วยงานและสถานที่ติดต่อได้สะดวก
หน่วยงาน: ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
โทรศัพท์: 02-664-1000 ต่อ 8520
โทรสาร: 02-260-0127
e-mail: sukhumaporn@swu.ac.th
5. ประวัติการศึกษา
Ph.D. (จุลชีววิทยา) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (2553)
วท.บ. (จุลชีววิทยา) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี (2548)
6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ
Taxonomy of actinomycetes, microbial enzyme, bioplastic degrading enzyme
7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ
7.1 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

- Sukkhum, S., S. Tokuyama, T. Tamura and V. Kitpreechavanich. 2007. Morphological study of *Actinomadura atraherbacea* sp.nov. a novel PLA-degrading actinomycete. **Journal of microscopy society of Thailand**. 21(1): 372-373.
- Sukkhum, S., S. Tokuyama, T. Tamura and V. Kitpreechavanich. 2009. A novel poly(L-lactide) degrading actinomycetes isolated from Thai forest soils, phylogenic relationship and enzyme characterization. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 55: 459-467.
- Sukkhum, S., S. Tokuyama and V. Kitpreechavanich. 2009. Development of fermentation process for PLA-degrading enzyme production by a new thermophilic *Actinomadura* sp. T16-1. **Biotechnol. Bioprocess Eng.** 14: 302-306.

- Sukkhum, S., Kongsaree, P., Tokuyama, S., Ishida, Y., Tamura, T., Kitpreechavanich, V. 2011. A novel poly (L-lactide) degrading thermophilic actinomycetes, *Actinomadura keratinilytica* strain T16-1 and *pla* gene sequencing. **Afr. J. Microbial research**. 5(18), 2575-2582.
- Sukkhum, S., Tokuyama, S., Kitpreechavanich, V. 2011. Poly(L-Lactide)-Degrading Enzyme Production by *Actinomadura keratinilytica* T16-1 in 3 L Airlift Bioreactor and Its Degradation Ability for Biological Recycle. **J. Microbiol. Biotechnol.** 22(1), 92–99.
- Sukkhum, S., Kitpreechavanich, V. 2011. New Insight into Biodegradation of Poly (L-Lactide), Enzyme Production and Characterization. Progress in Molecular and Environmental Bioengineering– From Analysis and Modeling to Technology Applications. Intech open access. 27, 587-604.

ที่ปรึกษาโครงการวิจัย

1. ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) นายวิเชียร กิจปรีชาวนิช
ชื่อ-นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Vichien Kitpreechavanich
2. วัน เดือน ปีเกิด 16 พฤศจิกายน 2496
3. ที่อยู่ปัจจุบัน 99/37 ถ. จามวงศ์วาน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร
กรุงเทพฯ 10900 โทร.02- 579-3769 ต่อ 138
4. ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์
5. หน่วยงานที่สังกัด ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900
โทรศัพท์ 579-3769 โทรสาร 579-2081
E-mail : fsciwck@nontri.ku.ac.th
6. ประวัติการศึกษา
 - 6.1 ปริญญา Doctor of Engineering (Fermentation Technology)
สถาบัน Hiroshima University, Japan
ปีที่สำเร็จ 2529 (1986)
 - 6.2 ปริญญา Master of Science (Microbiology)
สถาบัน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ปีที่สำเร็จ 2521
 - 6.3 ปริญญา วิทยาศาสตร์บัณฑิต (ชีววิทยา)

สถาบัน
ปีที่สำเร็จ

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
2518

7. ความชำนาญ

เทคโนโลยีการหมัก และเอนไซม์ การใช้ประโยชน์จากวัสดุการเกษตรและวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร โดยกระบวนการหมัก

8. งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

ชื่องานวิจัย/ปีที่ตีพิมพ์

สถานภาพในการวิจัย

1. Praneetrattananon, S., Wakisaka, M., Shirai, Y and Kitpreechavanich, 2005 Kitchen Refuse: a novel substrate for L(+)-lactic acid production by *Rhizopus oryzae* in submerge fermentation. *Japan Journal of Food Engineering*. 6(1) : 45-51

ผู้ร่วมโครงการ

2. กนกกร สีนมา ศาวิตร ตระกูลนำเลื่อมใส นภาพรรณ นพรัตนารักษ์ และ วิเชียร กิจปรีชาวนิช 2548 แอคติโนมัยสีทจากลำไส้ปลวกและการย่อยสารลิกโนเซลลูโลสและกรดซูริก เรื่องเต็มการประชุมวิชาการ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 43 สาขา วิทยาศาสตร์ น.277-286

หัวหน้าโครงการ

3. Japen Tangjitja roenkun, Vichien Ktpreechavanich, Surang Suthirawut, Pratumpon Chimanage, Wanna Praprilong, Warawut Krusong and Busba Yongsmith 2004 Improvement of High vitamin B 12 Tuanao by mixed cultures of soybean oligosaccharide and the use of bacteria and yeasts. *Kasetsart J(Nat Sci)* 38 :122-130

ผู้ร่วมโครงการ

4. Khucharoenphaisan K and Kitpreechavanich, V 2004 High thermostable xylanase producing *Thermomyces lanuginosus* isolated from Thailand The Proceeding of the 1st KMITL Internation Conference on Intergration of Science and Technology for Sustainable Development 2: 447-452

หัวหน้าโครงการ

4. ชลดา ซื่อสัตย์ บงกชรัตน์ ปิทยินต์ ธีรภัทร ศรีนรฤตร และวิเชียร กิจปรีชาวนิช 2547 การใช้ประโยชน์จากกากมันสำปะหลังเพื่อการผลิตเอทานอล เรื่องเต็มการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 43 สาขาการจัดการทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม น 450-458

ผู้ร่วมโครงการ

5 Suriyakul Na Ayudhya. C., Pomthong N., Chettanachit and

หัวหน้าโครงการ

Kitpreechavanich, V. 2003. Actinomycetes in Soil of Mixed Deciduous and Dry Dipterocarp Forests at Khao Nang Ram Wildlife Research Station, Huai Kha Khaeng Wildlife Sanctuary. Proceeding in the 41th Annual Meeting of Kasetsart University p 363-370.

6 Suriyachadkun C., Suwanarit P., Jantrarotai P. and Kitpreechavanich, V. หัวหน้าโครงการ
2003. Rare Actinomycetes in Soil from Sakaerat Biosphere Reserve and Suwan Farm Nakhon Ratchasima Thailand. Proceeding in the 41th Annual Meeting of Kasetsart University. p 104-111.

7. Kucharoenphaisan K., Ratanakhanokchai, K. and Kitpreechavanich, V. หัวหน้าโครงการ
2001. Induction of xylanases in the fungus *Humicola lanuginosa* (Griffon and Maublanc) Bunce. Proceeding in the 39th Annual Meeting of Kasetsart University p 33-41.

8 Kitpreechavanich, V. Sinsookh, J. Chotineeranat, Sriroth, K. and Yongsmith, B. 2001. Medium optimization on lactic acid production from cassava starch by *Rhizopus oryzae* DMKU 12 in shaking flask. Proceeding in the 39th Annual Meeting of Kasetsart University p181-188 หัวหน้าโครงการ

9 Yongsmith, B., Kitpreechavanich, V., Chitradon, L., Chaisrisook, C., and Budda, N. 2000. Color mutants of *Monascus* sp. KB9 and their comparative glucoamylase on rice solid culture. J. of Molecular catalysis B: Enzymatic 10 :263-272 ผู้ร่วมวิจัย

10 Limtong , S. Sumpradit, T., Kitpreechavanich, V. Tuntirungkij, M., Seki , T and Yoshida, T. 2000. Effect of acetic acid on growth and ethanol fermentation of xylose fermentating yeast and *Saccharomyces cerevisiae*. Kasetsart J. 34: 64-73. ผู้ร่วมวิจัย