

การใช้ประโยชน์จากหางน้ำยางที่แยกสกิมสำหรับการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์โดย  
*Actinomadura keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา  
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ  
สิงหาคม 2559

การใช้ประโยชน์จากหางน้ำย่างที่แยกสกิมสำหรับการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์โดย  
*Actinomadura keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา  
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สิงหาคม 2559

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การใช้ประโยชน์จากหางน้ำยางที่แยกสกิมสำหรับการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์โดย  
*Actinomadura keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1



บทคัดย่อ  
ของ  
สบดี วรรณมพิทักษ์

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา  
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สิงหาคม 2559

สบตี วรรณกรรมพิทักษ์. (2559). การใช้ประโยชน์จากหางน้ำย่างที่แยกสกิมสำหรับการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์โดย *Actinomadura keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1. ปริญญาานิพนธ์ วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ) กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. คณะกรรมการควบคุม: ดร.สุชมาภรณ์ กระจ่างสังข์

หางน้ำย่างที่แยกสกิมหรือซีรัมเป็นของเสียที่ได้จากอุตสาหกรรมผลิตน้ำย่างชั้น ซึ่งซีรัมมีสารอาหารที่เหมาะสมแก่การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ จึงน่าสนใจที่จะใช้เทคโนโลยีการหมักเพื่อใช้ประโยชน์จากหางน้ำย่างที่แยกสกิม ซึ่งงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นศักยภาพของหางน้ำย่างที่แยกสกิมในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์โดยสามารถไปประยุกต์ใช้สำหรับรีไซเคิลขยะพลาสติกได้ โดยงานวิจัยนี้สนใจที่ใช้น้ำย่างที่แยกสกิมมาเป็นแหล่งอาหารและเกลือแร่สำหรับผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์จาก *Actinomadura keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1 ด้วยวิธีการตรึงเซลล์ด้วยแผ่นใยขัดและในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์ในสภาวะแบบปลอดเชื้อ พบว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์จากสายพันธุ์ T16-1 ซึ่งการตรึงเซลล์กับแผ่นใยขัด 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรและเจริญในอาหาร basal medium ที่มีพอลิแลคไทด์ที่ความเข้มข้น 0.035 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ซึ่งทำการคัดเลือกปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์จากทั้งหมด 7 ปัจจัย ด้วยวิธีการออกแบบการทดลองทางสถิติวิธี Plackett และ Burman (PB) โดยมีการทดลองทั้งหมด 12 การทดลอง และมาหาจุดที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โดยการออกแบบ central composite design (CCD) ซึ่งเป็นการหาจุดที่เหมาะสมด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง (response surface methodology, RSM) พบว่า ค่า pH เริ่มต้นเจลาติน และ  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  เป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตเอนไซม์โดยให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่ 16.44 หน่วยต่อมิลลิลิตร และสามารถทำนายกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์ได้เท่ากับ 25.65 หน่วยต่อมิลลิลิตร และเมื่อทำการทดลองจริงตามจุดที่เหมาะสม พบว่าได้กิจกรรมของเอนไซม์เป็น 25.50 หน่วยต่อมิลลิลิตร คิดเป็นค่า productivity เท่ากับ 0.35 หน่วยต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งกล่าวได้ว่าหางน้ำย่างที่แยกสกิมสามารถนำมาผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์จาก *A. keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1 จากนั้นทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์จาก *A. keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1 ด้วยหางน้ำย่างที่แยกสกิมแบบไม่ปลอดเชื้อโดยวิธีตรึงเซลล์ในระบัพลาสก์ และในระดับถังหมัก โดยใช้เจลาตินเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเอนไซม์ในระดับถังหมักแบบไบพัคควมขนาด 2 ลิตร ได้แก่ อุณหภูมิที่ 45 องศาเซลเซียสค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 7.0 ไม่มีการให้อากาศ โดยมีอัตราการกวนที่ 100 rpm เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ 40.5 หน่วยต่อมิลลิลิตร และคิดเป็นค่า productivity เท่ากับ 0.56 หน่วยต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง

UTILIZATION OF NON-RUBBER SKIM LATEX FOR POLY (DL-LACTIDE)–DEGRADING  
ENZYME BY *Actinomadura keratinolytica* STRAINT16-1.



Presented in Partial Fulfillment of the Requirement for the  
Master of Science Degree in Biotechnology  
At Srinakharinwirot University

July 2016

Sabadee Worrathampitak.(2559).*Utilization of non-rubber skim latex for poly (DL-lactide)-degrading enzyme by Actinomadura keratinilytica strain T16-1*. Master thesis, M.Sc. (Biotechnology). Bangkok: Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee: Dr. Sukhumaporn Krajangsang

Non-rubber skim latex or serum is regarded as a waste result from the concentrated latex factory, which contains plenty of nutrients for microbial growth. Therefore, a better use for non-rubber skim latex could be use as fermentation technology. This work potentially showed how the utilization of non-rubber skim latex for PLA-degrading enzyme production, could be applicable for the recycling of plastic wastes. This study focused on the PLA-degrading enzyme production by *Actinomadura keratinilytica* strain T16-1, immobilized with scrub pad, in which the non-rubber skim latex was used as a sources of nutrients and mineral. In sterile conditions, the PLA-degrading activity from the strain T16-1 (supported by 1% w/v scrub pad) grown on a basal medium containing 0.035% (w/v) PLA powder in shake flask was investigated. The seven factors affecting PLA-degrading enzyme production were investigated using the Plackett and Burman (PB) design for twelve experimental runs. The central composite design (CCD) was used to statistically optimize PLA-degrading enzyme production by implementing the response surface methodology (RSM). From the results of PB, initial pH, gelatin and magnesium sulfate were mainly affected in terms of enzyme production. The enzyme activity was maximized at 16.44 U/ml from the run number 6. Under these conditions, this model predicted PLA-degrading enzyme activity of 25.65 U/ml. The verification showed that optimal PLA-degrading enzyme production activity was in the amount of 25.50 U/ml and productivity was 0.35 U/ml/h. As a result, the non-rubber skim latex showed the potential for PLA-degrading enzyme production from the strain T16-1. In non-sterile condition, the PLA-degrading enzyme production was determined using a non-rubber skim latex supplement with basal medium and used scrub pad as a supporter for the bacterial cells in a shake flask and fermenter. The effect of the physical parameters and the nitrogen sources were studied. The following optimal conditions were used: gelatin as the nitrogen source, a temperature of 45°C, an initial pH of 7.0, an agitation speed of 100 rpm, without aeration support and 72 hours of cultivation. This resulted in an activity of approximately 40.5 U/ml and 0.56 U/ml/h of productivity in the 2 L fermenter.

ปริญญาานิพนธ์

เรื่อง

การใช้ประโยชน์จากหางน้ำยางที่แยกสกิมสำหรับการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์โดย

*Actinomadura keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1

ของ

สปีดี วรรณรณพิทักษ์

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

..... วิชาการแทนคณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร.ปรีนทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร)

วันที่.....เดือน..... พ.ศ. 2559

อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญาานิพนธ์

คณะกรรมการสอบปากเปล่า

.....ที่ปรึกษา

..... ประธาน

(อาจารย์ ดร. สุขุมภรณ์ กระจ่างสังข์)

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรรณณ ชุณหชาติ)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ปรีนทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร)

..... กรรมการ

(อาจารย์ ดร. สุขุมภรณ์ กระจ่างสังข์)

..... กรรมการ

(อาจารย์ ดร.วัลลภา หล่อเหลี่ยม)

## ประกาศคุณูปการ

ปริญญาานิพนธ์ฉบับนี้จะไม่มีความสำเร็จลงได้หากขาดความช่วยเหลือ และคำแนะนำอย่างดียิ่งจาก อาจารย์ ดร. สุขุมภรณ์ กระจ่างสังข์ อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญาานิพนธ์ ผู้คอยตักเตือน แนะนำ สั่งสอน และให้คำปรึกษาแก่ข้าพเจ้าในด้านต่างๆ ทั้งวิทยากร ความรู้ และจริยธรรมประกอบการทำปริญญาานิพนธ์ที่สมบูรณ์ ข้าพเจ้าขอขอบคุณไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร รองศาสตราจารย์ ดร. อรอนงค์ พริ้งสุลกะ อาจารย์ ดร. สิริรักษ์ ศรวณียารักษ์ และอาจารย์ ดร. วัลลภา หล่อเหลี่ยม ตลอดจนคณาจารย์ทุกท่านที่ให้ความรู้แก่ผู้วิจัยตลอดการศึกษา ให้ได้รับความรู้ และข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์ในการทำปริญญาานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรวรรณ ชุณหชาติ ที่กรุณาเป็นกรรมการสอบปริญญา-นิพนธ์ และช่วยแก้ไขปริญญาานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์และเป็นที่ยอมรับในแวดวงวิชาการมากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์ต่าง ๆ ให้ข้าพเจ้าได้ใช้ตลอดระยะเวลาของการทำปริญญาานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบคุณ คุณอนุพันธ์ ยังปรีดา คุณภัทรพร พิกุลขวัญ และคุณฐิติพร ปัญญาชนะกุล ตลอดจนรุ่นพี่และเพื่อนๆ ทุกคนในห้องปฏิบัติการสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สำหรับความช่วยเหลือและกำลังใจที่มอบให้แก่ข้าพเจ้า

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าน้อมระลึกถึงพระคุณของบิดา มารดา ที่คอยช่วยเหลือ สนับสนุน เป็นแรงผลักดัน และให้กำลังใจตั้งแต่เริ่มทำปริญญาานิพนธ์จนเสร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สบดี วรธรรมพิทักษ์

## สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง.....	1
ความมุ่งหมายของการศึกษาวิจัย.....	3
ขอบเขตของการศึกษาวิจัย.....	3
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
ยาง.....	4
ยางสังเคราะห์ (Synthetic Rubber หรือ SR).....	4
ยางธรรมชาติ (Natural Rubber หรือ NR).....	4
ยางพาราไทย.....	5
ยางแห้ง.....	5
ยางแผ่น (Rubber Sheet).....	5
ยางเครพ (Crepe Rubber).....	6
ยางแท่ง (Technically Classified Rubber).....	6
น้ำยาง.....	6
พลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (Biodegradable plastics).....	8
การแบ่งประเภทของพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ.....	9
พอลิแลคติกแอซิด (Polylactic acid หรือ PLA).....	12
การประยุกต์ใช้พอลิแลคไทด์ หรือ PLA.....	15
เครื่องนุ่งห่มและสิ่งทอ.....	16
ด้านการแพทย์.....	16
ด้านเภสัชกรรม.....	16
บรรจุภัณฑ์.....	16
จุลินทรีย์ที่มีความสามารถย่อยสลายพอลิแลคไทด์.....	18
เอนไซม์ที่มีความสามารถย่อยสลายพอลิแลคไทด์.....	21
การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์.....	23

## สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
2 (ต่อ)	
การออกแบบของ Packett และ Burman (Packett and Burman design).....	23
การออกแบบพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology หรือ RSM).....	25
การออกแบบส่วนประสมกลาง (Central Composite Design หรือ CCD) .....	26
การทดลองปรับค่าปัจจัยทีละค่า (One factor at a time method).....	28
3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	30
อุปกรณ์และสารเคมี.....	30
เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง.....	30
สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	31
วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	33
การเตรียมหัวเชื้อ.....	33
การเตรียมและศึกษาคุณสมบัติของหางน้ำยาง.....	33
การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์.....	33
การผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์แบบปลอดเชื้อจากเชื้อ แอสคิโนมายซีท สายพันธุ์ T16-1 โดยการตรึงเซลล์.....	34
การศึกษาการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์แบบ ปลอดเชื้อจาก <i>A. keratinilytica</i> สายพันธุ์ T16-1 โดยการตรึงเซลล์ ในระดับฟลาสก์.....	34
การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย พอลิแลคไทด์แบบปลอดเชื้อ <i>A. keratinilytica</i> สายพันธุ์ T16-1 โดยใช้ การออกแบบการทดลองทางสถิติ.....	34
การวิเคราะห์หาปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย พอลิแลคไทด์ด้วยวิธีการออกแบบของ Packett และ Burman.....	34

## สารบัญ (ต่อ)

บทที่

หน้า

### 3 (ต่อ)

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย พอลิแลคไทด์แบบปลอดเชื้อจาก <i>A. keratinilytica</i> สายพันธุ์ T16-1 ด้วยวิธีการหาพื้นผิวตอบสนอง.....	36
การผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์จาก <i>A. keratinilytica</i> สายพันธุ์ T16-1 โดยการตรึงเซลล์แบบไม่ปลอดเชื้อ (Non-sterile).....	39
การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย พอลิแลคไทด์แบบไม่ปลอดเชื้อจาก <i>A. keratinilytica</i> สายพันธุ์ T16-1 โดยการตรึงเซลล์ในระดับฟลอสก์ด้วยวิธี one factor at a time.....	39
การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย พอลิแลคไทด์แบบไม่ปลอดเชื้อในถังหมักแบบไบปัดกวน ขนาด 2 ลิตร.....	39
ศึกษาการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์แบบ ไม่ปลอดเชื้อภายใต้สภาวะการหมักแบบ Batch.....	39
การนำเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์ที่ผลิตจากหางน้ำยางที่แยกสกิม โดย <i>A. keratinilytica</i> สายพันธุ์ T16-1 ไปใช้ในการย่อยสลาย พอลิแลคไทด์.....	40

### 4 ผลของการทดลอง

การวิเคราะห์องค์ประกอบของหางน้ำยางและหางน้ำยางที่แยกสกิมก่อนหมัก.....	41
การศึกษาการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์แบบปลอดเชื้อจาก หางน้ำยางที่แยกสกิมโดย <i>A. keratinilytica</i> สายพันธุ์ T16-1 ในระดับฟลอสก์.....	42
การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย พอลิแลคไทด์.....	42
การวิเคราะห์หาปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย พอลิแลคไทด์ด้วยวิธีการออกแบบการทดลองด้วย วิธีของ Packett และ Burman.....	43

## สารบัญ (ต่อ)

บทที่

หน้า

### 4 (ต่อ)

การหาจุดที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์แบบปลอดเชื้อจาก <i>A. keratinilytica</i> สายพันธุ์ T16-1 ด้วยวิธีการหาพื้นผิวตอบสนองโดยใช้การออกแบบการทดลองทางสถิติด้วยวิธี central composite design (CCD).....	45
การวิเคราะห์การถดถอย (regression analysis).....	47
การประมาณสัมประสิทธิ์การถดถอยเชิงพหุคูณ.....	47
การทดสอบสมมติฐานของสมการการถดถอยหรือสมการความสัมพันธ์.....	49
การตรวจสอบความเหมาะสมของข้อมูลและสมการที่ใช้ใน	
การวิเคราะห์การถดถอย.....	50
การทดสอบการแจกแจงแบบปกติ (normal distribution).....	50
การทดสอบความคงที่ความแปรปรวนของความคลาดเคลื่อน.....	51
การเปรียบเทียบค่าจริงจากการทดลอง และค่าทำนายของกิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์ที่ผลิตจาก <i>A. keratinilytica</i> สายพันธุ์ T16-1.....	51
การหาจุดที่เหมาะสมของตัวแปรในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์จากหางน้ำย่างที่แยกสกิมด้วย <i>A. keratinilytica</i> สายพันธุ์ T16-1.....	53
การศึกษาการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์แบบไม่ปลอดเชื้อจากหางน้ำย่างที่แยกสกิมโดย <i>A. keratinilytica</i> สายพันธุ์ T16-1 ในระดับพลาสติกด้วยวิธีการรีจเซลล์.....	57
การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์.....	57
การศึกษากุณภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์.....	58

## สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
4 (ต่อ)	
การศึกษา pH เริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ย่อย สลายพอลิแลคไทด์.....	59
การศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ย่อย สลายพอลิแลคไทด์.....	60
การศึกษาการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์แบบไม่ปลดเชื้อจาก หางน้ำยางที่แยกสกิมโดย <i>A. keratinolytica</i> สายพันธุ์ T16-1 ในถังหมัก แบบไบพัคควมขนาด 2 ลิตร ด้วยวิธีการตรึงเซลล์.....	62
การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย พอลิแลคไทด์.....	62
การศึกษาอัตราการกวนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย พอลิแลคไทด์.....	63
การศึกษาอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ย่อย สลายพอลิแลคไทด์.....	64
การศึกษาการย่อยสลายพอลิแลคไทด์.....	65
การวิเคราะห์หางน้ำยางที่แยกสกิมหลังจากการหมัก.....	65
การนำเอนไซม์ไปประยุกต์ใช้ในการย่อยสลายพอลิแลคไทด์.....	65
5 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง.....	67
บรรณานุกรม.....	74
ภาคผนวก.....	82
ภาคผนวก ก .....	83
ภาคผนวก ข .....	85
ภาคผนวก ค.....	87
ประวัติย่อผู้วิจัย.....	95

## บัญชีตาราง

ตาราง	หน้า
1 การรับรองพลาสติกที่ย่อยสลายได้ของแต่ละประเทศ.....	10
2 คุณสมบัติของพอลิแลคไทด์.....	15
3 ตัวอย่างของการประยุกต์ใช้พอลิแลคไทด์.....	17
4 จุลินทรีย์ที่มีความสามารถย่อยสลายพอลิแลคไทด์และวิธีในการตรวจสอบ.....	19
4 จุลินทรีย์ที่มีความสามารถย่อยสลายพอลิแลคไทด์และวิธีในการตรวจสอบ (ต่อ)...	20
5 การออกแบบสิ่งทดลองของ Packett และ Burman.....	24
6 แสดงการกำหนดค่า $\alpha$ ในแต่ละจำนวนปัจจัย.....	28
7 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง.....	30
8 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง.....	31
8 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง (ต่อ).....	32
9 แสดงปัจจัยของการศึกษาการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์โดย เชื้อแอคติโนมัยซีท สายพันธุ์ T16-1.....	35
10 แสดงการคัดกรองปัจจัยโดยการใช้การออกแบบการทดลองของ วิธีการออกแบบของ Packett และ Burman.....	36
11 การกำหนดช่วงของระดับปัจจัยที่ศึกษาโดยวิธีการออกแบบส่วนประสมกลาง.....	37
12 แบบการทดลองของการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์ จาก <i>A. keratinilytica</i> สายพันธุ์ T16-1 โดยวิธีการออกแบบส่วนประสมกลา.....	38
13 การวิเคราะห์น้ำยาง.....	41
14 ผลของตัวแปรตาม (กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์, U/ml) ที่ได้ จากการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Packett และ Burman.....	44
15 การวิเคราะห์ปัจจัย (main effect) ที่มีอิทธิพลต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย พอลิแลคไทด์.....	45
16 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์ที่ผลิตจากการออกแบบ การทดลองโดยใช้วิธี central composite design.....	46
17 ค่าการวิเคราะห์สัมประสิทธิ์ของสมการการถดถอยและค่าสัมประสิทธิ์ การตัดสินใจ.....	47
18 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA <sup>b</sup> ) ของการวิเคราะห์การถดถอยเชิงพหุคูณ...	49

## บัญชีตาราง (ต่อ)

ตาราง	หน้า
19 การเปรียบเทียบค่าจริง และค่าการทำนายกิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลาย พอลิแลคไทด์จากหางน้ำยางที่แยกสกิมด้วย <i>A. keratinolytica</i> สายพันธุ์ T16-1.....	52
20 การวิเคราะห์เปรียบเทียบหางน้ำยางที่แยกสกิมก่อนหมักและหลังหมัก.....	66
21 เปรียบเทียบผลกิจกรรมเอนไซม์ที่ได้จากการผลิตด้วยวิธีการต่างๆ.....	67
22 ค่าการเจือจางสารละลายโปรตีนมาตรฐาน.....	89
23 ค่าการเจือจางสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน.....	91
24 ค่าการเจือจางสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน.....	93






## บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 แผนภาพการผลิตน้ำยางข้น.....	7
2 แผนภาพการจัดจำแนกประเภทของพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ.....	11
3 อธิบายถึงการผลิตกรดแลคติก.....	13
4 โครงสร้างของกรดแลคติก.....	13
5 วิธีการสังเคราะห์ PLA ให้มีน้ำหนักโมเลกุลสูง.....	14
6 โครงสร้างของแลคไทด์.....	14
7 โครงสร้างทางเคมีของ (a) กรดแลคติกซึ่งเป็นหน่วยมอนอเมอร์ของ พอลิแลคไทด์ และ (b) L-alanine ซึ่งเป็นหน่วยของ silk fibroin.....	20
8 แผนภาพของการเหนียวน้ำ การผลิต และการย่อยสลายพอลิแลคไทด์ ของเอนไซม์.....	21
9 รูปแบบพื้นที่ผิวตอบสนองแบบสามมิติของกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลาย พอลิแลคไทด์มีค่า pH และอุณหภูมิเป็นปัจจัยในการศึกษา.....	26
10 การออกแบบส่วนประสมกลาง.....	27
11 กราฟแสดงผลของระยะเวลาในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์ แบบปลอดเชื้อจากหางน้ำยางที่แยกสกิมด้วย <i>A. keratinolytica</i> สายพันธุ์ T16-1 ระดับพลาสติก.....	42
12 normal probability plot ของค่าความคลาดเคลื่อน.....	50
13 scatter plot ของค่าความคลาดเคลื่อนกับค่าทำนาย.....	51
14 (ก) พื้นผิวตอบสนอง (response surface plot) และ (ข) คอนทัวร์พล็อต (contour plot) ระหว่าง ความเข้มข้นของ $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ กับ เจลาตินโดยมี ตัวแปรตามเป็นกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์ที่ผลิตจาก หางน้ำยางที่แยกสกิมด้วย <i>A. keratinolytica</i> สายพันธุ์ T16-1 และกำหนดให้มีค่า pH เริ่มต้นเป็น 7.....	54

## บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ (ต่อ)	หน้า
15 (ก) พื้นผิวตอบสนอง (response surface plot) และ (ข) คอนทัวร์พล็อต (contour plot) ระหว่างค่า pH กับ ความเข้มข้นเจลาติน โดยมีตัวแปรตามเป็นกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์ที่ผลิตจากหางน้ำยางที่แยกสกิมด้วย <i>A. keratinolytica</i> สายพันธุ์ T16-1 และกำหนดให้มีค่าความเข้มข้นของ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ เป็น 0.2 กรัมต่อลิตร.....	55
16 (ก) พื้นผิวตอบสนอง (response surface plot) และ (ข) คอนทัวร์พล็อต (contour plot) ระหว่างค่า pH กับ ความเข้มข้น $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ โดยมีตัวแปรตามเป็นกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์ที่ผลิตจากหางน้ำยางที่แยกสกิมด้วย <i>A. keratinolytica</i> สายพันธุ์ T16-1 และกำหนดให้มีค่าความเข้มข้นของเจลาติน เป็น 2.38 กรัมต่อลิตร.....	56
17 ระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์แบบไม่ปลดเชื้อจากหางน้ำยางที่แยกสกิมโดย <i>A. keratinolytica</i> สายพันธุ์ T16-1 ในระดับพลาสติกด้วยวิธีการตรึงเซลล์.....	58
18 ผลของอุณหภูมิในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์แบบไม่ปลดเชื้อจากหางน้ำยางที่แยกสกิมโดย <i>A. keratinolytica</i> สายพันธุ์ T16-1 ในระดับพลาสติก ด้วยวิธีการตรึงเซลล์ โดยกำหนดให้ $\blacklozenge$ , 40 °C ; $\blacksquare$ , 45°C ; $\blacktriangle$ , 50°C และ $\blacklozenge$ , 55°C ตามลำดับ.....	59
19 ผลของค่า pH ในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์แบบไม่ปลดเชื้อจากหางน้ำยางที่แยกสกิมโดย <i>A. keratinolytica</i> สายพันธุ์ T16-1 ในระดับพลาสติกด้วยวิธีการตรึงเซลล์ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง โดยตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กแสดงถึงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี LSD ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05.....	60

## บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ (ต่อ)	หน้า
20 ผลของแหล่งไนโตรเจนในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์แบบไม่ปลอดเชื้อจากหางน้ำยางที่แยกสกิมโดย <i>A. keratinolytica</i> สายพันธุ์ T16-1 ในระดับฟลาस्क ด้วยวิธีการตรึงเซลล์ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง และมีค่า pH เริ่มต้นเป็น 7 โดยตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กแสดงถึงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี LSD ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05.....	61
21 ผลของระยะเวลาในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์แบบไม่ปลอดเชื้อจากหางน้ำยางที่แยกสกิมด้วย <i>A. keratinolytica</i> สายพันธุ์ T16-1 ในถังหมักแบบไบพัดกวนขนาด 2 ลิตร ด้วยวิธีการตรึงเซลล์ โดยใช้อัตราการกวนเท่ากับ 100 rpm ไม่มีการให้อากาศ และควบคุมอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส....	62
22 ผลของอัตราการกวนในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์แบบไม่ปลอดเชื้อจากหางน้ำยางที่แยกสกิมด้วย <i>A. keratinolytica</i> สายพันธุ์ T16-1 ในถังหมักแบบไบพัดกวนขนาด 2 ลิตร ด้วยวิธีการตรึงเซลล์ โดยไม่มีการให้อากาศ ควบคุมอุณหภูมิที่ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งกำหนดให้  , 100;  , 150 และ  , 200 rpm ตามลำดับ.....	63
23 ผลของอัตราการให้อากาศในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์แบบไม่ปลอดเชื้อจากหางน้ำยางที่แยกสกิมด้วย <i>A. keratinolytica</i> สายพันธุ์ T16-1 ในถังหมักแบบไบพัดกวนขนาด 2 ลิตร ด้วยวิธีการตรึงเซลล์ อัตราการกวน 100 rpm ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส.....	64
24 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 770 นาโนเมตรกับปริมาณโปรตีนมาตรฐาน.....	89
25 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มาตรฐาน.....	92
26 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มาตรฐาน.....	94

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ภูมิหลัง

ในปัจจุบันประเทศไทยปลูกต้นยางพาราเป็นจำนวนมาก ส่งผลให้ประเทศไทยมีการส่งออกผลิตภัณฑ์ยางในรูปแบบต่างๆ เช่น ยางแผ่นรมควัน ยางก้อนอัดแท่ง และน้ำยางข้น เป็นต้น โดยการผลิตน้ำยางข้นนั้นเป็นการนำน้ำยางดิบมาผ่านกระบวนการปั่นเหวี่ยง (centrifugation) ผลที่ได้คือน้ำยางข้น และหางน้ำยาง (skim latex) ซึ่งเกิดเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้ขึ้น โดยจะมีเนื้อยางมากน้อยขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพของเครื่องปั่นเหวี่ยง แต่โดยทั่วไปจะมีปริมาณเนื้อยางอยู่ที่ 8% ส่วนที่เหลือเป็นน้ำซึ่งมีส่วนผสมของน้ำตาล โปรตีน และแอมโมเนียในปริมาณสูง จากนั้นนำหางน้ำยางที่ได้เติมด้วยกรดซัลฟิวริกเพื่อให้เนื้อยางจับตัวกัน แล้วแปรสภาพเป็นยางskim crepe โดยหางน้ำยางที่ได้จะปราศจากตะกอนยางซึ่งเรียกว่า หางน้ำยางที่แยกskim (non-rubber skim latex หรือ serum) นั้นมีสถานะเป็นกรด (pH 2.33-5.05) มีค่า Biological Oxygen Demand (BOD) อยู่ในช่วง 570 - 13,463 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่า Chemical Oxygen Demand (COD) ระหว่าง 672 - 23,300 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าของแข็งจมตัวได้ (Settleable Solids หรือ SS) ในช่วง 54 - 1,478 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่า Total Kjeldahl Nitrogen (TKN) อยู่ในช่วง 70 - 1,358 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่า Total Protein (TP) ระหว่าง 2.66 - 5.52 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีค่าซัลเฟต อยู่ในช่วง 16.3 - 1,085 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังนั้นจะเห็นได้ว่าหางน้ำยางที่แยกskimนั้นมีสารอาหารที่มากเพียงพอที่มีคุณสมบัติในการนำมาเป็นอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ได้ เพื่อเพิ่มมูลค่าของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมการเกษตร อีกทั้งยังเป็นการรักษาสภาพแวดล้อมให้โดยการลดการปล่อยน้ำเสียลงสู่ธรรมชาติอีกทางหนึ่ง โดยในงานวิจัยนี้มีความสนใจที่จะนำหางน้ำยางที่แยกskimมาผลิตเอนไซม์ย่อยพลาสติกชนิดพอลิแลคไทด์

พลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพนั้นมีหลายชนิด เช่น พอลิเอทิลีนอดิเพต (Poly-Ethylene Adipate หรือ PEA) พอลิบิวทิลีนซัคซิเนต (Poly-Butylene Succinate หรือ PBS) พอลิ-3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต (Poly-3-Hydroxybutyrate หรือ PHB) และพอลิแลคไทด์ (Poly-lactide หรือ PLA) เป็นต้น (Tokiwa; et al. 2009: 3722-3742) พลาสติกที่นำมาใช้ในงานวิจัยนี้เป็นชนิดพอลิแลคไทด์ซึ่งประกอบด้วยมอโนเมอร์ที่เป็นกรดแลคติก โดยกรดแลคติกสามารถผลิตได้จากการหมักผลิตผลทางการเกษตร เช่น มันสำปะหลัง ข้าว ข้าวโพด และ ช้างข้าวโพด เป็นต้น (Sukkhum; & Kitpreechavanich. 2011: 587-604) ซึ่งเป็นวัสดุหมุนเวียนทางการเกษตร ในการเปลี่ยนกรดแลคติกเป็นพอลิแลคไทด์ซึ่งเกิดจากกระบวนการเกิดพอลิเมอร์ (Polymerization) ในเชิงพาณิชย์พอลิแลคไทด์ สามารถผลิตเป็น

ฟิล์มสำหรับหุ้มอาหาร ผลิตภัณฑ์บรรจุอาหาร เช่น ถ้วยใส่โยเกิร์ต จาน ถ้วย แก้ว ที่ใช้ครั้งเดียวทิ้ง (Jamshidian; et al. 2010: 552-571)

จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยพอลิแลคไทด์ได้มีหลากหลายชนิด โดยพบว่า แอคติโนมัยซีท (Actinomycetes) เป็นแบคทีเรียที่มีรายงานว่ามีศักยภาพในการย่อยสลายพอลิแลคไทด์ได้ดี (Sukkhum; & Kitpreechavanich. 2011: 587-604) เช่น *Amycolatopsis* สายพันธุ์ HT-32 สามารถย่อยฟิล์มพอลิแลคไทด์หนัก 60 มิลลิกรัมจาก 100 มิลลิกรัม ภายในเวลา 14 วัน (Tokiwaga; & Jarerat. 2004: 771-777) ซึ่งจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในการทำงานวิจัยนี้คือ *Actinomadura keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1 ซึ่งเป็นเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพลาสติกชนิดพอลิแลคไทด์ (Poly-lactide หรือ PLA) ได้ดี อีกทั้งยังสามารถทำงานได้มีประสิทธิภาพที่อุณหภูมิสูง โดยมีรายงานว่า *A. keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1 สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์ได้สูง ซึ่งในระดับพลาสติกสามารถผลิตเอนไซม์ได้ 44.6 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ในระดับถังหมักแบบอากาศลอยตัวสามารถผลิตเอนไซม์ได้ 150 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (Sukkhum; & Kitpreechavanich. 2011: 587-604) ซึ่งเอนไซม์ที่ผลิตได้นี้สามารถนำไปใช้ในการย่อยสลายพอลิแลคไทด์ให้เป็นกรดแลคติกและนำกรดแลคติกที่ได้ไปใช้ในการ recycle เพื่อสังเคราะห์เป็นพลาสติกชนิดพอลิแลคไทด์ใหม่อีกครั้งซึ่งนอกจากจะเป็นการลดการใช้ขยะพลาสติกแล้ว การผลิตเอนไซม์โดยใช้หางน้ำยางที่แยกสกิมในการหมักแบบไม่ปลอดเชื้อ เป็นการลดต้นทุนการผลิตและจำลองการนำของเหลือทิ้งทางการเกษตรไปใช้ประโยชน์จริงในธรรมชาติ อีกทั้งยังสามารถเพิ่มมูลค่าของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมและการเกษตรได้อีกทางหนึ่งด้วย

## 1.2 ความมุ่งหมายของการศึกษาวิจัย

เพื่อศึกษาการนำหางน้ำยางที่แยกสกิมมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์โดยใช้เซลล์ตรึงจาก *A. keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1 โดยวิธีปลอดเชื้อ (sterile) และไม่ปลอดเชื้อ (non-sterile)

## 1.3 ขอบเขตของการศึกษาวิจัย

1.3.1 คัดเลือกปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์โดย *A. keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1 จากหางน้ำยางที่แยกสกิมในระดับฟลาस्कแบบปลอดเชื้อ

1.3.2 การศึกษาจุดที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์โดย *A. keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1 จากหางน้ำยางที่แยกสกิมในระดับฟลาस्कแบบปลอดเชื้อ

1.3.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์โดยเซลล์ตรึง *A. keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1 จากหางน้ำยางที่แยกสกิมในระดับฟลาस्कแบบไม่ปลอดเชื้อ

1.3.4 การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์โดยเซลล์ตรึง *A. keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1 จากหางน้ำยางที่แยกสกิมในระดับถังหมักแบบไบปัดกวนขนาด 2 ลิตรแบบไม่ปลอดเชื้อ

1.3.5 การศึกษาการย่อยสลายพอลิแลคไทด์ด้วยเอนไซม์จาก *A. keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1 ที่ผลิตจากหางน้ำยางที่แยกสกิม

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 ยาง

ยาง เป็นพอลิเมอร์ชนิดหนึ่งที่มีมวลโมเลกุลขนาดใหญ่ แบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ ได้แก่ ยางสังเคราะห์ (Synthetic Rubber หรือ SR) และยางธรรมชาติ (Natural Rubber หรือ NR) ด้วยคุณสมบัติของยางที่เป็นเอกลักษณ์พิเศษ คือความยืดหยุ่น (elasticity) ด้วยคุณสมบัติดังกล่าวนี้ ทำให้ยางมีความสำคัญในการเป็นวัตถุดิบให้กับผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น ยางนอกและยางในรถยนต์ รองเท้าผ้าใบ ยางรัดของ ถุงมือยางทางการแพทย์ และถุงยางอนามัย เป็นต้น (วิชิต สุวรรณปรีชา. 2530.)

##### 2.1.1. ยางสังเคราะห์ (Synthetic Rubber หรือ SR)

ยางสังเคราะห์ถูกสร้างขึ้นเพื่อทดแทนยางธรรมชาติที่ขาดแคลนสมัยสงคราม และความต้องการยางที่มีคุณสมบัติพิเศษที่เพิ่มขึ้น อาทิ ความทนทานต่อน้ำมัน สารเคมี และความร้อนสูงๆ เป็นต้น ยางสังเคราะห์เกิดจากนำมอนอเมอร์ที่เป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเลียม มาต่อกันให้ได้เป็นพอลิเมอร์ โดยใช้ปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชัน (polymerization) ตัวอย่างเช่น ยางพอลิบิวตาไดอีน (polybutadiene หรือ BR) ยางสไตรีนบิวตาไดอีน (styrene-butadiene rubber หรือ SBR) เป็นต้น (พงษ์ธร แซ่อูย. 2548)

##### 2.1.2. ยางธรรมชาติ (Natural Rubber หรือ NR)

ยางธรรมชาติ หรือยางพารา เป็นยางดิบส่วนใหญ่ที่ได้จากต้นยางพาราสายพันธุ์ *Hevea brasiliensis* ซึ่งเป็นต้นไม้ป่าบนฝั่งแม่น้ำอเมซอน เมืองพารา ประเทศบราซิลซึ่งเป็นศูนย์กลางในการปลูกและจัดจำหน่าย โดยองค์การมาตรฐานระหว่างประเทศ (International Organization for Standardization หรือ ISO) ได้นิยามว่า ยางธรรมชาติเป็นยางที่ได้จากต้น *H. brasiliensis* นั้นหมายถึง ยางพารา (Natural Rubber: cis 1, 4- polyisoprene) (พงษ์ธร แซ่อูย. 2548; วราภรณ์ ขจรไชยกูล. 2549)

## 2.2 ยางพาราไทย

ยางพาราในประเทศไทยนั้นมีการริเริ่มปลูกกันในปี พ.ศ. 2444 โดยพระยาสถลสถานพิทักษ์ ได้นำพันธุ์กล้ายางมาจากประเทศอินโดนีเซีย และในปี พ.ศ. 2454 หลวงราชไมตรี (ปุม ปุณศรี) ได้นำพันธุ์ยางไปปลูกที่จังหวัดจันทบุรี (วิจิต สุวรรณปรีชา. 2530.) ส่งผลให้มีการปลูกยางกันอย่างแพร่หลายไปทั่วประเทศ โดยในปี พ.ศ. 2555 มีพื้นที่การปลูกยางมากถึง 19,272,941 ไร่ (กระทรวงการเกษตรและสหกรณ์. 2555)

ในปัจจุบันยางพาราเป็นผลิตผลทางการเกษตรส่งออกเป็นอันดับต้นๆ ของประเทศไทยโดยในปี พ.ศ. 2555 มีการส่งออกยางธรรมชาติถึง 2,998,896.904 เมตริกตัน คิดเป็นมูลค่าการส่งออกถึง 270,153.82 ล้านบาท (สำนักงานปลัดกระทรวงพาณิชย์. 2558: online) ซึ่งถือเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจอีกชนิดหนึ่ง นอกเหนือจากละหุ่ง (*Ricinus*) มันสำปะหลัง (*Manihot*) และ guayule (*Parthenium argentatum*) เป็นต้น (วารสารณ์ ขจรไชยกูล. 2559) โดยยางธรรมชาติที่เป็นสินค้าส่งออกนั้น แบ่งได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ ได้แก่ ยางแห้งและน้ำยาง

### 2.2.1. ยางแห้ง (Dry Rubber)

ยางแห้งเกิดจากการนำน้ำยางสดมาตกตะกอนด้วยกรด ซึ่งนิยมใช้กรดฟอร์มิก และกรดอะซิติก เนื่องจากเป็นกรดอ่อนและไม่ทำให้ยางเสียคุณภาพ อีกทั้งยังเป็นกรดที่ไม่ก่อให้เกิดอันตรายรุนแรงต่อสุขภาพมนุษย์ แต่อย่างไรก็ตามการตกตะกอนหาน้ำยางให้เป็นยางสกีม ควรใช้กรดซัลฟูริก และทำการกำจัดความชื้นออกจากเนื้อยางหลังจากตกตะกอนแล้ว เพื่อป้องกันการเกิดเชื้อราจากยาง (พงษ์ธร แซ่ฮุย. 2548; วารสารณ์ ขจรไชยกูล. 2559; วิจิต สุวรรณปรีชา. 2530?) ยางแห้งสามารถแบ่งได้ดังนี้

#### 2.2.1.1 ยางแผ่น (Rubber Sheet)

ยางแผ่นมี 2 แบบคือ ยางแผ่นธรรมชาติและยางแผ่นรมควัน โดยกรรมวิธีการทำยางแผ่นนั้นทำโดยการเจือจางน้ำยางดิบให้มีเนื้อยางจาก 30% ให้เหลือ 12 – 18% หลังจากนั้นเติมกรดเพื่อทำให้เนื้อยางจับตัวกันและแยกออกจากน้ำ จากนั้นน้ำยางมาผ่านเครื่องรีด และทำการไล่ความชื้นออกโดยสามารถทำได้ 2 แบบคือ นำยางแผ่นไปตากแดด หรือผึ่งในอากาศร้อน และนำไปรมควันที่อุณหภูมิ 60 – 70 องศาเซลเซียส จนกว่าแผ่นยางจะแห้ง (พงษ์ธร แซ่ฮุย. 2548)

### 2.2.1.2 ยางเครฟ (Crepe Rubber)

ยางเครฟเป็นยางที่ผ่านกระบวนการรีดด้วยเครื่องเครฟ (creping machine) โดยยางที่จะนำมาทำยางเครฟมาจากน้ำยางสดหรือยางที่เริ่มจับตัวกันเป็นก้อนแล้ว อาทิ ยางก้นถ้วย เศษยางที่ติดบนเปลือกไม้ เป็นต้น ซึ่งยางเครฟที่ได้จะมีคุณภาพแตกต่างกันไปตามปริมาณของสิ่งเจือปนภายในเนื้อยาง โดยยางเครฟขาวจัดเป็นยางเครฟที่มีคุณภาพสูง (พงษ์ธร แซ่ฮุย. 2548; วราภรณ์ ขจรไชยกูล. 2549)

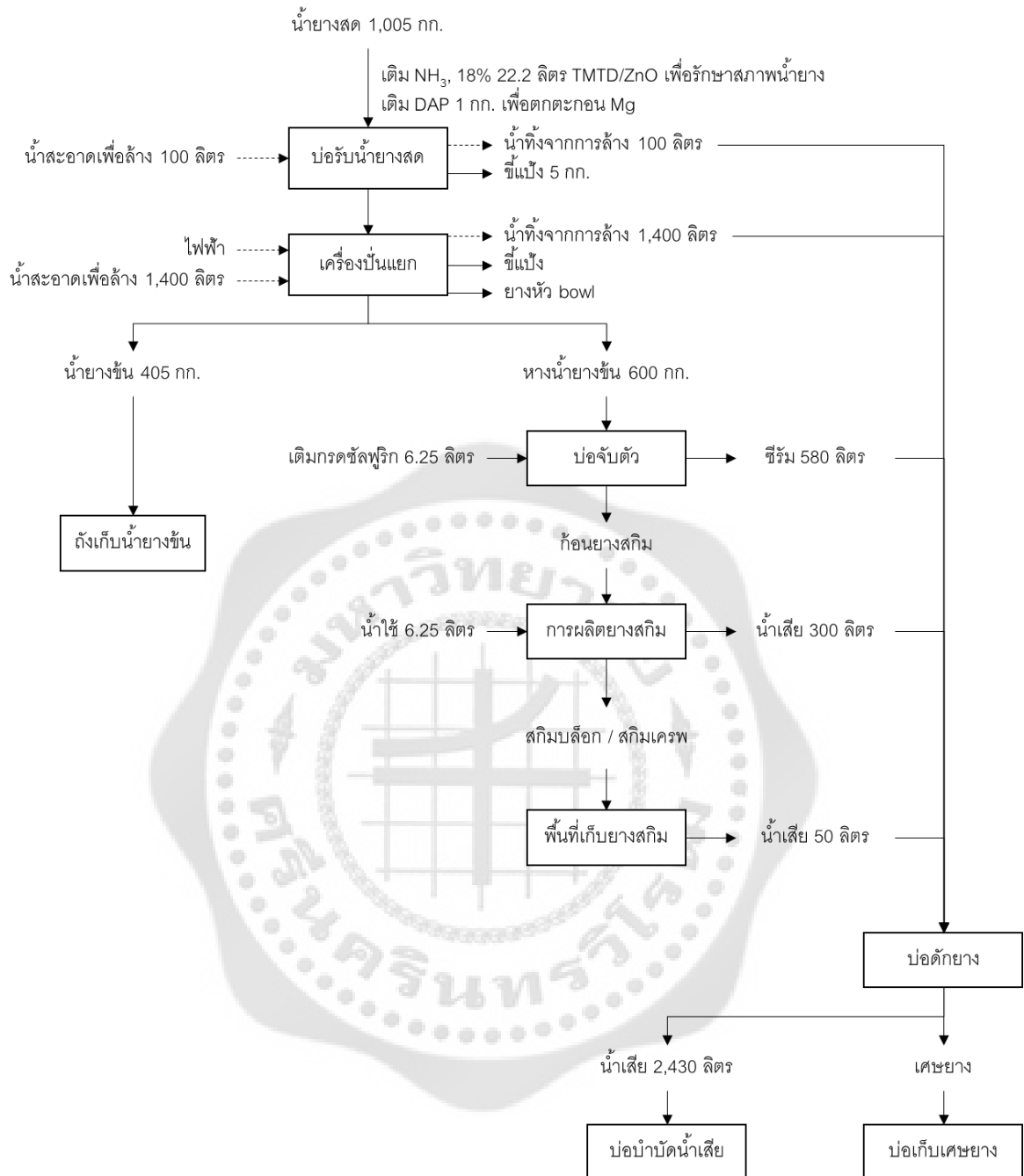
### 2.2.1.3 ยางแท่ง (Technically Classified Rubber)

ยางแท่งเป็นยางที่ถูกรับใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตภัณฑ์ยางอย่างแพร่หลายในปัจจุบันเนื่องด้วยยางแท่งมีคุณภาพอย่างสม่ำเสมอกว่ายางแผ่นและยางเครฟ อีกทั้งมีการรับรองและผ่านการทดสอบคุณภาพตามหลักวิชาการ ต่างจากยางแผ่นและยางเครฟที่ใช้สายตาในการตรวจสอบคุณภาพของยาง โดยประเทศไทยได้มีกำหนดมาตรฐานออกมาแล้วให้ชื่อยางแท่งว่า “Standard Thai Rubber หรือ STR” (วราภรณ์ ขจรไชยกูล. 2549)

### 2.2.2. น้ำยาง

น้ำยางได้จากการกรีดยางพาราโดยตรง น้ำยางสดส่วนมากมีน้ำเป็นองค์ประกอบค่อนข้างสูงโดยมีเนื้อยางเพียง 20 – 45% แตกต่างกันไปตามสภาวะที่ปลูกต้นยางพารา ดังนั้นน้ำยางที่ได้จึงไม่เหมาะที่จะทำการขนส่งเนื่องจากสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายในการขนส่ง ตลอดจนการนำไปผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ จากเหตุผลข้างต้นจึงมีการผลิตน้ำยางข้น (Concentrated Latex) โดยการนำยางสดมาผ่านกระบวนการปั่นเหวี่ยงทำให้มีส่วนของเนื้อยางเพิ่มขึ้นเป็น 60% เหมาะแก่การนำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ที่หลากหลาย อาทิ กุ้งมือ ลูกโป่ง และถุงยางอนามัย เป็นต้น โดยในน้ำยางสดนั้นไม่ได้มีเพียงเนื้อยางเท่านั้นยังมีส่วนประกอบของสารอินทรีย์อีกมากมาย เช่น โพรตีน และฟอสโฟลิปิด (phospholipid) ซึ่งเป็นอาหารอย่างดีของจุลินทรีย์ (พงษ์ธร แซ่ฮุย. 2548) จึงต้องมีการเติมแอมโมเนียรวมไปถึงอาจเพิ่มสารอื่นๆ เช่น Thiurum Disulphohide (TMTD) และ Zinc Oxide หรือกรดบอริก เป็นต้น (วราภรณ์ ขจรไชยกูล. 2557) เพื่อเป็นการป้องกันไม่ให้จุลินทรีย์ และลดการเน่าเสียที่ส่งกลิ่นเหม็นอีกด้วย

ในการผลิตน้ำยางข้นเริ่มโดยนำน้ำยางสดมาปั่นเหวี่ยงจากนั้นจะได้หางน้ำยาง และเมื่อนำหางน้ำยางมาเติมด้วยกรดซัลฟูริกจะเกิดการจับตัวกันของเนื้อยางได้เป็นกลายเป็นสกินเครฟ (Skim Crepe) หรือ สกินบล็อก (Skim block) ดังภาพประกอบ 1 ทั้งนี้จะเห็นได้ว่า ในระหว่างกระบวนการผลิตยางสกินที่เกิดขึ้นนั้นจะมีส่วนของซีรัมที่เป็นน้ำเสียที่เกิดขึ้น โดยในซีรัมที่เกิดขึ้นนี้มีสารอาหารที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงจุลินทรีย์ ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการผลิตเอนไซม์ด้วยเชื้อจุลินทรีย์ได้ เพื่อเพิ่มมูลค่าของซีรัมที่จะกลายเป็นน้ำเสีย



ภาพประกอบ 1 แผนภาพการผลิตน้ำยาสข้น

ที่มา : กรมควบคุมมลพิษ. (2548). แนวปฏิบัติที่ดีด้านการป้องกันและลดมลพิษอุตสาหกรรม  
น้ำยาสข้น. หน้า 3

## 2.3 พลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (Biodegradable Plastics)

ในปัจจุบันพลาสติกถูกนำไปประยุกต์ใช้ได้อย่างหลากหลายในชีวิตประจำวัน และในด้านอุตสาหกรรม เช่น แก้วน้ำ ฉนวน ฟิล์ม และถุงพลาสติก เป็นต้น ทำให้มีการใช้พลาสติกเป็นปริมาณมากและอย่างกว้างขวาง ส่งผลให้เกิดขยะพลาสติกเป็นจำนวนมากและการกำจัดขยะเหล่านี้ยังก่อให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อมอีกทางหนึ่ง เนื่องด้วยคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของพลาสติกที่มีความยืดหยุ่น ความแข็งแรง ทนต่อกรดและเบส อีกทั้งยังทนต่อการย่อยสลายของจุลินทรีย์ในธรรมชาติอีกด้วย (จุฬากานต์ บุญมี, 2555: 15-19) จึงมีการพัฒนาเป็นพลาสติกที่มีความสามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (Biodegradable Plastics) หรือ พลาสติกชีวภาพ (Bio-plastics) และในหลายๆ ประเทศหันมานิยมและเลือกใช้ถุงพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพเพิ่มสูงขึ้น จึงมีการกำหนดหรือการรับรองเพื่อให้ผู้ใช้รับทราบว่า พลาสติกที่ใช้อยู่นั้นมีความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพ โดยการรับรองนั้นสรุปไว้ดังตาราง 1

พลาสติกที่มีความสามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพมีคำนิยามที่หลากหลาย โดยแต่ละหน่วยงานให้คำนิยามดังนี้

The American Society for Testing and Standardization หรือ ASTM ให้คำนิยามตาม ASTM D6400-99 ว่า “พลาสติกที่มีความสามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพเป็นพลาสติกที่ถูกละลายด้วยกระบวนการของจุลินทรีย์ในธรรมชาติ เช่น แบคทีเรีย รา และสาหร่าย” (Mark, 2007)

The International Organization for Standardization หรือ ISO ให้คำนิยามตาม ISO 472: 1988 (1988) ว่า “พลาสติกที่มีความสามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพเป็นพลาสติกที่ได้รับการออกแบบให้มีการเปลี่ยนโครงสร้างทางเคมีภายใต้สภาวะที่มีความจำเพาะ โดยส่งผลให้พลาสติกมีการเสียดังคุณสมบัติบางประการ ซึ่งอาจมีวิธีการวัดคุณสมบัติได้ด้วยหลายหลายวิธี โดยวิธีการทดสอบมาตรฐานของพลาสติกและระยะเวลาของการใช้งานของพลาสติก ซึ่งแต่ละวิธีจะแตกต่างกันตามแต่ชนิดของพลาสติก โดยผลของการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีนี้เกิดจากกระบวนการของจุลินทรีย์” (Agrotech international, 2015: Online)

The German Deutsches Institut für Normung หรือ DIN ให้คำนิยามตาม DIN FNK 103.2 (1993) ว่า “พลาสติกที่เรียกว่าสามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพนั้น พลาสติกต้องผ่านกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพได้อย่างสมบูรณ์กลายเป็นสารประกอบอินทรีย์ โดยสภาวะแวดล้อมและอัตราการย่อยสลายทางชีวภาพถูกตรวจวัดด้วยวิธีทดสอบ” (Agrotech international, 2015: Online)

The European Committee for Standardization หรือ CEN ให้คำนิยามตาม CEN (1993) ว่า “วัสดุที่ย่อยสลายได้จะถูกละลายได้ด้วยกระบวนการของจุลินทรีย์ และวัสดุที่ถูกละลาย

สลายแล้วจะถูกเปลี่ยนไปเป็น น้ำ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และ/หรือ มีเทน และชีวมวล” (Agrotech international. 2015: Online)

The Biodegradable Plastics Society of Japan หรือ BPS ให้คำนิยามตาม BPS Japan (1994) ว่า “พลาสติกที่มีความสามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพเป็นวัสดุที่เป็นพอลิเมอร์ซึ่งจะถูกเป็นให้เป็นสารประกอบที่มีน้ำหนักโมเลกุลที่เล็กลงอย่างน้อย 1 ชั้น ในกระบวนการย่อยสลายนั้นเป็นกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการเมทาบอลิซึมของจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ”(Agrotech international. 2015: Online)

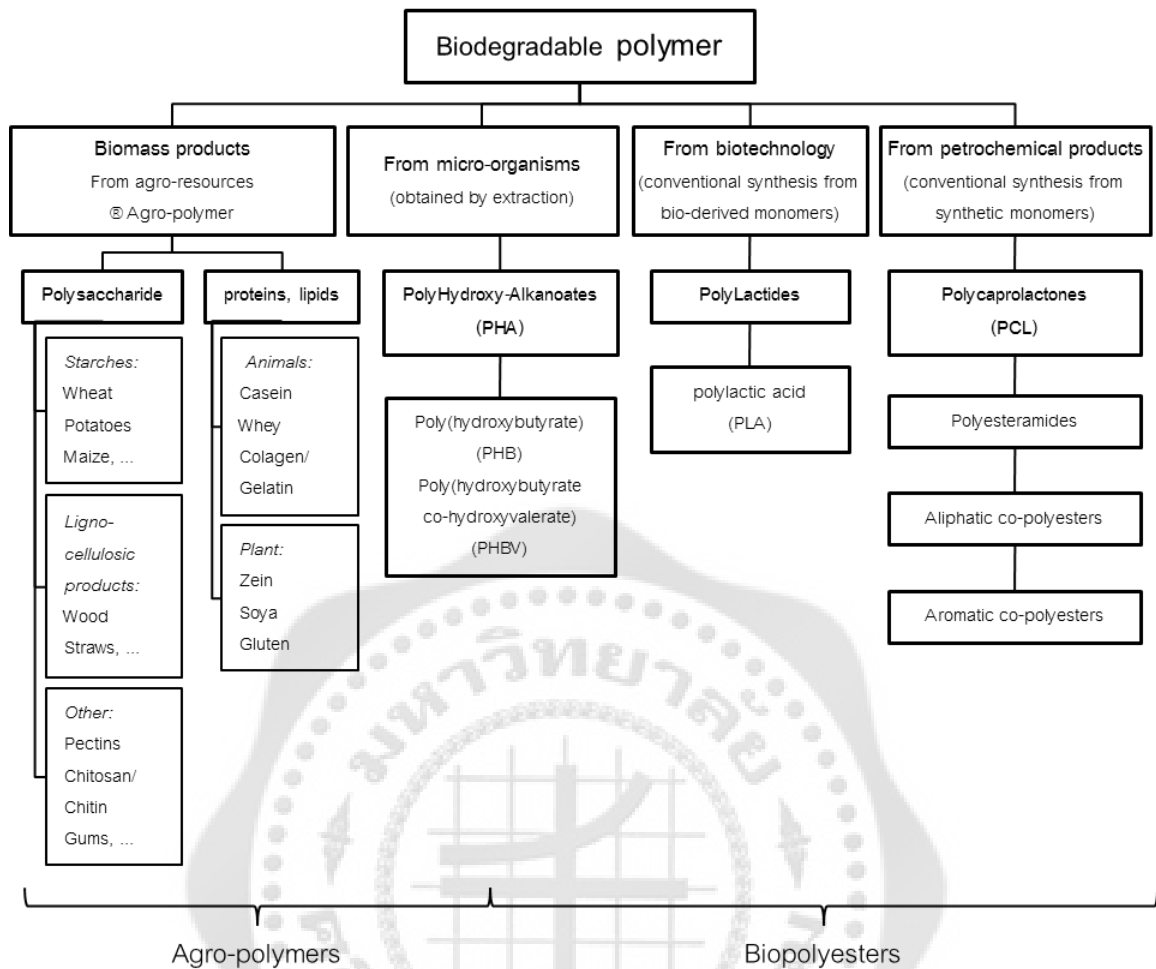
## 2.4 การแบ่งประเภทของพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ

พลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพเป็นพวกที่มีพื้นฐานจากชีวภาพ (biobase) หรือ สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (Biodegradation) หรือมีคุณสมบัติทั้งสอง โดยพลาสติกชีวภาพที่มีพื้นฐานจากชีวภาพ จะทำขึ้นจากวัสดุชีวมวล (Biomass) เช่น ข้าวโพด อ้อย หรือเซลลูโลส เป็นต้น โดยการย่อยสลายได้ทางชีวภาพนั้นเป็นกระบวนการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของพลาสติกทั้งทางเคมีและทางกายภาพจากปัจจัยต่างๆ ภายในสิ่งแวดล้อม และจะถูกดูดซึมและย่อยสลายโดยกระบวนการของจุลินทรีย์ให้กลายเป็นองค์ประกอบทางธรรมชาติ ได้แก่ น้ำ คาร์บอนไดออกไซด์ และชีวมวล (European bioplastics. 2015: Online) ซึ่งแบ่งพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพออกเป็น 4 กลุ่มตามแหล่งที่มาของมอนอเมอร์คือ ผลผลิตทางการเกษตร จากการสกัดจากจุลินทรีย์ จากมอนอเมอร์ที่ได้จากกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพและจากสารประกอบที่เกิดขึ้นจากมอนอเมอร์ของปิโตรเลียม หรือจะแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ (1) พอลิเมอร์จากการเกษตร (Agro-polymer) และ (2) พอลิเอสเตอร์ทางชีวภาพ (Biopolyester) ซึ่งแสดงได้จากภาพประกอบ 2 ส่วนใหญ่แล้วมักเป็นพลาสติกประเภทไบโอพอลิเอสเตอร์ เช่น พอลิไฮดรอกซีแอลคานอยต์ (Polyhydroxy-alkanoates หรือ PHA), พอลิคาโพลแลคโตน (Polycaprolactones หรือ PCL) และ พอลิแลคติกแอซิด (Polylactic acid หรือ PLA) เป็นต้น

ตาราง 1 การรับรองพลาสติกที่ย่อยสลายได้ของแต่ละประเทศ

ตัวการรับรอง	มาตรฐานอ้างอิง	สัญลักษณ์
Australia Bioplastics Association (Australia) www.bioplastics.org.au	EN 13432: 2000	
Association for Organics Recycling (UK) www.organics-recycling.org.uk	EN 13432: 2000	
Polish Packaging Research and Development Centre (Poland) www.cobro.org.pl/en	EN 13432: 2000	
DIN Certco (Germany) www.dincertco.de/en/	EN 13432: 2000	
Keurmerkinstituut (the Netherlands) www.keurmerk.nl	EN 13432: 2000	
Vincotte (Belgium) www.okcompost.be	EN 13432: 2000	
Jätelaito-syhdistys (Finland) www.jly.fi	EN 13432: 2000	
Certiquality/CIC (Italy) www.compostabile.com	EN 13432: 2000	
Biodegradable Products Institute (USA) www.bpiworld.org	ASTM D 6400-04	
Bureau de normalisation du Que'bec (Canada) www.bnq.qc.ca	BNQ 9011-911/2007	
Japan BioPlastics Association (Japan) www.jbpaweb.net	Green Plastic Certification System	  

ที่มา : Sin; Rahmat; & Rahman. (2013). Overview of Poly(lactic Acid). In *Handbook of Biopolymers and Biodegradable Plastics*. pp. 21-22.



ภาพประกอบ 2 แผนภาพการจัดจำแนกประเภทของพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ

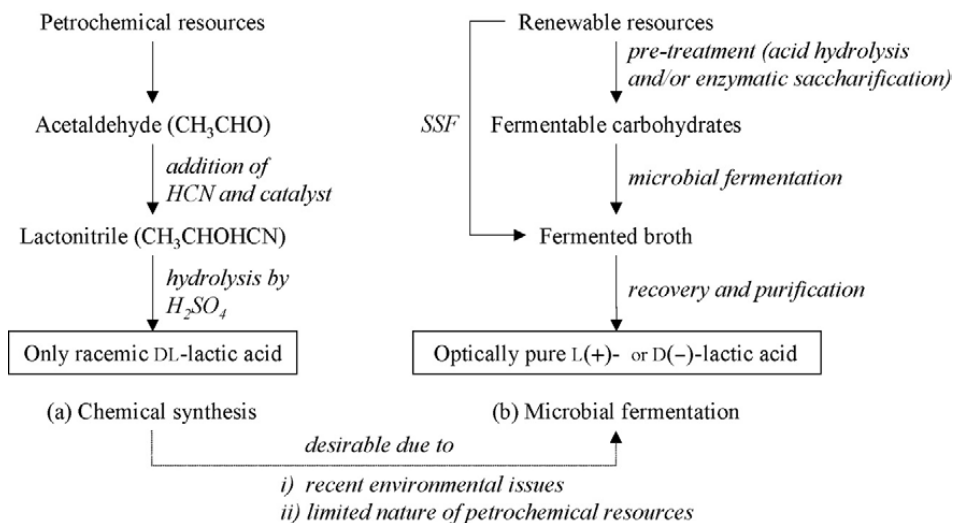
ที่มา : Avérous. (2013). Synthesis, Properties, Environmental and Biomedical Applications of Polylactic Acid. In *Handbook of Biopolymers and Biodegradable Plastics*. p. 172.

## 2.5 พอลิแลคติกแอซิด (Polylactic acid หรือ PLA)

พอลิแลคติกแอซิดหรือพอลิแลคไทด์ (PLA) เป็นพอลิเมอร์ชนิดพอลิเอสเทอร์ที่มีสูตรทางเคมีเป็น  $(C_3H_4O_2)_n$  สังเคราะห์ขึ้นจากกรดแลคติก ซึ่งผลิตได้จากการหมักด้วยจุลินทรีย์หรือการสังเคราะห์ทางเคมี จากภาพประกอบ 3 จะเห็นได้ว่าการผลิตกรดแลคติกโดยวิธีการทางเคมี และการใช้จุลินทรีย์พบว่า การใช้จุลินทรีย์สามารถผลิตกรดแลคติกที่มีโครงสร้างเป็น กรดแอลแลคติกหรือกรดดีแลคติก (L- หรือ D-lactic acid) ดังภาพประกอบ 4 แต่สำหรับการผลิตกรดแลคติกทางเคมีพบว่า กรดแลคติกที่ได้มีโครงสร้างเป็นกรดแอลแลคติกและกรดดีแลคติกผสมกัน ดังนั้นการผลิตกรดแลคติกด้วยจุลินทรีย์นั้นได้กรดแลคติกที่มีความบริสุทธิ์มากกว่าการสังเคราะห์ทางเคมี จึงนิยมใช้จุลินทรีย์ในการผลิต อีกทั้งกรดแลคติกที่ได้จากการหมักนั้นเมื่อนำไปสังเคราะห์เป็นพอลิแลคไทด์นั้นจะได้ PLA ที่มีความเป็นผลึกสูงอีกด้วย (Wee; Kim; & Ryu. 2006: 163-172)

กรดแลคติกซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักผลิตผลทางเกษตร เช่น มันสำปะหลัง ข้าว และข้าวโพด ด้วยจุลินทรีย์ (Sukkhum. 2010) ซึ่งจัดเป็นวัสดุหมุนเวียนทางการเกษตร ส่งผลให้พอลิแลคไทด์ถือเป็นวัสดุที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม โดยพอลิแลคไทด์สามารถสังเคราะห์ได้จาก 3 กระบวนการ ได้แก่ ปฏิกริยาการควบแน่นเป็นพอลิเมอร์โดยตรง (direct polymerization reaction) ปฏิกริยากระบวนการกลั่นแบบ azeotropic (Azeotropic dehydration condensation) และกระบวนการสังเคราะห์พอลิเมอร์แบบเปิดวง (ring-opening polymerization) ดังภาพประกอบ 5

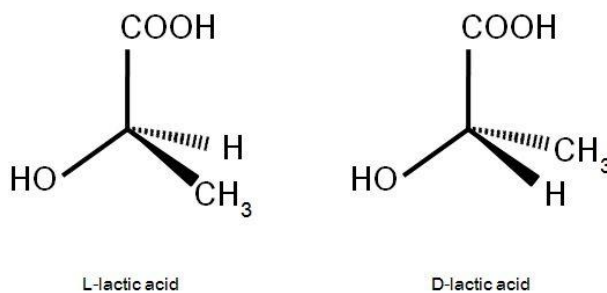
คุณสมบัติของพอลิแลคไทด์ มีความหลากหลายเนื่องจากหมู่เมทิลที่อยู่บนตำแหน่งแอลฟาของอะตอมคาร์บอน ด้วยโครงสร้างแบบ L- Lactide D- Lactide และ DL-Lactide ตามรูปประกอบ 6 โดย แอลแลคไทด์ผลิตจากกรดแอลแลคติก และ DL-Lactide สังเคราะห์จากการผสมของกรดดีแลคติกและกรดแอลแลคติก ซึ่งโดยทั่วไปกรดแลคติกที่ได้จากการหมักโดยจุลินทรีย์นั้นจะอยู่ในรูปของกรดแอลแลคติกเป็นส่วนใหญ่ และพอลิแลคไทด์ (Poly(L-lactide) หรือ PLLA) ที่ได้จะมีจุดหลอมเหลว (melting point หรือ  $T_m$ ) อยู่ระหว่าง 160-180 องศาเซลเซียส (Jiang; & Zhang. 2013)



ภาพประกอบ 3 อธิบายถึงการผลิตกรดแลคติก

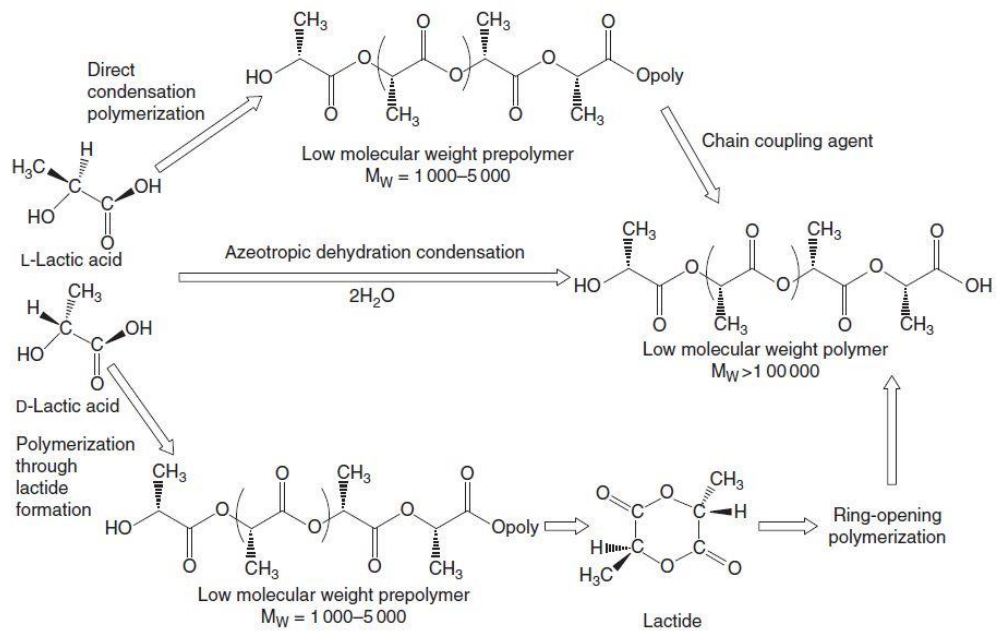
การผลิตกรดแลคติกแบบสังเคราะห์ทางเคมี (a) และการหมักด้วยจุลินทรีย์ (b) โดย SSF หมายถึง simultaneous saccharification and fermentation

ที่มา : Wee; Kim; & Ryu. (2006). Biotechnological Production of Lactic Acid and Its Recent Applications. In *Food Technol. Biotechnol.* p. 164.



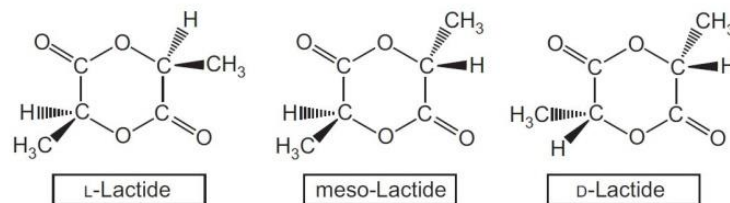
ภาพประกอบ 4 โครงสร้างของกรดแลคติก

ที่มา : Tsuji. (2005). Poly(lactide) Stereocomplexes: Formation, Structure, Properties, Degradation, and Applications. In *Macromolecular Bioscience.* p. 571.



ภาพประกอบ 5 วิธีการสังเคราะห์ PLA ให้มีน้ำหนักโมเลกุลสูง

ที่มา Avérous. (2013). Synthesis, Properties, Environmental and Biomedical Applications of Polylactic Acid. In *Handbook of Biopolymers and Biodegradable Plastics*. p. 173.



ภาพประกอบ 6 โครงสร้างของแล็กไทด์

ที่มา : Sin; Rahmat; & Rahman. (2013). Applications of Poly(lactic Acid). In *Handbook of Biopolymers and Biodegradable Plastics*. p. 55.

ตาราง 2 คุณสมบัติของพอลิแลคไทด์

	Nature works PLA	Biomer L9000
<b>คุณสมบัติเชิงกายภาพ</b>		
Melt flow rate (g/10 min)	4.3–2.4	3–6
Density (g/cm <sup>3</sup> )	1.25	1.25
Haze	2.2	
Yellowness index	20–60	
<b>คุณสมบัติเชิงกล</b>		
Tensile strength at yield (Mpa)	53	70
Elongation at yield (%)	10–100	2.4
Flexular modulus (Mpa)	350–450	3600
<b>คุณสมบัติเชิงความร้อน</b>		
HDT (°C)	40–45, 135	
VICAT Softening point (°C)		56
GTT (°C)	55–56	
Melting point (°C)	120–170	

ที่มา Nampoothiri; Nair; & John. (2010). An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research. In *Bioresource Technology*. 101: p. 8496

## 2.6 การประยุกต์ใช้พอลิแลคไทด์ หรือ PLA

พอลิแลคไทด์เป็นพอลิเมอร์ชนิดเทอร์โมพลาสติก ที่มีคุณสมบัติเป็นเอกลักษณ์ที่ดี มีความแข็งแรงเชิงกลที่สูง และมีความเป็นพิษที่ต่ำ อีกทั้งมีคุณสมบัติเป็น barrier ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้งานได้หลากหลาย เช่น นำไปผลิตเป็นเส้น ฟิล์มแผ่นและลักษณะแบบสามมิติ ด้วยวิธี fiber drawing, film blowing, extrusion และ injection molding เป็นต้น ด้วยคุณสมบัติที่หลากหลายของ PLA จึงมีการประยุกต์ใช้ได้หลากหลายเช่นกัน โดยอาจแบ่งการใช้งานของ PLA ได้ดังนี้

### 2.6.1. เครื่องนุ่งห่ม และสิ่งทอ

พอลิแลคไทด์มีคุณสมบัติที่สามารถกลายเป็นเส้นใยได้ ส่งผลให้นำไปผลิตเป็นผ้าได้ อีกทั้งมีการระบายอากาศและเนื้อสัมผัสที่สบายพอๆ กับเส้นใยที่ได้จาก PET (Sin; Rahmat; & Rahman. 2013b) เนื่องด้วยคุณสมบัติที่กล่าวมานี้ จึงสามารถนำมาทำเป็นเครื่องนุ่งห่ม หรือผลิตภัณฑ์อื่นๆ ที่ทำจากผ้า ซึ่งมีบริษัท Kanevo, Ltd สัญชาติญี่ปุ่น เป็นบริษัทที่มีการผลิตเส้นใยของ PLA ด้วยเครื่องหมายการค้าคือ LACTRON™ ได้แสดงเสื้อผ้านางาน Nagano Olympics ภายใต้หัวข้อ “แฟชั่นสำหรับโลก” (Sukkhum. 2010)

### 2.6.2. ด้านการแพทย์

PLA และ PLGA (Polylactide-Co-Glycolide) นั้นมีความเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อสิ่งมีชีวิต แต่อย่างไรก็ตามก็ยังมีข้อจำกัดอยู่เฉพาะโครงสร้างในรูปแบบ PLLA เท่านั้น เนื่องจากสัณฐานเชิงลูกดัดของมันสามารถสลายได้แต่ PLLA เท่านั้น โดยถูกนำมาทำเป็นไหมละลายเย็บแผล กระดูก และข้อต่อเทียม เป็นต้น (Sin; Rahmat; & Rahman. 2013b)

### 2.6.3. ด้านเภสัชกรรม

คุณสมบัติในการย่อยสลายได้ทางชีวภาพของพอลิแลคไทด์เป็นแรงบันดาลใจในการศึกษาการควบคุมระบบการส่งผ่านยาภายในร่างกาย โดยคุณสมบัติของพอลิแลคไทด์ที่มีความบริสุทธิ์สูงจะมีความเป็นผลึกที่สูงและใช้เวลานานในการสลายระหว่างที่ยาออกฤทธิ์ (Sin; Rahmat; & Rahman. 2013b)

### 2.6.4. บรรจุภัณฑ์

Cargill Dow's Nature Work™ เป็นเครื่องหมายการค้าของพอลิแลคไทด์ที่เป็นพอลิเมอร์ย่อยสลายได้ที่ถูกใช้อย่างกว้างขวางทั้งเป็นบรรจุภัณฑ์สำหรับอาหารในช่วงแรกๆ และมีการพัฒนาเป็นแผ่นฟิล์ม และเส้นใย (Sukkhum. 2010) โดยตาราง 4 อธิบายภาพรวมของตัวอย่างและการประยุกต์ใช้พอลิแลคไทด์อย่างหลากหลาย รวมไปถึงบริษัทที่ผลิต

ตาราง 3 ตัวอย่างของการประยุกต์ใช้พอลิแลคไทด์

บริษัท	ขอบเขตของการประยุกต์ใช้	ผลิตภัณฑ์ตามท้องตลาด
CL Chemical Fibers	ผ้าสปันบอนด์	ประยุกต์ใช้ทางการแพทย์ กระเป๋า และ สิ่งทอ
Dyne-a-Pak	ถาดโฟมรองเนื้อ	Dyne-a-Pak Nature™ ถาด
Bodin (France)	ถาดโฟม	ถาดรองสำหรับเนื้อ ปลา และชีส
CDS srl	อุปกรณ์ในการทานอาหาร	มีด ช้อน ช้อม
Cargo Cosmetics	ปลอก	ปลอกสำหรับเครื่องสำอาง
DS Technical Nonwoven	พรมสำหรับงานตกแต่ง	Ecopunch® พรม
Natures Organics	ขวดพอลิแลคไทด์	ขวดแชมพูในประเทศออสเตรเลีย
Naturally Iowa	EarthFirst® ฉลากแบบปลอกหัด	ฉลากของขวด Yogurt 7.0
Priori	บรรจุภัณฑ์เครื่องสำอาง	CoffeeBerry®
Frito-Lay	บรรจุภัณฑ์แบบถุง	SunChips®
Ahlastrom	ผ้าใยสังเคราะห์	ถุงชา
TelecomItalia and MID product designstudio	ปลอกสำหรับอุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์	โทรศัพท์ไร้สาย
Carrefour Belgium	แผ่นฟิล์ม	แผ่นฟิล์มใสสำหรับคลุมถาด
Kik & Boo	เส้นใย	ของเล่นที่ทำจากเส้นใย PLA
Stilolinea	เครื่องเขียน	ปากกา
Company	เส้นใย	ผ้าคลุมเตียง ปลอกหมอน
Valor Brands	เส้นใย	DiapersdNatural Choice™
Kimberly-Clark	เส้นใย	Huggies® Pure และ Natural diapers
Fujitsu	เคสคอมพิวเตอร์	FMV-BIBLO notebook
Toyota	ยานยนต์	Toyota Eco-Plastic-spare tire covers และ floor mats
Bioserie	ปลอกสำหรับอุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์	iPhone covers

ที่มา : Sin; Rahmat; & Rahman. (2013a). Overview of Poly(lactic Acid). In *Handbook of Biopolymers and Biodegradable Plastics*. pp. 24-29

## 2.7 จุลินทรีย์ที่มีความสามารถย่อยสลายพอลิแลคไทด์

พอลิแลคไทด์สามารถถูกย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ ซึ่งจะเกิดการย่อยสลายได้หรือไม่ขึ้นอยู่กับปัจจัยทางกายภาพ การเกิดปฏิกิริยาทางเคมี และการเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ (Chuensangjun; Pechyen; & Sirisansaneeyakul. 2013: 73-82) ซึ่งในปัจจุบันนี้มีรายงานที่กล่าวถึงแบคทีเรียในกลุ่มของแอกติโนมัยซีท (actinomycetes) และแบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิสูง (thermophilic bacteria) มีความสามารถในการย่อยสลายพอลิแลคไทด์ เช่น *Actinomadura keratinolytica*, *Bacillus brevis*, *B. stearothermophilus*, *B. licheniformis*, *Laceyella sacchari*, *Micromonospora echinospora*, *M. viridifaciens*, *Nonomureae fastidiosa*, *Nonomureae terrinata*, *Geobacillus thermocatenulatus* และ *Thermoactinomyces vulgaris* (Sukkhum; Tokuyama; & Kitpreechavanich. 2012: 92-99; Kim; et al. 2008: 234-239; Sakai; et al. 2001: 298-300; Tomita; Kuroki; & Nagai. 1999: 752-755; & Tomita; et al. 2004: 433-438) ในปี ค.ศ. 1997 มีรายงานของ Pranamuda และคนอื่นๆ ได้รายงานครั้งแรกกล่าวว่า *Amycolatopsis* สายพันธุ์ HT-32 มีความสามารถสร้างวงใส (clear zone) บนอาหารแข็งที่ผสมพอลิแลคไทด์ โดยแบคทีเรียนี้มีความสามารถย่อยสลายฟิล์มพอลิแลคไทด์ปริมาณ 60 มิลลิกรัมในอาหารเหลวเมื่อเวลาผ่านไปแล้ว 14 วัน (Pranamuda; Tokiwa; & Tanaka. 1997: 1637-1640) และนอกจากนี้พบว่ายังมีจุลินทรีย์อีกหลากหลายชนิดที่มีความสามารถในการย่อยสลายพอลิแลคไทด์ดังแสดงในตาราง 5

มีรายงานว่า *Amycolatopsis* sp. สายพันธุ์ HT-32 มีความสามารถในการย่อยสลายพอลิแลคไทด์และ silk fibroin ได้ (Tokiwa; Konno; & Nishida. 1999: 355-356) และรายงานของ Jarerat และ Tokiwa กล่าวว่าโครงสร้างของกรดแอมลอคติกของพอลิแลคไทด์มีความคล้ายคลึงกับโครงสร้างแอลอะลานิน (L-alanine) ของ silk fibroin (Jarerat; & Tokiwa. 2001: 136-140) ดังภาพประกอบ 7 โดยแอลอะลานินเป็นกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบหลักของ silk fibroin ซึ่ง silk fibroin มีลำดับของกรดอะมิโนดังนี้  $(\text{Gly}-\text{Ala})_2-\text{Gly}-\text{Ser}-\text{Gly}-(\text{Ala})_2-\text{Gly}-[\text{Ser}-\text{Gly}-(\text{Ala}-\text{Gly})_n]_3-\text{Tyr}$  โดยที่ n โดยส่วนใหญ่เป็น 2 (Jarerat; Tokiwa; & Tanaka. 2004: 136-146) นอกจากนี้ยังมีรายงานอีกว่า *Amycolatopsis* สายพันธุ์ KT-s-9 มีความสามารถในการย่อย silk fibroin ได้และยังสามารถย่อยสลายพอลิแอลแลคไทด์ได้ (Sukkhum. 2010) โดยการย่อยสลายพอลิแลคไทด์ของจุลินทรีย์ อาจเกิดจากการจดจำโครงสร้างตำแหน่งซ้ำๆ ของกรดแอมลอคติกของพอลิแลคไทด์ที่มีความคล้ายคลึงกับแอลอะลานินภายใน silk fibroin ดังภาพประกอบ 8

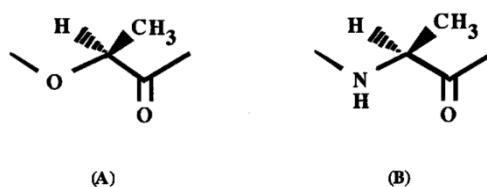
ตาราง 4 จุลินทรีย์ที่มีความสามารถย่อยสลายพอลิแลคไทด์และวิธีในการตรวจสอบ

สายพันธุ์ของจุลินทรีย์	วิธีการตรวจสอบการย่อยสลาย PLA	อ้างอิง
<i>Amycolatopsis</i> sp. HT 32	น้ำหนักของแผ่นฟิล์ม PLA ที่ลดลงและปริมาณกรดแลคติกที่เกิดขึ้น	Pranamuda; Tokiwa; & Tanaka. (1997)
<i>Amycolatopsis</i> sp. 3118	น้ำหนักของแผ่นฟิล์ม PLA ที่ลดลงและปริมาณกรดแลคติกที่เกิดขึ้น	Ikura; & Kudo. (1999)
<i>Amycolatopsis</i> sp. KT-s-9	วิธีการเกิดวงใสบนอาหารแข็ง	Tokiwa; Kono; & Nishida. (1999)
<i>Amycolatopsis</i> sp. 41	น้ำหนักของแผ่นฟิล์ม PLA ที่ลดลงและปริมาณกรดแลคติกที่เกิดขึ้น	Pranamuda; Tsuchii; & Tokiwa. (2001)
<i>Amycolatopsis</i> sp. K104-1	วิธีวัดความขุ่น	Nakamura; et al. (2001)
<i>Lentzea waywayandensis</i>	น้ำหนักของแผ่นฟิล์ม PLA ที่ลดลงและปริมาณกรดแลคติกที่เกิดขึ้น	Jarerat; & Tokiwa (2003)
<i>Kibdelosporangium aridum</i>	น้ำหนักของแผ่นฟิล์ม PLA ที่ลดลงและปริมาณกรดแลคติกที่เกิดขึ้น	Jarerat; et al. (2003)
<i>Tritirachium album</i> ATCC 22563	น้ำหนักของแผ่นฟิล์ม PLA ที่ลดลงและปริมาณกรดแลคติกที่เกิดขึ้น	Jarerat; & Tokiwa (2001)
<i>Brevibacillus</i>	การเปลี่ยนแปลงโมเลกุลของ PLA และความหนืด	Tomita; Kuroki; & Nagai. (1999)
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	การเปลี่ยนแปลงโมเลกุลของ PLA และความหนืด	Tomita; et al., (2003)
<i>Bacillus smithii</i> PL 21	การเปลี่ยนแปลงโมเลกุลของ PLA และความหนืด	Tomita; et al. (2004)
<i>Bacillus licheniformis</i> PLLA-2	การทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพ	Kim; et al. (2008)
<i>Paenibacillus amylolyticus</i> TB-13	วิธีวัดความขุ่น	Shigeno; et al. (2003)
<i>Bacillus clausii</i> strain pLA-M4	เทคนิคทางโมเลกุล	Mayumi; et al. (2008)
<i>Bacillus cereus</i> pLA-M7	เทคนิคทางโมเลกุล	Mayumi; et al. (2008)
<i>Treponema denticola</i> pLA-M9	เทคนิคทางโมเลกุล	Mayumi; et al. (2008)
<i>Paecilomyces</i>	เทคนิคทางโมเลกุล	Sangwan; & Wu. (2008)

ตาราง 4 (ต่อ)

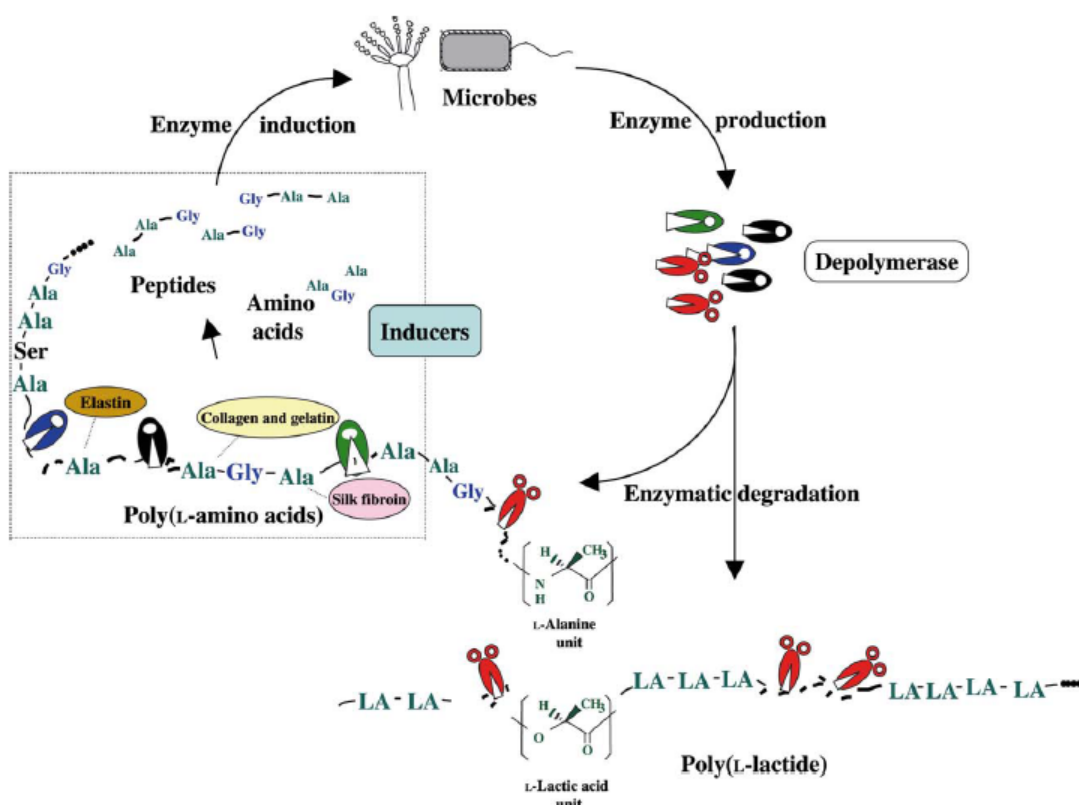
สายพันธุ์ของจุลินทรีย์	วิธีการตรวจสอบการย่อยสลาย PLA	อ้างอิง
<i>Thermomonospora</i>	เทคนิคทางโมเลกุล	Sangwan; & Wu. (2008)
<i>Thermopolyspora</i>	เทคนิคทางโมเลกุล	Sangwan; & Wu. (2008)
<i>Actinomadura keratinilytica</i> T16-1	วิธีการเกิดวงใสบนอาหารแข็ง และวิธีวัดความชื้น	Sukkhum; et al. (2009)
<i>Micromonospora echinospora</i> B12-1	วิธีการเกิดวงใสบนอาหารแข็ง และวิธีวัดความชื้น	Sukkhum; et al. (2009)
<i>Micromonospora viridifaciens</i> B7-3	วิธีการเกิดวงใสบนอาหารแข็ง และวิธีวัดความชื้น	Sukkhum; et al. (2009)
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	น้ำหนักของแผ่นฟิล์ม PLA ที่ลดลง	Mehlika; Houlden; & Robson. (2014)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	น้ำหนักของแผ่นฟิล์ม PLA ที่ลดลง	Mehlika; Houlden; & Robson. (2014)
<i>Pseudonocardia</i> sp. RM423	น้ำหนักของแผ่นฟิล์ม PLA ที่ลดลง	Apinya; Sombatsompop; & Prapagdee (2015)
<i>Laceyella sacchari</i> LP175	น้ำหนักของแผ่นฟิล์ม PLA ที่ลดลง	Lomthong; et al. (2015)

ดัดแปลงมาจาก Sukkhum; & Kitpreechavanich (2011). New Insight into Biodegradation of Poly (L-Lactide), Enzyme Production and Characterization. In *Progress in Molecular and Environmental Bioengineering*. p. 590



ภาพประกอบ 7 โครงสร้างทางเคมีของ (a) กรดแลคติกซึ่งเป็นหน่วยมอนอเมอร์ของพอลิแลคไทด์ และ (b) L-alanine ซึ่งเป็นหน่วยของ silk fibroin

ที่มา Jarerat; & Tokiwa. (2001). Degradation of Poly(l-lactide) by a Fungus. *Macromol. Biosci.* p. 140



ภาพประกอบ 8 แผนภาพของการเหนี่ยวนำ การผลิต และการย่อยสลายพอลิแลคไทด์ของเอนไซม์

ที่มา Jarerat; Tokiwa; & Tanaka. (2004). Microbial poly(l-lactide)-degrading enzyme induced by amino acids, peptides, and poly(l-amino acids). *Journal of Polymers and the Environment*. p. 144

## 2.8 เอนไซม์ที่มีความสามารถย่อยสลายพอลิแลคไทด์

ในการย่อยสลายพอลิแลคไทด์ทางชีวภาพพบว่า จุลินทรีย์ตามธรรมชาติมีการปลดปล่อยเอนไซม์ PLA depolymerase ออกมาภายนอกเซลล์ (Li; et al. 2013: 1143-1149) โดยเอนไซม์มีบทบาทสำคัญเป็นอย่างมากในการย่อยสลายพอลิแลคไทด์ซึ่งเป็นพอลิเอสเทอร์ ซึ่งการย่อยสลายพอลิแลคไทด์นั้นมีอยู่ 2 กระบวนการ โดยลำดับแรกนั้นเอนไซม์ถูกดูดซับอยู่บนผิวของซัสเตรท ต่อมาจะมีการสลายพันธะเอสเทอร์ (Ester Bond) ของพอลิแลคไทด์ให้ได้กรดแลคติก (Tokiwa; & Calabia. 2006: 244-251) และมีรายงานครั้งแรกของ Williams พบว่าเอนไซม์ proteinase-K, bromelain และ pronase มีความสามารถในการย่อยสลายพอลิแลคไทด์ได้ โดยเอนไซม์ proteinase-K ถูกผลิตจากรา *Tritirachium album* และมีความสามารถในการย่อยสลายพอลิแลคไทด์และโคพอลิเมอร์ได้ (Pranamuda; Tsuchii; & Tokiwa. 2001: 25-29) และในปี ค.ศ. 2012 มีรายงานของ Sukkhum และคนอื่นๆ พบว่าเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์จาก *Actinomadura keratinilytica*

สายพันธุ์ T16-1 มีความสามารถย่อยสลายผงพอลิแลคไทด์ได้ประมาณ 40% ของน้ำหนักทั้งหมด เมื่อถูกบ่มเป็นเวลา 4 วัน (Sukkhum; et al. 2013: 92-99) และในปี 2013 มีรายงานว่า น้ำหนักของพอลิแลคไทด์หายไปมากกว่า 50% เมื่อถูกบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อใช้เอนไซม์จาก *Amycolatopsis orientalis* ssp. *orientalis* (Li; et al. 2013: 1143-1149)

เอนไซม์ไลเปสจัดเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในกลุ่มของเอนไซม์เอสเทอเรส (esterase) ที่มีความสามารถในการย่อยสลายอะลิฟาติกพอลิเอสเทอร์ (Aliphatic Polyester) โดยเอนไซม์ไลเปสที่สร้างจาก *Candida cylindracea* และ *Rhizopus arrhizus* มีความสามารถย่อยสลายส่วนของอะมอร์ฟัสพอลิเมอร์ (Amorphous Polymer) ของพอลิแลคไทด์ได้ (Tokiwa; Konno; & Nishida. 2000: 33) โดยเอนไซม์ไลเปสสามารถย่อยสลายพอลิแลคไทด์ได้ ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าเอนไซม์ไลเปสสามารถย่อยสลายสายอะลิฟาติกพอลิเอสเทอร์ต่างๆ ที่มีอุณหภูมิหลอมเหลวต่ำ ไม่มีอะตอมโครอคาร์บอน และมีจำนวนกลุ่มของเมทิลีนมากอยู่ระหว่างพันธะเอสเทอร์ และอะมอร์ฟัสพอลิเมอร์ โดยเอนไซม์ที่ไม่ใช่เอนไซม์ไลเปสก็ยังสามารถได้การย่อยสลายพอลิแลคไทด์ได้โดยสามารถแตกพันธะแอลฟาเอสเทอร์ ( $\alpha$ -Ester) ของโครงสร้างที่เป็นแอลไอโซเมอร์ โดยเอนไซม์ไลเปสและเอนไซม์ PHB depolymerase มีความสามารถได้การแตกพันธะเอสเทอร์แบบสุ่มตามสายของสับสเตรท

ในการย่อยสลายพอลิแลคไทด์ให้กลายเป็นกรดแลคติกนั้นเป็นกระบวนการหนึ่งของการรักษาสภาพแวดล้อมในปัจจุบัน เนื่องจากการใช้เอนไซม์ในการย่อยสลายมีคุณลักษณะที่ีการทำงานที่ไม่รุนแรง สะอาด และไม่มีผลิตภัณฑ์ไม่พึงประสงค์กล่าวคือ ใช้อุณหภูมิที่ต่ำ ไม่มีการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ และมีความบริสุทธิ์สูง มีผลิตภัณฑ์เป็นกรดแลคติก หรือ กรดดีแลคติก (Li; et al. 2013: 1143-1149) อีกทั้งการประยุกต์ใช้เอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์มาใช้เคลือบพอลิแลคไทด์ที่เป็นของเสียให้นำกลับมาใช้ใหม่ได้อีกครั้ง (Jarerat; Tokiwa; & Tanaka. 2006: 726-731) การสังเคราะห์สายพอลิแลคไทด์ในปัจจุบันเป็นการสังเคราะห์ทางเคมีซึ่งต้องใช้อุณหภูมิที่สูง อีกทั้งใช้ความดันสูงอีกด้วย จึงมีแนวคิดว่าการสังเคราะห์พอลิแลคไทด์ด้วยกระบวนการทางชีวภาพ โดยมีการประยุกต์ใช้เอนไซม์ไลเปสในการเร่งปฏิกิริยา polymerization ในการสังเคราะห์พอลิแลคไทด์ทดแทนวิธีการสังเคราะห์ทางเคมี เนื่องจากการกระบวนการสังเคราะห์และย่อยสลายด้วยสารเคมีในการเร่งปฏิกิริยามีความเป็นพิษ ใช้อุณหภูมิสูง และใช้ปฏิกิริยาที่รุนแรง (Chuensangjun; Pechuen; & Sirisansaneeyakul. 2013: 73-82)

เมื่อพอลิแลคไทด์ถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ได้มอนอเมอร์เป็นกรดแลคติก หรือโพลิโกเมอร์สายสั้นๆ สามารถมาเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์พอลิแลคไทด์ได้อีกครั้งด้วยกระบวนการ polymerization การใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาแทนการใช้สารเคมี แม้ว่าในปัจจุบันวิธีการสังเคราะห์โดยวิธีการนี้จะให้ผลผลิตน้ำหนักโมเลกุลของพอลิแลคไทด์ที่ต่ำ แต่กระบวนการนี้ไม่เกิด

ความเป็นพิษ และเป็นกระบวนการที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม (Sukkhum; Tokuyama; & Kitpreechavanich. 2012: 92-99; Li; et al. 2013: 1143-1149; & Chuensangjun; Pechyen; & Sirisansaneeyakul. 2013: 73-82) จึงต้องศึกษาเพื่อพัฒนาต่อไปในอนาคต

## 2.9 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์

การผลิตเอนไซม์ด้วยจุลินทรีย์ระดับห้องปฏิบัติการและอุตสาหกรรมมีความจำเป็นที่จะต้องใช้จุลินทรีย์ในกระบวนการผลิต จึงจำเป็นต้องหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับจุลินทรีย์ เพื่อให้จุลินทรีย์มีการปลดปล่อยเอนไซม์ออกมาได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในงานวิจัยมีปัจจัยที่หลากหลายที่ส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์ จึงมีการออกแบบการทดลองโดยวิธีสถิติในการช่วยหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์ เพื่อลดปริมาณของข้อมูลให้น้อยที่สุด อีกทั้งยังช่วยประหยัดทั้งรายจ่าย เวลา และทรัพยากร

### 2.9.1. การออกแบบของ Packett และ Burman (Packett and Burman design)

การออกแบบของ Packett และ Burman ถือเป็นการวางแผนการทดลองแบบแฟกทอเรียล เป็นการวางแผนการทดลองแบบแฟกทอเรียลที่มีปัจจัยที่มีอิสระต่อกัน เพื่อคัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการทดลองหรือการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์มากที่สุด โดยคัดเลือกจาก 10-20 ปัจจัยจากการทดสอบเบื้องต้นให้เหลือ 1-4 ปัจจัย ซึ่งการวางแผนการทดลองรูปแบบนี้ไม่ต้องทำการทดลองที่มีขนาดใหญ่ อีกทั้งยังช่วยลดจำนวนการทดลองได้อีกวิธีหนึ่ง แต่อย่างไรก็ตามยังมีข้อเสียคือไม่สามารถศึกษาปฏิสัมพันธ์ของปัจจัยต่างๆ ได้

การออกแบบการทดลองนั้นจะใช้  $2^k$  factorial arrangement เป็นพื้นฐานโดยจะมีแบบแผนมาตรฐานเป็นแถวแรกของการเริ่มต้นในการสร้างสิ่งทดลอง ซึ่งพื้นฐานของแบบแผนมาตรฐานแถวแรกแสดงดังตาราง 5 การออกแบบการทดลองควรเลือก จำนวนข้อมูล (n) ให้มากกว่าค่าปัจจัยที่ทำการศึกษาเพื่อสร้าง dummy effect สำหรับใช้คำนวณหาค่าคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Standard Error ;SE) ซึ่งจะต้องนำไปใช้ในการคำนวณค่าทางสถิติ t-test ต่อไป นอกจากนี้เมื่อมีค่า dummy variable สูงส่งผลทำให้การประมาณค่า SE ถูกต้องเพิ่มมากขึ้นซึ่งอย่างน้อยควรมีค่า dummy variable 2 ตัว เช่น ต้องการคัดเลือกปัจจัย 4-5 ตัว ให้เลือก N=8 หรือต้องการคัดเลือกปัจจัย 6-9 ตัว ให้เลือก N=12 เป็นต้น

ตาราง 5 การออกแบบสิ่งทดลองของ Packett และ Burman

N	ปัจจัยที่ต้องการกลั่นกรอง																						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
8	+	+	+	-	+	-	-																
12	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-												
16	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-								
24	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-

โดยการออกแบบแผนการทดลองมีการตั้งสมมติฐาน ได้ดังนี้

$H_0$  หมายถึง ปัจจัยที่  $X_i$  ไม่มีผลต่อตัวแปรตาม และ

$H_1$  หมายถึง ปัจจัยที่  $X_i$  มีผลต่อตัวแปรตาม

ซึ่งกำหนดให้เมื่อเปรียบเทียบค่า  $|t|$  กับค่า  $t$  จากตาราง  $t$  ที่  $df = n$  โดยที่  $n =$  จำนวนของ dummy และถ้าค่า  $|t| >$  ค่า  $t$  จากตาราง เป็นการปฏิเสธสมมติฐาน  $H_0$  โดยอาจกล่าวได้ว่าปัจจัยในการทดลองนั้นมีอิทธิพลต่อตัวแปรตาม และในการหาค่า  $t$  สามารถหาได้จากสมการ (1) ดังต่อไปนี้

$$t = \frac{Ex}{SE} \quad (1)$$

เมื่อ ค่าอิทธิพลของปัจจัย ( $Ex$ ) ค่าอิทธิพลของ Dummy ( $Ed$ ) และค่า Standard Error ( $SE$ ) หาได้จากสมการ (2) (3) และ (4) ตามลำดับ

$$Ex = \frac{\sum(\text{sum of plus sign})}{n} - \frac{\sum(\text{sum of minus sign})}{n} \quad (2)$$

$$Ed = \frac{\sum(\text{sum of plus sign})}{n} - \frac{\sum(\text{sum of minus sign})}{n} \quad (3)$$

$$SE = \left[ \frac{\sum(Ed)^2}{n} \right]^{\frac{1}{2}} \quad (4)$$

กำหนดให้  $n$  คือ จำนวนของข้อมูลที่ประกอบเป็นผลรวม

## 2.9.2. การออกแบบพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology หรือ RSM)

การออกแบบพื้นผิวตอบสนองเป็นส่วนหนึ่งของวิชาคณิตศาสตร์และยังเป็นเทคนิคทางสถิติ ซึ่งแต่เดิมการออกแบบพื้นผิวตอบสนองพัฒนามาจากรูปแบบการตอบสนองการทดลอง (Model experimental responses) (Box; & Draper. 1987) โดยการออกแบบพื้นผิวตอบสนองเพื่อช่วยในการจำลองรูปแบบการทดลองและวิเคราะห์ปัญหา ซึ่งผลของพื้นผิวตอบสนองขึ้นอยู่กับปัจจัยที่หลากหลายและจุดประสงค์เพื่อหาสภาวะหรือค่าปัจจัยที่เหมาะสมที่สุดของพื้นที่ตอบสนอง

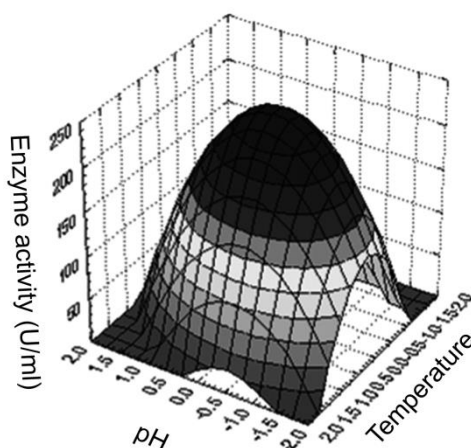
โดยทั่วไปพื้นผิวตอบสนองนั้นจะรายงานเป็นรูปกราฟฟิก ดังภาพประกอบ 9 ซึ่งตัวแปรตามจะถูกพล็อตกับระดับของปัจจัย  $X_1$  และ  $X_2$  ทั้งนี้เพื่อให้มองรูปร่างของพื้นผิวตอบสนองได้ง่ายยิ่งขึ้น จึงทำการพล็อตอยู่ในรูปแบบของเส้นโครงร่าง (Contour Plot) ของพื้นผิวตอบสนอง และปัญหาของพื้นผิวตอบสนองคือ พื้นผิวตอบสนองส่วนใหญ่แล้วจะไม่ทราบความสัมพันธ์ของตัวแปรตามและตัวแปรอิสระ ดังนั้นในขั้นแรกเพื่อกำจัดปัญหานั้น ผู้ทำการวิจัยต้องหาตัวประมาณที่เหมาะสมในการใช้เป็นตัวแทนของการแสดงความสัมพันธ์ที่แท้จริงระหว่าง  $y$  (ตัวแปรตาม) และชุดของตัวแปรอิสระโดยตัวแปรอิสระมีความสัมพันธ์เชิงเส้นกับแบบจำลองของพื้นผิวตอบสนอง ดังนั้นแบบจำลองพหุนามกำลังหนึ่งจะเป็นฟังก์ชันที่ให้ประเมินความสัมพันธ์นี้ ตามสมการ (5)

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \varepsilon \quad (5)$$

แต่อย่างไรก็ตามถ้าในระบบมีส่วนโค้งมาเกี่ยวข้อง ฟังก์ชันของพหุนามที่ใช้จะมีกำลังที่สูงขึ้น เช่น พหุนามกำลังสอง ตามสมการ (6)

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^k \sum_{j=1, j < i}^k \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (6)$$

โดยปัญหาส่วนใหญ่ที่เกี่ยวข้องกับพื้นที่ผิวตอบสนอง เป็นการหาผลตอบสนองนั้นจะใช้แบบจำลองของสมการกำลังหนึ่งและกำลังสอง ซึ่งสมการทั้งสองไม่สามารถประมาณความสัมพันธ์ของค่าตัวแปรอิสระได้ทั้งหมด โดยถ้าปัจจัยที่สนใจมีพื้นที่ผิวขนาดใหญ่ จะมีการออกแบบพื้นผิวด้วยกันหลายวิธี หนึ่งในวิธีเหล่านั้นคือ การออกแบบส่วนประสมกลาง (Central Composite Design หรือ CCD)

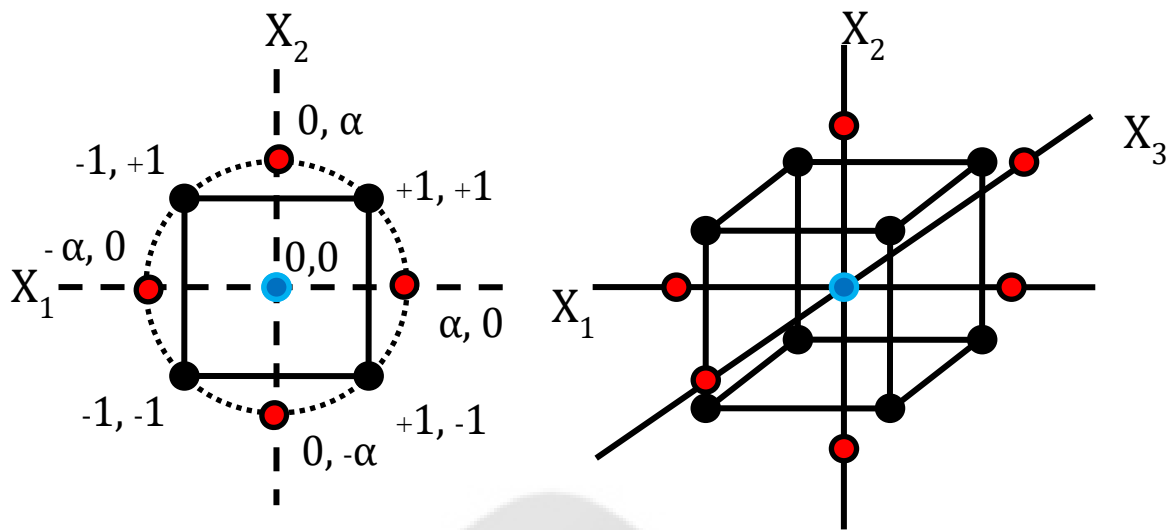


ภาพประกอบ 9 รูปแบบพื้นที่ผิวตอบสนองแบบสามมิติของกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์มีค่า pH และอุณหภูมิเป็นปัจจัยในการศึกษา

ที่มา Sukkhum; Tokuyama; & Kitpreechavanich. (2012). Poly(l-lactide)-degrading enzyme production by *Actinomadura keratinilytica* T16-1 in 3 L airlift bioreactor and its degradation ability for biological recycle. In *Journal of Microbiol and Biotechnology*. p. 96

### 2.9.3. การออกแบบส่วนประสมกลาง (Central Composite Design หรือ CCD)

การออกแบบส่วนประสมกลางเป็นหนึ่งในหลายๆ วิธีของรูปแบบพื้นที่ผิวตอบสนองเพื่อใช้หาสภาวะหรือปัจจัยที่เหมาะสมที่สุดในการทดลอง โดยเป็นการเพิ่มสิ่งทดลองระหว่างระดับของปัจจัยให้เพิ่มขึ้นเพื่อใช้เป็นแบบจำลองที่มีลำดับที่สูงขึ้นจากลำดับหนึ่งเป็นลำดับสองและสาม และในการออกแบบส่วนประสมกลางเริ่มจากการสร้างสิ่งทดลองจาก  $2^k$  แฟกทอเรียลแล้วเพิ่มจุดบนแกน coordinate ดังภาพประกอบ 10 โดยมีค่า code level  $\pm\alpha$  ซึ่งประกอบไปด้วย รันแฟกทอเรียล (factorial run) หรือจุดแฟกทอเรียล (factorial point) จำนวน  $n_f$  รัน มีรันแอกเซียล (axial run) หรือจุดสตาร์ (star point) จำนวน  $2k$  รัน และมีรันจุดศูนย์กลาง (center run) หรือ (center point) จำนวน  $n_c$  รัน



ภาพประกอบ 10 การออกแบบส่วนประสมกลาง

กำหนดให้  $k=2$  (ภาพด้านซ้าย) และ  $k=3$  (ภาพด้านขวา) โดย ● หมายถึง Center point ● หมายถึง Factorial point และ ● หมายถึง Star point

ดัดแปลงมาจาก สายชล สิ้นสมบูรณ์ทอง. (2558). ระเบียบวิธีพื้นผิวตอบสนอง. ใน การวางแผนแบบการทดลอง เล่ม 2. หน้า 933

2.9.3.1. Factorial point โดยมีจำนวนจุดเป็น  $2^k$  ซึ่งแต่ละระดับปัจจัย และมีสัญลักษณ์แทนด้วย -1 ซึ่งเป็นระดับต่ำและ +1 ซึ่งเป็นระดับสูง ซึ่งในการทดลองของ Factorial point จะสามารถแทนด้วยสัญลักษณ์ ดังนี้

$$(X_1, X_2, \dots, X_k) = (\pm 1, \pm 1, \dots, \pm 1)$$

2.9.3.2. Center point ( $n_c$ ) โดยต้องมีจำนวนจุดทำซ้ำมากกว่า 1 ครั้ง เพื่อนำไปคำนวณหาค่า pure error ของการวิเคราะห์ความเหมาะสมของรูปแบบการทดลอง ซึ่งการทดลองของ Center point จะสามารถแทนด้วยสัญลักษณ์ ดังนี้

$$(X_1, X_2, \dots, X_k) = (0, 0, \dots, 0)$$

2.9.3.3. Star point โดยมีจำนวนจุดเป็น  $2k$  ซึ่งในแต่ละจุดของ star point มีความห่างจากจุด center point เป็น  $\alpha$  สามารถคำนวณได้จาก  $\alpha = \sqrt[4]{2^k}$  เมื่อ  $k$  คือจำนวนปัจจัยในการศึกษา โดยจะแสดงในตาราง 6 ซึ่งการทดลองของ Star point จะสามารถแทนด้วยสัญลักษณ์ ดังนี้

$$(X_1, X_2, \dots, X_k) = (\pm 1.68, \pm 1.68, \pm 1.68) \text{ (เมื่อ } k = 3 \text{)}$$

$$(X_1, X_2, \dots, X_k) = (\pm 1.414, \pm 1.414) \text{ (เมื่อ } k = 2 \text{)}$$

ตาราง 6 แสดงการกำหนดค่า  $\alpha$  ในแต่ละจำนวนปัจจัย

จำนวนของปัจจัย	จุดแพททอเรียล	ค่าของ $\alpha$ โดยกำหนดเป็น $\pm 1$
2	$2^2$	$2^{2/4} = 1.414$
3	$2^3$	$2^{3/4} = 1.682$
4	$2^4$	$2^{4/4} = 2.000$
5	$2^5$	$2^{5/4} = 2.378$
6	$2^6$	$2^{6/4} = 2.828$

จำนวนของชุดการทดลองสามารถคำนวณได้จากสมการ (6)

$$\text{จำนวนของชุดการทดลอง} = 2^k + 2k + n_c \quad (6)$$

โดยกำหนดให้  $k$  หมายถึง จำนวนปัจจัยในการทดลอง

$n_c$  หมายถึง จำนวนซ้ำการทดลองที่จุดศูนย์กลาง (center point)

#### 2.9.4. การทดลองปรับตั้งค่าปัจจัยทีละค่า (One factor at a time method)

วิธีการทดลองนี้เป็นหนึ่งในรูปแบบของการออกแบบการทดลองเพื่อศึกษาปัจจัยหรือสาเหตุของการทดลอง โดยวิธีการนี้จะทำการทดลองปัจจัยทั้งหมดพร้อมกันในครั้งเดียว ซึ่งจะปรับเปลี่ยนปัจจัยได้เพียงครั้งละ 1 ปัจจัยเท่านั้นและคงที่ของค่าปัจจัยอื่นๆ ไว้ แต่อย่างไรก็ตามในการออกแบบการทดลองทางสถิตินี้เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการทดลองหาปัจจัยที่เหมาะสมพร้อมๆ กันเมื่อต้องการศึกษาหนึ่งหรือมากกว่า และด้วยเหตุนี้วิธีการทดลองปรับตั้งค่าปัจจัยทีละค่าจึงนิยม

ทำซ้ำหลายๆครั้งเพื่อความแม่นยำของการประมาณค่าของข้อมูล และไม่สามารถประมาณค่าความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยได้

เนื่องจากวิธีนี้ใช้แหล่งของทรัพยากรเพียงเล็กน้อยสำหรับปริมาณของข้อมูล (ผลการทดลอง) ที่ได้รับการทดลอง ซึ่งตัวอย่างของแหล่งของทรัพยากร เช่น การทดลอง เวลา และวัสดุที่ใช้ และการทดลองนี้อาจมีค่าใช้จ่ายที่สูง ฉะนั้นเวลาเป็นสิ่งที่สำคัญอย่างมากในภาคอุตสาหกรรม โดยการทดลองนี้มีความแม่นยำเป็นอย่างมากในการประมาณค่าของอิทธิพลของปัจจัยในแต่ละตัว แต่วิธีนี้อาจมีข้อเสียคือต้องการการทำซ้ำเพื่อความแม่นยำของผลการทดลอง และวิธีนี้ไม่สามารถอธิบายถึงความสัมพันธ์ระหว่างแต่ละปัจจัยได้ รวมไปถึงไม่สามารถตั้งค่าสภาวะที่เหมาะสมของปัจจัยได้ (สายชล สีนสมบุญทอง. 2558)



## บทที่ 3

### วิธีดำเนินงานวิจัย

#### 3.1. อุปกรณ์และสารเคมี

##### 3.1.1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

ตาราง 7 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องมือที่ใช้การทดลอง	รุ่น	บริษัท
1. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)	HMT200	HETO
2. เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge)	RC-5C	SORVALL
3. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)	Model 1565	Sheldon Manufacturing, Inc.
4. เครื่อง Sonicator	Model VCX500	Sonics & Materias, inc.
5. เครื่อง Freezer	SR-F215C	SANYO
6. เครื่อง Spectrophotometer	UV-1700	SHIMADZU
7. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave)	ES-315	Tomy
8. ถังหมัก (Fermenter)	BIOSTAT <sup>®</sup> B	B. Braun Biotech International
9. ปิเปตอัตโนมัติ (Auto pipette)		SCILOGAX
10. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow)	NU-440	NUAIRE
11. ตู้บ่มเพาะเชื้อแบบเขย่า (Incubator shaker)	MNOVA 4000	New Brunswick Sciencetific
12. เครื่องวัดพีเอช (pH meter)	SP-2100	SUNTEX
13. กล้องจุลทรรศน์ (Microscope)	AXIOSTAR1031-031	CARL ZEISS
14. ตู้อบฆ่าเชื้อ (Hot air sterilizing oven)	ISOTEMP	FISHER SCIENCETIFIC
15. เตาความร้อนไฟฟ้า (Hot plate)	HM-3000C	3N HOLDING
16. ตาชั่งดิจิตอล (Digital scale)	TC-205	Denver Instrument Company

### 3.1.2 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

#### 3.1.2.1 สารเคมี

ตาราง 8 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี	ยี่ห้อ	บริษัท
1. Agar	HIMEDIA	HIMEDIA Laboratories Pvt. Ltd.
2. Albumin, Bovine Serum, Fraction V (BSA)	CALBIOCHEM	EMD Chemicals, Inc.
3. Ammonium sulfate ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	UNIVER	Ajax finechem Pty, Ltd.
4. Copper(II) sulfate pentahydrate (CuSO <sub>4</sub> •5H <sub>2</sub> O)	MERCK	Merck KgaA
5. Dextrose	HIMEDIA	HIMEDIA Laboratories Pvt. Ltd.
6. Dichloromethane (CH <sub>2</sub> Cl)	Fisher	Fisher Scientific UK
7. Dipotassium phosphate (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	UNIVER	Ajax finechem Pty, Ltd.
8. Folin-Ciocalteu's phenol reagent	MERCK	Merck KgaA
9. Ethanol (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH)	EMSURE <sup>®</sup>	Merck KgaA
10. Gelatin	Chemical	Ajax finechem Pty, Ltd.
11. Hydrochloric acid 37% (HCl)	MERCK	Merck KgaA
12. Lactic acid 85% (CH <sub>3</sub> CHOHCOOH)	UNIVER	Ajax finechem Pty, Ltd.
13. Magnesium sulfate heptahydrate (MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O)	MERCK	Merck KgaA
14. Malt extract	SRL	Sisco Research Laboratories Pvt. Ltd.
15. Methanol (CH <sub>3</sub> OH)	EMSURE <sup>®</sup>	Merck KgaA
16. Monopotassium phosphate (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	UNIVMER	Ajax finechem Pty, Ltd.
17. Phenol	CARLO ERBA REAGENTS	Carlo Erba Reactifs-SDS
18. Poly (DL-lactic acid) (PLA) Mw. 43,000	Bioecole BE 400	TOYOBO
19. Potassium sodium tartrate tetrahydrate (C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> KNaO <sub>6</sub> •4H <sub>2</sub> O)	EMSURE <sup>®</sup>	Merck KgaA
20. Sodium carbonate (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	Anala <sup>®</sup>	VWR International Ltd.
21. Sodium Chloride (NaCl)	UNIVER	Ajax finechem Pty, Ltd.
22. Sulfuric acid (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	J.T.Baker	Avantor Performance Materials, Inc.
23. Tris-hydroxymethyl-methylamine (NH <sub>2</sub> C(CH <sub>2</sub> OH) <sub>3</sub> )	UNIVER	Ajax finechem Pty, Ltd.
24. Yeast extract	HIMEDIA	HIMEDIA Laboratories Pvt. Ltd.
25. 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS or DNSA)	SIGMA	Sigma-Aldrich Co. LLC.

- 3.1.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ
  - 3.1.2.1.1 ISP-2 (ภาคผนวก ก)
  - 3.1.2.1.2 Basal Medium (ภาคผนวก ก)
- 3.1.2.2 บัฟเฟอร์และสารเคมี
  - 3.1.2.2.1 Tris-HCl buffer (pH 9) (ภาคผนวก ข)
  - 3.1.2.2.2 PLA emulsion (ภาคผนวก ข)
  - 3.1.2.2.3 PLA powder (ภาคผนวก ข)



## 3.2. วิธีการดำเนินงานวิจัย

### 3.2.1 การเตรียมหัวเชื้อ

นำเชื้อ *Actinomadura keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1 จาก glycerol stock ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP-2 แบบปลอดเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว ISP-2 ภายใน ฟลาสก์ (Flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน จะได้หัวเชื้อเพื่อทำการทดลองต่อไป

### 3.2.2 การเตรียมและการศึกษาคุณสมบัติของหางน้ำยาง

นำหางน้ำยางมาตกตะกอนโดยการเติมกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 5% ปริมาตร 230 มิลลิลิตรต่อหางน้ำยาง 1000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส จนกระทั่งเนื้อเยื่อจับตัวกันเป็นก้อน (Skim Crepe) และทำการแยก Skim Crepe ออกจากหางน้ำยางโดยการกรองด้วยกระดาษกรองส่วนใสที่ได้ เรียกว่า non-rubber skim latex หรือ หางน้ำยางที่แยกสกิม และนำส่งวิเคราะห์ที่ศูนย์ทดสอบและมาตรฐานวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (TISTR) เพื่อวิเคราะห์ค่า Biological Oxygen Demand (BOD) ด้วยวิธี APHA, AWWA, WEF, 22<sup>nd</sup> edition 2012, Part 5210 B, ค่า Chemical Oxygen Demand (COD) ด้วยวิธี In-house test method based on ASTM D 1252-06, ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Kjeldahl (Total Kjeldahl nitrogen; TKN), ปริมาณ Ammonia nitrogen ด้วยวิธี In-house test method based on JECFA ปริมาณ Zinc ด้วยวิธี ICP-OES และปริมาณเฟอร์ริฟิวรัลด้วยวิธี In-house test method based on ISO 11890-2/GC นอกจากนี้ได้วิเคราะห์ค่าพีเอช (pH), หาปริมาณ Total protein (TP) ด้วยวิธี lowry method (Held; & Hurley. 2014), ปริมาณ Reducing sugar ด้วยวิธี DNSa method (Wang. 2014) และหาปริมาณ Total sugar ด้วยวิธี Phenol sulfuric method (Albalasmeh; Berhe; & Ghezzehei. 2013: 253– 261) หลังจากนั้นนำหางน้ำยางที่แยก Skim มาปรับค่าพีเอชให้มีค่าเป็น 7 เพื่อใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อต่อไป และได้ทำการศึกษาคุณสมบัติของหางน้ำยางที่แยกสกิมออกภายหลังจากการหมักจุลินทรีย์ที่ผ่านการหมัก เพื่อให้เปรียบเทียบคุณสมบัติก่อนและหลังการนำไปใช้ประโยชน์

### 3.2.3 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์

เติมเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์ ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ลงในข้อปัสเตอร์ที่มี PLA emulsion (ภาคผนวก ข) ความเข้มข้น 0.1% น้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาตร 2.25 มิลลิลิตร ป่มที่ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาหยุดปฏิกิริยาโดยนำไปแช่ในอ่างน้ำเย็น เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร หลังจากนั้นนำค่าดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ ดังสมการ (7)

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์} = (\text{ค่าดูดกลืนแสง}_{\text{ควบคุม}} - \text{ค่าดูดกลืนแสง}_{\text{เอนไซม์}}) \times 4 \times 10 \times \text{ค่าการเจือจาง} \quad (7)$$

เมื่อ ค่าดูดกลืนแสง<sub>ควบคุม</sub> คือ reaction mixture ที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแทนเอนไซม์

ค่าดูดกลืนแสง<sub>เอนไซม์</sub> คือ reaction mixture โดยใช้เอนไซม์ที่ผลิตได้

1 หน่วยเอนไซม์ หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ที่ใช้ในการลดค่าการดูดกลืนแสงหนึ่งหน่วยที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร ต่อ 1 มิลลิลิตร ภายใต้สภาวะที่กำหนด

### 3.2.4 การผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์แบบปลอดเชื้อจาก *A. keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1 โดยการตรึงเซลล์

#### 3.2.4.1 การศึกษาการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์แบบปลอดเชื้อจาก *A. keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1 ในระดับฟลาสก์

ศึกษาการผลิตเอนไซม์ด้วยการตรึงเซลล์ *A. keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1 ด้วยแผ่นใยขัด (Scrub Pad) โดยตัดแผ่นใยขัดให้มีขนาด 5x5 มิลลิเมตร ปริมาณ 0.1 กรัม ใส่ลงในหางน้ำยางที่แยกจาก skim ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติม PLA Powder 0.035% น้ำหนักต่อปริมาตร และอาหาร Basal Medium ใส่ในฟลาสก์จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทำการเติมหัวเชื้อที่เตรียมไว้ 5 มิลลิลิตร ป่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 168 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมงเพื่อศึกษาระยะเวลาในการผลิตเอนไซม์ โดยนำตัวอย่างที่ได้มาปั่นเหวี่ยงที่ 10,000g เป็นเวลา 5 นาที นำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์

3.2.4.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์แบบปลดปล่อย จาก *A. keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1 โดยใช้การออกแบบการทดลองทางสถิติ

3.2.4.2.1 การวิเคราะห์หาปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์ ด้วยวิธีการออกแบบ Packett และ Burman

ทำการเลือกปัจจัยในการศึกษาทั้งหมด 7 ปัจจัย ได้แก่ เจลาติน PLA powder pH อุณหภูมิ ความเร็วรอบในการเขย่า ปริมาณของ  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  และ  $(NH_4)_2SO_4$  และกำหนดระดับค่าปัจจัยเป็นเครื่องหมายบวก (+ หมายถึงใช้ปัจจัยนั้นในระดับสูง) และเครื่องหมายลบ (- หมายถึงใช้ปัจจัยในระดับต่ำ) ได้ดังตาราง 9 โดยการกำหนดค่าปัจจัยที่เครื่องหมายลบต้องมีค่าจริงไม่ติดลบและเป็นศูนย์ จากนั้นนำปัจจัยแต่ละระดับไปออกแบบการทดลองเพื่อคัดกรองปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ ซึ่งกำหนดและแสดงดังตาราง 10 ซึ่งพบว่ามี การทดลองทั้งหมด 10 การทดลอง จากนั้นทำการทดลองจริงแล้ววิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้ และนำผลการทดลองที่ได้ไปวิเคราะห์ผลทางสถิติ ANOVA for PB ด้วยโปรแกรม SPSS (Statistical Package for Social Sciences) Version 19 ประเทศอเมริกา

ตาราง 9 จำนวนปัจจัยและระดับของปัจจัยในการศึกษาการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์โดย *A. keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1

ลำดับ	ปัจจัย	-1	0	+1
1	เจลาติน (g/L)	1.38	2.38	3.38
2	PLA powder (g/L)	0.15	0.35	0.55
3	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (g/L)	0.1	0.2	0.3
4	$(NH_4)_2SO_4$ (g/L)	1	4	7
5	pH	6	7	8
6	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	40	45	50
7	ความเร็วรอบในการเขย่า (rpm)	50	150	250

ตาราง 10 การออกแบบการทดลองตามวิธี Packett และ Burman

การทดลอง	ปัจจัย							ปัจจัย Dummy			
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>	D <sub>1</sub>	D <sub>2</sub>	D <sub>3</sub>	D <sub>4</sub>
1	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-
2	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+
3	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+
4	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-
5	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+
6	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+
7	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+
8	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-
9	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-
10	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-
11	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

เมื่อ D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> และ D<sub>4</sub> เป็นตัวแปร Dummy

3.2.4.2.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์แบบปลอดเชื้อจาก *A. keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1 ด้วยวิธีการหาพื้นผิวตอบสนอง

ในวิธีการหาพื้นผิวตอบสนองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์นั้นใช้การออกแบบการทดลองด้วยวิธี Central Composite Design (CCD) โดยนำปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์ในการศึกษาข้อที่ 3.2.4.2.1 มากำหนดค่าปัจจัยเป็น 5 ระดับ ได้แก่  $-\alpha$ ,  $-1$ ,  $0$ ,  $+1$  และ  $+\alpha$  โดยค่า  $\alpha$  คำนวณได้จากสมการ (8) ซึ่งสามารถกำหนดระดับของปัจจัยจากสมการที่ได้ตามตาราง 11 แล้วนำระดับปัจจัยข้างต้นมาทำการกำหนดค่า Factorial Point, Star Point และ Center Point ตามตาราง 12 จากนั้นทำการทดลองตามการออกแบบที่ระบุไว้ และนำผลการทดลองมาวิเคราะห์ regression และหาค่าสัมประสิทธิ์เพื่อสร้างสมการถดถอยด้วยโปรแกรม SPSS (Statistical Package for Social Sciences) Version 19 และสร้างกราฟพื้นผิวตอบสนองด้วยโปรแกรม Statistica Version 10

สมการ (8) เป็นสมการหาค่าระดับ  $\alpha$  ดังนั้นเมื่อมีตัวแปรต้นเท่ากับ 3 จะได้ว่าค่าระดับ  $\alpha$  จะเท่ากับ 1.68 โดยมีสมการดังนี้

$$\alpha = \sqrt[4]{2K} \quad (8)$$

เมื่อกำหนดให้ K เป็นจำนวนตัวแปร

สมการ (9) กำหนดค่าแต่ละระดับของปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์จาก *A. keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1 มีดังนี้

$$X_i = \frac{A_i - A_0}{\Delta A} \quad (9)$$

เมื่อกำหนดให้  $X_i$  เป็น code ของแต่ละปัจจัย  
 $A_i$  เป็นค่าระดับที่แท้จริงของปัจจัย (True level)  
 $A_0$  เป็นค่าระดับที่แท้จริงที่ level = 0  
 $\Delta A$  เป็นค่าการเปลี่ยนแปลงระดับที่แท้จริงจาก level ที่ 0 เป็น +1 หรือ -1

ตาราง 11 การกำหนดช่วงของระดับปัจจัยที่ศึกษาโดยวิธีการ Central composite design

ปัจจัยที่ต้องการศึกษา ( $X_i$ )	ระดับ				
	-1.68	-1	0	1	1.68
เจลาติน (กรัมต่อลิตร) ( $X_1$ )	0.70	1.38	2.38	3.38	4.06
MgSO <sub>4</sub> (กรัมต่อลิตร) ( $X_2$ )	0.03	0.10	0.20	0.30	0.36
pH ( $X_3$ )	5.32	6	7	8	8.68

ตาราง 12 แบบการทดลองของการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์ จาก *A. keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1 โดยวิธีการออกแบบ CCD

การทดลอง	การทดลองที่	$X_1$	$X_2$	$X_3$	เจลาติน ( $X_1$ )	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ( $X_2$ )	pH ( $X_3$ )
Factorial point	1	1	1	1	3.38	0.3	8
	2	1	1	-1	3.38	0.3	6
	3	1	-1	1	3.38	0.1	8
	4	1	-1	-1	3.38	0.1	6
	5	-1	1	1	0.38	0.3	8
	6	-1	1	-1	0.38	0.3	6
	7	-1	-1	1	0.38	0.1	8
	8	-1	-1	-1	0.38	0.1	6
Star point	9	-1.68	0	0	0.7	0.2	7
	10	0	-1.68	0	2.38	0.03	7
	11	0	0	-1.68	2.38	0.2	5.32
	12	1.68	0	0	4.06	0.2	7
	13	0	1.68	0	2.38	0.368	7
	14	0	0	1.68	2.38	0.2	8.68
Center point	15	0	0	0	2.38	0.2	7
	16	0	0	0	2.38	0.2	7
	17	0	0	0	2.38	0.2	7

3.2.5 การผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์จาก *A. keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1 โดยการตรึงเซลล์แบบไม่ปลอดเชื้อ

3.2.5.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์แบบไม่ปลอดเชื้อจาก *A. keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1 โดยการตรึงเซลล์ ในระดับฟลาสก์ ด้วยวิธี One Factor at a Time

ทำการเติมหัวเชื้อ *A. keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1 ความเข้มข้น 10% (ปริมาตรต่อปริมาตร) ของในหาน้ำยาล้างที่แยกสกิม ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วยแผ่นใยขัดขนาด 5x5 มิลลิเมตร ปริมาณ 0.1 กรัม PLA powder 0.035% (น้ำหนักต่อปริมาตร) และอาหาร Basal medium ซึ่งมีแหล่งไนโตรเจนเป็นเจลาติน โดยปรับค่า pH เริ่มต้นเป็น 7 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่าเป็น 150 rpm เป็นเวลา 7 วัน เก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง โดยนำตัวอย่างที่ได้มาปั่นเหวี่ยงที่ 10,000g เป็นเวลา 10 นาที นำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์เพื่อหาเวลาที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเอนไซม์ หลังจากที่ได้เวลาที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์ จึงทำการศึกษาอุณหภูมิ ค่า pH เริ่มต้น และผลของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม ด้วยวิธี One Factor at a Time ซึ่งกำหนดค่าของปัจจัยที่ต้องการศึกษาที่ค่าต่างๆ ที่ต้องการ และควบคุมปัจจัยอื่นๆ ให้คงที่ โดยกำหนดค่าปัจจัยต่างๆ ที่ต้องการศึกษา ดังนี้ ควบคุมอุณหภูมิในการบ่มที่ 40, 45, 50 และ 55 องศาเซลเซียส ค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 4, 5, 6, 7, 8 และ 9 และแหล่งไนโตรเจนเป็นเจลาติน ผงสกัดจากมอลต์ ผงสกัดจากยีสต์ ผงสกัดจากเนื้อ เคซีน และเปปไทน์

3.2.5.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์แบบไม่ปลอดเชื้อในถังหมักแบบไบโอดกวนขนาด 2 ลิตร

3.2.5.2.1 ศึกษาการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์แบบไม่ปลอดเชื้อ ภายใต้สภาวะการหมักแบบ Batch

ทำการเติมหัวเชื้อ *A. keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1 ความเข้มข้น 10% (ปริมาตรต่อปริมาตร) ของในหาน้ำยาล้างที่แยกสกิมปริมาตร 1,500 มิลลิลิตร ใส่ในถังหมักขนาด 2 ลิตร (B.BraunBiotechBiostat B, Sartorius, Goettingen, Germany) เติมแผ่นใยขัดขนาด 5x5 มิลลิเมตร ปริมาณ 3 กรัม PLA powder 0.035% (น้ำหนักต่อปริมาตร) และอาหาร Basal medium ทำการหมักที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส มีการปรับเปลี่ยนอัตราการกวน (agitation Speed) ที่ 100 rpm และไม่มี การเติมอากาศ ทำการหมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง แล้วนำตัวอย่างที่ได้มาปั่นเหวี่ยงที่ 10,000g เป็นเวลา 5 นาที นำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์ นอกจากนี้ทำการปรับเปลี่ยนอัตราการกวนเป็น 150 และ 200 rpm ตามลำดับ เพื่อหาอัตราการ

กวนที่เหมาะสม และทำการศึกษ้อัตราการเติมอากาศ (aeration Rate) โดยมีการปรับเปลี่ยนอัตราการเติมอากาศเป็น 0.25 0.5 0.75 และ 1 vvm ตามลำดับ

3.2.6 การนำเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์ที่ผลิตจากหางน้ำยางที่แยกสกิมโดย *A. keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1 ไปใช้ในการย่อยสลายพอลิแลคไทด์

เติมเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์ในถุงไดอะไลซิส (molecular cut off = 10 kDa) 25 มิลลิลิตร และใส่ PLA ผงลงไป 1 กรัม จากนั้นนำไปใส่ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีบัฟเฟอร์ Tris-HCl pH 9 ปริมาตร 50 มิลลิลิตรอยู่ภายใน หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลานำ PLA ผงที่เหลือมาวัดน้ำหนักแห้ง โดยนำพอลิแลคไทด์ผงที่ผสมกับเอนไซม์ภายในถุงไดอะไลซิสไปกรองด้วยกระดาษกรอง (Whatman No.1) แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และนำไปชั่งน้ำหนักสุดท้ายเปรียบเทียบกับน้ำหนักเริ่มต้น โดยคำนวณเป็นค่า weight loss (%) ซึ่งแสดงดังสมการ (10)

$$\text{weight loss (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักเริ่มต้น} - \text{น้ำหนักสุดท้าย}}{\text{น้ำหนักเริ่มต้น}} \times 100 \quad (10)$$

## บทที่ 4

### ผลของการทดลอง

#### 4.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบของหาน้ำยางและหาน้ำยางที่แยกสีกิมก่อนหมัก

หลังจากการนำหาน้ำยาง หาน้ำยางที่แยกสีกิม ทั้งแบบปลอดเชื้อและไม่ปลอดเชื้อ ไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบต่างๆ พบว่า หาน้ำยางมีค่า COD BOD TKN แอมโมเนียไนโตรเจน สังกะสี โปรตีน และน้ำตาลรีดิวซ์ มีค่าเป็น 91,775, 62,000, 4,953, 3,217, 144, 831 และ 1,197 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และมีค่า pH อยู่ในช่วง 11.0-12.0 เมื่อทำการตกตะกอนยางสีกิมด้วยกรดซัลฟูริก พบว่าปริมาณขององค์ประกอบต่างๆ มีค่าลดลง ดังนี้ ค่า COD BOD TKN แอมโมเนียไนโตรเจน สังกะสี ปริมาณโปรตีน น้ำตาลรีดิวซ์ น้ำตาลทั้งหมด และ เฟอร์ฟิวรัล มีค่าเท่ากับ 31,840, 12,825, 2,680, 2,111, 71, 531, 16, 1,836 และ <10 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และมีค่า pH อยู่ในช่วง 2.0-3.0 โดยหลังจากการนำไปผ่านการฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที พบว่าค่า COD BOD TKN แอมโมเนียไนโตรเจน สังกะสี ปริมาณโปรตีน น้ำตาลรีดิวซ์ น้ำตาลทั้งหมด และ เฟอร์ฟิวรัล มีค่าเท่ากับ 23,000, 315.0, 0.65, 0.53, 62.43, 287.77, 66.26, 1,086.58 และ <10 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีค่าลดลงและมีค่า pH อยู่ในช่วง 6.8-7.0 โดยแสดงดังตาราง 13 ซึ่งจะเห็นว่าหาน้ำยางที่แยกสีกิมก่อนหมักมีองค์ประกอบต่างๆ ที่เหมาะกับการเจริญของจุลินทรีย์ได้จึงสามารถนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

ตาราง 13 การวิเคราะห์หาน้ำยาง

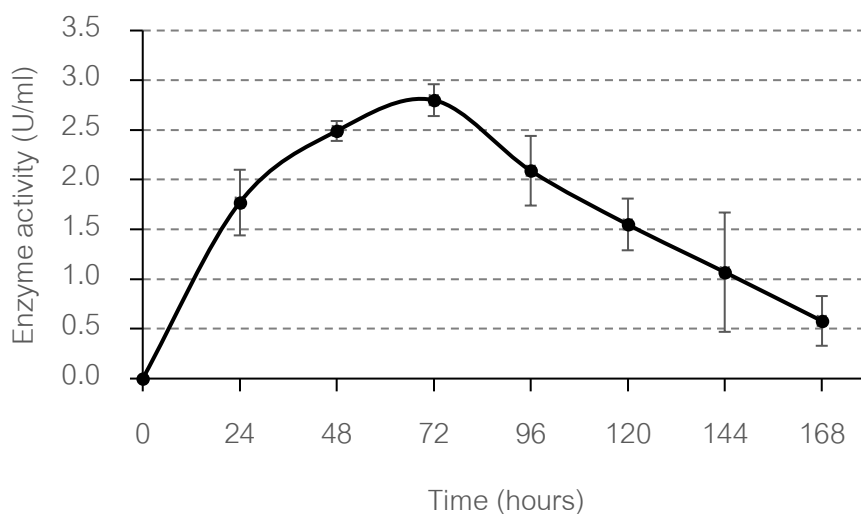
องค์ประกอบ	หาน้ำยาง	หาน้ำยางที่แยกสีกิมก่อนหมัก	
		แบบไม่ปลอดเชื้อ	แบบปลอดเชื้อ
COD (มิลลิกรัมต่อลิตร)	91,775	31,840	23,000
BOD (มิลลิกรัมต่อลิตร)	62,000	12,825	315
TKN (มิลลิกรัมต่อลิตร)	4,953	2,680	65
แอมโมเนียไนโตรเจน (มิลลิกรัมต่อลิตร)	3,217	2,111	53
สังกะสี (มิลลิกรัมต่อลิตร)	144	71	62
ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อลิตร)	831	531	287
น้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	1,197	16	66
น้ำตาลทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ND	1,836	1,086
เฟอร์ฟิวรัล (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ND	<10	<10
pH	11.0-12.0	2.0-3.0	6.8-7.0

## 4.2 การศึกษาการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์แบบปลดเชื้อจากหางน้ำ ยางที่แยกสกิมโดย *A. keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1 ในระดับฟลาสก์

เพื่อเป็นการศึกษาประสิทธิภาพของหางน้ำยางที่แยกสกิมในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์นั้นจึงทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์ในสภาวะที่หางน้ำยางที่แยกสกิมปลดเชื้อ โดยมีการผสม basal medium ลงไปเป็น supplement และทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาทีได้ผลการทดลองแสดงดังต่อไปนี้

### 4.2.1 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์

จากการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์แบบปลดเชื้อจากหางน้ำยางที่แยกสกิมโดยใช้ *A. keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1 ในระดับฟลาสก์พบว่า *A. keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1 มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์ได้ดีที่สุดที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง และให้ค่ากิจกรรมในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์เท่ากับ 2.8 ยูนิตต่อมิลลิลิตร คิดเป็นค่า productivity เท่ากับ 0.04 ยูนิตต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง ดังภาพประกอบ 11



ภาพประกอบ 11 กราฟแสดงผลของระยะเวลาในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์แบบปลดเชื้อจากหางน้ำยางที่แยกสกิมด้วย *A. keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1 ระดับฟลาสก์

#### 4.2.2 การวิเคราะห์หาปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์ ด้วยวิธีการ ออกแบบการทดลองด้วยวิธีของ Packett และ Burman

ในการวิเคราะห์หาปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์ ด้วยวิธีการ ออกแบบ Packett และ Burman โดยมีปัจจัยที่นำมาศึกษาทั้งหมด 7 ปัจจัย ได้แก่ ปริมาณของเจลาติน PLA powder,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $(NH_4)_2SO_4$ , ค่า pH เริ่มต้น, อุณหภูมิ และ ความเร็วรอบในการเขย่า ซึ่งในแต่ละปัจจัยได้กำหนดช่วงในระดับสูงและต่ำตามตาราง 9 แล้วทำการทดลองตามรูปแบบใน ตาราง 10 โดยระยะเวลาที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์เท่ากับ 72 ชั่วโมง ได้ผลดังตาราง 13 โดยจากจำนวน การทดลองทั้งหมด 12 การทดลองพบว่า การทดลองที่ 6 มีกิจกรรมของเอนไซม์มากที่สุดเป็น 16.44 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และเมื่อนำผลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติด้วยวิธี ANOVA สำหรับ PB ด้วยโปรแกรม SPSS ได้ผลดังตาราง 14 โดยปริมาณของเจลาติน  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  และ ค่า pH เริ่มต้น เป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์ โดยมีค่าระดับนัยสำคัญเป็น 0.30 และมีค่า R-Squared เท่ากับ 0.858 ดังนั้นเจลาติน  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  และค่า pH เริ่มต้น ซึ่งเป็นตัวแปรที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ จะนำไปใช้ในการศึกษาจุดที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลค ไทด์ด้วยวิธีการพื้นที่ผิวตอบสนองต่อไป

ตาราง 14 ผลของตัวแปรตาม(กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์, U/ml) ที่ได้จากการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Packett และ Burman

การทดลอง	ปัจจัย							ปัจจัย Dummy				กิจกรรมของเอนไซม์ (U/ml)
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>	D <sub>1</sub>	D <sub>2</sub>	D <sub>3</sub>	D <sub>4</sub>	
1	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	12.74±1.17
2	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	12.78±2.78
3	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	3.91±0.93
4	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	0.68±0.14
5	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	10.09±3.35
6	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	16.44±0.95
7	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	2.73±0.82
8	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	9.75±1.45
9	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	8.93±1.73
10	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	0.36±0.14
11	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	10.27±0.91
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.06±1.16

เมื่อ X<sub>1</sub> = เจลาติน, X<sub>2</sub> = PLA, X<sub>3</sub> = MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, X<sub>4</sub> = (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, X<sub>5</sub> = pH เริ่มต้น, X<sub>6</sub> = อุณหภูมิ, X<sub>7</sub> = อัตราการเขย่า, D<sub>1</sub> = ตัวแปร dummy ที่ 1, D<sub>2</sub> = ตัวแปร dummy ที่ 2, D<sub>3</sub> = ตัวแปร dummy ที่ 3, D<sub>4</sub> = ตัวแปร dummy ที่ 4 และ ค่า ± แสดงค่า Standard error ของข้อมูลเมื่อทำการทดลองทั้ง 3 ซ้ำ

ตาราง 15 การวิเคราะห์ปัจจัย (main effect) ที่มีอิทธิพลต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์

Source	Type III Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	274.266 <sup>a</sup>	7	39.181	3.466	0.123
Intercept	685.994	1	685.994	60.691	0.001
เจลาติน (X <sub>1</sub> )	19.882	1	19.882	1.759	0.255
PLA (X <sub>2</sub> )	0.524	1	0.524	0.046	0.840
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (X <sub>3</sub> )	19.309	1	19.309	1.708	0.261
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (X <sub>4</sub> )	5.106	1	5.106	0.452	0.538
pH (X <sub>5</sub> )	217.465	1	217.465	19.240	0.012
อุณหภูมิ (X <sub>6</sub> )	0.112	1	0.112	0.010	0.926
อัตราการเขย่า (X <sub>7</sub> )	11.868	1	11.868	1.050	0.363
Error	45.212	4	11.303		
Total	1005.472	12			
Corrected Total	319.478	11			

a. R Squared = 0.858 (Adjusted R Squared = 0.611)

4.2.3 การหาจุดที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์แบบปลดเชื้อจาก *A. keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1 ด้วยวิธีการหาพื้นผิวตอบสนองโดยใช้การออกแบบการทดลองทางสถิติด้วยวิธี central composite design (CCD)

จากการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์ พบว่าเจลาติน MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O และ ค่า pH เริ่มต้น มีผลต่อการผลิตเอนไซม์จากนั้นนำปัจจัยที่ได้มาทำการหาจุดที่เหมาะสมด้วยวิธีการหาพื้นผิวตอบสนอง โดยกำหนดให้เจลาติน MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O และ ค่า pH เริ่มต้น เป็น X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub> และ X<sub>3</sub> ตามลำดับ ซึ่งวิธีการหาพื้นผิวตอบสนองมีการกำหนดค่าช่วงปัจจัย แสดงดังในตาราง 11 และวิธีการออกแบบการทดลองนี้สามารถแบ่งการทดลองออกเป็น 17 การทดลอง โดยการทดลองที่ 1-8 เรียกว่า Factorial point ในการทดลองที่ 9-14 เรียกว่า Star point และ ในการทดลอง 15-17 เรียกว่า Center point ซึ่งในแต่ละการทดลองมีการทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ เพราะฉะนั้นจึงมี

จำนวนการทดลองทั้งหมด 51 การทดลอง เมื่อทำการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์ พบว่า การทดลองที่ 15, 16 และ 17 ซึ่งเป็นการทดลองที่เรียกว่า Center point มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์มากที่สุด เท่ากับ 22.94, 23.06 และ 31.08 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ที่ความเข้มข้นของเจลาตินเป็น 2.38 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของ  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  เป็น 0.2 กรัมต่อลิตร และมีค่า pH เริ่มต้นเป็น 7 ดังตาราง 16 และมีการทดลองลำดับที่ 12 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์น้อยที่สุด มีค่าเพียง 0.080 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เท่านั้น

ตาราง 16 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์ที่ผลิตจากการออกแบบการทดลองโดยใช้วิธี central composite design

การทดลอง	การทดลองที่	$X_1$	$X_2$	$X_3$	เจลาติน ( $X_1$ )	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ( $X_2$ )	pH ( $X_3$ )	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ (U/ml)
Factorial point	1	1	1	1	3.38	0.3	8	10.63±1.07
	2	1	1	-1	3.38	0.3	6	3.39±0.960
	3	1	-1	1	3.38	0.1	8	17.51±0.45
	4	1	-1	-1	3.38	0.1	6	0.69±0.12
	5	-1	1	1	0.38	0.3	8	21.89±0.45
	6	-1	1	-1	0.38	0.3	6	12.55±0.33
	7	-1	-1	1	0.38	0.1	8	10.03±0.86
	8	-1	-1	-1	0.38	0.1	6	12.48±0.42
Star point	9	-1.68	0	0	0.7	0.2	7	14.00±0.56
	10	0	-1.68	0	2.38	0.03	7	5.95±0.09
	11	0	0	-1.68	2.38	0.2	5.32	1.25±0.24
	12	1.68	0	0	4.06	0.2	7	0.08±0.14
	13	0	1.68	0	2.38	0.368	7	7.81±1.64
	14	0	0	1.68	2.38	0.2	8.68	14.58±0.20
Center point	15	0	0	0	2.38	0.2	7	22.94±0.73
	16	0	0	0	2.38	0.2	7	23.06±0.91
	17	0	0	0	2.38	0.2	7	31.08±0.22

เมื่อ ค่า ± แสดงค่า Standard error

#### 4.2.3.1 การวิเคราะห์การถดถอย (regression analysis)

##### 4.2.3.1.1 การประมาณสัมประสิทธิ์การถดถอยเชิงพหุคูณ

ในการวิเคราะห์ประมาณค่าสัมประสิทธิ์ของปัจจัยที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์จากหางน้ำย่างที่แยกสกิมด้วย *A. keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1 และนำมาสร้างสมการถดถอย เพื่อทดสอบหาทิศทางและอิทธิพลของตัวแปรในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์จากหางน้ำย่างที่แยกสกิมด้วย *A. keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1

ตาราง 17 ค่าการวิเคราะห์สัมประสิทธิ์ของสมการการถดถอยและค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ

Model	Unstandardized Coefficients		Standardized	t	Sig. <sup>a</sup>
	B	Standard Error	Coefficients Beta		
(Constant)	24.417	2.063		11.838	0.000
x <sub>1</sub>	-3.527	1.250	-0.340	-2.821	0.020
x <sub>2</sub>	0.798	1.250	0.077	0.638	0.539
x <sub>3</sub>	3.909	1.250	0.377	3.127	0.012
x <sub>1</sub> <sup>2</sup>	-5.166	1.252	-0.507	-4.127	0.003
x <sub>2</sub> <sup>2</sup>	-5.223	1.252	-0.513	-4.172	0.002
x <sub>3</sub> <sup>2</sup>	-4.856	1.252	-0.477	-3.879	0.004
x <sub>1</sub> x <sub>2</sub>	-2.015	1.633	-0.149	-1.234	0.248
x <sub>1</sub> x <sub>3</sub>	2.145	1.633	0.158	1.314	0.221
x <sub>2</sub> x <sub>3</sub>	0.278	1.633	0.021	0.170	0.869

<sup>a</sup> significant at 95% level ( $p < 0.05$ ),  $R^2 = 0.869$ ; and  $R^2_{adj} = 0.738$

จากตาราง 17 ตัวแปรที่มีค่า sig. น้อยกว่าค่าระดับนัยสำคัญ 0.05 ประกอบด้วย ความเข้มข้นเจลาติน ( $X_1$ ) ค่า pH เริ่มต้น ( $X_3$ ) พจน์กำลังสองของความเข้มข้นเจลาติน ( $X_1^2$ ) พจน์กำลังสองของความเข้มข้น  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  ( $X_2^2$ ) พจน์กำลังสองของค่า pH ( $X_3$ ) มีค่า sig. น้อยกว่าค่าระดับนัยสำคัญ 0.05 ดังนั้นค่าทั้งหมดเหล่านี้เป็นตัวแปรอิสระที่มีอิทธิพลต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์จากหางน้ำยางที่แยกสกิมด้วย *A. keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1 จึงสามารถนำมาสร้างสมการถดถอยได้ดังสมการ 11

$$Y = 24.417 - 3.527X_1 + 3.909X_3 - 5.166X_1^2 - 5.223X_2^2 - 4.856X_3^2 \quad (11)$$

จากสมการ 11 พบว่าตัวแปรอิสระ  $X_1$  มีค่าสัมประสิทธิ์เป็นลบ ซึ่งหมายความว่าตัวแปรอิสระ  $X_1$  มีอิทธิพลทางลบ และตัวแปรอิสระ  $X_3$  มีค่าสัมประสิทธิ์เป็นบวก ซึ่งหมายความว่าตัวแปรอิสระ  $X_3$  มีอิทธิพลทางบวก ต่อค่าตอบสนอง ( $Y$ ) หรือกิจกรรมของเอนไซม์ อาจกล่าวได้ว่าเมื่อลดค่าสัมประสิทธิ์ของตัวแปรอิสระ  $X_1$  และ  $X_3$  จะส่งผลให้การผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์จากหางน้ำยางที่แยกสกิมด้วย *A. keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1 มีกิจกรรมของเอนไซม์มีค่าเพิ่มขึ้น

นอกจากนี้ จากตาราง 17 พบว่าค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ ( $R^2$ ) อยู่ที่ 0.869 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า การทดลองนี้ตัวแปรอิสระทั้ง 3 ตัวแปรสามารถอธิบายค่าของกิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์ได้ถึง ร้อยละ 86.9 และส่วนที่เหลืออีก ร้อยละ 13.1 ไม่สามารถอธิบายค่าของกิจกรรมเอนไซม์ได้ เนื่องจากเป็นผลจากตัวแปรอิสระอื่นที่ไม่สามารถควบคุมได้ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าสมการถดถอยนี้สามารถอธิบายตัวแปรตาม หรือ กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์ได้ถึง ร้อยละ 86.9

#### 4.2.3.1.2 การทดสอบสมมติฐานของสมการการถดถอยหรือสมการความสัมพันธ์

เมื่อนำกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์ของแต่ละการทดลองที่ได้ไปวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของการวิเคราะห์การถดถอยเชิงพหุคูณด้วยโปรแกรม SPSS เพื่อหาสมการถดถอยเชิงพหุคูณและพิจารณาผลของปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์จากหางน้ำยางที่แยกสีกิมด้วย *A. keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1 พบว่า การออกแบบการทดลองนี้มีค่าทางสถิติ F (F-test) มีค่าเป็น 6.639 โดยมีค่า degree of freedom (df) เท่ากับ 9, 9 และ 18 ตามลำดับ โดยมีค่าความน่าจะเป็นของการทดลอง (Sig.) น้อยกว่า 0.05 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าปัจจัยของการออกแบบการทดลองในการศึกษานี้มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์จากหางน้ำยางที่แยกสีกิมด้วย *A. keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1 อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยแสดงที่ตาราง 18

ตาราง 18 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA<sup>b</sup>) ของการวิเคราะห์การถดถอยเชิงพหุคูณ

	Sum of Squares	df <sup>c</sup>	Mean Square	F	Sig.
Regression	1274.151	9	141.572	6.639	.005 <sup>a</sup>
Residual	191.922	9	21.325		
Total	1466.073	18			

<sup>a</sup>. Predictors: (Constant),  $x_2x_3$ ,  $x_1x_3$ ,  $x_1x_2$ ,  $x_3^2$ ,  $x_3$ ,  $x_2$ ,  $x_1$ ,  $x_2^2$ ,  $x_1^2$

<sup>b</sup>. Dependent Variable: Enzyme activity

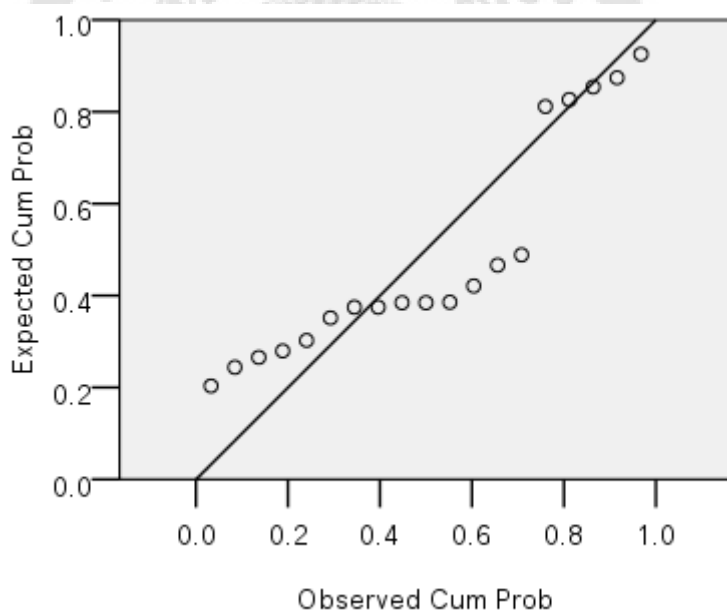
<sup>c</sup>. Degree of freedom

#### 4.2.3.2 การตรวจสอบความเหมาะสมของข้อมูลและสมการที่ใช้ในการวิเคราะห์การถดถอย

จากสมการถดถอย (สมการ 9) ที่ได้นำมาทำการตรวจสอบความเหมาะสมของสมการถดถอย (model adequacy checking) ก่อนนำมาใช้งาน โดยใช้ การวิเคราะห์ความคลาดเคลื่อน (residual analysis) เป็นเครื่องมือในการตรวจสอบ โดยถ้าหากแบบจำลองถูกต้องความคลาดเคลื่อนจะต้องไม่มีรูปแบบ ซึ่งจะสามารถตรวจสอบความเหมาะสมได้ดังต่อไปนี้

##### 4.2.3.2.1 การทดสอบการแจกแจงแบบปกติ (normal distribution)

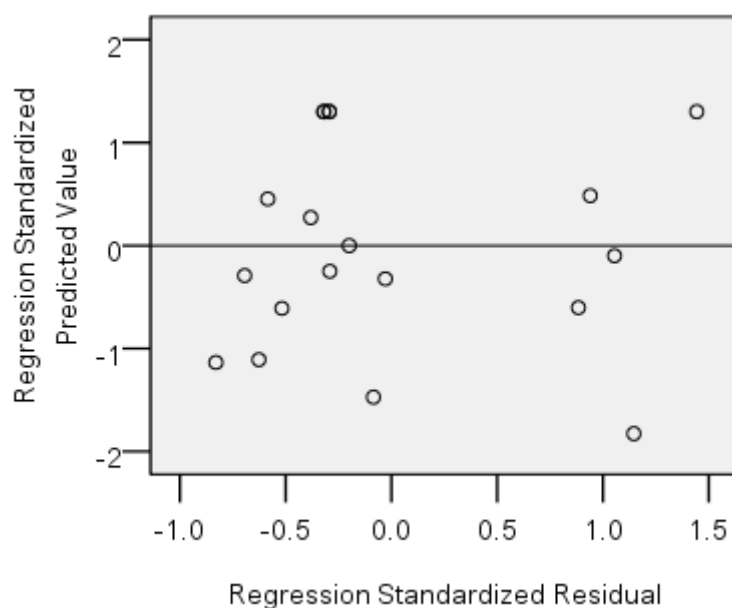
เมื่อทำการตรวจสอบการความเหมาะสมของสมการถดถอยด้วยวิธี normal probability plot ได้ผลดังภาพประกอบ 12 พบว่า ลักษณะของจุดบนกราฟส่วนใหญ่มีการกระจายตัวตามแนวเส้นตรงที่เป็นค่ามาตรฐาน ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า ความคลาดเคลื่อนของข้อมูลจากการทดลองมีการแจกแจงแบบปกติ



ภาพประกอบ 12 normal probability plot ของค่าความคลาดเคลื่อน

#### 4.2.3.2.2 การทดสอบความคงที่ความแปรปรวนของความคลาดเคลื่อน

จากภาพประกอบ 13 เป็นกราฟการกระจาย (scatter plot) ระหว่างค่า regression standardized predicted value บนแกน Y กับค่า Regression standardized residual บนแกน X ทำให้ทราบว่าข้อมูลมีการกระจายตัวอย่างไม่มีรูปแบบ และกระจายตัวรอบศูนย์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าความแปรปรวนของความคลาดเคลื่อนค่อนข้างคงที่



ภาพประกอบ 13 scatter plot ของค่าความคลาดเคลื่อนกับค่าทำนาย

เมื่อทำการตรวจสอบความเหมาะสมของการกระจายตัวของข้อมูล และความคงที่ความแปรปรวนของความคลาดเคลื่อน สรุปได้ว่าข้อมูลมีการกระจายตัวอย่างปกติ และมีความแปรปรวนของความคลาดเคลื่อนค่อนข้างคงที่ แสดงให้เห็นว่ารูปแบบของสมการถดถอย หรือ สมการความสัมพันธ์ที่ได้จากการทดลองนั้นเป็นรูปแบบที่เหมาะสม จึงสามารถนำสมการถดถอยมาทำนายผลการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์จากหางน้ำยางที่แยกสกิมด้วย *A. keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1

4.2.3.3 การเปรียบเทียบค่าจริงจากการทดลอง และค่าทำนายของกิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์ที่ผลิตจาก *A. keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1

เมื่อนำสมการถดถอย (สมการ 9) ที่เหมาะสมมาทำนายผลของตัวแปรตาม หรือ กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์จากหางน้ำยางที่แยกสกิมด้วย *A. keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1 ซึ่งตัวแปรต้นที่ทำการศึกษาคือ ปริมาณของเจลาติน ( $X_1$ ),  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  ( $X_2$ ) และ ค่า pH ( $X_3$ )

พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์ที่ได้จากการทำน่ายมีแนวโน้มที่สอดคล้องกับค่าจริงจากการทดลองดังแสดงดัง ตาราง 19

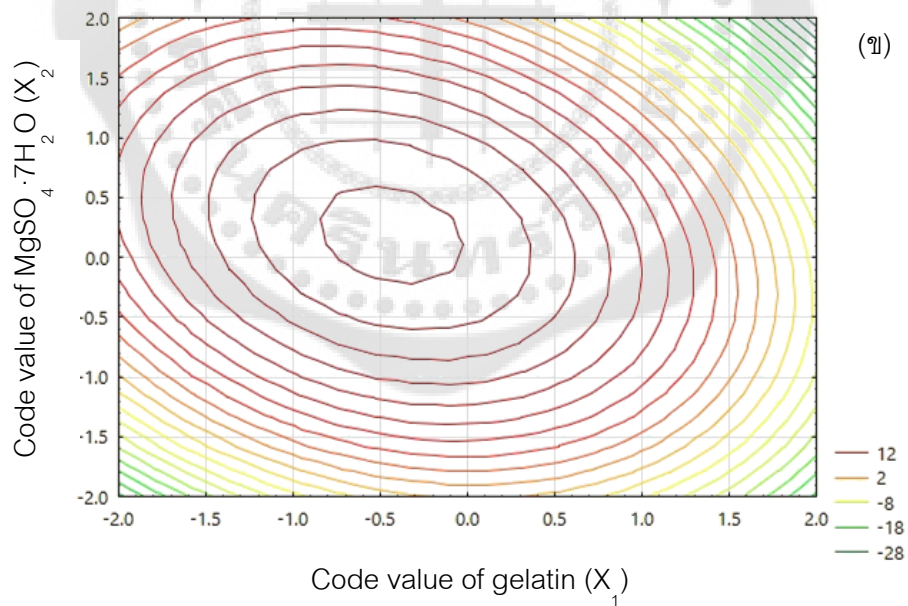
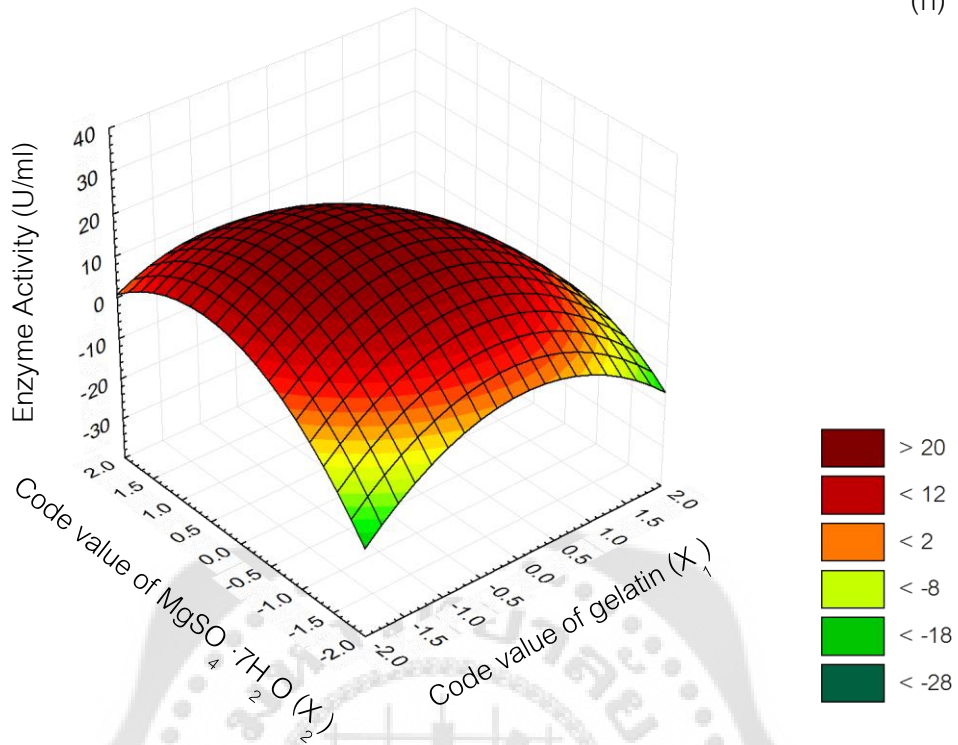
ตาราง 19 การเปรียบเทียบค่าจริง และค่าการทำน่ายกิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์จากหางน้ำยางที่แยกสกิมด้วย *A. keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1

การทดลอง	การทดลองที่	$X_1$	$X_2$	$X_3$	เจลาติน ( $X_1$ )	MgSO <sub>4</sub> ( $X_2$ )	pH ( $X_3$ )	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ (U/ml)	
								ค่าจริง	ค่าทำนาย
Factorial point	1	1	1	1	3.38	0.3	8	10.627	10.759
	2	1	1	-1	3.38	0.3	6	3.387	-1.905
	3	1	-1	1	3.38	0.1	8	17.507	12.637
	4	-1	-1	-1	3.38	0.1	6	0.693	1.085
	5	-1	1	1	0.38	0.3	8	21.893	17.555
	6	-1	1	-1	0.38	0.3	6	12.547	13.471
	7	-1	-1	1	0.38	0.1	8	10.027	11.373
	8	-1	-1	-1	0.38	0.1	6	12.480	8.401
Star point	9	-1.68	0	0	0.7	0.2	7	14.000	15.763
	10	0	-1.68	0	2.38	0.03	7	5.947	8.335
	11	0	0	-1.68	2.38	0.2	5.32	1.250	4.144
	12	1.68	0	0	4.06	0.2	7	0.080	3.910
	13	0	1.68	0	2.38	0.368	7	7.813	11.016
	14	0	0	1.68	2.38	0.2	8.68	14.580	17.279
Center point	15	0	0	0	2.38	0.2	7	22.940	24.417
	16	0	0	0	2.38	0.2	7	23.060	24.417
	17	0	0	0	2.38	0.2	7	31.080	24.417

#### 4.2.3.4 การหาจุดที่เหมาะสมของตัวแปรในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์จาก หางน้ำย่างที่แยกสกิมด้วย *A. keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1

จากสมการถดถอย (สมการ 11) ซึ่งได้จากการศึกษาความสัมพันธ์ของตัวแปรต้น ทั้ง 3 ปัจจัย ได้แก่ ความเข้มข้นของเจลาติน และ  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  รวมถึง ค่า pH เริ่มต้น ในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์จากหางน้ำย่างที่แยกสกิมด้วย *A. keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1 มาเขียนกราฟพื้นผิวตอบสนอง (response surface plot) ซึ่งเป็นกราฟสามมิติ และกราฟคอนทัวร์พล็อต (contour plot) ซึ่งเป็นกราฟสองมิติ แสดงดังภาพประกอบ 14, 15 และ 16 โดยจากภาพทั้ง 3 พบว่าค่าทำนายกิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์ที่สูงที่สุด คือ ความเข้มข้นของเจลาตินที่อยู่ในช่วง 1.68-2.48 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของ  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  อยู่ในช่วง 0.16-0.22 กรัมต่อลิตร และมีค่า pH เริ่มต้นอยู่ในช่วง 7.2-7.8 จะให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ของการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์จากหางน้ำย่างที่แยกสกิมด้วย *A. keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1 ได้สูงที่สุด โดยพบว่า เมื่อใช้ความเข้มข้นของเจลาตินและ  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  เป็น 2.48 และ 0.17 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ pH เริ่มต้น เท่ากับ 7.3 PLA ความเข้มข้น 0.15 กรัมต่อลิตร  $(NH_4)_2SO_4$  ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่า 250 rpm จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด คือ 25.65 ยูนิตต่อมิลลิลิตร จากการทำนายข้างต้นเมื่อนำสภาวะที่เหมาะสมมาทำการทดลองจริง พบว่ากิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์จากหางน้ำย่างที่แยกสกิมด้วย *A. keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1 มีค่าเป็น 25.50 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับกิจกรรมเอนไซม์ที่ได้จากการทำนายด้วยสมการถดถอย และนำมาคำนวณค่า productivity ได้ 0.35 ยูนิตต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง

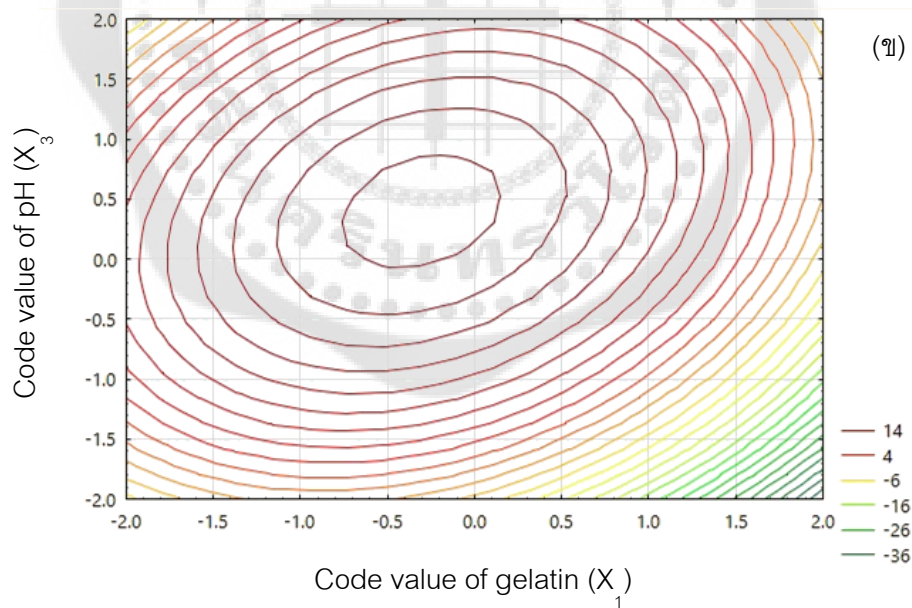
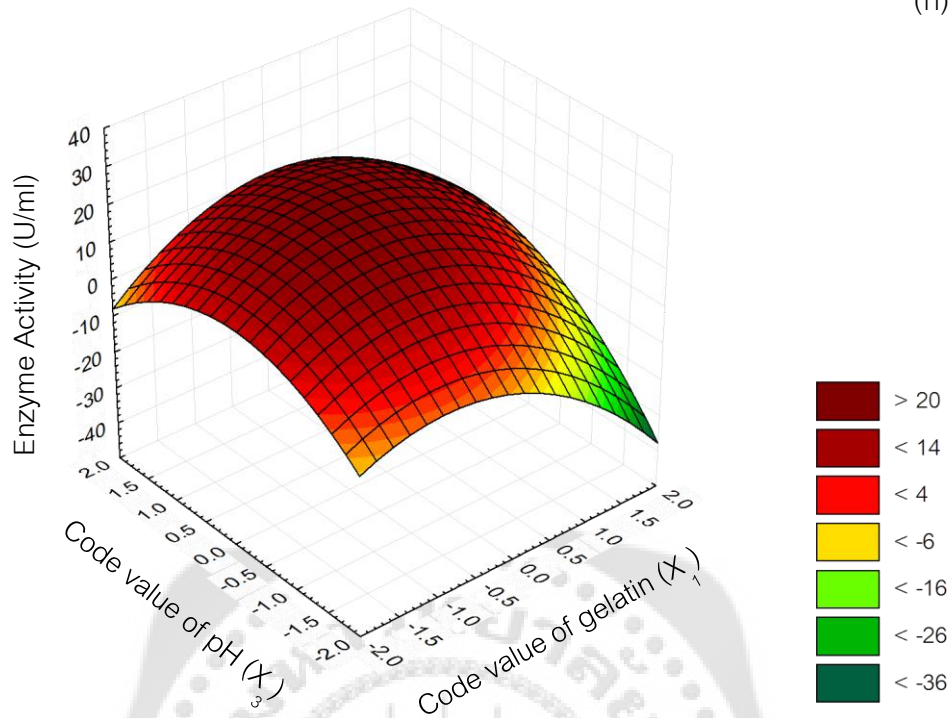
(ก)



(ข)

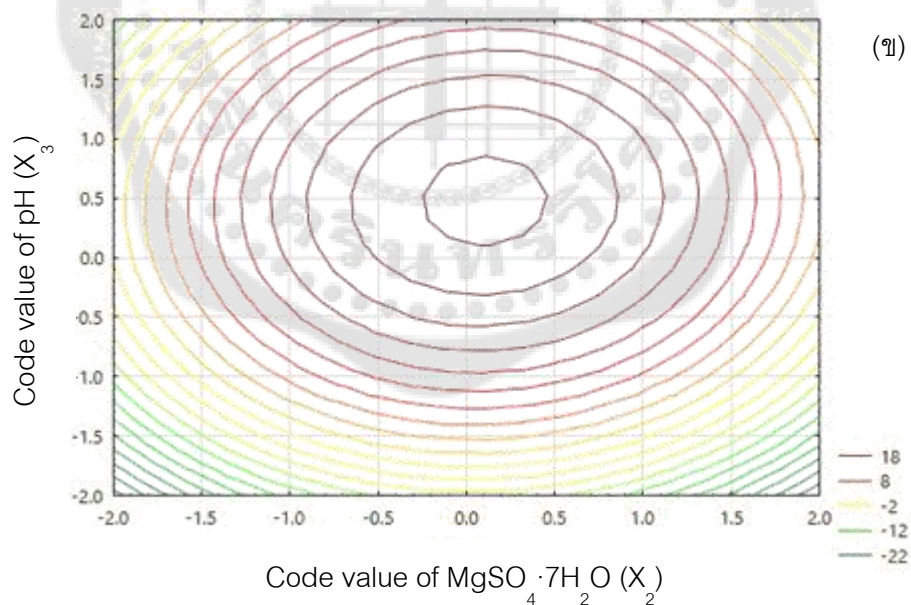
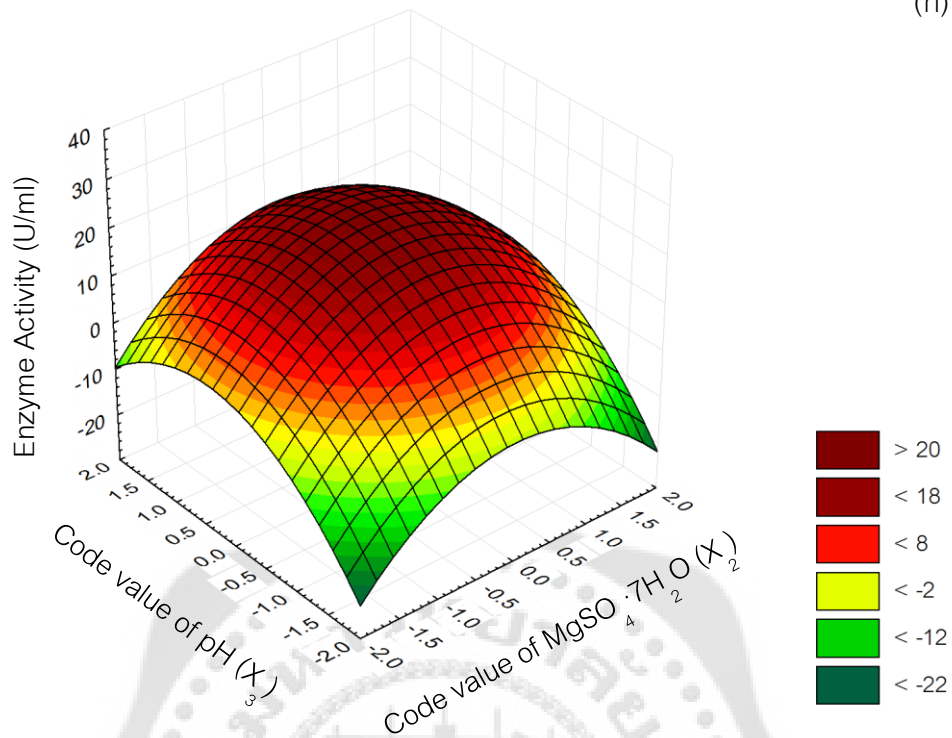
ภาพประกอบ 14 (ก) พื้นผิวตอบสนอง (response surface plot) และ (ข) คอนทัวร์พล็อต (contour plot) ระหว่าง ความเข้มข้นของ  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  กับ เจลาตินโดยมีตัวแปรตามเป็นกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์ที่ผลิตจากหางน้ำยางที่แยกสกิมด้วย *A. keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1 และกำหนดให้มีค่า pH เริ่มต้นเป็น 7

(ก)



ภาพประกอบ 15 (ก) พื้นผิวตอบสนอง (response surface plot) และ (ข) คอนทัวร์พล็อต (contour plot) ระหว่างค่า pH กับ ความเข้มข้นเจลาติน โดยมีตัวแปรตามเป็นกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์ที่ผลิตจากหางน้ำยาที่แยกสกิมด้วย *A. keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1 และกำหนดให้มีค่าความเข้มข้นของ  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  เป็น 0.2 กรัมต่อลิตร

(ก)



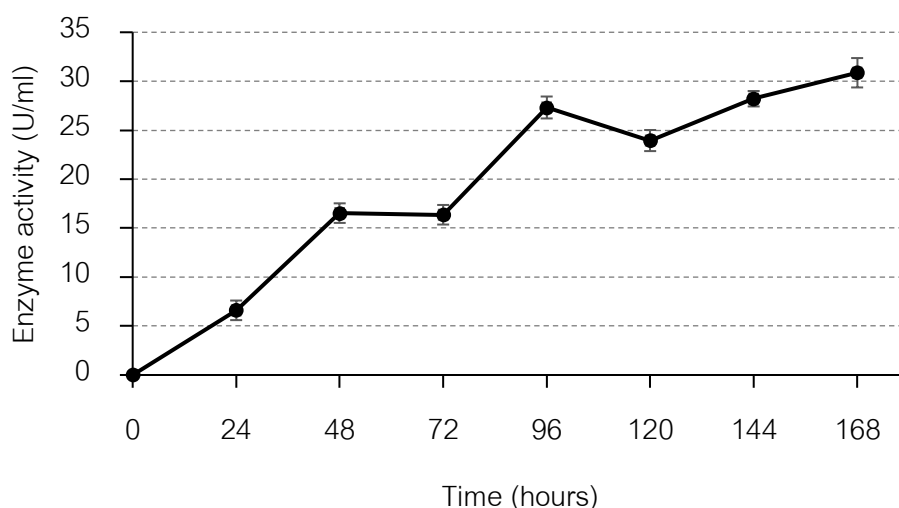
ภาพประกอบ 16 (ก) พื้นผิวตอบสนอง (response surface plot) และ (ข) คอนทัวร์พล็อต (contour plot) ระหว่างค่า pH กับ ความเข้มข้น  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  โดยมีตัวแปรตามเป็นกิจกรรมของ เอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์ที่ผลิตจากหางน้ำยางที่แยกสกิมด้วย *A. keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1 และกำหนดให้มีค่าความเข้มข้นของเจลาติน เป็น 2.38 กรัมต่อลิตร

### 4.3 การศึกษาการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์แบบไม่ปลอดเชื้อจากหางน้ำยางที่แยกสกิมโดย *A. keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1 ในระดับฟลาสก์ ด้วยวิธีการตรึงเซลล์

จากการศึกษาการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์โดยใช้หางน้ำยางที่แยกสกิมในสภาวะปลอดเชื้อ พบว่าหางน้ำยางที่แยกสกิมร่วมกับ basal medium สามารถนำมาใช้ในการผลิตเอนไซม์ได้แต่เนื่องจากในสภาวะการนำของเหลือทิ้งจากโรงงานยางพาราขึ้นไปใช้ประโยชน์และลดต้นทุนในการผลิตเอนไซม์นั้นจึงสนใจที่จะศึกษากระบวนการหมัก เพื่อผลิตเอนไซม์แบบไม่ปลอดเชื้อหรือ non-sterile fermentation และขยายขนาดการผลิตเป็น 2 ลิตร โดยรายละเอียด ดังต่อไปนี้

#### 4.3.1 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์

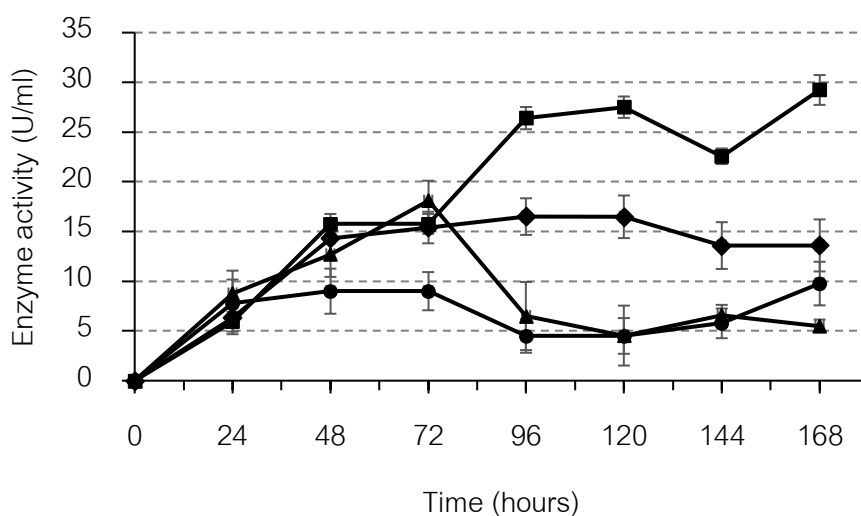
จากการศึกษาการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์แบบไม่ปลอดเชื้อโดย *A. keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1 ในระดับฟลาสก์ โดยการตรึงเซลล์ซึ่งสภาวะที่ใช้ในการศึกษาคือ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 7 ในหางน้ำยางที่แยกสกิมที่มีการเติมอาหาร basal medium เป็นระยะเวลา 168 ชั่วโมง โดยมีการเก็บตัวอย่างทุก ๆ 24 ชั่วโมง พบว่า ค่ากิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์สูงขึ้นจนถึงชั่วโมงที่ 96 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เป็น 27 ยูนิตต่อมิลลิลิตร คิดเป็น productivity เท่ากับ 0.28 ยูนิตต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง หลังจากชั่วโมงที่ 96 พบว่า *A. keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1 สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์ได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในภาพประกอบ 17 โดยที่ 168 ชั่วโมงสามารถผลิตเอนไซม์ 30.87 ยูนิตต่อมิลลิลิตร คิดเป็น productivity เท่ากับ 0.18 ยูนิตต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง ดังนั้น *A. keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1 สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์จากหางน้ำยางที่แยกสกิมด้วยวิธีการตรึงเซลล์ในระดับฟลาสก์ได้สูงสุดที่เวลา 96 ชั่วโมง ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับการหมักแบบปลอดเชื้อต้องใช้ระยะเวลาในการหมักนานขึ้น 24 ชั่วโมง แต่เมื่อเปรียบเทียบค่า productivity พบว่า การหมักแบบปลอดเชื้อให้ productivity สูงกว่า



ภาพประกอบ 17 ระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์แบบไม่ปลดเชื้อจากหางน้ำยางที่แยกสกิมโดย *A. keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1 ในระดับฟลาสก์ด้วยวิธีการตรึงเซลล์

#### 4.3.2 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์

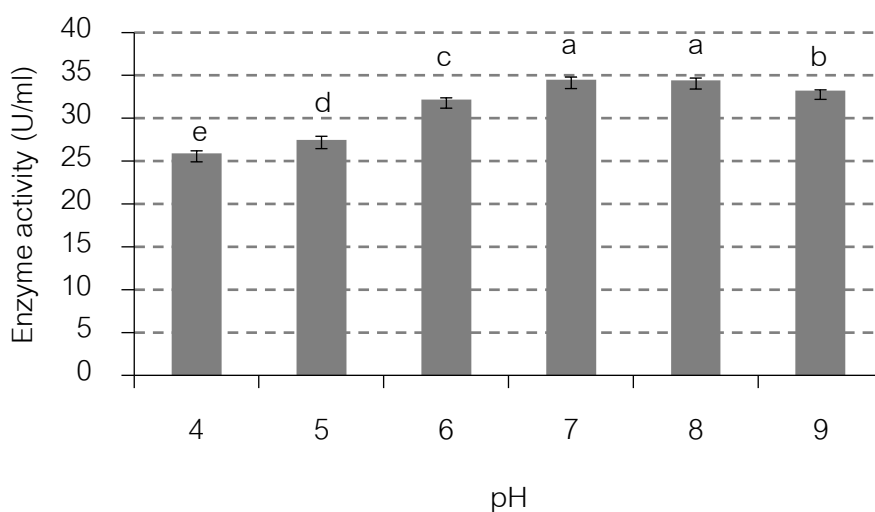
จากการศึกษาการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์แบบไม่ปลดเชื้อโดย *A. keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1 ในระดับฟลาสก์ ด้วยวิธีการตรึงเซลล์ โดยมีสภาวะที่ใช้ในการศึกษา คือ มีค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 7 ในหางน้ำยางที่แยกสกิมที่มีการเติมอาหาร basal medium เป็นระยะเวลา 168 ชั่วโมง และนำไปปมที่อุณหภูมิ 40, 45, 50 และ 55 องศาเซลเซียส โดยมีการเก็บตัวอย่างทุก ๆ 24 ชั่วโมง พบว่า ในช่วงแรก *A. keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1 สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์ ในแต่ละอุณหภูมิมีกิจกรรมของเอนไซม์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่เมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 96 ทุกอุณหภูมิมีแนวโน้มของค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลงในขณะที่เมื่อเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส การผลิตเอนไซม์ยังคงสูงขึ้นเล็กน้อย ดังที่แสดงในภาพประกอบ 18 ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์จากหางน้ำยางที่แยกสกิมโดย *A. keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1 ในระดับฟลาสก์ด้วยวิธีการตรึงเซลล์คือ 45 องศาเซลเซียส ในสภาวะไม่ปลดเชื้อ ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ได้ 26.4 ยูนิตต่อมิลลิลิตร คิดเป็น productivity เท่ากับ 0.28 ยูนิตต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง



ภาพประกอบ 18 ผลของอุณหภูมิในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์แบบไม่ปลดเชื้อจากทางน้ำยางที่แยกสกิมโดย *A. keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1 ในระดับฟลาสก์ ด้วยวิธีการตรึงเซลล์ โดยกำหนดให้ ●, 40 °C ; ■, 45 °C ; ▲, 50 °C และ ◆, 55 °C ตามลำดับ

#### 4.3.3 การศึกษา pH เริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์

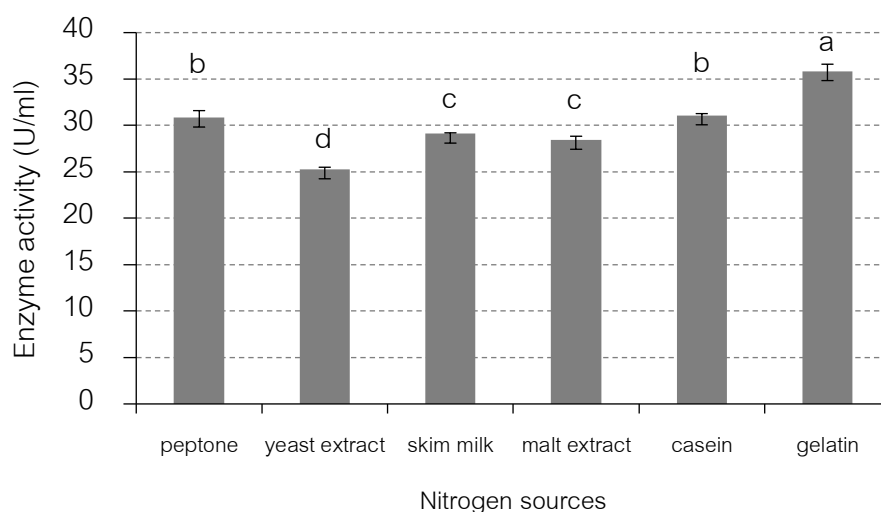
จากการศึกษาการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์แบบไม่ปลดเชื้อในระดับฟลาสก์โดย *A. keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1 ด้วยวิธีการตรึงเซลล์ในทางน้ำยางที่แยกสกิมที่มีการเติมอาหาร basal medium โดยใช้เวลาในการผลิตเอนไซม์ 96 ชั่วโมงที่ 45 องศาเซลเซียส และทำการศึกษาค่า pH ต่างๆ ที่ 4, 5, 6, 7, 8 และ 9 พบว่า ที่ค่า pH 7 และ 8 สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ใกล้เคียงกันและไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้น ค่า pH ที่เหมาะสมที่สุดซึ่ง *A. keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1 ใช้ในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์แบบไม่ปลดเชื้อในระดับฟลาสก์ด้วยวิธีการตรึงเซลล์ คือ pH 7 เนื่องจากให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุด เท่ากับ 34.47 ยูนิตต่อมิลลิลิตร คิดเป็น productivity เท่ากับ 0.36 ยูนิตต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งแสดงดัง ภาพประกอบ 19 ซึ่งผลของค่า pH ที่เหมาะสมในสภาวะการหมักแบบไม่ปลดเชื้อมีค่าใกล้เคียงกับสภาวะแบบปลดเชื้อ คืออยู่ในช่วง pH เป็นกลาง



ภาพประกอบ 19 ผลของค่า pH ในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์แบบไม่ปลดเชื้อจากหางน้ำยางที่แยกสกิมโดย *A. keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1 ในระดับฟลาสก์ ด้วยวิธีการตรึงเซลล์ ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง โดยตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กแสดงถึงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี LSD ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

#### 4.3.4 การศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์

จากการศึกษาการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์แบบไม่ปลดเชื้อในระดับฟลาสก์ โดย *A. keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1 ด้วยวิธีการตรึงเซลล์ ในหางน้ำยางที่แยกสกิมที่มีการเติมอาหาร basal medium โดยใช้เวลาในการผลิตเอนไซม์ 96 ชั่วโมงที่ 45 องศาเซลเซียส และมีค่า pH เป็น 7 จากนั้นทำการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม ได้แก่ peptone, yeast extract, skim milk, malt extract, casein และ gelatin พบว่า peptone กับ casein และ skim milk กับ malt extract ให้ผลที่ไม่แตกต่างกัน และ gelatin ให้ผลค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด ดังนั้นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์จากหางน้ำยางที่แยกสกิมโดย *A. keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1 ด้วยวิธีการตรึงเซลล์แบบไม่ปลดเชื้อในระดับฟลาสก์ คือ gelatin ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดเท่ากับ 35.83 ยูนิตต่อมิลลิลิตร คิดเป็นค่า productivity เท่ากับ 0.37 ยูนิตต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง ตามภาพประกอบ 20



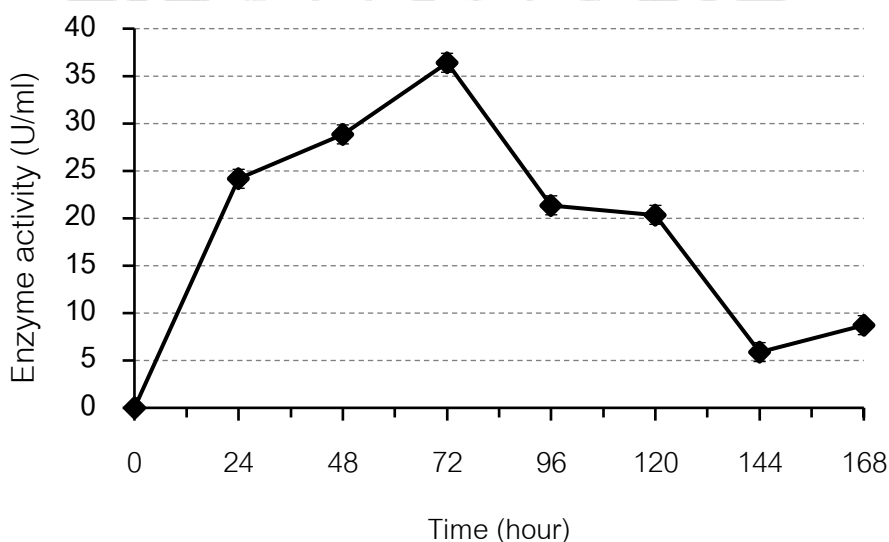
ภาพประกอบ 20 ผลของแหล่งไนโตรเจนในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์แบบไม่ปลดเชื้อจากหางน้ำยางที่แยกสกิมโดย *A. keratinolytica* สายพันธุ์ T16- 1 ในระดับพลาสติก ด้วยวิธีการตั้งเซลล์ ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง และมีค่า pH เริ่มต้นเป็น 7 โดยตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กแสดงถึงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี LSD ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

จากการศึกษาข้างต้นสรุปได้ว่า *A. keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1 ใช้เจลาตินเป็นแหล่งไนโตรเจนร่วมกับสารอาหารในหางน้ำยางที่แยกสกิมและเสริมด้วย basal medium ที่ประกอบด้วย  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตร  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  ความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตร  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ความเข้มข้น 2 กรัมต่อกรัม  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ความเข้มข้น 0.2 กรัมต่อลิตร และ เจลาติน ความเข้มข้น 2.38 กรัม โดยมีค่า pH เริ่มต้นเป็น 7 และทำการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ที่ 45 องศาเซลเซียส โดยการตั้งเซลล์ด้วยแผ่นใยขัดแบบไม่ปลดเชื้อในระดับพลาสติก สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์ ได้สูงที่สุดเท่ากับ 35 ยูนิตต่อมิลลิลิตร คิดเป็นค่า productivity เท่ากับ 0.36 ยูนิตต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง

#### 4.4 การศึกษาการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์แบบไม่ปลดเชื้อจากทาง น้ำยาที่แยกสกิมโดย *A. keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1 ในถังหมักแบบไบพัดกวน ขนาด 2 ลิตร ด้วยวิธีการตรึงเซลล์

##### 4.4.1 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์

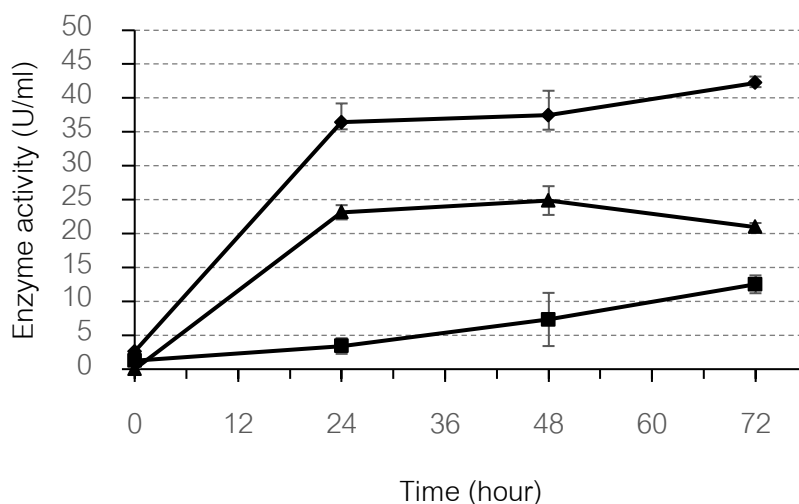
จากการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์แบบไม่ปลดเชื้อในถังหมักแบบไบพัดกวนขนาด 2 ลิตร ซึ่งปริมาตรทำงาน (working volume) เท่ากับ 1.5 ลิตร ด้วยวิธีการตรึงเซลล์จาก *A. keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1 และมีการเสริมด้วยอาหาร basal medium โดยทำการศึกษาระยะเวลาในการผลิตทั้งหมด 168 ชั่วโมง ซึ่งมีอัตราการกวนอยู่ที่ 100 rpm ไม่มีการให้อากาศ โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 45 องศาเซลเซียส พบว่า กิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์มีค่าสูงขึ้น โดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดที่ 36 ยูนิตต่อมิลลิลิตรที่เวลา 72 ชั่วโมง คิดเป็นค่า productivity เท่ากับ 0.5 ยูนิตต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง และเมื่อเวลาผ่านไปค่ากิจกรรมของเอนไซม์มีค่าลดลง ดังแสดงในภาพประกอบ 21 ดังนั้นกล่าวได้ว่า การผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์ที่เวลา 72 ชั่วโมง เป็นเวลาที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์แบบไม่ปลดเชื้อด้วยวิธีการตรึงเซลล์ในถังหมักแบบไบพัดกวนขนาด 2 ลิตร จาก *A. keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1



ภาพประกอบ 21 ผลของระยะเวลาในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์แบบไม่ปลดเชื้อจาก  
ทางน้ำยาที่แยกสกิมด้วย *A. keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1 ในถังหมักแบบไบพัดกวนขนาด  
2 ลิตร ด้วยวิธีการตรึงเซลล์ โดยใช้อัตราการกวนเท่ากับ 100 rpm ไม่มีการให้อากาศ และ  
ควบคุมอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

#### 4.4.2 การศึกษาอัตราการกวนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์

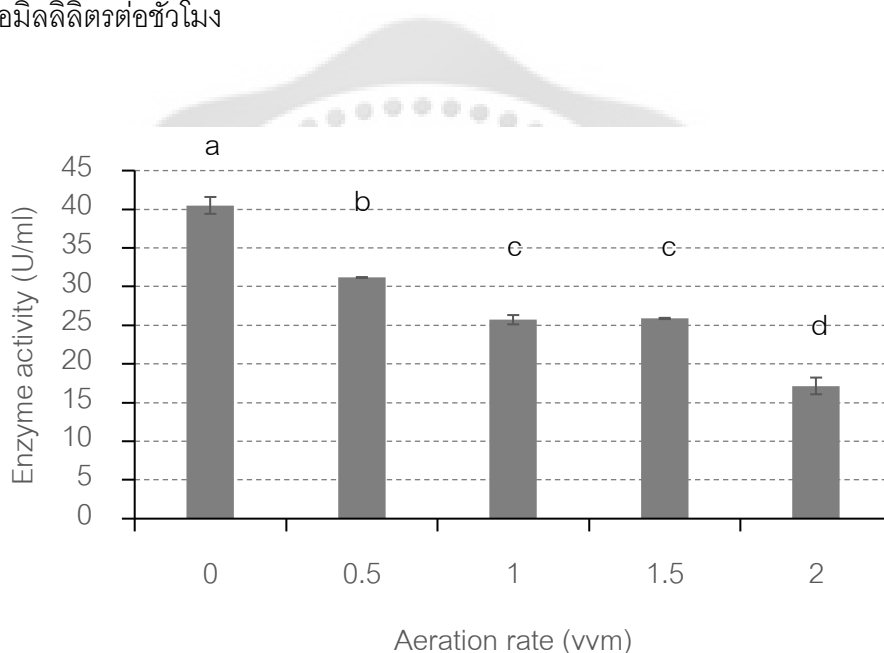
จากการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์แบบไม่ปลอดเชื้อจากหางน้ำย่างที่แยกสกิมในถังหมักแบบไบพัคกวนขนาด 2 ลิตร ด้วยวิธีการตรึงเซลล์ จาก *A. keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1 และมีการเสริมด้วยอาหาร basal medium ซึ่งใช้เวลาในการผลิตเอนไซม์ 72 ชั่วโมง โดยไม่ให้อากาศ และทำการศึกษาอัตราการกวนที่ 100, 150 และ 200 rpm พบว่า เมื่อเวลาผ่านไปค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่อัตราการกวนต่างๆ มีค่าเพิ่มขึ้น แต่พบว่าที่อัตราการกวนเท่ากับ 150 มีค่าลดลงที่ 72 ชั่วโมง แต่อย่างไรก็ตามพบว่า อัตราการกวนที่ 100 rpm ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุด เท่ากับ 40.5 หน่วยต่อมิลลิลิตร และมีค่า productivity เท่ากับ 0.56 หน่วยต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งเมื่อเพิ่มอัตราการกวนที่สูงขึ้นทำให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ลดลงตามลำดับ ดังแสดงในภาพประกอบ 22



ภาพประกอบ 22 ผลของอัตราการกวนในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์แบบไม่ปลอดเชื้อจากหางน้ำย่างที่แยกสกิมด้วย *A. keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1 ในถังหมักแบบไบพัคกวนขนาด 2 ลิตร ด้วยวิธีการตรึงเซลล์ โดยไม่มีการให้อากาศ ควบคุมอุณหภูมิที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งกำหนดให้  $\blacklozenge$ , 100;  $\blacktriangle$ , 150 และ  $\blacksquare$ , 200 rpm ตามลำดับ

#### 4.4.3 การศึกษาอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์

จากการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์แบบไม่ปลดเชื้อจากหางน้ำยางที่แยกสกิมในถังหมักแบบไบพัคกวนขนาด 2 ลิตร ด้วยวิธีการตรึงเซลล์ จาก *A. keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1 และมีการเสริมด้วยอาหาร basal medium ซึ่งใช้เวลาในการผลิตเอนไซม์ 72 ชั่วโมง และมีอัตราการกวน 100 rpm โดยทำการศึกษาศักยภาพให้อากาศที่ 0.5, 1, 1.5, 2 vvm และไม่มีการเติมอากาศพบว่า เมื่อมีการเติมการอากาศมากขึ้น ทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลงตามลำดับ ดังภาพประกอบ 23 ดังนั้นจึงสรุปได้ว่ากระบวนการหมักเมื่อผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ไม่จำเป็นต้องใช้การเติมอากาศทำให้ได้กิจกรรมสูงที่สุดเท่ากับ 40.5 ยูนิตต่อมิลลิลิตร คิดเป็นค่า productivity เท่ากับ 0.56 ยูนิตต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง



ภาพประกอบ 23 ผลของอัตราการให้อากาศในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์แบบไม่ปลดเชื้อจากหางน้ำยางที่แยกสกิมด้วย *A. keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1 ในถังหมักแบบไบพัคกวนขนาด 2 ลิตร ด้วยวิธีการตรึงเซลล์ อัตราการกวน 100 rpm ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

จากการที่ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์แบบไม่ปลอดเชื้อโดยใช้หางน้ำย่างที่แยกสกิมด้วย *A. keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1 ในถังหมักแบบไบปัด กวณขนาด 2 ลิตร ด้วยวิธีการตรึงเซลล์ พบว่า สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์ได้สูงสุดเมื่อใช้ อัตราการกวนอยู่ที่ 100 rpm โดยไม่ให้อากาศ และใช้เวลาในการผลิตที่ 72 ชั่วโมง ได้กิจกรรมของเอนไซม์ เท่ากับ 40.5 ยูนิตต่อมิลลิลิตรและคิดเป็นค่า productivity เท่ากับ 0.56 ยูนิตต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง

#### 4.5 การวิเคราะห์หางน้ำย่างที่แยกสกิมหลังจากการหมัก

หลังจากการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์ด้วย *A. keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1 ในสภาวะปลอดเชื้อพบว่า องค์ประกอบต่างๆ ภายในหางน้ำย่างที่แยกสกิมมีค่าดังนี้ COD BOD TKN แอมโมเนียไนโตรเจน สังกะสี ปริมาณโปรตีน น้ำตาลรีดิวซ์ น้ำตาลทั้งหมด และ เฟอร์ฟิวรัล มีค่าเท่ากับ 14,000, 259.4, 12.82, 15.57, 11.51, 223.23, 42.05, 623.42 และ <10 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และมีค่า pH อยู่ในช่วง 6.8-7.0 และในสภาวะที่ไม่ปลอดเชื้อ มีองค์ประกอบต่างๆ ภายในหางน้ำย่างที่แยกสกิมมีค่าดังนี้ COD BOD TKN แอมโมเนียไนโตรเจน สังกะสี ปริมาณโปรตีน น้ำตาลรีดิวซ์ น้ำตาลทั้งหมด มีค่าเท่ากับ 18,456, 236.4, 3.4, 4.1, 64.57, 0.3 และ 1,336 มิลลิกรัมต่อลิตร แสดงดังตาราง 20 ซึ่งจะเห็นได้ว่าองค์ประกอบต่างๆ ที่วัดได้ หลังจากการหมักทั้งแบบปลอดเชื้อ และไม่ปลอดเชื้อมีค่าลดลง เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์ใช้สารอาหารในการเจริญ และผลิตเอนไซม์ซึ่งเอนไซม์ที่ได้สามารถนำไปย่อยสลายพอลิแลคไทด์

#### 4.6 การนำเอนไซม์ไปประยุกต์ใช้ในการย่อยสลายพอลิแลคไทด์

เมื่อนำเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์ที่ผลิตจากหางน้ำย่างที่แยกสกิมด้วย *A. keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1 มาย่อยสลายผง PLA ปริมาณ 1.00 กรัม โดยใช้เอนไซม์ 25.50 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ทำปฏิกิริยาที่ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ในถุงไดอะไลซิสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า เอนไซม์สามารถย่อยสลาย PLA ผงได้ และคิดเป็นน้ำหนักที่หายไปร้อยละ 32.12 ดังนั้น แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ ที่ผลิตได้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการย่อยสลายพอลิแลคไทด์เพื่อนำมา recycle ต่อบริโภค

ตาราง 20 การวิเคราะห์เปรียบเทียบทางน้ำที่ยกสภิมก่อนหมักและหลังหมัก

องค์ประกอบ	ทางน้ำข้าง	สภาวะในการหมัก			
		ทางน้ำข้างที่ยกสภิมแบบไม่ปลดเชื้อ		ทางน้ำข้างที่ยกสภิมแบบปลดเชื้อ	
		ก่อนการหมัก	หลังการหมัก	ก่อนการหมัก	หลังการหมัก
COD (มิลลิกรัมต่อลิตร)	91,775	31,840	18,456	23,000	14,000
BOD (มิลลิกรัมต่อลิตร)	62,000	12,825	236	315.0	259
TKN (มิลลิกรัมต่อลิตร)	4,953	2,680	3	65	13
แอมโมเนียไนโตรเจน (มิลลิกรัมต่อลิตร)	3,217	2,111	4	53	16
สังกะสี (มิลลิกรัมต่อลิตร)	144	71	65	62	12
ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อลิตร)	831	531	7	287	223
น้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	1,197	16	0.3	66	42
น้ำตาลทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ND	1,836	1,336	1086	623
เฟอริฟิวรัล (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ND	<10	ND	<10	<10
pH	11.0-12.0	2.0-3.0	6.8-7.0	6.8-7.0	6.8-7.0

## บทที่ 5

### สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

การผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์จากหางน้ำย่างที่แยกสปีชีส์พบว่า การใช้เจลาตินเป็นแหล่งไนโตรเจนส่งผลให้ *A. keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1 สามารถผลิตเอนไซม์สูงที่สุด โดยการผลิตเอนไซม์ในสภาวะแบบปลอดเชื้อ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส มี pH เริ่มต้นที่ 7.3 และอัตราการเขย่า 250 rpm เป็นเวลา 72 ชั่วโมงทำให้มีกิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุด เท่ากับ 25.50 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และคิดเป็น productivity ได้เป็น 0.35 ยูนิตต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง และสภาวะแบบไม่ปลอดเชื้อ ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ที่ pH เริ่มต้นที่ 7.0 และอัตราการเขย่า 150 rpm เป็นเวลา 96 ชั่วโมงเป็นสภาวะที่ให้กิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุด มีค่าเท่ากับ 35.50 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และคิดเป็น productivity ได้เป็น 0.36 ยูนิตต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง นอกจากนี้เมื่อนำไปขยายการผลิตเอนไซม์เป็นการใช้ถังหมักแบบไบปัดกวน ขนาด 2 ลิตรแบบไม่ปลอดเชื้อ ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส มี pH เริ่มต้นที่ 7.0 และอัตราการเขย่า 100 rpm เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยไม่มีการเติมอากาศ พบว่าให้ผลของกิจกรรมเอนไซม์สูงสุดซึ่งมีค่าเท่ากับ 40.5 ยูนิตต่อมิลลิลิตร คิดค่า Productivity เป็น 0.56 ยูนิตต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง ดังตาราง 21 โดยเมื่อนำเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์มาย่อยผง PLA ในถุงไดอะไลซิสที่ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าสามารถคิดเป็นน้ำหนักที่หายไปได้ร้อยละ 32.12

ตาราง 21 เปรียบเทียบผลกิจกรรมเอนไซม์ที่ได้จากการผลิตด้วยวิธีการต่างๆ

สภาวะการหมัก	กิจกรรมเอนไซม์ (U/mL)	Productivity (U/mL/h)
แบบปลอดเชื้อ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เวลา 72 ชั่วโมง pH เริ่มต้น 7.3 อัตราการเขย่า 250 rpm	25.50	0.35
แบบไม่ปลอดเชื้อ อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เวลา 96 ชั่วโมง pH เริ่มต้น 7 อัตราการเขย่า 150 rpm	35.00	0.36
ถังหมักขนาด 2 ลิตร อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เวลา 72 ชั่วโมง pH เริ่มต้น 7 อัตราการกวน 100 rpm ไม่มีการเติมอากาศ	40.50	0.56

จากการรายงานว่าเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์ที่ผลิตด้วย *A. keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1 จัดอยู่ในกลุ่มเอนไซม์โปรติเอสชนิดเซอรินโปรติเอส ที่สามารถไฮโดรไลซ์พันธะเอสเทอร์ของพอลิแลคไทด์ได้ (Sukkhum; et al. 2009: 459-467) โดยปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสด้วยจุลินทรีย์นั้นมาจากองค์ประกอบของอาหารโดยเฉพาะอย่างยิ่งแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน อีกทั้งยังมีปัจจัยทางกายภาพ อาทิ อุณหภูมิ ค่า pH ระยะเวลาในการบ่ม อัตราการเขย่า และความเข้มข้นของหัวเชื้อ เป็นต้น (Balachandran; Duraipandiyam; & Ignacimuthu. 2012: S392-S400) สำหรับการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์จากหางน้ำยางที่แยกสกิมแบบปลอดเชื้อด้วย *A. keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1 ในระดับฟลาสก์ มีการเติม basal medium ลงไปเพื่อใช้เป็น supplement ในการทดลองนี้ได้ใช้การออกแบบการทดลองตามวิธีของ Packett และ Burman เพื่อคัดกรองปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์ ได้อย่างมีประสิทธิภาพและรวดเร็ว ทำให้ประหยัดค่าใช้จ่าย (Korayem; et al. 2015: 209-217) โดยทำการศึกษาทั้งหมด 7 ปัจจัย พบว่ามี 3 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์จากหางน้ำยางที่แยกสกิม ได้แก่ เจลาติน  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  และ ค่า pH เริ่มต้น โดยมีระดับนัยสำคัญเท่ากับ 0.30 ที่ค่า  $R^2$  เท่ากับ 0.858 ซึ่งแสดงว่าการออกแบบการทดลองตามวิธีของ Packett และ Burman มีความน่าเชื่อถือสามารถยอมรับได้จากการทดลองทั้งหมด 12 การทดลอง พบว่าการทดลองที่ 6 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุด เท่ากับ 16.44 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร โดยเจลาตินเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตเอนไซม์ ซึ่งเจลาตินเป็นตัวเลือกที่ดีในการเป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนและตัวชักนำในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์ และมีต้นทุนต่ำ (Li; et al. 2013: 1143-1149) อีกทั้งยังพบว่าค่า pH เป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์อีกด้วยซึ่งพบว่า ในการผลิตแบบปลอดเชื้อและไม่ปลอดเชื้อมีค่า pH เริ่มต้นที่เหมาะสมในการผลิตอยู่ที่ 7.3 และ 7 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์ของ *Amycolatopsis orientalis* ที่มีค่า pH เริ่มต้นที่เหมาะสมเป็น 7 (Jarerat; Tokiwa; & Tanaka. 2006: 726-731) จากปัจจัยทั้ง 3 ปัจจัยที่ได้ข้างต้นมาหาจุดที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์ได้สูงที่สุด โดยการหาพื้นผิวตอบสนองจากการออกแบบการทดลองทางสถิติวิธี Central Composite Design พบว่า จากทั้งหมด 17 การทดลอง มีการทดลองที่ 15, 16 และ 17 เป็นการทดลองที่เรียกว่า Center point มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์มากที่สุด เท่ากับ 22.94, 23.06 และ 31.08 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยมีความเข้มข้นของเจลาตินเป็น 2.38 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของ  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  เป็น 0.2 กรัมต่อลิตร และมีค่า pH เริ่มต้นเป็น 7.3 โดยการทดลองที่ Center point ของการออกแบบการทดลองเป็นการทำการทดลองซ้ำสำหรับการคำนวณความคลาดเคลื่อน (Li; et al. 2007: 1381-1388) โดยวิธีนี้เป็นการหาจุดที่เหมาะสมของสภาวะในกระบวนการหมัก เช่น ปัจจัยทางกายภาพ อาทิ อุณหภูมิ ค่า pH อัตราการให้อากาศและ อัตราการกวนเป็นต้น อีกทั้งยังเป็นการหาจุดที่

เหมาะสมขององค์ประกอบของอาหารที่ใช้ในกระบวนการหมัก อาทิ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน กลีโกล์ และตัวชักนำ เป็นต้น ซึ่งวิธีการนี้ถูกนำไปใช้ในการปรับปรุงการผลิตเอนไซม์ที่สำคัญได้อย่างประสบความสำเร็จ ตัวอย่างเช่น เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส เอนไซม์ไซเลส เอนไซม์คาราติเนส และ เอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์ เป็นต้น (Sukkhum; Tokuyama; & Kitpreechavanich. 2012: 92-99; Anbu; et al. 2007: 1298-1303; Li; et al. 2007: 1381-1388; & Tanyildizi; Özer; & Elibol. 2005: 2291-2296) ซึ่งผลการทดลองจากการออกแบบการทดลองทางสถิติ ด้วยวิธี central composite design พบว่าข้อมูลของการทดลองมีความเหมาะสมต่อการนำไปวิเคราะห์การถดถอย เนื่องจากข้อมูลมีการแจกแจงแบบปรกติบนกราฟ normal probability plot และมีความแปรปรวนของความคลาดเคลื่อนค่อนข้างคงที่ จากข้อมูลมีความเหมาะสมต่อการนำมาวิเคราะห์การถดถอย โดยการนำมาสร้างสมการถดถอย 9 โดยสมการถดถอยนี้มีค่า  $R^2$  เท่ากับ 0.869 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของเจลาติน  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  และค่า pH เริ่มต้นสามารถอธิบายค่ากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์ได้ ร้อยละ 86.9 และส่วนที่เหลือร้อยละ 13.1 ไม่สามารถอธิบายค่ากิจกรรมเอนไซม์ได้ เนื่องจากเป็นผลจากตัวแปรอิสระอื่นที่ไม่สามารถควบคุมได้ อีกทั้งสมการถดถอยนี้มีค่าความน่าจะเป็นของการทดลอง (Sig.) ของการวิเคราะห์ความแปรปรวนของการวิเคราะห์การถดถอยเชิงพหุคูณน้อยกว่าค่า  $\alpha$  ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 แสดงให้เห็นว่ามีอย่างน้อยหนึ่งตัวแปรที่อธิบายสมการถดถอยได้ จากนั้นนำสมการที่ได้มาเขียนกราฟพื้นผิวตอบสนอง และกราฟคอนทัวร์พล็อต เพื่อหาความสัมพันธ์ของ 3 ตัวแปร คือ เจลาติน  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  และ pH ซึ่งส่งผลต่อกิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์ พบว่าจุดที่เหมาะสมของตัวแปรต้นทั้งสาม คือความเข้มข้นของเจลาตินอยู่ในช่วง 1.68-2.48 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของ  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  อยู่ในช่วง 0.16-0.22 กรัมต่อลิตร และค่า pH เริ่มต้นอยู่ในช่วง 7.2-7.8 ซึ่งคาดว่าทำให้ *A. keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1 สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์จากหางน้ำย่างที่แยกสกิมแบบปลอดเชื้อได้ผลดีที่สุด และพบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของเจลาตินที่ 2.48 กรัมต่อลิตร  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  เป็น 0.17 กรัมต่อลิตร และค่า pH เท่ากับ 7.3 จะให้ค่าทำนายกิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด คือ 25.65 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และเมื่อนำสภาวะปัจจัยที่ได้จากการคำนวณทางสถิติไปทดลองจริงพบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์จากหางน้ำย่างที่แยกสกิมด้วย *A. keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1 ในระดับฟลasks โดยมีการผสม basal medium ลงไปเป็น supplement แบบปลอดเชื้อที่ได้มีค่าเป็น 25.50 ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยคิดเป็นค่า productivity เท่ากับ 0.35 ยูนิตต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับค่ากิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์ที่ได้จากการทำนายตามสมการถดถอย 9 ที่ได้จากการประมาณค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยเชิงพหุคูณ ที่มีระดับนัยสำคัญที่ 0.05 และตามตาราง 19 พบว่า ผลของค่ากิจกรรมที่ทำนายและค่าจากผลการทดลองจริงของบางการทดลองมีความแตกต่างกัน เช่นการทดลองที่ 2 และ 12 ซึ่งสามารถพิสูจน์ได้ด้วยค่า  $R^2$  เท่ากับ 0.869

พบว่าตัวแปรต้นสามารถอธิบายตัวแปรตามได้ร้อยละ 86.9 แต่อีกร้อยละ 13.1 ไม่สามารถอธิบายได้ เนื่องจากตัวแปรอื่นๆที่ไม่สามารถควบคุมได้ นอกจากนี้สามารถถอย 9 พบว่าความเข้มข้นของเจลาตินมีค่าสัมประสิทธิ์อิทธิพลเป็นลบ ซึ่งให้เห็นว่าเมื่อปริมาณของเจลาตินลดลงส่งผลให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์เพิ่มขึ้น และค่า pH เริ่มต้นมีค่าสัมประสิทธิ์อิทธิพลเป็นบวก หรือกล่าวได้ว่าเมื่อเพิ่มค่า pH เริ่มต้นถึงจุดที่เหมาะสมจะส่งผลให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์เพิ่มขึ้น

จากการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์แบบไม่ปราศจากเชื้อจากหางน้ำย่างที่แยกสปีชีส์ด้วย *A. keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1 ในระดับพลาสมาจากการตั้งเซลล์ด้วยแผ่นใยขัดและมีการเสริมด้วยอาหาร basal medium โดยใช้วิธีการ One-factor at a time พบว่าการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง โดยมีค่า pH เริ่มต้นเป็น 7 และมีแหล่งไนโตรเจนเป็นเจลาติน สามารถผลิตเอนไซม์ให้มีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุด เท่ากับ 35 ยูนิตต่อมิลลิลิตร คิดเป็นค่า productivity ได้เท่ากับ 0.36 ยูนิตต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Sukkhum และคนอื่นๆ ว่า *A. keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1 สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์ได้สูงสุดที่ 96 ชั่วโมง เมื่อใช้ basal medium เพียงอย่างเดียวในการผลิตเอนไซม์ (Sukkhum; Tokuyama; & Kitpreechavanich. 2009: 302-306)

จากการศึกษาการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์จากหางน้ำย่างที่แยกสปีชีส์ด้วย *A. keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1 ในสภาวะปลอดเชื้อในข้างต้น มีการเลือกใช้วิธีทางสถิติเพื่อต้องการรวบรวมข้อมูลเบื้องต้นก่อน เนื่องจากมีความสะดวก รวดเร็ว และได้ข้อมูลที่ละเอียดมากกว่าวิธีอื่นๆ โดยพบว่าสามารถนำหางน้ำย่างที่แยกสปีชีส์มาผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์ได้ จากนั้นจึงสนใจที่จะนำหางน้ำย่างที่แยกสปีชีส์มาผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์ด้วย *A. keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1 ในสภาวะไม่ปลอดเชื้อ เนื่องจากการนำของเหลือทิ้งจากโรงงานยางพาราขึ้นไปใช้ประโยชน์และลดต้นทุนในการผลิตเอนไซม์ ซึ่งการศึกษารูปแบบไม่ปลอดเชื้อนี้มีการเลือกใช้วิธีการ one-factor at a time ในการศึกษาเนื่องจากมีข้อมูลเบื้องต้นจากการศึกษาสภาวะปลอดเชื้อแล้วจึงเพียงต้องการปรับเปลี่ยนสภาวะเพื่อให้มีสภาวะของการผลิตเอนไซม์ในรูปแบบไม่ปลอดเชื้อมีความเหมาะสมมากขึ้น ซึ่งทั้งสองสภาวะมีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย แต่อย่างไรก็ตามการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์ด้วย *A. keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1 จากหางน้ำย่างที่แยกสปีชีส์ที่สภาวะปลอดเชื้อและไม่ปลอดเชื้อ พบว่าระยะเวลาที่เหมาะสมของการผลิตเอนไซม์นั้นแตกต่างกัน 24 ชั่วโมงโดยในสภาวะที่ปลอดเชื้อใช้เวลา 72 ชั่วโมง และไม่ปลอดเชื้อใช้เวลา 96 ชั่วโมง โดยเนื่องจากในช่วงแรกของการผลิตเอนไซม์แบบไม่ปลอดเชื้อนั้น *A. keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1 ต้องมีการปรับตัวและแก่งแย่ง แข่งขันในการเจริญกับจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ปนเปื้อนมากับหางน้ำย่างที่แยกสปีชีส์ก่อน จึงใช้

เวลานานขึ้นในสภาวะปลอดเชื้อและไม่ปลอดเชื้อ นอกจากนี้พบว่าค่า pH ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์มีค่าไม่แตกต่างกันคือเท่ากับ 7.3 และ 7.0 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Sukkhum และคนอื่นๆ ที่พบว่าอิทธิพลของค่า pH ที่เหมาะสมของการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์ด้วย *A. keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1 อยู่ในช่วงที่เป็นกลาง (Sukkhum; Tokuyama; & Kitpreechavanich. 2009: 302-306) อีกทั้งการเติมเจลาตินเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดของทั้งสองสภาวะ โดยเจลาตินเป็นสายเปปไทด์พื้นฐานของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมซึ่งได้จากการต้มคอลลาเจนในน้ำ และสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนให้กับการผลิตเอนไซม์ได้ (Leboffe & Pierce. 2010) ซึ่งสอดคล้องกับ Sukkhum และคนอื่นๆ ที่ได้มีการรายงานว่า *A. keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1 มีความสามารถย่อยสลายเจลาติน อีกทั้งยังแสดงให้เห็นว่าเจลาตินเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดสำหรับการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์ (Sukkhum; Tokuyama; & Kitpreechavanich. 2009: 302-306)

จากการศึกษาการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์แบบไม่ปราศจากเชื้อจากหางน้ำayang ที่แยกสกิมในถังหมักแบบไบโอดิกอนขนาด 2 ลิตรด้วย *A. keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1 ที่ตรึงเซลล์ด้วยแผ่นใยขัด โดยใช้วิธีการ One-factor at a time พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์คือ อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส มีอัตราการกวนที่ 100 rpm โดยไม่มีการให้อากาศเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ได้ค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 40.5 ยูนิตต่อมิลลิลิตร คิดเป็นค่า productivity ได้เท่ากับ 0.56 ยูนิตต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งจากการศึกษาอัตราการกวนต่อการผลิตเอนไซม์นั้นพบว่าเมื่อเพิ่มอัตราการกวนที่สูงขึ้นทำให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์มีค่าลดลง เนื่องจากการเพิ่มอัตราการกวนทำให้ไปรบกวนการเจริญของ *A. keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1 โดยไบโอดิกอนนั้นเป็นการเพิ่มแรงเฉือน (Jagani; et al. 2010: 261-301) ซึ่งมีผลต่อจุลินทรีย์ที่มีลักษณะเป็นเส้นใย ซึ่งแอกติโนมัยสิตเป็นแบคทีเรียที่สร้างเส้นใยได้ ดังนั้นเมื่อเพิ่มอัตราเร็วในการกวน เป็นการเพิ่มแรงเฉือนส่งผลให้เชื้อจุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ได้น้อยลง และยังพบว่าเมื่อเพิ่มอัตราการให้อากาศพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์น้อยลงเช่นกัน โดยการเพิ่มอากาศส่งผลให้มีจุลินทรีย์ปนเปื้อนภายในถังหมักเพิ่มขึ้น เนื่องจากจุลินทรีย์ตัวอื่นที่ต้องการอากาศมีการเจริญเติบโตที่เร็วกว่า *A. keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1 ที่เจริญเติบโตได้ดีภายใน 3-5 วัน และเมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตเอนไซม์ในระดับฟลaskพบว่าการใช้ถังหมักสามารถผลิตเอนไซม์ได้ในระยะเวลาที่น้อยกว่าคือ 72 ชั่วโมง จาก 96 ชั่วโมง เนื่องจากการผลิตในถังหมักสามารถควบคุมสภาวะการให้อากาศและความคุมอุณหภูมิส่งผลให้การผลิตเอนไซม์ได้ดีกว่า

จากการตาราง 20 การวิเคราะห์องค์ประกอบต่างๆของน้ำยางพบว่า องค์ประกอบของหางน้ำยางมีมากกว่าหางน้ำยางที่แยกสกิมแล้ว เนื่องจากหางน้ำยางที่แยกสกิมแล้วถูกตกตะกอนด้วยกรดซัลฟิวริก โดยความเป็นกรดทำให้โปรตีนตกตะกอน (Lucey; & Singh. 2003: pp1001-1025) อีกทั้งการทำให้เป็นกรดยังไปไฮโดรไลซ์สารอินทรีย์ในน้ำยางอีกด้วย (Bin; et al. 2015: 1220-1224) และเมื่อแยกตะกอนออกทำให้องค์ประกอบต่างๆ ลดลง นอกจากนี้จะเห็นได้ว่าก่อนและหลังการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนมีองค์ประกอบแหล่งไนโตรเจนที่ลดลงอาจเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงของค่า pH ของหางน้ำยางที่แยกสกิม ซึ่งก่อนที่จะนำหางน้ำยางมาใช้ต้องมีการปรับค่า pH ให้เป็นกลางจึงมีการเติมเบสลงไป พบว่าในหางน้ำยางที่แยกสกิมมีสารตกตะกอนขึ้น และก่อนที่จะนำหางน้ำยางที่แยกสกิมไปส่งวิเคราะห์ต้องทำการกรองและนำตะกอนออกก่อน จึงอาจส่งผลให้ค่าแหล่งไนโตรเจนมีค่าลดลง ทั้งนี้เมื่อนำหางน้ำยางที่แยกสกิมมาผลิตเอนไซม์ พบว่าองค์ประกอบต่างๆ ของหางน้ำยางที่แยกสกิมลดลงเนื่องจาก *A. keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1 ได้นำองค์ประกอบต่างๆ ไปใช้ในการเจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์ โดยเฉพาะค่า BOD และ COD ที่บอกถึงปริมาณออกซิเจนในน้ำที่จุลินทรีย์ต้องการใช้ในการย่อยสลายอินทรีย์ และปริมาณออกซิเจนในน้ำที่ใช้ออกซิโดซ์สารอินทรีย์ (LEO. 2000) แสดงให้เห็นว่า *A. keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1 ใช้สารอินทรีย์ในหางน้ำยางที่แยกสกิมในการเจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์ แต่อย่างไรก็ตามจะเห็นได้ว่าหางน้ำยางที่แยกสกิมที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์น้อยกว่าสภาวะที่ไม่มีการฆ่าเชื้อ ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณของสารอาหารที่ลดลงเมื่อถูกฆ่าเชื้อแล้วในตาราง 20 นอกจากนี้พบว่าน้ำตาลที่อยู่ในหางน้ำยางที่แยกสกิมเมื่อถูกฆ่าเชื้อด้วยความร้อนไม่ก่อให้เกิดสารพิษ เนื่องจากปริมาณของ furfural ไม่เพิ่มขึ้น แต่อย่างไรก็ตามเมื่อนำค่ากิจกรรมของเอนไซม์มาเปรียบเทียบกับรายงานก่อนหน้านี้ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงที่สุด 44.6 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตรเมื่อเลี้ยงในอาหาร basal medium (Sukkhum; Tokuyama; & Kitpreechavanich. 2009: 302-306) พบว่ามีกิจกรรมเอนไซม์ต่ำกว่าอาจเนื่องจากปริมาณของ  $ZnO_2$  ที่เกษตรกรเติมในน้ำยางสดเพื่อช่วยรักษาคุณภาพน้ำยางก่อนที่จะนำมาแปรรูปในโรงงาน โดยปริมาณของ  $Zn^{2+}$  ในหางน้ำยางที่แยกสกิมที่ผ่านการหมักลดลงเนื่องจากจุลินทรีย์ดูดซับ Zn ไว้ที่ผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ (Arabil; et al. 2012: 3679-3685) นอกจากนี้ยังพบว่า Zn มีผลทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเพราะ Zn เป็นโลหะหนักที่ไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (Atmaca; Kadri; & ÇIÇEK. 1998: 595-597)

จากการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์จากหางน้ำยางที่แยกสกิมด้วย *A. keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1 พบว่าค่าองค์ประกอบของหางน้ำยางที่แยกสกิมลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับหางน้ำยางที่แยกสกิมก่อนและหลังการผลิตเอนไซม์ ซึ่งจะเห็นได้ว่า ค่า BOD หรือ Biochemical Oxygen Demand ที่อธิบายถึงออกซิเจนที่จุลินทรีย์ต้องการในการย่อยสลายสารอินทรีย์ที่อยู่ในน้ำลดลง แสดงให้เห็นว่า

สารอินทรีย์ในหาน้ำยางมีปริมาณลดลง นอกจากนี้ค่า TKN ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจน และค่าน้ำตาลรีดิวซ์ ซึ่งเป็นแหล่งของคาร์บอนของจุลินทรีย์ยังมีค่าลดลงหลังจากผ่านกระบวนการผลิตเอโนไซม์ ดังนั้นหาน้ำยางที่แยกสกิมสามารถนำมาใช้เลี้ยงจุลินทรีย์ได้ และจากการพบว่าปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์ในหาน้ำยางที่แยกสกิมก่อนและหลังการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนมีปริมาณเพิ่มขึ้นอาจเนื่องมาจากน้ำตาลสองโมเลกุลในหาน้ำยางที่แยกสกิมมีการแตกตัวเมื่อโดนความร้อนจากการฆ่าเชื้อทำให้กลายเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและเกิดปลายรีดิวซ์ขึ้น





ขอนแก่น

## บรรณานุกรม

- Agrotech-international. (2015). Environmentally Degradable Plastic (EDP). Retrieved August 24, 2015, from <http://agrotech-international.com/edp.php>
- Albalasmeh, A. A.; Berhe, A. A.; & Ghezzehei T. A. (2013). A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. *Carbohydrate Polymers*. 97: 253– 261
- Anbu, P. et al. (2007). Optimization of extracellular keratinase production by poultry farm isolate *Scopulariopsis brevicaulis*. *Bioresource Technology*. 98: 1298–1303.
- Apinya, T.; Sombatsompop, N.; & Prapagdee, B. (2015). Selection of a *Pseudonocardia* sp. RM423 that accelerates the biodegradation of poly(lactic) acid in submerged cultures and in soil microcosms. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 99: 23-30.
- Arabil, F. et al. (2012). Investigation anti-bacterial effect of zinc oxide nanoparticles upon life of *Listeria monocytogenes*, *Ann. Biol. Res.* 3(7): 3679-3685.
- Atmaca, S.; Kadri, A.; & ÇIÇEK, R. The Effect of Zinc On Microbial Growth. *Tr. J. Med Sci.* 28: 595-597.
- Avérous, L. (2013). 9 - Synthesis, properties, environmental and biomedical applications of polylactic acid. In *Handbook of Biopolymers and Biodegradable Plastics*. Edited by Ebnesajjad, Sina. pp. 171-188. Boston: William Andrew Publishing.
- Balachandran, C.; Duraipandiyan, V.; & Ignacimuthu, S. (2012). Purification and characterization of protease enzyme from actinomycetes and its cytotoxic effect on cancer cell line (A549). *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. S392-S400.
- Box, G. E. P.; & Draper N. R. (1987). *Empirical model-building and response surfaces*. New York: Wiley.
- Chuensangjun, C.; Pechyen, C.; & Sirisansaneeyakul, S. (2013). Degradation behaviors of different blends of polylactic acid buried in soil. *Energy Procedia*. 34: 73-82.

- European Bioplastic. (2015). What are bioplastics? material types, terminology and label - an introduction. Retrieved August 24, 2015, from [http://en.european-bioplastics.org/wp-content/uploads/2011/04/fs/Bioplastics\\_eng.pdf](http://en.european-bioplastics.org/wp-content/uploads/2011/04/fs/Bioplastics_eng.pdf)
- Held, P.; & Hurley, J. (2014). Determination of Total Protein by the Lowry Method Using the BioTek Instruments' ELx808 Microplate Reader. Retrieved August 24, 2014, from [http://www.biospx.com/sr/pdf\\_biotek/ELx808\\_Determining\\_Total\\_Protein\\_Lowry\\_Method.pdf](http://www.biospx.com/sr/pdf_biotek/ELx808_Determining_Total_Protein_Lowry_Method.pdf)
- Ikura, Y.; & Kudo, T. (1999). Isolation of a microorganism capable of degrading poly (L-lactide). *Journal of General and Applied Microbiology*. 45: 247-251.
- Jagani, H.; et al. (2010). An Overview of Fermenter and the Design Considerations to Enhance Its Productivity. *Pharmacologyonline*. 1: 261-301.
- Jamshidian, M.; et al. (2010). Poly-lactic acid: production, applications, nanocomposites, and release Studies. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 9: 552-571.
- Jarerat, A.; & Tokiwa, Y. (2001). Degradation of poly (L-lactide) by a fungus. *Macromolecular Bioscience*. 1(4): 136-140.
- (2003). Poly(L-lactide) degradation by *Saccharothrix waywayandensis*. *Biotechnology Letters*. 25(5): 401-404.
- Jarerat, A.; Tokiwa, Y.; & Tanaka, H. (2003). Poly (L-lactide) degradation by *Kibdelosporangium aridum*. *Biotechnology Letters*. 25(23): 2035-2038.
- (2004). Microbial poly (L-lactide)-degrading enzyme induced by amino acids, peptides, and poly(L-amino acids). *Journal of Polymers and the Environment*. 12(3): 139-146.
- (2006). Production of poly (L-lactide)-degrading enzyme by *Amycolatopsis orientalis* for biological recycling of poly (L-lactide). *Applied Microbiology and Biotechnology*. 72(4): 726-731.
- Jiang, L.; & Zhang, J. (2013). 6 - Biodegradable Polymers and Polymer Blends. In *Handbook of Biopolymers and Biodegradable Plastics*. Edited by Ebnesajjad, S. pp. 109-128. Boston: William Andrew Publishing.

- Karamanlioglu, M.; Houlden, A.; & Robson, G. D. (2014). Isolation and characterisation of fungal communities associated with degradation and growth on the surface of poly(lactic) acid (PLA) in soil and compost. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 95: 301-310.
- Karamanlioglu, M.; Houlden, A.; & Robson, G. D. (2014). Isolation and characterisation of fungal communities associated with degradation and growth on the surface of poly(lactic) acid (PLA) in Soil and Compost. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 95, Part B: 301-310.
- Kim, M. N.; et al. (2008). Poly (L-Lactide)-degrading activity of a newly isolated Bacterium. *Applied Polymer Science*. 109(1): 234-239.
- Korayem, A. S.; et al. (2015). Optimization of biosurfactant production by *Streptomyces* isolated from Egyptian arid soil using Plackett–Burman design. *Annals of Agricultural Science*. 60(2), 209–217.
- Leboffe, M.J.; & Pierce, B.E. (2010). *Microbiology: Laboratory Theory and Application*. 3rd ed. Englewood, CO: Morton Publishing Company.
- LEO, M. L. M. (2000). *Handbook of water analysis*. New York : Marcel Dekker.
- Li, F.; et al. (2013). Production of poly (L-lactide)-degrading enzyme by *Amycolatopsis orientalis* ssp *orientalis* and its catalytic ability in biological recycling of poly(L-lactide). *Journal of Polymers and the Environment*. 21(4): 1143-1149.
- Li, Y.; et al. (2007). Improvement of xylanase production by *Penicillium oxalicum* ZH-30 using response surface methodology. *Enzyme and Microbial Technology*. 40: 1381–1388.
- Lomthong, T; et al. (2015). Co-production of poly (L-lactide)-degrading enzyme and raw starch-degrading enzyme by *Laceyella sacchari* LP175 using agricultural products as substrate, and their efficiency on biodegradation of poly (L-lactide)/thermoplastic starch blend film. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 104: 401-410.
- Lucey, J. A.; & Singh, H. (2003). Acid Coagulation of Milk. *Advanced Dairy Chemistry volume 1 Proteins*. (1): pp 1001-1025.

- Mark, H. F. (2007). *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, concise, 3rd ed. New Jersey: Wiley.
- Mayumi, D.; et al. (2008). Identification and characterization of novel poly (DL-lactic acid) depolymerases from metagenome. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 79(5): 743-750.
- Nakamura, K.; et al. (2001). Purification and characterization of an extracellular poly(L-lactic acid) depolymerase from a soil isolate, *Amycolatopsis* sp. strain K104-1. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(1): 345-353.
- Nampoothiri, K. M.; Nair, N. R.; & John, R. P. (2010). An overview of the recent developments in polylactide (PLA) Research. *Bioresource Technology*. 101(22): 8493-8501.
- Pranamuda, H.; Tokiwa, Y.; & Tanaka, H. (1997). Polylactide degradation by an *Amycolatopsis* sp. *Applied And Environmental Microbiology*. 63(4): 1637-1640.
- Pranamuda, H.; Tsuchii, A.; & Tokiwa, Y. (2001). Poly (L-lactide)-degrading enzyme produced by *Amycolatopsis* sp. *Macromolecular Bioscience*. 1(1): 25-29.
- Sakai, K.; et al. (2001). Isolation of a thermophilic poly-L-lactide degrading bacterium from compost and its enzymatic characterization. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 92(3): 298-300.
- Sangwan, P.; & Wu, D. Y. (2008). New insights into polylactide biodegradation from molecular ecological techniques. *Macromolecular Bioscience*. 8(4): 304-315.
- Sin, L. T.; Rahmat, A. R.; & Rahman, W. A. W. A. (2013a). Overview of poly(lactic acid). In *Handbook of Biopolymers and Biodegradable Plastics*. Edited by Ebnesajjad, S. pp. 11-54. Boston: William Andrew Publishing.
- (2013b). Applications of poly(lactic acid). In *Handbook of Biopolymers and Biodegradable Plastics*. Edited by Ebnesajjad, S. pp. 55-69. Boston: William Andrew Publishing.
- Shigeno, Y. A.; et al. (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*. *Applied And Environmental Microbiology*. 69(5): 2498-2504.

- Sukkhum, S. (2010). *A Novel Poly (L-Lactide) Degrading Actinomycetes, Actinomadura Keratinilytica Strain T16- 1, Phylogenetic Study, Enzyme Production and Characterization*. Dissertation, Ph.D. (Microbiology) Bangkok: Graduate school, Kasetsart University. Photocopied.
- Sukkhum, S.; & Kitpreechavanich, V. (2011). New insight into biodegradation of poly (L-lactide), enzyme production and characterization. In *Progress in Molecular and Environmental Bioengineering – from Analysis and Modeling to Technology Applications*. Edited by Carpi, A. pp. 587-604. INTECH.
- Sukkhum, S.; Tokuyama, S.; & Kitpreechavanich, V. (2009). Development of Fermentation Process for PLA-degrading Enzyme Production by a New Thermophilic *Actinomadura* sp. T16-1. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 14: 302-306.
- Sukkhum, S.; Tokuyama, S.; & Kitpreechavanich, V. (2012). Poly (L-lactide)-degrading enzyme production by *Actinomadura keratinilytica* T16- 1 in 3 L airlift bioreactor and its degradation ability for biological recycle. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 22(1): 92-99.
- Sukkhum, S.; et al. (2009). A novel poly (L-lactide) degrading *Actinomycetes* isolated from Thai forest soil, phylogenic relationship and the enzyme characterization. *The Journal of General and Applied Microbiology*. 55(6): 459-467.
- Tanyildizi, M. S.; Özer, D.; & Elibol, M. (2005). Optimization of  $\alpha$ -amylase production by *Bacillus* sp. using response surface methodology. *Process Biochemistry*. 40: 2291–2296.
- Tokiwa, Y.; & Calabia, B. P. (2006). Biodegradability and biodegradation of Poly(lactide). *Applied Microbiology and Biotechnology*. 72(2): 244-251.
- Tokiwa, Y.; et al. (2009). Biodegradability of plastics. *International Journal of Molecular Sciences*. 10(9): 3722-3742.
- Tokiwa, Y.; & Jarerat, A. (2004). Biodegradation of Poly (L-lactide). *Biotechnology Letters*. (26): 771-777.
- Tokiwa, Y.; Konno, M.; & Nishida, H. (1999). Isolation of silk degrading microorganisms and its poly (L-lactide) degradability. *Chemistry Letters*. 28(4): 355-356.

- (2000). 9th Annual Meeting of the Bio Environmental Polymer Society, 2000 Dec 12-16; Honolulu, Hawaii, USA. p.33.
- Tomita, K.; Kuroki, Y.; & Nagai, K. (1999). Isolation of thermophiles degrading poly(L-lactic acid). *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 87(6): 752-755.
- Tomita, K.; et al. (2003). Degradation of Poly (D-lactic acid) by a Thermophile. *Polymer Degradation and Stability*. 81(1): 167-171.
- Tomita, K.; et al. (2004). Degradation of poly (L-lactic acid) by a newly isolated thermophile. *Polymer Degradation and Stability*. 84(3): 433-438.
- Tsuji, H. (2005). Poly (lactide) stereocomplexes: formation, structure, properties, degradation, and applications. *Macromolecular Bioscience*. 5(7): 569-597.
- Wang, N. S. (2014). Experiment no. 4 a glucose assay by dinitrosalicylic colorimetric method. Retrieved August 24, 2014, from <http://www.eng.umd.edu/~nsw/ench485/lab4a.htm>
- Wee, Y. J.; Kim, J. N.; & Ryu, H. W. (2006). Biotechnological Production of Lactic Acid and Its Recent Applications. *Food Technology and Biotechnology*. 44(2): 163-172.
- กรมควบคุมมลพิษ. (2548). แนวปฏิบัติที่ดีด้านการป้องกันและลดมลพิษอุตสาหกรรมน้ำยางขึ้น. กรุงเทพฯ: ส่วนน้ำเสียอุตสาหกรรม สำนักจัดการคุณภาพน้ำ.
- กระทรวงการเกษตรและสหกรณ์. (2555). สถิติการเกษตรของประเทศไทย ปี 2555. กรุงเทพฯ: สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร.
- จุฑากานต์ บุญมี. (2555). พลาสติกชีวภาพ (Biodegradable Plastic) ทางเลือกที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม. *วารสารสิ่งแวดล้อม*. 16(2): 15-19.
- พงษ์ธร แซ่ฮุย. (2548). ยาง :ชนิด สมบัติ และการใช้งาน. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ: ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ (เอ็มเทค).
- วราภรณ์ ขจรไชยกูล. (2549). ยางธรรมชาติ :การผลิตและการใช้งาน. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ: สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.).
- วิจิต สุวรรณปรีชา. (2530?). ยางพารา. กรุงเทพฯ: ม.ป.พ.
- สายชล สิ้นสมบุญรัตน์ทอง. (2558). การวางแผนแบบการทดลอง = *Experimental Designs*. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: ศูนย์หนังสือจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สำนักงานปลัดกระทรวงพาณิชย์. 10 กุมภาพันธ์ 2556 ed.: ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร. Retrieved from <http://www.thainr.com/th/?detail=stat-thai>

อนุวัตร แจ่มชัด. (2549). สถิติสำหรับการพัฒนาผลิตภัณฑ์และการประยุกต์. ใน เอกสารคำสอนวิชา  
สถิติในงานพัฒนาผลิตภัณฑ์ และสถิติประยุกต์สำหรับการพัฒนาผลิตภัณฑ์. กรุงเทพฯ: คณะ  
อุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.





ภาคผนวก



ภาคผนวก ก

สูตรอาหารและวิธีการเตรียมอาหาร

## ภาคผนวก ก

## สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

## 1. อาหารเลี้ยงแควคตินอัมยีสท์ (ISP-2)

สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	4	กรัม
สารสกัดจากมอลต์ (malt extract)	10	กรัม
น้ำตาล dextrose	4	กรัม
Agar	15	กรัม

เติมน้ำให้ครบให้ครบปริมาตร 1 ลิตรนำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

## 2. อาหารที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลคไทด์ (Basal medium)

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	4	กรัม
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	4	กรัม
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	2	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2	กรัม
Gelatin	2.38	กรัม

เติมน้ำให้ครบให้ครบปริมาตร 1 ลิตรนำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที



ภาคผนวก ข  
บัพเพอร์และวิธีการเตรียมสาร

## ภาคผนวก ข

## บัฟเฟอร์และวิธีการเตรียมสาร

## 1. บัฟเฟอร์ Tris-HCl (pH 9)

$\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$	24	กรัม
---	----	------

HCl	0.16	มิลลิลิตร
-----	------	-----------

เตรียมสารละลาย ก โดยละลาย  $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$  ด้วยน้ำกลั่น หลังจากนั้นปรับปริมาตรให้

ครบ 1 ลิตร

เตรียมสารละลาย ข โดยเจือจาง HCl ด้วยน้ำกลั่น โดยปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร

นำสารละลาย ก ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมกับ สารละลาย ข ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

หลังจากนั้นทำการปรับปริมาตรให้ครบ 400 มิลลิลิตร

## 2. PLA emulsion

PLA	1	กรัม
-----	---	------

$\text{CH}_2\text{Cl}$	10	มิลลิลิตร
------------------------	----	-----------

บัฟเฟอร์ Tris-HCl (pH 9)		
--------------------------	--	--

นำ PLA มาละลายด้วย  $\text{CH}_2\text{Cl}$  หลังจากนั้นเติมด้วย บัฟเฟอร์ Tris-HCl (pH 9) ให้ครบ

ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปทำให้เข้ากันด้วยเครื่อง Sonicator



ภาคผนวก ค  
การวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมี

## การวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมี

### 1. การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วย Lowry method (Held; & Hurley. 2014)

#### 1.1 สารละลาย LOWRY

##### 1.1.1 สารละลาย ก ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

NaOH	0.4	กรัม
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	2	กรัม

ละลาย NaOH ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร หลังจากสารละลายเป็นเนื้อเดียวกันปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย NaOH ความเข้มข้น 1 N ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นทำการละลาย Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ด้วยสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 1 N ปริมาตร 50 มิลลิลิตรหลังจากสารละลายเป็นเนื้อเดียวกันปรับปริมาตรด้วยสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 1 N ให้ครบ 100 มิลลิลิตร

##### 1.1.2 สารละลาย ข ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.1	กรัม
--------------------------------------	-----	------

##### 1.1.3 สารละลาย ค ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

Potassium sodium tartrate	0.27	กรัม
---------------------------	------	------

นำสารละลาย ก, ข และ ค มาผสมกันในอัตราส่วน ก : ข : ค เป็น 100 : 1 : 1 ตามลำดับ (สารละลาย LOWRY ต้องใช้ภายในวันที่เตรียมเท่านั้น)

#### 1.2 Folin-Ciocalteu reagent ความเข้มข้น 1 N

##### 1.3 สารละลายโปรตีนมาตรฐาน

Bovine serum albumin (BSA)	0.250	กรัม
----------------------------	-------	------

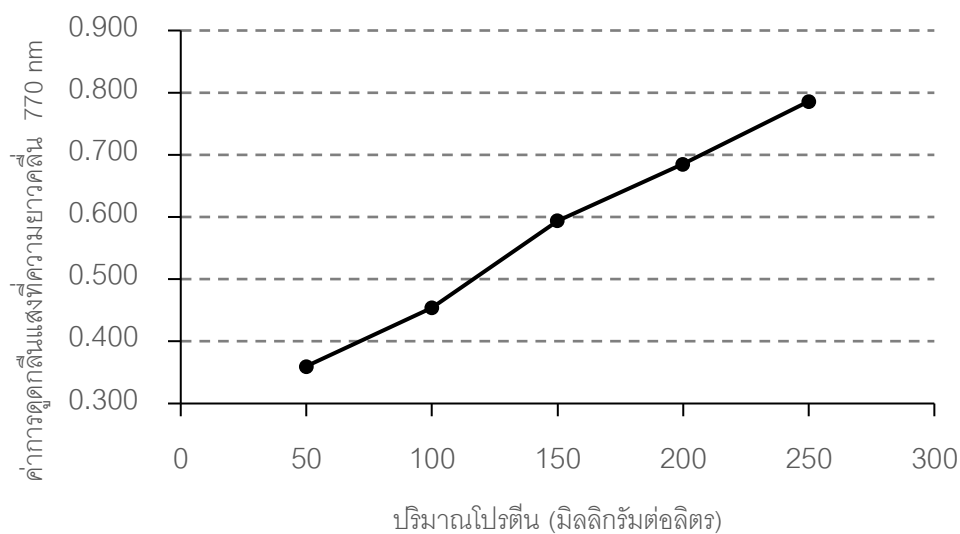
ละลาย BSA ด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 50 มิลลิลิตร หลังจากสารละลายเป็นเนื้อเดียวกันแล้วทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายโปรตีนมาตรฐานความเข้มข้น 2500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำการเจือจางตามตาราง 22

ทำการวัดปริมาณโปรตีนโดยผสมสารละลายโปรตีนมาตรฐานปริมาตร 1 มิลลิลิตรกับสารละลาย LOWRY ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นเติม Folin-Ciocalteu reagent ความเข้มข้น 1 N ผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว และตั้งให้ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 770 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปวาดกราฟปริมาณโปรตีนมาตรฐาน ดังภาพประกอบ 24 เพื่อเปรียบเทียบกับปริมาณโปรตีนในตัวอย่าง

ต่อไป โดยการวัดปริมาณโปรตีนในตัวอย่างทำปฏิกิริยาดังการวัดปริมาณโปรตีนในสารละลายโปรตีนมาตรฐาน แต่เปลี่ยนจากสารละลายโปรตีนมาตรฐานเป็นตัวอย่างที่ต้องการวัดปริมาณโปรตีน

ตาราง 22 ค่าการเจือจางสารละลายโปรตีนมาตรฐาน

สารละลายโปรตีนมาตรฐาน ( $\mu\text{g/ml}$ )	ปริมาณสารละลายโปรตีนมาตรฐาน ความเข้มข้น 2500 $\mu\text{g/ml}$ (ml)	ปริมาณน้ำกลั่น (ml)	ปริมาตรรวม (ml)
250	0.5	4.5	5
200	0.4	4.6	5
150	0.3	4.7	5
100	0.2	4.8	5
50	0.1	4.9	5



ภาพประกอบ 24 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 770 นาโนเมตรกับปริมาณโปรตีนมาตรฐาน

จากภาพประกอบ 24 สามารถสร้างสมการเส้นตรง 12 ซึ่งสามารถนำมาคำนวณเพื่อหาปริมาณโปรตีนในตัวอย่างโดยการนำค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างมาแทนค่า Y ในสมการ

$$Y = 0.0022x + 2509 \quad (12)$$

กำหนดให้ Y คือค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่นที่ 770 นาโนเมตร และ x คือปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อลิตร)

## 2. การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วย DNSa method (Wang, 2014)

### 2.1 สารละลาย DNSa

#### 2.1.1 สารละลาย ก ปริมาตร 20 มิลลิลิตร

NaOH	1.6	กรัม
3,5- Dinitro salicylic acid (DNSa)	1	กรัม

#### 2.1.2 สารละลาย ข ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

KNatartrate	30	กรัม
-------------	----	------

นำสารละลาย ข ค่อยๆเติมใส่ในสารละลาย ก โดยมีการคนอยู่ตลอดเวลา โดยมากรให้ ความร้อนที่ 50 องศาเซลเซียส เมื่อเต็มจนครบและสารเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นทำการปรับปริมาตร สารละลายให้ครบ 100 มิลลิลิตร

### 2.2 สารละลายน้ำตาลมาตรฐาน

น้ำตาลกลูโคส	0.1	กรัม
--------------	-----	------

ละลายน้ำตาลกลูโคสด้วยน้ำกลั่นให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย น้ำตาลมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำการเจือจางดังตาราง 23

ตาราง 23 ค่าการเจือจางสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน

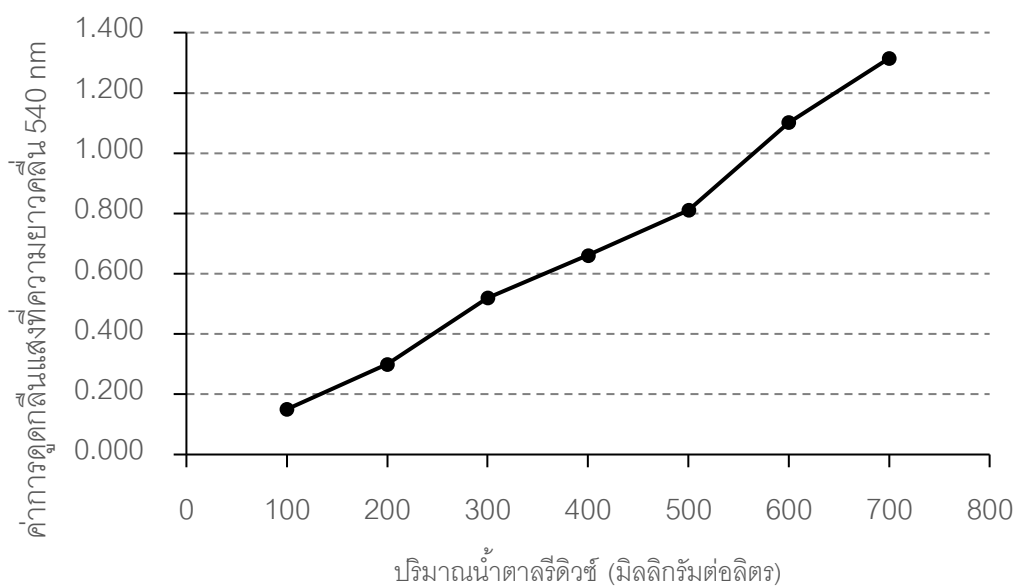
ความเข้มข้นสารละลาย น้ำตาล ( $\mu\text{g/ml}$ )	ปริมาณสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน ความเข้มข้น 1000 $\mu\text{g/ml}$ (ml)	ปริมาณน้ำกลั่น (ml)	ปริมาตรรวม (ml)
1000	5	0	5
800	4	1	5
600	3	2	5
400	2	3	5
200	1	4	5
100	0.5	4.5	5

การทำกราฟปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มาตรฐาน เริ่มจากนำสารละลายน้ำตาลมาตรฐานในแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 1 มิลลิลิตรมาทำปฏิกิริยากับสลายละลาย DNSa ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร โดยการวางไว้บนภาคน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำมาหยุดปฏิกิริยาด้วยการแช่น้ำเย็นจัดเป็นเวลา 5 นาที และทำการเติมน้ำกลั่นปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาวาดกราฟแสดงค่าความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์มาตรฐานกับค่าการดูดกลืนแสง ดังภาพประกอบ 25 หลังจากนั้นทำการหาสมการเส้นตรง 13

$$Y = 0.0019x - 0.0759 \quad (13)$$

กำหนดให้ Y คือค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่นที่ 770 นาโนเมตร และ x คือปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัมต่อลิตร)

ทำการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในตัวอย่าง โดยนำตัวอย่างซึ่งรู้มาทำปฏิกิริยากับสารละลาย DNSa ตามกระบวนการทำกราฟปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มาตรฐาน แต่เปลี่ยนจากสารละลายน้ำตาลมาตรฐานเป็นตัวอย่าง นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปหาค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในตัวอย่าง จากสมการเส้นตรง 13 ที่ได้สามารถนำมาคำนวณเพื่อหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในตัวอย่างโดยการนำค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างมาแทนค่า Y ในสมการ 13



ภาพประกอบ 25 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มาตรฐาน

### 3. การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วย Phenol-sulfuric acid method (Albalasmeh; Berhe; & Ghezzehei. 2013: 253– 261)

#### 3.1 สารละลายฟีนอล ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)

ละลายฟีนอล 5 กรัมในน้ำปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วย volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร

#### 3.2 กรดซัลฟิวริกเข้มข้น ( $H_2SO_4$ )

#### 3.3 สารละลายน้ำตาลมาตรฐาน

น้ำตาลกลูโคส 0.01 กรัม

ละลายน้ำตาลกลูโคสในน้ำปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วย volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายน้ำตาลความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำการเจือจางตามตาราง 24

การวัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเริ่มจากการนำน้ำตาลมาตรฐานปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายฟีนอล ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ต่อมาเติมกรดซัลฟิวริกลงไป หลังจากนั้นตั้งไว้ทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำการผสมกันอย่างรวดเร็วเป็นเวลา 30 วินาที แล้วนำไปทำปฏิกิริยาต่อเป็นเวลา 20 นาทีในอ่างน้ำที่มีอุณหภูมิห้อง พอครบเวลาทำการวัดค่าการ

ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตรนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาวาดกราฟแสดงค่าความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดมาตรฐานกับค่าการดูดกลืนแสง ดังภาพประกอบ 26 หลังจากนั้นทำการหาสมการเส้นตรง 14

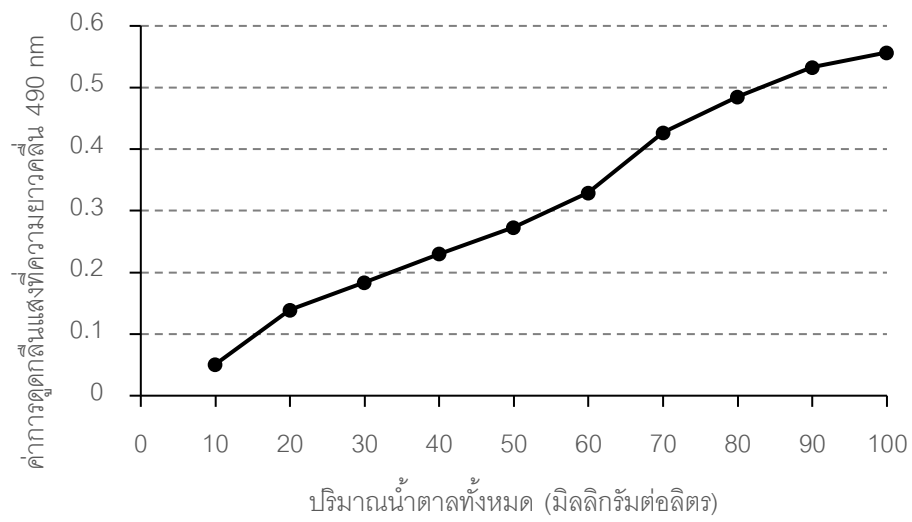
$$y = 0.0057x + 0.0053 \quad (14)$$

กำหนดให้ Y คือค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่นที่ 770 นาโนเมตร และ x คือปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อลิตร)

ทำการวัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของตัวอย่าง โดยทำปฏิกิริยาเช่นเดียวกับการวัดน้ำตาลทั้งหมดมาตรฐาน แต่เปลี่ยนการทำปฏิกิริยาจากน้ำตาลมาตรฐานเป็นตัวอย่าง จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปหาค่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในตัวอย่าง จากสมการเส้นตรง 14 ที่ได้สามารถนำมาคำนวณเพื่อหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในตัวอย่างโดยการนำค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างมาแทนค่า Y ในสมการ 14

ตาราง 24 ค่าการเจือจางสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน

ความเข้มข้นสารละลาย น้ำตาล ( $\mu\text{g/ml}$ )	ปริมาณสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ (ml)	ปริมาณน้ำกลั่น (ml)	ปริมาตรรวม (ml)
100	5	0	5
80	4	1	5
60	3	2	5
40	2	3	5
20	1	4	5
10	0.5	4.5	5



ภาพประกอบ 26 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรกับปริมาณน้ำตาลทั้งหมดมาตรฐาน





## ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ ชื่อสกุล	นายสมบัติ วรรณรมพิทักษ์
วันเดือนปีเกิด	วันพฤหัสบดีที่ 20 ธันวาคม พ.ศ. 2533
สถานที่เกิด	โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ กรุงเทพมหานคร
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	251/1 ซอยลาดพร้าว 122 (แยก 19) แขวงพลับพลา เขตวังทองหลาง กรุงเทพมหานคร 10310

### ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2552

จบการศึกษาในระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย  
จากโรงเรียนบดินทรเดชา (สิงห์ สิงหเสนี)

พ.ศ. 2556

จบการศึกษาในระดับปริญญาตรี  
สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์  
จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

