

..

การหาจุดที่เหมาะสมในการย่อยสลายพอลิแล็กไทด์ด้วยเอนไซม์จาก
Actinomadura keratinilytica สายพันธุ์ T16-1



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

ธันวาคม 2558

การหาจุดที่เหมาะสมในการย่อยสลายพอลิแล็กไทด์ด้วยเอนไซม์จาก
Actinomadura keratinolytica สายพันธุ์ T16-1



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

ธันวาคม 2558

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

..

การหาจุดที่เหมาะสมในการย่อยสลายพอลิแล็กไทด์ด้วยเอนไซม์จาก
Actinomadura keratinilytica สายพันธุ์ T16-1



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

ธันวาคม 2558

อนุพันธ์ ยังปรีดา. (2558). การหาจุดที่เหมาะสมในการย่อยสลายพอลิแลกไทด์ด้วยเอนไซม์จาก

Actinomadura keratinolytica สายพันธุ์ T16-1. ปรินญาณพนธ์ กศ.ม. (ชีววิทยา).

กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. คณะกรรมการควบคุม:

อาจารย์ ดร.สุชมาภรณ์ กระจ่างสังข์ รองศาสตราจารย์ ดร.อรอนงค์ พริงศ์กุลกะ.

พอลิแลกติกแอซิด หรือ PLA เป็น พอลิเมอร์ที่สามารถย่อยสลายได้ด้วยวิธีการทางชีวภาพ และสามารถสังเคราะห์ได้จากกรดแลกติกซึ่งกรดแลกติกนี้ สามารถผลิตได้จากกระบวนการหมัก โดยเชื้อจุลินทรีย์ PLA ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากเนื่องจากมีบทบาทในการช่วยแก้ไขปัญหาโลกร้อนได้ โดยทั่วไปแล้ว PLA สามารถถูกย่อยสลายได้โดยเอนไซม์หลากหลายชนิด มีรายงานก่อนหน้านี้ว่า เอนไซม์โปรติเอส ซึ่งผลิตจาก *Actinomadura keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1 เป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลาย PLA ได้โดยสามารถย่อย PLA ที่พันธะเอสเทอร์ ดังนั้นจึงนำมา ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ ในปัจจุบันงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับการย่อยสลาย และการศึกษากระบวนการสังเคราะห์โดยใช้วิธีการทางชีวภาพของพลาสติกชนิดนี้ยังมีน้อย ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์ เกี่ยวกับกระบวนการรีไซเคิล (recycle) พลาสติกชนิด PLA นี้ด้วยกระบวนการทางชีวภาพ โดยใช้เอนไซม์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ ทั้งในกระบวนการย่อยสลาย และ การนำกลับมาสังเคราะห์ใหม่ (repolymerization) การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลาย PLA ทำโดยการออกแบบการทดลองทางสถิติด้วยวิธี central composite design (CCD) พบว่าสภาวะที่ดีที่สุดในการย่อยสลาย PLA โดยใช้เอนไซม์ที่ผลิตจาก *A. keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1 คือค่ากิจกรรมของเอนไซม์เริ่มต้น เป็น 200 U/ml บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชม. โดยใช้ปริมาณ PLA เริ่มต้น 4,000 มิลลิกรัมต่อลิตรพบว่า PLA ถูกย่อยสลายและได้ปริมาณกรดแลกติกเป็น 3,426.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ประสิทธิภาพในการย่อยสลาย PLA ได้สูงถึงร้อยละ 85.6 จากนั้นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายเช่น โอลิโกเมอร์ และกรดแลกติกได้นำกลับมาสังเคราะห์ใหม่ด้วยเอนไซม์ไลเปสทางการค้า ภายใต้ก๊าซไนโตรเจน เป็นเวลา 6 ชม. ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นนั้นเป็นโอลิโกเมอร์สายสั้นๆของพลาสติกชนิด PLA มีจำนวนโมเลกุลเท่ากับ 5 โมเลกุล และมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 413 Da งานวิจัยนี้เป็นรายงานแรกที่ใช้วิธีการรีไซเคิลของเสีย PLA โดยกระบวนการทางชีวภาพ และเป็นแนวทางสำหรับ การกำจัด และการนำพลาสติกชีวภาพกลับมาใช้ประโยชน์ใหม่ ต่อไปในอนาคต

..

OPTIMIZATION OF POLY (L-LACTIDE) DEGRADATION USING THE ENZYME
PRODUCED BY *Actinomadura keratinilytica* STRAIN T16-1



Presented in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Master of Education Degree in Biology
at Srinakharinwirot University
December 2015

..

Anupan youngpreda. (2015). *Optimization of Poly (L-lactide) degradation using the enzyme produced by Actinomadura keratinilytica strain T16-1*. Master thesis, M.Ed.

(Biology). Bangkok: Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committees:
Dr.Sukhumaporn Krajangsang ,Assoc. Prof. Dr.Onanong Pringsulaka.

Poly(DL-lactic acid) or PLA is a biodegradable polymer ;synthesized from lactic acid which has been produced microbially from agricultural products. It has recieved much attention since it plays an important role in resolving the global warming problem. In general, PLA is degraded by various types of enzymes. The protease produced by *Actinomadura keratinilytica* strain T16-1 was reported previously to have PLA depolymerase potential, which hydrolyzes PLA ester bond, and is applicable to PLA biodegradation used in this work.The study of degradations condition and re-polymerization of this plastic is limited, Therefore, this research aimed to recycle PLA by biological methods, using the microbial enzymes for degradation and re-polymerization. The optimization of PLA degradation conditions by using statistical methods based on central composite design (CCD) was determined. According to the results of regression analysis it was demonstrated that the best degradation conditions of PLA by enzymes produced by *Actinomadura keratinilytica* strain T16-1, was an initial enzyme activity of 200 U/ml, incubated at 60 °C for 24 h. Most of the 4,000 mg/L PLA powder was degraded to liberate 3,426.25 mg/L lactic acid with 85.6% degradation efficiency. The oligomers and lactic acid derived from degradable products were re-polymerized repeatedly by using commercial lipase as catalyst under nitrogen atmosphere for 6 h. PLA was achieved and had a molecular weight of 413 Da (n=5). This is the first report to demonstrate the recycling of PLA wastes biologically, and it is promising for treatment and utilization of biodegradable plastic waste in the future.

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

การหาจุดที่เหมาะสมในการย่อยสลายพอลิแล็กไทด์ด้วยเอนไซม์จาก

Actinomadura keratinilytica สายพันธุ์ T16-1

ของ

อนุพันธ์ ยังปริดา

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

..... รักษาการแทนคณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร.ดุษฎี โยเหลา)

วันที่เดือน.....พ.ศ. 2558

อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์

คณะกรรมการสอบปากเปล่า

.....ที่ปรึกษาหลัก ประธาน

(อาจารย์ ดร.สุชมาภรณ์ กระจำสรวง)

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สมเกียรติ พรพิสุทธิมาศ)

.....ที่ปรึกษาร่วม กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.อรอนงค์ พริ้งสุลกะ)

(อาจารย์ ดร. สุชมาภรณ์ กระจำสรวง)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.อรอนงค์ พริ้งสุลกะ)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.วิเชียร กิจปรีชาวนิช)



ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ ด้วยดีเนื่องจากผู้วิจัยได้รับความกรุณาและคำแนะนำที่ดีจาก อาจารย์ ดร. สุขุมภรณ์ กระจำรังษี อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์ ผู้ซึ่งคอยช่วยเหลือ ตักเตือน อบรมสั่งสอน ทั้งในด้านวิชาการ และจริยธรรม ทำให้สามารถจัดทำปริญญานิพนธ์ได้เสร็จสมบูรณ์ ข้าพเจ้ากราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย(สกว.) ปี 2556 และ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ปี 2558 ข้าพเจ้ากราบขอบพระคุณอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สมเกียรติ พรพิสุทธิมาศ รองศาสตราจารย์ ดร.อรอนงค์ พริ้งสุลกะ อาจารย์ ดร.ณัฐิกา สุวรรณาสัย อาจารย์ ดร.อนิษฐาน ศรีนวล และคณาจารย์ทุกท่านที่มอบความรู้และคำชี้แนะตักเตือนให้แก่ผู้วิจัยตลอดระยะเวลาการศึกษาและขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่าน และภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สำหรับสถานที่ และเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ดร.วิเชียร กิจปรีชาวนิชภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้เกียรติเสียสละเวลา อันมีค่ามาเป็นผู้ทรงคุณวุฒิในการเป็น กรรมการสอบปริญญานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สุนิตย์ สุขสำราญ เจ้าหน้าที่ทุกท่าน และภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย ศรีนครินทรวิโรฒ และคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง สำหรับการช่วยเหลือ และให้คำปรึกษา แนะนำเกี่ยวกับเครื่องมือ วิเคราะห์ทางเคมี และการวิเคราะห์สารตัวอย่าง ในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สาโรจน์ ศิริคันสนียกุล คุณ ชนิกา ชื่นแสงจันทร์ รวมถึงเจ้าหน้าที่ และคณะอุตสาหกรรม การเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สำหรับการช่วยเหลือ และให้คำปรึกษาแนะนำเกี่ยวกับกระบวนการสังเคราะห์ PLA ด้วยกระบวนการทางชีวภาพ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ และขอน้อมรำลึกพระคุณ บุญการี บิดา มารดา ที่ให้กำเนิดคอยเลี้ยงดูอบรมสั่งสอนคอยสนับสนุน และให้กำลังใจข้าพเจ้าตั้งแต่เริ่มต้นทำปริญญานิพนธ์ จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ขอขอบคุณครอบครัว ญาติพี่น้อง รวมทั้ง กัลยาณมิตรที่ดี และขอขอบคุณ น้องชาน น้องแนน เพื่อนताल และทุกคนในคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สำหรับความช่วยเหลือ และแสดงน้ำ ใจให้กันอย่างสม่ำเสมอ และขอขอบคุณผู้มีพระคุณทุกท่านที่ได้กล่าวนามในที่นี้จนสำเร็จปริญญานิพนธ์

ท้ายที่สุดนี้ ข้าพเจ้าขอเอาประโยชน์อันเกิดจากปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ทั้งหมดเป็นกุศล แก่ผู้มีพระคุณทุกท่าน ที่คอยช่วยเหลือข้าพเจ้าตลอดมา

อนุพันธ์ ยังปรีดา

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง.....	1
จุดมุ่งหมายของการวิจัย.....	2
ขอบเขตของการวิจัย.....	2
สมมุติฐานของการวิจัย.....	2
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
พอลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (Biodegradable polymer).....	3
การจัดจำแนกชนิดของพอลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ.....	3
ผลิตจากผลผลิตทางอุตสาหกรรมปิโตรเคมี.....	3
ผลิตจากมวลชีวภาพทางการเกษตร.....	3
ผลิตจากการสกัดจากเซลล์จุลินทรีย์.....	3
ผลิตจากกระบวนการเทคโนโลยีชีวภาพ.....	3
พลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (Biodegradable plastic).....	4
คำนิยามของพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ.....	4
พอลิแลคไทด์หรือพอลิแลกติกแอซิด (Poly(Lactide), Poly(L-lactic acid);PLA)....	6
คุณสมบัติทางเคมีของกรดแลกติก และPLA.....	7
กระบวนการสังเคราะห์ PLA.....	9
กระบวนการควบแน่นโดยตรง (Direct polycondensation).....	10
กระบวนการเปิดวงแหวน (Ring opening polymerization).....	11
การประยุกต์ใช้ PLA.....	13
กระบวนการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ (Biodegradation of bioplastic).....	13
จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลาย PLA ได้ (PLA biodegrading Microorganisms)....	14
เอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการย่อยสลาย PLA (PLA degrading enzyme).....	18
เอนไซม์โปรติเอส.....	18
เอนไซม์ไลเปส.....	19
เอนไซม์เอสเทอเรส.....	19
การสังเคราะห์ PLA ด้วยกระบวนการทางชีวภาพ (Biosynthesis of PLA).....	19

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	22
เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง.....	22
อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี.....	24
การเตรียมสารเคมี PLA.....	25
การเตรียมจุลินทรีย์ <i>A. keratinilytica</i> สายพันธุ์ T16.....	25
การผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลาย PLA จาก <i>A. keratinilytica</i> สายพันธุ์ T16-1.....	26
การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่ย่อยสลาย PLA	26
การหาจุดที่เหมาะสมในการย่อยสลาย PLA โดยเอนไซม์จาก	
<i>A. Keratinilytica</i> สายพันธุ์ T16-1 ด้วยวิธีการทางสถิติ.....	26
การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลาย PLA โดยเครื่อง HPLC.....	31
การวิเคราะห์ผลทางสถิติเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมจากการย่อยสลาย	
PLA โดยเอนไซม์จาก <i>A. keratinilytica</i> สายพันธุ์ T16-1.....	31
การสังเคราะห์ PLA ด้วยกระบวนการทางชีวภาพ จากผลิตภัณฑ์ที่ได้จาก	
การย่อยสลาย PLA โดยใช้เอนไซม์ไลเปสทางการค้าเป็นคะตะลิสต์.....	31
การวิเคราะห์ PLA ที่สังเคราะห์ได้จากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากโดยใช้เอนไซม์ไลเปส	
ทางการค้าเป็นคะตะลิสต์โดยกระบวนการทางชีวภาพ.....	32
4 ผลการทดลอง.....	33
การหาจุดที่เหมาะสมในการย่อยสลาย PLA โดยวิธีพื้นผิวตอบสนอง.....	33
การวิเคราะห์การถดถอย (regression analysis).....	36
การประมาณสัมประสิทธิ์การถดถอยเชิงพหุคูณ.....	36
การทดสอบสมมติฐานของสมการการถดถอยหรือสมการความสัมพันธ์.....	37
การตรวจสอบความเหมาะสมของข้อมูลที่ใช้ในการวิเคราะห์การถดถอย.....	39
การทดสอบความคงที่ของความคลาดเคลื่อน.....	39
การทดสอบการแจกแจงแบบปกติ (normal distribution).....	39

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
4 (ต่อ)	
การทดสอบความคงที่ของความแปรปรวนของความคลาดเคลื่อน	40
การเปรียบเทียบค่าจริงจากการทดลอง และค่าทำนายปริมาณกรดแลกติก จากการสลาย PLA โดยใช้เอนไซม์จาก <i>A. keratinilytica</i> สายพันธุ์ T16-1.....	44
การหาจุดที่เหมาะสมของตัวแปรที่ศึกษาต่อการสลาย PLA โดยใช้เอนไซม์ จาก <i>A. keratinilytica</i> สายพันธุ์ T16-1.....	44
การประเมินการสังเคราะห์ PLA จากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลาย PLA โดยใช้เอนไซม์ไลเปสทางการค้าเป็นคะตะลิสต์.....	48
5 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง.....	52
บรรณานุกรม.....	56
ภาคผนวก.....	67
ภาคผนวก ก.....	68
ภาคผนวก ข.....	70
ภาคผนวก ค.....	72
ประวัติย่อผู้วิจัย.....	74

บัญชีตาราง

ตาราง	หน้า
1 สารเคมีที่ใช้ในกระบวนการรีพอลิเมอร์ไรเซชัน PLA.....	12
2 เชื้อจุลินทรีย์ ชนิดของเอนไซม์ และวิธีการตรวจวัดการย่อยสลาย PLA.....	17
3 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง.....	22
3 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง (ต่อ).....	23
4 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง.....	24
5 การกำหนดช่วงของปัจจัยที่ศึกษาโดยวิธี central composite design.....	28
6 การออกแบบการทดลองในการศึกษาย่อยสลาย PLA ด้วยเอนไซม์จาก <i>A. keratinilytica</i> สายพันธุ์ T16-1 โดยใช้วิธี CCD.....	29
7 การกำหนดช่วงของปัจจัยที่ศึกษาโดยวิธี central composite design.....	33
8 ผลการทดลองในการย่อยสลาย PLA โดยใช้เอนไซม์จาก <i>A. keratinilytica</i> สายพันธุ์ T16-1 โดยใช้ วิธีการออกแบบการทดลอง แบบCCD.....	34
9 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของการวิเคราะห์การถดถอยเชิงพหุคูณ.....	37
10 ค่าการวิเคราะห์สัมประสิทธิ์ของสมการการถดถอยและค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ.....	38
11 ผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติกจากการสลาย PLA โดยใช้เอนไซม์จาก <i>A. keratinilytica</i> สายพันธุ์ T16-1และค่าทำนายปริมาณกรดแลกติกที่ได้จากสมการ ถดถอย.....	42

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 การจัดจำแนกพอลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ.....	5
2 กระบวนการสังเคราะห์ PLA จากวัตถุดิบทางธรรมชาติ.....	6
3 อินทรีย์โอเมอร์ของกรดแลคติกชนิดแอล และกรดแลคติกชนิดดี.....	7
4 โครงสร้างของผลึกที่เกิดจากกรดแลคติกในแต่ละไอโซเมอร์.....	8
5 ขั้นตอนการสังเคราะห์ PLA ทั้งการควบแน่นโดยตรง และการเปิดวงแหวน.....	9
6 ปฏิกริยาการสังเคราะห์ PLA ด้วยกระบวนการควบแน่นโดยตรง.....	10
7 ปฏิกริยาการสังเคราะห์ PLA ด้วยกระบวนการเปิดวงแหวน.....	11
8 กลไกการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพโดยจุลินทรีย์	14
9 การนำ PLA กลับมาใช้ใหม่โดยใช้เอนไซม์ไลเปส ทั้งในกระบวนการย่อยสลาย PLA และการนำกลับมาสังเคราะห์ใหม่.....	20
10 normal probability plot ของค่าความคลาดเคลื่อน.....	40
11 Scatter plot ของค่าความคลาดเคลื่อนกับค่าทำนาย.....	41
12 พื้นผิวตอบสนอง (response surface plot) และคอนทัวร์พล็อตของ อุณหภูมิ และ เวลา	45
13 พื้นผิวตอบสนอง (response surface plot) และคอนทัวร์พล็อตของ อุณหภูมิ และ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์	46
14 พื้นผิวตอบสนอง (response surface plot) และคอนทัวร์พล็อตของ ค่ากิจกรรมของ เอนไซม์ และเวลา.....	47
15 กราฟ $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสังเคราะห์ PLA โดยใช้กระบวนการทางชีวภาพ.....	49
16 ภาพโครงสร้างโมเลกุลจำลองของโพลิโกลิเมอร์ PLA (n=5).....	50
17 กราฟ LC/MS ของการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุล ของโพลิโกลิเมอร์ที่ได้จากการสังเคราะห์ PLA โดยใช้ กระบวนการทางชีวภาพ.....	51

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

ในปัจจุบันจำนวนประชากร รมนุษย์มีเพิ่มมากขึ้น ประกอบกับการพัฒนาทางเทคโนโลยีอย่างรวดเร็วส่งผลให้ความต้องการใช้เครื่องอุปโภค บริโภคมีมากยิ่งขึ้น ซึ่งก่อให้เกิดปัญหาตามมา มากมาย เช่น ปัญหาขยะ โดยเฉพาะขยะพลาสติกซึ่งสังเคราะห์ได้จากสารในกลุ่มปิโตรเคมี และมีโครงสร้างทางเคมีที่ซับซ้อน จึงย่อยสลายตามธรรมชาติได้ยาก เป็นผลให้เกิดการสะสม ขยะพลาสติกชนิดนี้เป็นจำนวนมาก รวมทั้งการเผาทำลาย ขยะพลาสติกส่งผลให้เกิดก๊าซเรือนกระจก ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดภาวะโลกร้อน

ปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์จึงได้มีการคิดค้นพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพขึ้นเพื่อใช้ทดแทนพลาสติกเดิม โดยพลาสติกชนิดนี้สามารถถูกย่อยสลายได้โดยจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ เช่น แบคทีเรีย รา และแอคติโนมัยซีต (actinomycetes) ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้จะสร้างเอนไซม์เพื่อ ย่อยสลายโดยผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่เกิดขึ้น คือ น้ำ พลังงาน มวลชีวภาพ (biomass) ก๊าซมีเทน (methane) และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (Marten; et al., 2003: 485-501) ซึ่งผลิตภัณฑ์ดังกล่าวนี้ไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพมีหลายชนิด ได้แก่ poly- β -hydroxybutyrate (PHB) poly-L-lactide (PLA) และ poly- ϵ -caprolactone (PCL)

พลาสติกชีวภาพชนิด PLA ได้รับความนิยมในการนำมาใช้เป็นพลาสติกทดแทนเนื่องจาก PLA สามารถสังเคราะห์ได้จากการดแลกติก (lactic acid) โดยกรดชนิดนี้สามารถผลิตได้จากกระบวนการหมักผลิตผลทางการเกษตร ด้วยจุลินทรีย์ ซึ่งวัตถุดิบทางการเกษตรนี้ถือเป็นทรัพยากรที่ใช้แล้วไม่หมดไป สามารถเกิดขึ้นใหม่ได้ (Tokiwa; & Jarerat, 2004: 771-777) นอกจากนี้ยังพบว่า กระบวนการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ ชนิด PLA นั้นเกิดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ และเอนไซม์จาก จุลินทรีย์ต่างๆ ใน Williams. (1981: 5-7) พบว่า *Tritirachium album* สามารถย่อยสลาย PLA ได้ ซึ่งเป็นรายงานฉบับแรกทำให้เกิดความสนใจในการศึกษาต่อมา สำหรับการศึกษานี้ในประเทศไทยมีรายงานว่า Sukkhum; et al. (2009: 302-306) แยกแอคติโนมัยซีตชนิดใหม่ในสกุล *Actinomadura keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1 ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLA ได้โดยเอนไซม์ที่ได้ผลิตจากเชื้อชนิดนี้เป็นเอนไซม์เซอรินโปรติเอส และเมื่อศึกษาการผลิตเอนไซม์ในระดับฟลasks สามารถผลิตเอนไซม์ได้ 44.6 U/ml ในขณะที่ในระดับถังหมักแบบอากาศลอยตัวผลิตเอนไซม์ได้ถึง 150 U/ml จากงานวิจัยที่ผ่านมาเน้นการศึกษาเกี่ยวกับการคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ และศึกษาสภาวะในการผลิตเอนไซม์ ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ ชนิด PLA แต่การศึกษากการสังเคราะห์ PLA โดยกระบวนการทางชีวภาพยังมีการศึกษาไม่มากนัก

Chuensangjun; et al. (2012: 154-157) สังเคราะห์ PLA โดยใช้เอนไซม์ไลเปสทางการค้า เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดคือ 50 องศาเซลเซียส และทำให้เกิดพอลิเมอร์ ของ PLA น้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 2,600–4,500 หน่วย นอกจากนี้ความเข้มข้นของเอนไซม์ไลเปสก็ส่งผล ต่อน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ ซึ่งน้ำหนักโมเลกุลเพิ่มขึ้นได้ถึง ร้อยละ 70 หากเพิ่มความเข้มข้นของ เอนไซม์ไลเปสจากร้อยละ 1.25 เป็นร้อยละ 5 อย่างไรก็ตาม ภาวะในการย่อยสลาย PLA แตกต่างกันไป ตามชนิดของเอนไซม์ และเพื่อเป็นการลดต้นทุนการใช้เอนไซม์ทางการค้า ใน งานวิจัยนี้จึง ศึกษา ภาวะในการย่อยสลาย PLA โดยเอนไซม์ที่ผลิตจาก *Actinomadura keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1 และ การสังเคราะห์ PLA โดยกระบวนการทางชีวภาพ เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการนำพลาสติก ชนิดนี้ กลับมาใช้ใหม่ในอนาคต

จุดมุ่งหมายของงานวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยได้ตั้งความมุ่งหมายของการศึกษาวิจัยไว้ดังนี้

1. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลาย PLA โดยเอนไซม์จาก *A. keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1
2. นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลาย PLA ด้วยเอนไซม์จาก *A. keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1 มาสังเคราะห์ให้เป็น PLA ใหม่ด้วยกระบวนการทางชีวภาพ

ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยครั้งนี้จะทำการศึกษาระบบการย่อยสลาย PLA โดยเอนไซม์ที่ผลิต จาก *A. keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1 โดยศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลาย นอกจากนี้ยังนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จาก การย่อยสลาย มาทำการ สังเคราะห์ให้ เป็น PLA ใหม่ด้วยวิธีการทางชีวภาพ โดยทำการทดลองที่ สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

สมมุติฐานของการวิจัย

อุณหภูมิ เวลา และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ มีผลต่อกระบวนการย่อยสลาย PLA โดยเอนไซม์ จาก *A. keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1 นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายสามารถนำกลับมา สังเคราะห์ใหม่ด้วยกระบวนการทางชีวภาพโดยใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในงานวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยได้ศึกษา เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง และได้นำเสนอ ตามหัวข้อต่อไปนี

1. พอลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (Biodegradable polymer)
2. พลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (Biodegradable plastic)
3. พอลิแลคไทด์หรือพอลิแลคติกแอซิด (Poly(Lactide), Poly (Lactic acid) (PLA))
4. กระบวนการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ (Biodegradation of bioplastics)
5. จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลาย PLA ได้ (PLA biodegrading microorganisms)
6. เอนไซม์ที่ใช้กระบวนการย่อยสลาย PLA (PLA degrading enzyme)
7. การสังเคราะห์ PLA ด้วยกระบวนการทางชีวภาพ (Biosynthesis of PLA)

1. พอลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (Biodegradable polymer)

1.1 การจัดจำแนกชนิดของพอลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ

สามารถจัดจำแนกตามแหล่งที่มาได้ 4 แหล่ง ดังในภาพประกอบ 1 ได้แก่

1.1.1 ผลิตจากผลผลิตทางอุตสาหกรรมปิโตรเคมี ซึ่งตัวอย่างพอลิเมอร์ประเภทนี้ ได้แก่ poly(vinyl alcohol) (PVA) และ poly(ϵ -caprolactone) (PCL)

1.1.2 ผลิตจากมวลชีวภาพทางการเกษตรซึ่งตัวอย่างพอลิเมอร์ประเภทนี้ ได้แก่ วัสดุที่เป็นพอลิแซคคาไรด์ที่ได้จากแป้ง ข้าวสาลี แป้งมันฝรั่ง แป้งข้าวโพด หรือวัตถุดิบลิกโนเซลลูโลส (lignocellulose) เช่น ฟาง ไม้ นอกจากนั้นยังรวมไปถึงวัตถุดิบในกลุ่มของไคติน ไคโตซาน เพคติน โปรตีน และไขมันด้วย

1.1.3 ผลิตจากการสกัดจากเซลล์จุลินทรีย์ ซึ่งตัวอย่างพอลิเมอร์ประเภทนี้ ได้แก่ polyhydroxy alkanate (PHA) และ poly(hydroxy Butyrate-co-hydroxy valerate) (PHBV)

1.1.4 ผลิตภัณฑ์จากกระบวนการเทคโนโลยีชีวภาพ ซึ่งสังเคราะห์ขึ้นจากกระบวนการทางเคมี โดยใช้โมโนเมอร์ที่ได้จากวัตถุดิบทางชีวภาพ เช่น ข้าวโพด มันสำปะหลัง อ้อย โดยผ่านกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพเปลี่ยนแปลงไปเป็นน้ำตาล และเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นกรดแล็กติก และนำกรดแล็กติกที่ได้มาเชื่อมต่อเป็นพอลิเมอร์สายยาว ตัวอย่างพอลิเมอร์ประเภทนี้ได้แก่ poly(L-lactide) และ Poly (Lactic acid, PLA)

2. พลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (Biodegradable plastics)

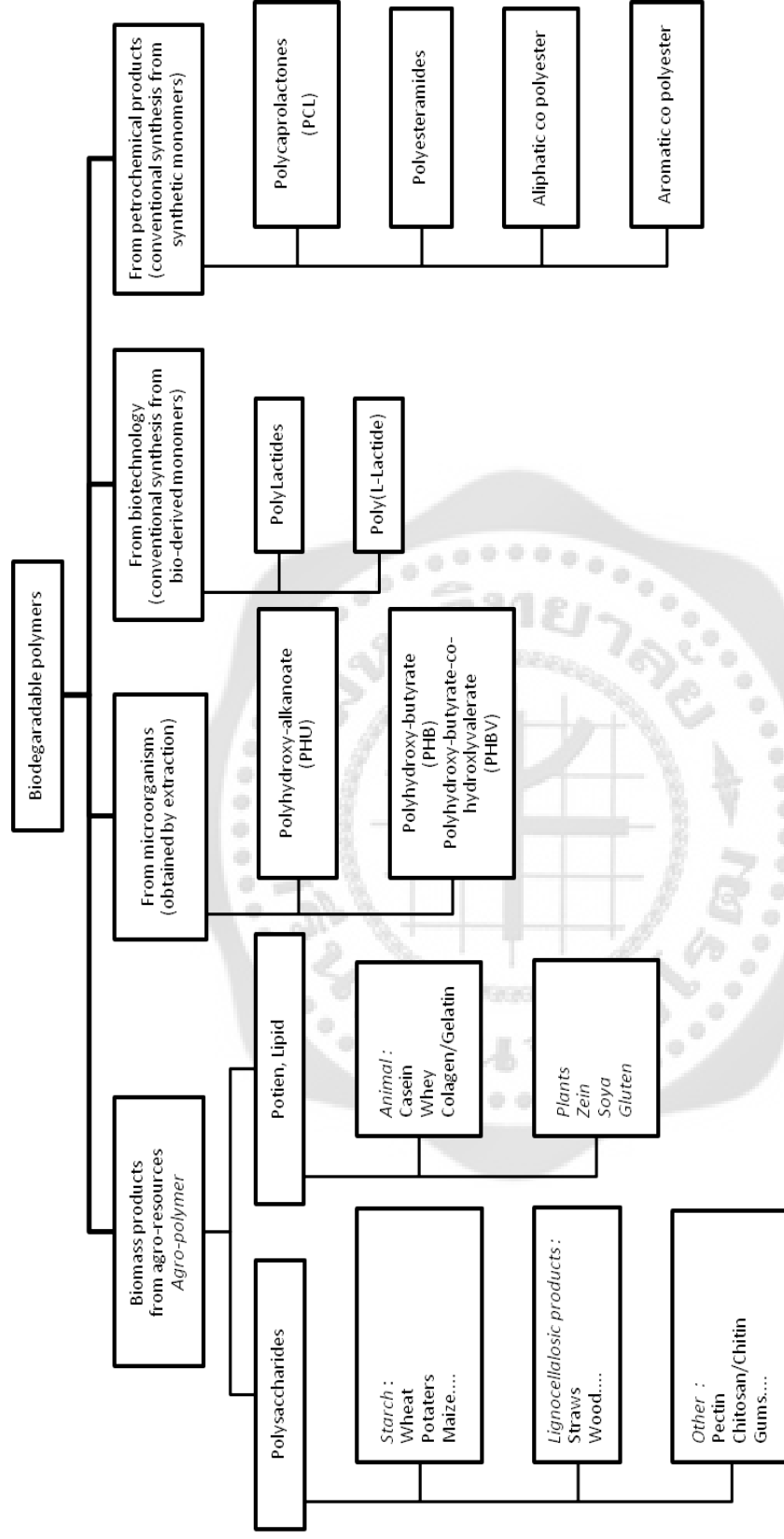
2.1 คำนิยามของพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ

“ASTM D6400-99 – พลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ หมายถึง พลาสติกที่ย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติ โดยกระบวนการจากจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย เชื้อรา และสาหร่าย”

“ISO 472: 1988 (1988) – พลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ หมายถึง พลาสติกที่ถูกออกแบบให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีได้ภายใต้สภาวะทางธรรมชาติที่จำเพาะโดยการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมี จะเกิดจากกระบวนการย่อยสลายของจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ”

“BPS Japan (1994) – พลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพคือ วัสดุพอลิเมอร์ที่จะเปลี่ยนไปเป็นสารประกอบที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ หลังจากผ่านกระบวนการย่อยสลายอย่างน้อย 1 ขั้นตอน ซึ่งการย่อยสลายจะเกิดจากเมแทบอลิซึม (metabolism) ของสิ่งมีชีวิตในธรรมชาติ”

“DIN FNK 103.2 (1993) – พลาสติกชีวภาพคือ พลาสติกที่สามารถเกิดกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพอย่างสมบูรณ์ตามสภาวะแวดล้อม โดยอัตราการย่อยสลายทางชีวภาพสามารถวัดได้จากวิธีทดลองมาตรฐาน” (Sukkhum; et al. 2009b: 302-306)

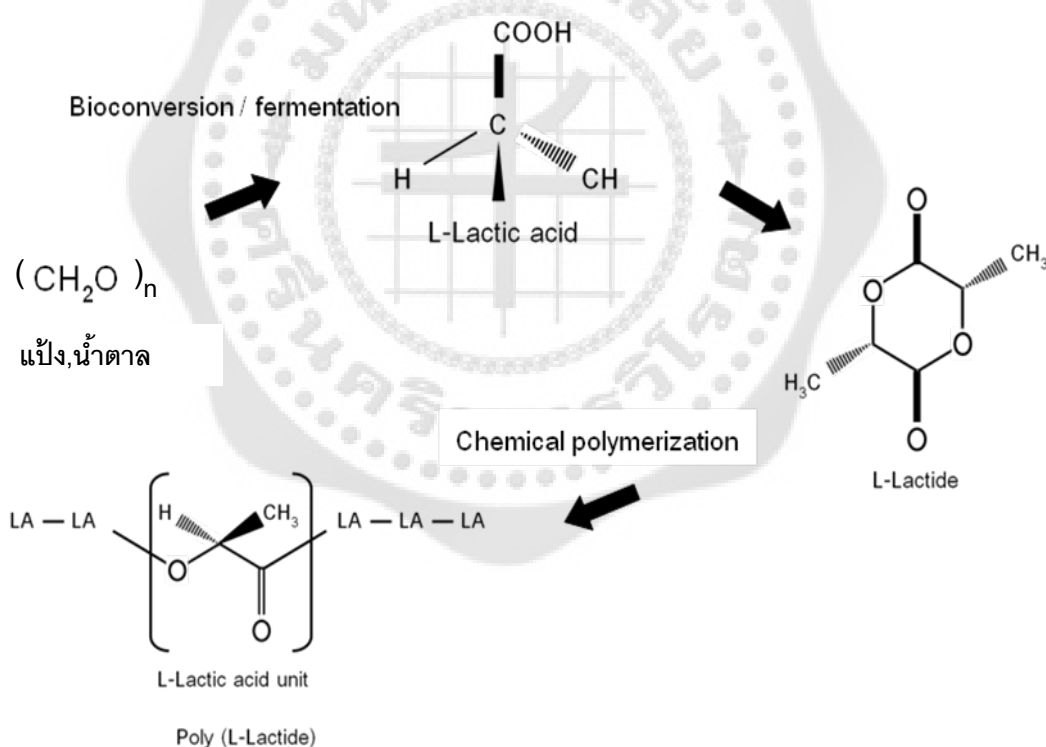


ภาพประกอบ 1 การจัดจำแนกพอลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ

ที่มา: Averous, L. (2008). *Poly(lactic Acid: Synthesis, Properties and Applications*. Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources. p. 435.

3. พอลิแลกไทด์หรือพอลิแลกติกแอซิด (Poly(Lactide), Poly(L-lactic acid); PLA)

พอลิแลกไทด์หรือพอลิแลกติกแอซิด (PLA) เป็นพอลิเอสเตอร์สายตรง ซึ่งเกิดจากกรดแลกติกต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะเอสเตอร์ ซึ่งกรดแลกติกนั้นสามารถผลิตได้จากกระบวนการหมัก หรือกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพ (bioconversion) ของผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร เช่น มันสำปะหลัง ข้าว ข้าวโพดและซังข้าวโพด โดยวัตถุดิบดังกล่าวถือเป็นวัตถุดิบที่สามารถเกิดขึ้นใหม่ได้ วิธีการผลิตกรดแลกติกเริ่มจากการบดหรือโม้ชิ้นส่วนของพืชให้มีขนาดเล็กลง จนเป็นผง จากนั้นย่อยสลายส่วนของพืชที่ได้ให้เป็นน้ำตาล และนำไปหมักด้วยจุลินทรีย์ เช่น *Lactobacillus brevis* จนได้เป็นกรดแลกติกที่เป็นโมเลกุลเดี่ยว ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ PLA ได้ ดังในภาพประกอบ 2 (Miura; et al.. 2004: 153-157; Oh; et al. 2005: 1492-1498; Xiaodong; et al. 1997: 841-843; Yun; et al. 2004: 1613-1616)



ภาพประกอบ 2 กระบวนการสังเคราะห์ PLA จากวัตถุดิบทางธรรมชาติ

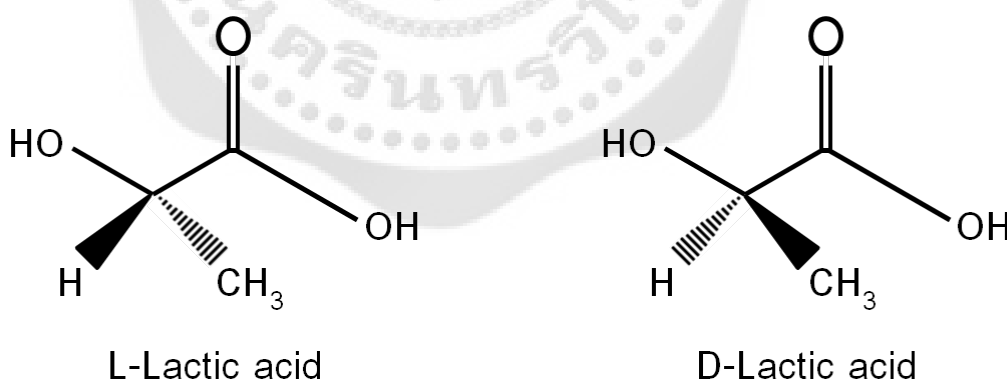
ที่มา: Tokiwa; & Jarerat. (2004). *Biodegradation of poly(L-lactide)*. Biotechnology Letters. p. 774.

3.1 คุณสมบัติทางเคมีของกรดแลคติก และ PLA

กรดแลคติกที่ใช้เป็น โมโนเมอร์ในการผลิต PLA มีสูตรเคมีคือ $\text{HOCH}_2\text{CHCOOH}$ ซึ่งเป็นโมเลกุลที่มีคู่อิแนนทิโอเมอร์(enantiomer) คือ กรดแลคติกชนิดแอลไอโซเมอร์(L-lactic acid) และดีไอโซเมอร์(D-lactic acid) ดังในภาพประกอบ 3 (Vink; et al. 2002: 403-419; Miura; et al. 2004: 153-157)

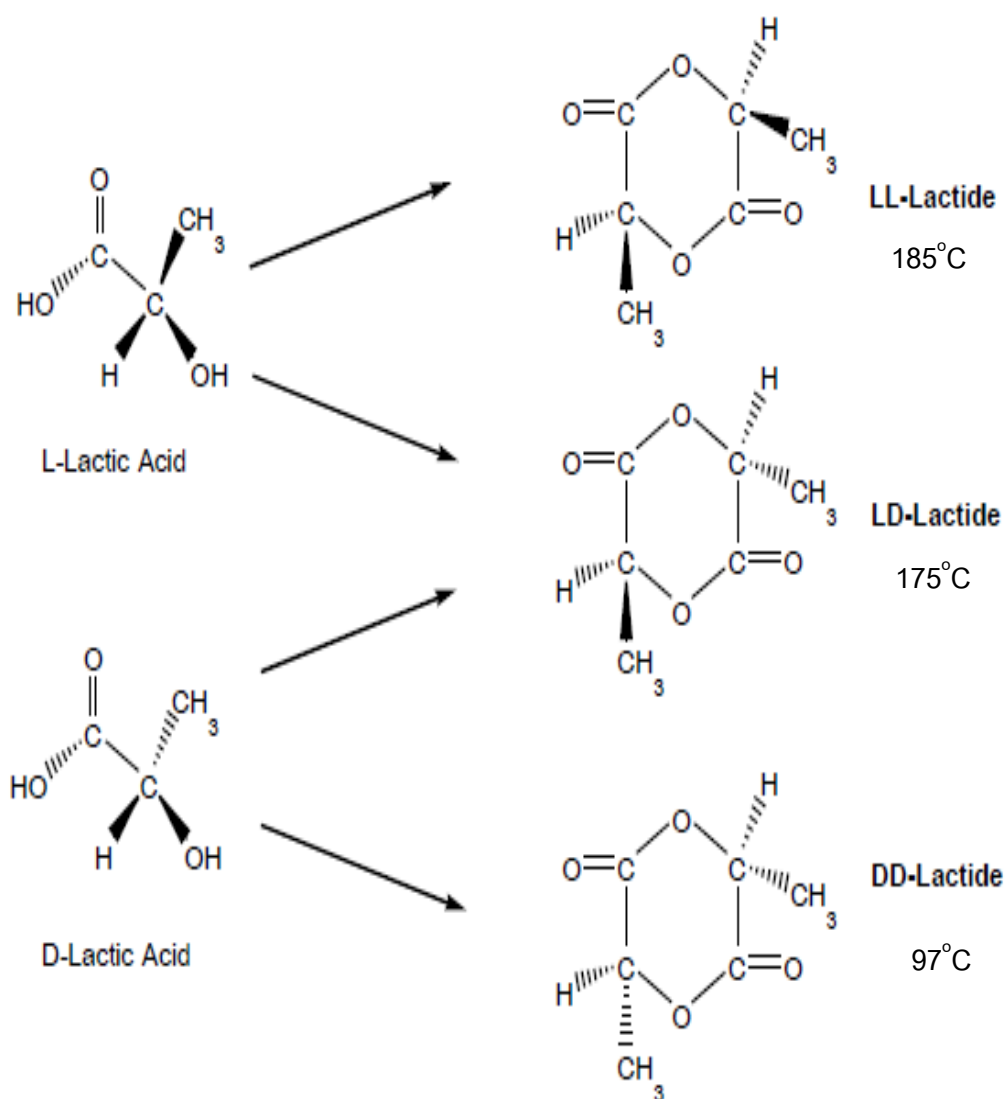
กรดแลคติกชนิดแอลแลคติก สามารถตกผลึกได้ 3 รูปแบบ คือ แอลฟา (LL-lactic acid) บีตา (LD-lactic acid) และแกมมา (DD-lactic acid) ดังในภาพประกอบ 4 โครงสร้างแบบแอลฟา มีความเสถียรมากที่สุดมีจุดหลอมเหลว 185 องศาเซลเซียส เมื่อเทียบกับโครงสร้างแบบบีตาที่มีจุดหลอมเหลว 175 องศาเซลเซียส (Auras; Harte; & Selke. 2004: 835-864) กรดแลคติกชนิดแอล-ไอโซเมอร์ เป็นรูปแบบส่วนใหญ่ที่พบตามธรรมชาติ และผลิตได้จากแหล่งทรัพยากรที่สร้างทดแทนได้

PLA จัดเป็นเทอร์โมพลาสติก ซึ่งสามารถขึ้นรูปด้วยกระบวนการผลิตทางเคมี คุณสมบัติของ PLA ในด้านต่างๆ ได้แก่ สมบัติการละลาย พบว่า PLA จะไม่ละลายในน้ำแต่สามารถละลายในตัวทำละลายอินทรีย์บางชนิด (Anders; & Mikael. 2002: 1123 -1163) สมบัติการทนความร้อน พบว่า PLA สามารถทนความร้อนได้ค่อนข้างสูงกว่าเทอร์โมพลาสติกทั่วไป (Dorgan; Lehermeier; & Mang. 2000: 1-9) มีการซึมผ่านของน้ำได้ดี และยังสามารถป้องกันการแพร่ผ่านของกลิ่นได้(Lehermeier; Dorgan; & Donglas. 2001: 243-251)



ภาพประกอบ 3 อิแนนทิโอเมอร์ของกรดแลคติกชนิด กรดแลคติกแอล (ซ้าย) และกรดแลคติกดี (ขวา)

ที่มา: Vink; et al. (2002). *Application of life cycle assessment to Nature Works™ polylactide (PLA) production*. . p. 405.



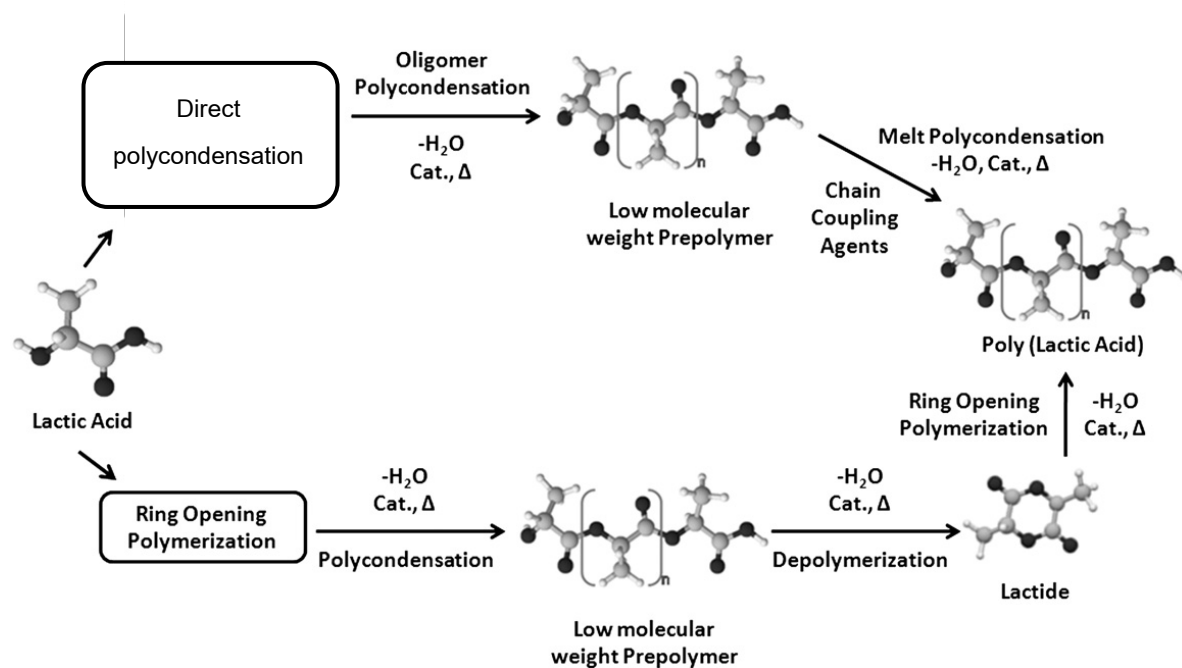
ภาพประกอบ4 โครงสร้างของผลึกที่เกิดจากกรดแลกติกในแต่ละไอโซเมอร์สืบทอดกัน ทำให้เกิดผลึกแลกไทด์

3 รูปแบบ คือแอลฟา (LL-lactic acid) บีตา (LD-lactic acid) และแกมมา (DD-lactic acid)

ที่มา: จตุพร วุฒิกนกกาญจน์; และคนอื่นๆ. (2555). *งานวิจัยและสิทธิบัตรที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาบรรจุภัณฑ์จากพลาสติกชีวภาพชนิด PLA*. (เอกสารประกอบการสอน). หน้า 2.

3.2 กระบวนการสังเคราะห์ PLA

วิธีการสังเคราะห์ PLA จากกรดแลคติก สามารถทำได้ 2 วิธี ได้แก่ การควบแน่นโดยตรง (direct polycondensation) และ กระบวนการเปิดวงแหวน (ring opening polymerization) ซึ่งทั้ง 2 กระบวนการเป็นกระบวนการทางเคมี (Vink; et al. 2002: 403-419) ดังในภาพประกอบ 5

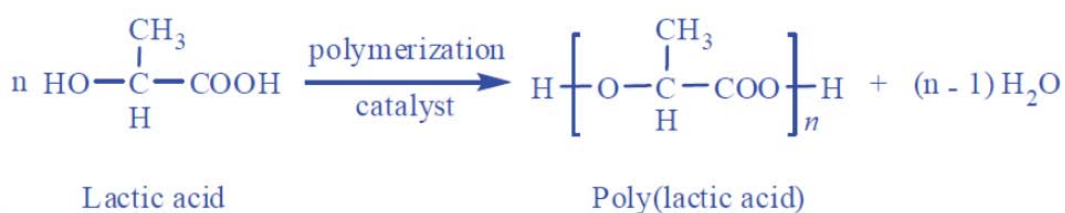


ภาพประกอบ 5 ขั้นตอนการสังเคราะห์ PLA ทั้งการควบแน่นโดยตรง (direct polycondensation) (ด้านบนของภาพ) และการเปิดวงแหวน (ring opening polymerization) (ด้านล่างของภาพ)

ที่มา: Astrid; et al. (2012). *Poly-lactic acid synthesis for application in biomedical devices*. Biotechnology Advances. p. 325.

3.2.1 กระบวนการควบแน่นโดยตรง (direct polycondensation)

กระบวนการควบแน่นโดยตรง เป็นวิธีที่ต้องใช้ตัวทำละลาย และคะตะลิสต์ (catalyst) ภายใต้สภาวะสุญญากาศ ที่อุณหภูมิสูง เพื่อดึง น้ำออกทำให้มอนอเมอร์ของกรดแลคติก สร้างพันธะต่อกันเป็นสาย PLA ดังในภาพประกอบ 6 ในกระบวนการควบแน่นของ PLA พอลิเมอร์ที่เกิดขึ้นจะมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำถึงปานกลาง สามารถใช้ได้ในรูปแบบนี้ หรือนำไปรวมกับไอโซไซยาเนต (isocyanate) อีพอกไซด์ (epoxide) หรือเพอร์ออกไซด์ (peroxide) เพื่อให้ได้น้ำหนักโมเลกุลต่าง ๆ ตามต้องการ (Lunt. 1998: 145-152; Lunt; & Andrew. 2000: 191-205; Gupta; Revagade; & Hilborn. 2007: 455-482) Achmad; et al. (2009: 342-350) รายงานว่ากระบวนการควบแน่นภายใต้สภาวะสุญญากาศโดยไม่ต้องใช้ คะตะลิสต์ ตัวทำละลาย และ สารตั้งต้นของ ปฏิกริยาสามารถทำให้เกิด PLA ได้ แต่จำเป็นต้องใช้อุณหภูมิสูงในการทำ ปฏิกริยา นอกจากนี้บริษัท Mitsui Toatsu Chemical ได้ศึกษาการควบแน่น โดยตรงโดยใช้คะตะลิสต์ และตัวทำละลาย อินทรีย์ที่จุดเดือดสูง พบว่า ได้ผลิตภัณฑ์เป็น oligomer ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยประมาณ ร้อยละ 10 และยังพบว่า มีผลผลิตอื่น ๆ ที่ไม่ต้องการเกิดขึ้นได้ด้วย เนื่องจากเกิด การจับกันเองภายในโมเลกุล และยังเกิดกระบวนการย่อยสลายควบคู่ไปด้วย ดังนั้นกระบวนการควบแน่นโดยตรงจึงไม่นิยมนำมาใช้ในระดับการผลิตขนาดใหญ่ ใช้ในการสังเคราะห์ในระดับห้องปฏิบัติการเพียงเท่านั้น เนื่องจากกระบวนการนี้มีความไวในการ เกิดปฏิกิริยาพลอดภัย และเป็นกระบวนการที่ง่าย (Dutkiewicz; Grochowska-Lapienis; & Tomaszewski. 2003: 66-70)



ภาพประกอบ 6 ปฏิกริยาการสังเคราะห์ PLA ด้วยกระบวนการควบแน่นโดยตรง

ที่มา: Lin; et al. (2012). *Poly (lactic acid)-based biomaterials: synthesis, modification and applications*. Biomedical Science, Engineering and Technology. p. 250.

ตาราง 1 ตารางแสดงสารเคมีที่ใช้ในกระบวนการผลิตโพลิเอสเตอร์ PLA

วิธีการ	วัตถุดิบ	คะตะลิสต์	ตัวทำละลาย	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ความดัน (Vac./N ₂)	อ้างอิง
DP	L-Lactic acid	ไม่มี	ไม่มี	150-250	vac.	Achmad; et al., 2007
	D,L-Lactic acid			160-200	N ₂	Kaitian; et al., 1996
		SnCl ₂		110-170	vac.	Harshe; et al., 2007
		Ti(BuO) ₄		110-180	vac.	
ROP	D,L-Lactide	Aluminum/Schiff	Toluene	60-100	atm	Tang; et al., 2004
	L-Lactide	Titanium tetra isopropylate		195-235	N ₂	Rafler; et al., 2001
		Aluminum trialkoxides / (2-methacryloxy) ethyloxy		80-110	N ₂	Eguiburu; et al., 1999
		Tin octoate as catalyst and n- dodecanol as initiator	ไม่มี	120-220	N ₂	Okamoto; & Matsuo, 2008

vac =สุญญากาศ; atm =บรรยากาศปกติ

DP= กระบวนการควบแน่นโดยตรง (direct polycondensation); ROP= กระบวนการเปิดวงแหวน (ring opening polymerization)

3.3 การประยุกต์ใช้ PLA

การนำ PLA มาใช้งานในช่วงแรกจำกัดอยู่ในเฉพาะด้านการแพทย์ เช่น อุปกรณ์การปลูกถ่ายอวัยวะ และไหมละลายสำหรับการเย็บแผล ในการผ่าตัด เนื่องจากการผลิตมีต้นทุนสูง และผลิตได้ยากจึงไม่แพร่หลาย จนในปัจจุบัน มีการพัฒนาเทคโนโลยีในการผลิตขึ้นทำให้ PLA ถูกนำมาใช้เชิงพาณิชย์มากยิ่งขึ้น (Datta; & Henry. 2006: 1119-1129) และนำมาใช้ในด้านต่าง ๆ เช่น

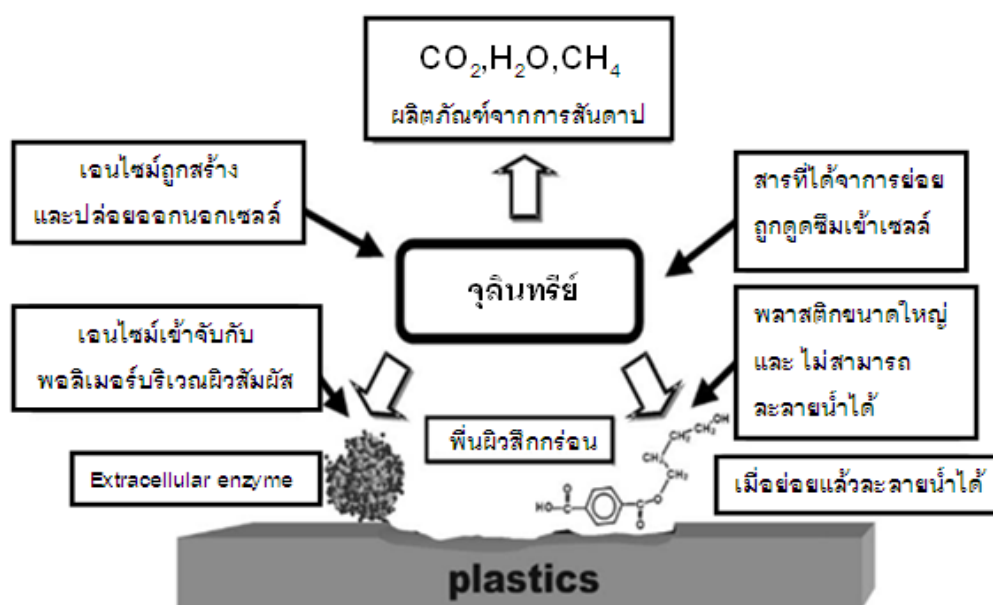
ด้านเภสัชศาสตร์ เนื่องจาก PLA สามารถย่อยสลายได้เอง จึงให้เกิดการศึกษามากมาย ทางด้านระบบการส่งผ่านยา โดยพอลิเมอร์ที่บรรจุยา จะถูกย่อยโดยกระบวนการแบบไฮโดรไลซิส และตัวยาจะถูกปล่อยออกมาทีละน้อย (Wood. 1980; 1-18; Langer; & Nikolaus. 1983: 61-126)

ด้านเครื่องนุ่งห่ม โดย บริษัทคานะโบะ ประเทศญี่ปุ่น ได้ผลิตเส้นใย PLA และนำมาตัดเย็บเป็นเครื่องนุ่งห่ม ภายใต้ยี่ห้อ LACTRON™ ซึ่งได้จัดแสดงในงาน Nagano Olympics (Lunt; & Andrew. 2000: 191-205)

ด้านบรรจุภัณฑ์ โดย PLA ยี่ห้อ Cargill Dow's Nature Works™ เป็นพอลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้เร็วที่ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลาย ทั้งในด้านการบรรจุภัณฑ์ (โดยเฉพาะบรรจุภัณฑ์อาหาร) พิล์ม และเส้นใย ประโยชน์ของ PLA ที่ผลิตโดยบริษัท Cargill Dow (Laitinen; et al. 1992: 1012-1016)

4. กระบวนการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ (Biodegradation of bioplastic)

กระบวนการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพโดยจุลินทรีย์จะเกิดจากเอนไซม์ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้น ซึ่งการย่อยแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนที่ 1 เริ่มจากการย่อยสลาย ที่เกิดขึ้นภายนอกเซลล์ เนื่องจากขนาดของสายพอลิเมอร์ยังมีขนาดใหญ่ และไม่ละลายน้ำจึงไม่สามารถเข้าสู่เซลล์ได้ จุลินทรีย์จึงต้องสร้างเอนไซม์ภายในเซลล์ และปลดปล่อยเอนไซม์ออกนอกเซลล์เพื่อย่อยสลายซึ่งเกิดได้ 2 แบบ คือใช้ endo-enzyme หรือเอนไซม์ที่ทำให้เกิดการแตกตัวของพันธะภายในสายพอลิเมอร์อย่างไม่เป็นระเบียบ และ exo-enzyme หรือเอนไซม์ที่ทำให้เกิดการแตกหักของพันธะที่ละหน่วยจากหน่วยที่เล็กที่สุดที่อยู่ด้านปลายของสายพอลิเมอร์ เอนไซม์ที่ปล่อยออกไปจะเข้ายึดเกาะกับผิวของพอลิเมอร์ ด้วยแรง hydrophobic interaction หรือแรงอื่น และเมื่อพอลิเมอร์ถูกย่อยสลายให้มีขนาดเล็กลงแล้ว จะเข้าสู่ขั้นตอนที่ 2 คือ เมื่อพอลิเมอร์ที่แตกตัวจนมีขนาดเล็ก จะถูกดูดซึมผ่านเข้าเยื่อหุ้มเซลล์ ของจุลินทรีย์ เข้าสู่กระบวนการเมแทบอลิซึม เป็นพลังงาน น้ำ มีเทน คาร์บอนไดออกไซด์ กลีเซอรอลต่าง ๆ และมวลชีวภาพ โดยที่สารบางส่วนของไปเหนี่ยวนำให้จุลินทรีย์ สร้างเอนไซม์ในปริมาณที่มากขึ้น ดังในภาพประกอบ 8 (Jaeger; et al. 1994: 29-63, Tserki; et al. 2006a: 367-376, Tserki; et al. 2006b: 377-384)



ภาพประกอบ 8 กลไกการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพโดยจุลินทรีย์

ที่มา: ดัดแปลงจาก Marten; et al. (2003). *Studies on the enzymatic hydrolysis of polyesters I. Low molecular mass model esters and aliphatic polyesters*. Polymer Degradation and Stability. p. 486.

5. จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลาย PLA ได้ (PLA biodegrading Microorganisms)

จุลินทรีย์เป็นปัจจัยหลักในกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพ โดยจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลาย PLA ได้แสดงในตาราง 2 การศึกษาเกี่ยวกับจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลาย PLA Williams (1981: 5-7) เป็นนักวิทยาศาสตร์คนแรกที่รายงานการย่อยสลาย PLA โดยใช้เอนไซม์โปรติเนส เค (proteinase K) ซึ่งเป็นเอนไซม์เซอรีนโปรติเอส (serine protease) ที่แยกได้จากรา *Tritirachium album* ต่อมา Pranamuda; Tokiwa; & Tanaka (1997: 1637-1640) รายงานว่า *Amycolatopsis* sp. สายพันธุ์ HT-32 เป็นแอคติโนมัยซีทชนิดแรกที่สามารถย่อยสลาย PLA ได้โดยสามารถสร้างบริเวณไสบนจานเลี้ยงเชื้อที่มี PLA ได้ และพบว่าเอนไซม์ที่ได้มีลักษณะคล้ายกับเอนไซม์โปรติเนส โดยแอคติโนมัยซีทนี้สามารถย่อยสลายฟิล์ม PLA ได้ 60 มิลลิกรัม หลังการบ่มในอาหารเหลวเป็นเวลา 14 วัน นอกจากแอคติโนมัยซีทสายพันธุ์นี้ยังพบว่า *Amycolatopsis* sp. สายพันธุ์ 15 สามารถสร้างบริเวณไสบนอาหารที่ประกอบด้วย PLA

ได้เช่นกัน แสดงให้เห็นว่า แอคติโนมัยสีทที่สามารถย่อยสลาย PLA กระจายตัวอยู่ในสกุลดังกล่าว ในการศึกษาต่อมา มีรายงานว่า แอคติโนมัยสีทที่สามารถย่อยสลาย PLA ได้นั้น เป็นแอคติโนมัยสีทในสกุล *Amycolatopsis* (Ikura; & Toshiaki. 1999: 247-251; Nakamura; et al. 2001: 345-353; Tokiwa; & Jarerat. 2003: 283-289) ต่อมา Ikura; & Kudo (1999: 247-251) ได้แยก *Amycolatopsis* สายพันธุ์ 3118 จากดิน น้ำจากบ่อ และแม่น้ำ โดยพบว่า มีการย่อยสลายฟิล์ม PLA อย่างสมบูรณ์ด้วย จุลินทรีย์ สายพันธุ์นี้ภายใน 2 สัปดาห์ และ Tokiwa; Konno; & Nishida (1999: 355-356) พบ *Amycolatopsis* sp. สายพันธุ์ KT-s-9 ซึ่งสามารถย่อยเส้นใยไหมและ PLA ได้ Tomita; Yutaka; & Koat (1999: 752-755) รายงานถึงแบคทีเรียทนร้อนชนิด *Brevibacillus* sp. ซึ่งสามารถย่อยฟิล์ม L-PLA ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยแยกได้จากดิน จากนั้น Nakamura; et al. (2001: 345-353) ได้แยก *Amycolatopsis* sp. สายพันธุ์ K10H-1 และ K104-2 ได้จากตัวอย่างดิน ซึ่งเอนไซม์นี้มีลำดับกรดอะมิโน คล้ายกับเอนไซม์เซอร์อินโปรติเอส Sakai; et al. (2001: 298-300) คัดแยกแบคทีเรียทนร้อนซึ่งสามารถย่อยสลาย L-PLA ได้จากกองปุ๋ยหมัก ซึ่งระบุว่าเป็น *Bacillus smithii* แบคทีเรียสายพันธุ์นี้เจริญได้ดี ในอาหารที่มี L-PLA ร้อยละ 1 และน้ำหนักโมเลกุลของ L-PLA ลดลงร้อยละ 35.6 หลังจากบ่มไว้เป็นเวลา 3 วัน ในสภาวะที่มีการเขย่าที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส Jarerat; Pranamuda; & Tokiwa (2002: 420-428) ศึกษาการกระจายของจุลินทรีย์ที่ย่อยสลาย PLA ในกลุ่ม แอคติโนมัยสีทเป็นจำนวน 105 สายพันธุ์ โดยศึกษาลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA พบว่า สายพันธุ์ที่ย่อยสลาย PLA จัดอยู่ในวงศ์ของ Pseudonocardiaceae และสกุลที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ *Amycolatopsis*, *Kibdelosporangium*, *Saccharothrix*, *Lentzea* และ *Streptoalloteichus* Tokiwa; & Jarerat (2003: 283-289) ยืนยันว่าแอคติโนมัยสีทในวงศ์ Pseudonocardiaceae และสกุลที่เกี่ยวข้อง มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลาย PLA ต่อมา Tomita; et al. (2004: 433-438) คัดแยกแบคทีเรียทนร้อนชนิด *Geobacillus* sp. สายพันธุ์ 41 ที่สามารถย่อยสลาย L-PLA ได้ โดยใช้เวลา 20 วัน ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส Tokiwa; & Jarerat (2004: 771-777) รายงานการคัดแยกจุลินทรีย์หลายกลุ่มที่สามารถย่อยสลาย PLA ได้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จุลินทรีย์ส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่มของวงศ์ Pseudonocardiaceae และสกุลอื่น ๆ ได้แก่ *Amycolatopsis*, *Lentzea*, *Kibdelosporangium*, *Streptoalloteichus* และ *Saccharothrix* Tomita; et al. (2004: 433-438) รายงานว่าเมื่อใช้ crude enzyme ที่ผลิตได้จาก *Geobacillus thermocatenulatus* สามารถย่อยสลาย PLA ขนาดโมเลกุล 47,000 หน่วย ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยใช้ระยะเวลา 20 วัน

Kim; et al. (2007: 234–239) พบแบคทีเรียเทอร์มอแอคตินอไมด์ใหม่แยกได้จากปุ๋ยหมัก และระบุว่า เป็น *Bacillus licheniformis* ซึ่งไม่เพียงแต่ย่อยสลาย L-PLA ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำเท่านั้น แต่ยังสามารถย่อยสลาย L-PLA ชนิดอื่นที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงได้ที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส การย่อยสลายนี้น่าจะกล่าวถึงความสามารถที่ยืนยันได้จากน้ำหนักโมเลกุล และค่าความหนืดของพอลิเมอร์ที่เปลี่ยนไป ในปี ค.ศ. 2009 มีรายงานว่าพลาสติกชนิดนี้สามารถถูกย่อยสลายได้ด้วยจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ด้วย เช่น *Bacillus brevis*, *B. stearothermophilus*, *B. Licheniformis*, *N. fastidiosa*, *Geobacillus thermocatenulatus*, *Laceyella sacchari*, *Micromonospora echinospora*, *M. Viridifaciens*, *Nonomureae terrinata* และ *Thermoactinomyces vulgaris* (Tomita; Yutaka; & Kota. 1999: 752-755; Tomita; et al. 2003: 167-171; Tomita; et al. 2004: 433-438) Sukkhum; et al. (2009a: 459-467, 2009b: 302-306) พบแอคตินอไมด์สปีทเทอร์มอแอคตินอไมด์ในสกุล *Actinomadura keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1 ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLA ได้สูง โดยในระดับฟอสฟอรัสสามารถผลิตเอนไซม์ได้ 44.6 U/ml ในขณะที่ในระดับถึงหมักแบบอากาศลอยตัว ผลิตเอนไซม์ได้ถึง 150 U/ml ไม่นานมานี้ Maytiya; et al. (2012: 128-132) ศึกษาการย่อยสลาย PLA โดยใช้ *Pseudonocardia alni* สายพันธุ์ AS4.1531T โดยบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสพบว่าสามารถย่อยสลายฟิล์ม PLA ได้ และทำให้น้ำหนักลดลงมากกว่าร้อยละ 70 ภายในเวลา 20 วัน โดยแอคตินอไมด์สายพันธุ์นี้สามารถย่อย PLA ได้ 35.8 มิลลิกรัมจากปริมาณ PLA ทั้งหมด 50 มิลลิกรัม และ Hanparkphoom; et al. (2014: 13-22) ศึกษาลักษณะของเอนไซม์ที่ย่อยสลาย PLA ที่สร้างจาก *Laceyella sacchari* สายพันธุ์ LP175 ซึ่งเป็นแบคทีเรียเทอร์มอแอคตินอไมด์ พบว่า เอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์ชนิดนี้เป็นเอนไซม์เซอรินโปรติเอส ซึ่งสามารถย่อยสลาย PLA ได้มีสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายคือ สภาวะความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสมอยู่ที่ pH 9 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และมีความเสถียรของเอนไซม์ที่อุณหภูมิสูงถึง 50 องศาเซลเซียส

ตาราง 2 จุลินทรีย์ ชนิดของเอนไซม์ และวิธีการตรวจวัดการย่อยสลาย PLA

จุลินทรีย์	ชนิดเอนไซม์	อ้างอิง
<i>Tritirachium album</i>	–	Williams. 1981
<i>Amycolatopsis</i> sp. HT 32	Protease	Pranamuda; Tokiwa; & Tanaka. 1997
<i>Amycolatopsis</i> sp. 3118	Protease	Ikura; & Toshiaki. 1999
<i>Amycolatopsis</i> sp. KT-s-9	Protease	Tokiwa; Yutaka; & Kota. 1999
<i>Amycolatopsis</i> sp. 41	Protease	Pranamuda; Tokiwa; & Tanaka., 2001
<i>Amycolatopsis</i> sp. K104-1	Protease	Nakamura; et al. 2001
<i>Bacillus smithii</i>	–	Sakai; et al. 2001
<i>Lentzea waywayandensis</i>	Protease	Jarerat; Tokiwa; & Tanaka. 2003
<i>Kibdelosporangium aridum</i>	Protease	Jarerat; Tokiwa; & Tanaka. 2003
<i>Tritirachium album</i> ATCC 22563	Protease	Jarerat; & Tokiwa. 2001
<i>Brevibacillus</i> sp.	Protease	Tomita; Yutaka; & Kota. 1999
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Protease	Tomita; et al. 2003
<i>Bacillus smithii</i> PL 21	Lipase	Tomita; et al. 2004
<i>Bacillus licheniformis</i> PLLA-2	–	Kim; et al. 2007
<i>Paenibacillus amylolyticus</i> TB-13	Lipase	Shigeno; et al. 2003
<i>Bacillus clausii</i> สายพันธุ์ pLA-M4	Lipase	Mayumi; et al. 2008
<i>Bacillus cereus</i> สายพันธุ์ pLA-M7	Lipase	Mayumi; et al. 2008
<i>Paecilomyces</i> sp.	–	Sangwan; & Wu, 2008
<i>Thermomonospora</i> sp.	–	Sangwan; & Wu. 2008
<i>Actinomadura keratinolytica</i> T16-1	Protease	Sukkhum; et al. 2009a,b
<i>Pseudonocardia alni</i> AS4.1531T	–	Maytiya; et al. 2012
<i>Laceyella sacchari</i>	Protease	Hanparkphoom; et al. 2014

6. เอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการย่อยสลาย PLA (PLA degrading enzyme)

การย่อยสลาย PLA เกิดจากกระบวนการไฮโดรไลซิสโดยใช้เอนไซม์ทำปฏิกิริยา 2 ขั้นตอน ขั้นแรกเอนไซม์จะถูกดูดซึมเข้าไปใน ผิวของพลาสติกตรงบริเวณ surface-binding domain และ การเกิดไฮโดรไลซิสที่ตำแหน่งของพันธะเอสเทอร์ (Tokiwa; & Buena. 2006: 244-251) ทั้งนี้กลุ่มของเอนไซม์ที่มีบทบาทในกระบวนการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพที่มีรายงานนั้นมี 3 ชนิด ได้แก่

6.1 เอนไซม์โปรติเอส

เอนไซม์โปรติเอสเป็นเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของโปรตีนเป็นกรดอะมิโน โดยตัดที่ตำแหน่งพันธะเปปไทด์ โดย Williams (1981: 5-7) ศึกษาการย่อยสลาย L-PLA ด้วยเอนไซม์โปรติเนสซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ได้จาก รา *Tritirachium album* ต่อมา Reeve; et al. (1994: 825-831) รายงานว่า กรดอะมิโน ตามธรรมชาติซึ่งเป็นส่วนประกอบของโปรตีนมีโครงสร้างเป็น แอล-ไอโซเมอร์ ซึ่งส่งผลให้เอนไซม์โปรติเอส มีความจำเพาะกับแอล-ไอโซเมอร์ โดยจับบริเวณ repeated L-lactic acid ทำให้ไม่สามารถตัดพันธะของ D-PLA ได้ เหตุผลนี้จึงทำให้สรุปได้ว่า เอนไซม์โปรติเอส สามารถย่อยสลาย PLA ที่มีลักษณะเป็น แอล-ไอโซเมอร์ได้ McDonald; Stephen; & Richard (1996: 7356-7361) ใช้เอนไซม์ชนิดนี้ในการศึกษาการย่อยสลาย L-PLA ประเภทแอลไอโซเมอร์ พบว่า เอนไซม์โปรติเอสสามารถย่อยสลายได้เพียง แอล-ไอโซเมอร์เท่านั้น และทำให้เกิดกรดแลกติก Oda; et al. (2000: 29-32) ศึกษาการย่อยสลาย PLA ด้วยเอนไซม์โปรติเอส ที่มีขายตามท้องตลาด โดยวัดปริมาณของกรดแลกติกที่ถูกสร้างขึ้นหลังจาก สิ้นสุดปฏิกิริยาด้วยการต้ม 5 นาที พบว่า เอนไซม์ย่อยสลาย PLA ส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่ม alkaline protease ต่อมา Tsuji; & Takeharu (2001: 59-65) พบว่า เอนไซม์โปรติเนสสามารถย่อยสลาย PLA ทำให้มีขนาดเล็กลงได้ Moon; Urayama; & Kimura (2003: 301-309) รายงานว่าสามารถใช้ เอนไซม์โปรติเนสเคย่อย สลายโคพอลิเมอร์ของฟิล์ม PLA Lim; et al. (2005: 459-464) ศึกษาเปรียบเทียบการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพระหว่างเอนไซม์ทางการค้าคือ α -chymotrypsin กับเอนไซม์ในกลุ่มเซอรินโปรติเอสชนิดอื่น ๆ ได้แก่ ทริปซิน (trypsin) อีลาสเทส (elastase) โปรติเนสเค และซับติลิซิน (subtilisin) โดยใช้พลาสติกย่อยสลายทางชีวภาพ PLA PBS PBSA PHB PCL PBS/C และ PES พบว่า เอนไซม์ทั้งหมดสามารถย่อยสลาย PLA ได้ ส่วนเอนไซม์ α -chymotrypsin สามารถย่อยสลายได้เฉพาะ PLA และ PBSA ได้ โดยเอนไซม์ α -chymotrypsin มีความจำเพาะต่อพันธะ α -ester ของ PLA ทำให้สามารถย่อยพลาสติกชีวภาพนี้ได้ นอกจากนี้การย่อยสลาย PLA พบว่า เป็นเอนไซม์ในกลุ่มเซอรินโปรติเอส(Sukkhum; et al. 2009b: 302-306, Hanparkphoom; et al. 2014: 13-22)

6.2 เอนไซม์ไลเปส

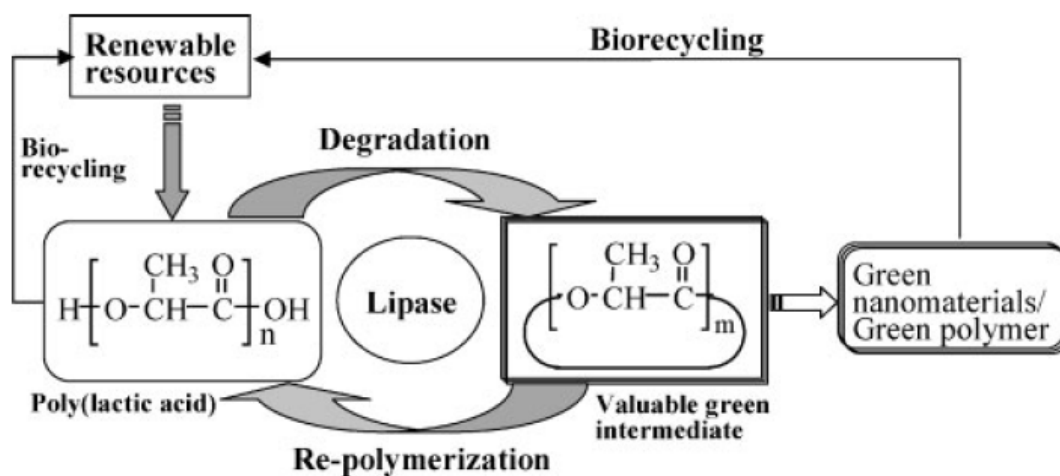
เอนไซม์ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่สามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่บริเวณพันธะเอสเทอร์ ในโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ที่มีสายคาร์บอนยาวมากกว่า 10 อะตอมได้เป็นโมโนกลีเซอไรด์ไดกลีเซอไรด์ และกรดไขมันอิสระ อย่างไรก็ตาม ไลเปสไม่สามารถตัดพันธะของ PLA ขนาดใหญ่ที่เป็นแอล- และดี-พอลิแลกไทด์ในรูปผสมได้ ไลเปสไม่สามารถย่อยอะลิฟาติกพอลิเอสเทอร์ เนื่องจาก ไม่มีอะตอมคาร์บอนที่มีหมู่เมทิลระหว่างพันธะเอสเทอร์ พอลิเมอร์ที่มี รูปร่างไม่แน่นอน เช่น PHB หรือ PLA ซึ่งต่อมาพบว่าสามารถย่อยสลาย PLA อย่างสมบูรณ์นั้นจะต้องใช้เอนไซม์เอสเทอเรส และไลเปส ร่วมกัน (Sakai; et al. 2001: 298-300)

6.3 เอนไซม์เอสเทอเรส

เอสเทอเรส เป็นเอนไซม์ที่สามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของ กรดไขมันที่มีสายคาร์บอนสั้นกว่า 10 อะตอม โดยการตัดพันธะเอสเทอร์ Tezuka; et al. (2004: 115-121) พบว่า เอนไซม์เอสเทอเรสที่ย่อยอะลิฟาติกพอลิเอสเทอร์ ผลิตได้จาก *Bacillus pumilus* สายพันธุ์ KT1012 Mayumi; et al. (2008: 743-750) พบว่า เอนไซม์ที่ย่อยสลาย poly (DL-lactic acid) จัดอยู่ในกลุ่มของเอนไซม์คาร์บอกซีเอสเทอเรส (carboxylesterase) (EC 3.1.1.1) ซึ่งสามารถย่อยสลายอะลิฟาติกพอลิเอสเทอร์ เช่น tributyrin *p*-nitrophenyl ester (C_2 - C_{18}) PBS PBSA PCL PHB และ PLA

7. การสังเคราะห์ PLA ด้วยกระบวนการทางชีวภาพ (Biosynthesis of PLA)

พลาสดิกชีวภาพชนิด PLA เมื่อผ่านกระบวนการย่อยสลายตามธรรมชาติโดยจุลินทรีย์แล้ว จะได้ผลิตภัณฑ์เป็น กรดแลกติก ซึ่งกรดแลกติก นี้สามารถนำกลับมาใช้เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการสังเคราะห์พลาสดิก PLA ได้ อย่างไรก็ตาม การศึกษาส่วนใหญ่ใช้กระบวนการทางเคมีในการสังเคราะห์ PLA แต่การสังเคราะห์ PLA ใหม่ด้วยวิธีการทางชีวภาพนั้น ยังมีการศึกษาไม่มากนัก Takahashi; et al. (2004: 346-353) ศึกษาการย่อยสลาย PLA ชนิด DL-PLA โดยใช้เอนไซม์ ไลเปส ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ซึ่ง PLA จะถูกเปลี่ยนให้เป็นโพลิโกเมอร์ที่เป็นวง แหวนแลกไทด์ และสามารถนำกลับมาใช้ผลิต PLA ได้ เช่นเดียวกับการใช้เอนไซม์ไลเปสทางการค้าที่มีชื่อว่า lipase CA (Novozyme 435) ในการย่อยสลาย PLA ซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์โพลิโกเมอร์ที่เป็นวง แหวนที่สามารถนำกลับมาใช้ในการผลิต PLA ได้อีกครั้ง โดยทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส (ภาพประกอบ 9)



ภาพประกอบ 9 การนำ PLA กลับมาใช้ใหม่โดยใช้เอนไซม์ไลเปส ทั้งในกระบวนการย่อยสลาย PLA และการนำกลับมาสังเคราะห์ใหม่

ที่มา: Takahashi; et al. (2004). *lipase-catalyzed transformation of poly(lactic acid) into cyclic oligomers*. Macromolecular Bioscience. p. 349.

Lassalle; & Ferreira (2008: 1493-1502) ศึกษาภาวะที่เหมาะสม ในการนำกรดแลกติกที่ผ่านกระบวนการย่อยสลายมาแล้ว มาสังเคราะห์เป็น PLA ขึ้นใหม่โดยใช้เอนไซม์คือเอนไซม์ไลเปส ในตัวทำละลายเฮกเซน จากการศึกษาพบว่า ภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ PLA คือที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง โดยได้ PLA สูงถึงร้อยละ 55

Roeb; et al. (2009: 197-201) ศึกษาการสังเคราะห์ PLA ใหม่โดยใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นเอนไซม์ผ่านกระบวนการเปิดวงแหวนแลกไทด์ พบภาวะที่เหมาะสมคือ ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน โดยใช้กรดแลกติกร้อยละ 20 (w/v) ในภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เหลว ทั้งนี้ PLA ที่เกิดขึ้น มีโมโนเมอร์ต่อกันมากถึง 12,900 หน่วย

Chuensangjun; et al. (2012: 154-157) ศึกษาการนำเอากรดแลกติกมาสังเคราะห์ขึ้นใหม่ โดยใช้เอนไซม์ไลเปสทางการค้าเป็นคะตะลิสต์ และศึกษาคุณสมบัติของพอลิเมอร์ ที่สังเคราะห์ได้ พบว่า ปัจจัยสำคัญในการรวมตัว ของกรดแลกติก คืออุณหภูมิ ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดคือ 50 องศาเซลเซียส โดยใช้เวลา 5 ชั่วโมง นอกจากนี้ความเข้มข้น ของเอนไซม์ไลเปสก็ส่งผลต่อน้ำหนัก โมเลกุลของ พอลิเมอร์ โดยพบว่า น้ำหนักโมเลกุลเพิ่มขึ้นได้ถึงร้อยละ 70 หากเพิ่มความเข้มข้นของ เอนไซม์ไลเปสจากร้อยละ 1.25 เป็นร้อยละ 5

ปัจจุบันกระบวนการย่อยสลายและการสังเคราะห์ PLA ขึ้นใหม่ด้วยกระบวนการทางชีวภาพ ถือเป็นวิธีที่ได้รับการพิจารณาว่าเป็นวิธีที่ยั่งยืนและไม่ก่อผลเสียต่อธรรมชาติ การใช้เอนไซม์ย่อยสลาย PLA เป็นกรรมวิธีทางชีวภาพที่มีประโยชน์ ในการนำขยะพลาสติกที่มี PLA เป็นส่วนประกอบของ PLA กระบวนการดังกล่าว จะดำเนินภายใต้สภาวะที่ไม่รุนแรง เป็นกระบวนการที่สะอาด และไม่ก่อให้เกิด ผลิตภัณฑ์ข้างเคียงที่ไม่ต้องการภายหลังกระบวนการย่อยสลาย เช่น สารราซิเมค (racemic) ของ PLA จากรายงานการศึกษาข้างต้นทำให้เกิดแนวคิดในการศึกษาถึงการใช้วิธีการทางชีวภาพ ซึ่งการศึกษานี้ จะใช้เป็นพื้นฐานในการย่อยสลาย PLA และนำมอนอเมอร์กลับมาสังเคราะห์ใหม่โดยใช้เอนไซม์ไลเปส ซึ่งการศึกษานี้จะใช้เป็นพื้นฐานในการนำ PLA ไปใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อไป

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

1. เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

ตาราง 3 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	บริษัท	รุ่น
1. เครื่องชั่งสารเคมี (Dual range analytical balance)	Denver	TC-205
2. ตู้กรองปลอดเชื้อ (Biosafety cabinet; laminar flow)	NUAIRE	NU-440
3. ตู้บ่มเพาะเชื้อ (High temperature incubator)	Shel-lab	C1565
4. ตู้บ่มเพาะเชื้อแบบเขย่าอุณหภูมิต่ำ (Low temperature shaking incubator)	Thermo Forma	481
5. ตู้บ่มเพาะเชื้อแบบเขย่าอุณหภูมิสูง (High temperature shaking incubator)	NBW	Inova4000
6. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave)	TOMY	ES-315
7. ตู้อบร้อนฆ่าเชื้อ (Hot air sterilizing oven)	Fisher Scientific	ISOTemp
8. เครื่องวัดพีเอช (pH meter)	Suntex	SP-2100

ตาราง 3 (ต่อ)

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	บริษัท	รุ่น
9. เครื่องปั่นเหวี่ยง (High speed centrifuge)	Sorvell	RC-50
10. เครื่อง Ultrasonic sonicator	Labquip	FS-250
11. อ่างน้ำร้อน (Water bath)	Heto	Hmt200
12. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-Visible Spectrophotometer)	Shimadzu	UV-1700
13. เครื่องปั่นผสม (Vortex)	Scientific industry	G-560E
14. กล้องจุลทรรศน์ (Light compound microscope)	Olympus	E202Ti/LED
15. เครื่องวิเคราะห์สาร HPLC (High Performance Liquid Chromatography)	SHIMAZU	10A
16. เครื่องวิเคราะห์โครงสร้างโมเลกุล NMR (Nuclear Magnetic Resonance)	Vance	NMR-300MHz
17. เครื่องวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุล LC/MS (Liquid Chromatography / Mass Spectrometry)	QTRAP	3200

2. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

ตาราง 4 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี	บริษัท	ยี่ห้อ
1. แคลเซียมคลอไรด์ ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Ajax Finechem Pty, Ltd.	Univar
2. คอปเปอร์ (II) ซัลเฟต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	Merck KGaA	Merck
3. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	Ajax Finechem Pty, Ltd.	Univar
4. โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)	VWR International	AnalarR
5. โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)	Ajax Finechem Pty, Ltd.	Univar
6. โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต ($\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	Merck KGaA	Emsure
7. เด็กโทรส (Dextrose)	Himedia Laboratories	Himedia
8. ไคคลอโรมีเทน (CH_3Cl)	Fisher Scientific UK	Fisher
9. ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต (K_2HPO_4)	Ajax Finechem Pty, Ltd.	Univar
10. ทริปโตน (Tryptone)	Himedia Laboratories	Himedia
11. ทริส (ไฮดรอกซีเมทิล)แอมิโนมีเทน ($\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$)	Ajax Finechem Pty, Ltd.	Univar
12. โบวีน ซีรัม อัลบูมิน (Albumin, Bovine Serum, Fraction V)	EMD Chemicals Inc.	Calbiochem
13. เพปโตน (Peptone)	Himedia Laboratories	Himedia
14. โพแทสเซียม ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต(KH_2PO_4)	Ajax Finechem Pty, Ltd.	Univar
15. พอลิ แลค-แลคติก แอซิด (Poly (L-lactic acid; PLA))		
16. ฟอลิน ซีโอแคลตูรีเอเจนต์ (Folin-Ciocalteu's phenol reagent)	Merck KGaA	Merck
17. แมกนีเซียมซัลเฟต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	Merck KGaA	Merck
18. เมทานอล (CH_3OH)	Merck KGaA	Emsure

วิธีการดำเนินการวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ดำเนินการตามขั้นตอนดังนี้

1. การเตรียมสารเคมี
2. การเตรียมจุลินทรีย์ *A. keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1
3. การผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลาย PLA ที่ผลิตจาก *A. keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1
4. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่ย่อยสลาย PLA
5. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลาย PLA โดยเอนไซม์ที่ผลิตจาก *A. keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1
6. การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลาย PLA
7. การวิเคราะห์ผลทางสถิติเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสม ในการย่อยสลาย PLA จากเอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อ *A. keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1
8. การสังเคราะห์ PLA จากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์ ไลเปสทางการค้า เป็นคะตะลิสต์โดยกระบวนการทางชีวภาพ
9. การวิเคราะห์ PLA ที่สังเคราะห์ที่ได้จากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลาย โดยใช้เอนไซม์ จากเชื้อ *A. keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1 โดยวิธีการทางชีวภาพ

3. วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 การเตรียมสารเคมี PLA

ละลาย PLA 1 กรัม ในตัวทำละลาย dichloromethane 20 มิลลิลิตร เมื่อละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ทำการเติม methanol 50 มิลลิลิตร เพื่อทำการตกตะกอน PLA จากนั้นเท ตะกอนใส่ในภาชนะแก้ว ทิ้งข้ามคืนเพื่อระเหยสารละลายออก เก็บ PLA ผงที่ได้เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป

3.2 การเตรียมจุลินทรีย์ *A. keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1

นำ *A. keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1 มาเลี้ยงในอาหารแข็ง ISP-2 (ภาคผนวก ก หมายเลข 2) ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นนำโคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็ง ประมาณ 1-2 ลูก ถ่ายใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเหลว ISP-2 (ภาคผนวก หมายเลข ข) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำมาเข้าเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 rpm อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 วัน นำเชื้อที่เตรียมได้ไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

3.3 การผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลาย PLA จาก *A. keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1

นำเชื้อที่เตรียมจากข้อ 3.2 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเหลว Basal medium ปริมาตร 50 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ก หมายเลข 1) ที่มีส่วนผสมของ PLA ผงร้อยละ 0.01 นำมาเข้าเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 rpm อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์เอนไซม์ โดยนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 xg อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกกากเซลล์และ PLA ที่เหลือออก จากนั้นเก็บส่วนใสที่ได้จากการกรองแล้วนำไปวัดกิจกรรมของเอนไซม์ และทดสอบการย่อยสลายต่อไป

3.4 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลาย PLA

เตรียม Emulsified PLA ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ โดยการนำ PLA ละลายใน dichloromethane 20 มิลลิลิตร จนหมด จากนั้นเติม Tris-HCl buffer (pH 9) (ภาคผนวก ข หมายเลข 1) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาทำให้เข้ากันเป็นเนื้อเดียวโดยเครื่อง Ultrasonic sonicator ที่ตั้งค่า Amplify 40 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 นาที ที่ซึ่งข้ามคืน เพื่อระเหย dichloromethane ออกนำส่วนผสมที่เตรียมได้ดังกล่าวมา 2.25 มิลลิลิตร และส่วนใสจากข้อ 3.3 ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร มาทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาหยุดปฏิกิริยาในน้ำเย็นเป็นเวลา 5 นาที วัดกิจกรรมของเอนไซม์โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร โดยกำหนดให้ 1 unit ของเอนไซม์ หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ ที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลง 1 หน่วยที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ คำนวณได้จาก สมการที่ 1

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์ (U/ml)} = (\text{ค่าดูดกลืนแสง}_{\text{ควบคุม}} - \text{ค่าดูดกลืนแสง}_{\text{เอนไซม์}}) \times 4 \times 10 \times \text{ค่าการเจือจาง} \quad (1)$$

3.5 การหาจุดที่เหมาะสมในการย่อยสลาย PLA โดยเอนไซม์ จาก *A. keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1 ด้วยวิธีการทางสถิติ

ออกแบบการทดลองแบบ central composite design (CCD) โดยมีปัจจัยที่ศึกษาทั้งหมด 3 ปัจจัย คือ อุณหภูมิ (X_1) เวลา (X_2) และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ (X_3) ซึ่งในการออกแบบการทดลอง จะแบ่งการทดลองออกเป็น องค์ประกอบ 3 ส่วนที่สำคัญคือ factorial point center point และ star point

ส่วนที่ 1 factorial point ซึ่งใช้สัญลักษณ์ -1 แทนระดับต่ำ และ $+1$ แทนระดับสูงและสามารถหาจำนวนการทดลองทั้งหมดได้จาก

จำนวนการทดลองของจุด factorial point $= 2^k$ (โดย k คือจำนวนปัจจัย)

ในการทดลองครั้งนี้มีจำนวน ปัจจัย $k = 3$ ทำให้จำนวนการทดลองของจุด factorial point เท่ากับ $2^3 = 8$ การทดลอง

ส่วนที่ 2 center point (n_0) ซึ่งใช้สัญลักษณ์ของ center point คือ 0 โดยจะต้องมีการทำซ้ำมากกว่า 1 ครั้ง เพื่อคำนวณหา pure error และสามารถหาจำนวนการทดลองทั้งหมดได้จาก

จำนวนการทดลองของจุด center point $= n_0$

ในการทดลองครั้งนี้มีจำนวนการทดลองของจุด center point มีจำนวนเท่ากับ $n_0 = 3$ การทดลอง

ส่วนที่ 3 star point สามารถหาช่วงห่างจาก center point ด้วยระยะเท่ากันคือระยะ α ซึ่งสามารถหาได้จาก สมการที่ 2

$$\text{ระยะห่าง } \alpha = \sqrt[4]{2^k}$$

$$\text{ในการทดลองครั้งนี้ระยะห่าง } \alpha = \sqrt[4]{2^3} = \pm 1.68 \quad (2)$$

และสามารถหาจำนวนการทดลองของจุด star point ได้จาก

จำนวนการทดลองของจุด star point $= 2k$

ในการทดลองครั้งนี้มีจำนวนการทดลองของจุด star point มีจำนวนเท่ากับ $2(3) = 6$ การทดลอง

สามารถออกแบบจำนวนชุดการทดลองทั้งหมดได้จาก สมการที่ 3

$$2^k + 2k + n_0 \quad (3)$$

จำนวนชุดการทดลองในครั้งนี้เท่ากับ $2^3 + 2(3) + 3 = 17$ การทดลอง ซึ่งแต่ละการทดลองทำซ้ำ 3 ครั้ง ดังนั้นจึงมีจำนวนการทดลองทั้งสิ้น $17 \times 3 = 51$ การทดลอง

การกำหนดค่าของระดับแต่ละปัจจัยสามารถกำหนดได้จากสมการที่ 4

$$X_i = \frac{A_i - A_0}{\Delta A} \quad (4)$$

X_i คือ code ของระดับปัจจัย เช่นที่ $\alpha = 1.68$

A_i คือ ค่าระดับที่แท้จริงของปัจจัย (true level)

A_0 คือ ค่าช่วงกลางของระดับปัจจัย (center point) จาก (ค่าสูงสุด- ค่าต่ำสุด)/2

ΔA คือ ค่าการเปลี่ยนแปลงจากค่ากลางของระดับปัจจัย

แบ่งปัจจัย ออกเป็น 5 ระดับ ($-\alpha$, -1, 0, +1, + α) ดังสรุปแสดงในตาราง 5

ตาราง 5 การกำหนดช่วงของปัจจัยที่ศึกษาโดยวิธี central composite design

ปัจจัย	-1.68	-1	0	1	1.68
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	43	50	60	70	77
เวลา (ชั่วโมง)	4	12	24	36	44
ค่ากิจกรรมของเอนไซม์(U/ml)	32	100	200	300	368

จากระดับทั้ง 5 ระดับของ 3 ปัจจัย สามารถออกแบบ การทดลองตามวิธี CCD ได้ทั้งสิ้น 17 การทดลอง ประกอบด้วย factorial point 8 การทดลอง center point 3 การทดลอง และ star point อีก 6 การทดลอง แสดงดังตาราง 6 โดยในแต่ละการทดลองจะประกอบด้วย PLA ผงปริมาณ 4,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมน้ำเอนไซม์ที่ผลิตได้จาก *A. keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1 และผ่านการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ แล้วนำมาเจือจางด้วยด้วย Tris-HCl (pH 9) ให้มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สุดท้ายที่ออกแบบการทดลองไว้ เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปปั่นในอ่างควบคุมความร้อนแบบแห้ง (day bath) ที่ควบคุมอุณหภูมิตามที่กำหนดในแบบการทดลอง รวมทั้ง กำหนดระยะเวลาในการทำ ปฏิบัติตามแบบการทดลองจากตาราง 6 เมื่อทำปฏิกิริยาสิ้นสุดลง แยก PLA ผงที่เหลืออยู่ออก โดยการนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 10000 $\times g$ เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนใสไปวัดปริมาณกรดแลกติกที่เกิดขึ้นโดยใช้ HPLC

ตาราง 6 การออกแบบการทดลองในการศึกษาย่อยสลาย PLA ด้วยเอนไซม์จาก *A. keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1 โดยใช้วิธี CCD

Treatment	Treatment number	X_1	X_2	X_3	Temperature (°C)	Time (h)	Enzyme activity (U/ml)
Factorial point	1	-1	-1	-1	50	12	100
	2	-1	-1	1	50	12	300
	3	-1	1	-1	50	36	100
	4	-1	1	1	50	36	300
	5	1	-1	-1	70	12	100
	6	1	-1	1	70	12	300
	7	1	1	-1	70	36	100
	8	1	1	1	70	36	300

ตาราง 6 (ต่อ)

Treatment	Treatment number	X_1	X_2	X_3	Temperature (°C)	Time (h)	Enzyme activity (U/ml)
Star point	9	-1.68	0	0	43	24	200
	10	0	-1.68	0	60	4	200
	11	0	0	-1.68	60	24	32
	12	1.68	0	0	77	24	200
	13	0	1.68	0	60	44	200
	14	0	0	1.68	60	24	368
Center point	15	0	0	0	60	24	200
	16	0	0	0	60	24	200
	17	0	0	0	60	24	200

3.6 การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลาย PLA โดยใช้เครื่อง HPLC

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลาย PLA มาทำการวิเคราะห์หาปริมาณกรดแลกติกโดยเครื่อง HPLC (High Performance Liquid Chromatography) โดยนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลาย PLA ในแต่ละการทดลองที่ออกแบบไว้ตามตาราง 6 มาวัดหาปริมาณ ความเข้มข้นของ กรดแลกติกที่ได้จากการย่อยสลาย โดยใช้เครื่อง HPLC (ยี่ห้อ SHIMAZU, รุ่น 10 A, Japan) โดยใช้ คอลัมน์เป็น InertSustain C18 column ซึ่งเป็นคอลัมน์ชนิด reversed-phase chromatography ซึ่งตัวอย่างที่ใช้สามารถแยกจากกันได้โดยใช้คุณสมบัติ hydrophobicity นอกจากนี้จะใช้ mobile phase เป็น 10 mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (pH 2.6) อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส กรดแลกติกมาตรฐานที่ใช้เป็น L-lactic acid ความเข้มข้น 100 200 และ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมี retention time เท่ากับ 5.06 นาทีนำพื้นที่ใต้กราฟของสารตัวอย่างเทียบกับกรดแลกติกมาตรฐาน เพื่อคำนวณเป็นค่าความเข้มข้นของกรดแลกติกที่ได้จากการย่อยสลาย PLA ผง

3.7 การวิเคราะห์ผลทางสถิติเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลาย PLA เอนไซม์จาก *A. keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1

นำข้อมูลผลการทดลองที่ได้มาทำการวิเคราะห์หาสมการถดถอย โดยใช้โปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 20/21 (SPSS version 20/21 Inc. IBM, USA) และนำสมการถดถอยที่ได้มาสร้างกราฟพื้นผิวตอบสนองโดยโปรแกรม Statistica (Statistica Statsoft. Proprietary software, USA) เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อไป

3.8 การสังเคราะห์ PLA ด้วยกระบวนการทางชีวภาพ จากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลาย PLA โดยใช้เอนไซม์ไลเปสทางการค้าเป็นคะตะลิสต์

เตรียมชุดพอลิเมอร์ไฮดรอกซี โดยต่อชุดควบแน่น ชุดให้ก๊าซไนโตรเจน เทอร์โมมิเตอร์ และหัวกรวน เข้ากับขวดก้นกลมแบบ 4 คอ ขนาด 500 มิลลิลิตร จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลาย PLA ซึ่งมีความเข้มข้นของกรดแลกติก อยู่ในช่วง 3,000-3,500 มิลลิกรัมต่อลิตร มาใส่ลงในขวดก้นกลม จากนั้นเติมเอนไซม์ไลเปส (Lipzyme TL IM Novo Nordisk, Denmark) ร้อยละ 15 โดยมวล ต่อ ปริมาตรของกรดแลกติก ปรับปริมาตรโดยใช้โทลูอีน ให้ได้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชม.

กวนตัวอย่างต่อเนื่องภายใต้อัตราการไหลของก๊าซไนโตรเจน 0.1 vvm (volume per volume per minute) จากนั้นแยกส่วนตะกอน PLA ที่เกิดขึ้นโดยการปั่นเหวี่ยงที่ 10000 ×g เป็นเวลา 5 นาที มาวิเคราะห์โครงสร้าง ชนิด และน้ำหนักโมเลกุลในขั้นตอนต่อไป

3.9 การวิเคราะห์ PLA ที่สังเคราะห์ได้จากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลาย โดยใช้เอนไซม์จาก *A. keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1 โดยกระบวนการทางชีวภาพ

นำตะกอนผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากสังเคราะห์ได้โดยใช้เอนไซม์ไปสททางการค้าเป็นคะตะลิสต์ โดยกระบวนการทางชีวภาพ มาทำการเตรียมสารโดย นำส่วนชั้นน้ำมาเติม methanol และดึงน้ำออก โดยกระบวนการ evaporation จนได้สารเหนียวสีน้ำตาลหนัก 0.5084 กรัม นำสารที่ได้มาแยกจากกันด้วยวิธี TLC (Thin-layer chromatography) ในตัวทำละลาย CH_2Cl_2 ต่อ Hexane อัตราส่วน 60 : 40 จนได้ของแข็งสีน้ำตาลหนัก 64.7 มิลลิกรัม ของแข็งที่ได้นำมาทำการวิเคราะห์หาโครงสร้างโมเลกุล โดยใช้เครื่อง ^1H NMR (ยี่ห้อ VANCE, รุ่น NMR-300 MHz Spectrometer Brucker, USA) โดยทำการวิเคราะห์ที่ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย ศรีนครินทรวิโรฒ และวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุล โดยใช้เครื่อง LC/MS (Thermo Finnigan LC-Q mass spectrometer) (ยี่ห้อ QTRAP, รุ่น 3200, USA) ซึ่งภาพที่ใช้เป็น ภาพมาตรฐาน โดยวิเคราะห์ ที่คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การหาจุดที่เหมาะสมในการย่อยสลาย PLA โดยวิธีพื้นผิวตอบสนอง

การศึกษานี้มีผลต่อการย่อยสลาย PLA โดยใช้เอนไซม์จาก *A. keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1 ซึ่งได้กำหนดปัจจัยในการศึกษานี้ อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) (X_1), เวลา (ชม.) (X_2) และ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ (U/ml) (X_3) โดยการกำหนดช่วงของปัจจัยโดยวิธี central composite design ดังแสดงในตาราง 7 และสามารถออกแบบการทดลองได้ทั้งหมด 17 การทดลองโดยแบ่งเป็นการทดลองที่ 1-8 คือ factorial point การทดลองที่ 9-14 คือ star point และการทดลองที่ 15-17 คือ center point ดังแสดงในตาราง 8 โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ ดังนั้นจึงมีจำนวนการทดลองเท่ากับ 51 ($n=51$) และนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาทำการวิเคราะห์หาปริมาณ กรดแลกติกจากผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยวิธี HPLC จากผลการทดลองในการทดลองที่ 15-17 ซึ่งเป็น center point พบว่าสภาวะที่สามารถย่อยสลาย PLA แล้วได้กรดแลกติก สูงสุด ประกอบด้วย อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชม. และกิจกรรมของ เอนไซม์ 200 (U/ml) ตามลำดับ โดยได้ปริมาณกรดแลกติกเฉลี่ยเท่ากับ 3,539.1 3,572.8 และ 3,343.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และการทดลองที่ 1 เป็นสภาวะที่ใช้ในการย่อยสลาย PLA และได้กรดแลกติก น้อยที่สุด 841.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังแสดงในตาราง 8

ตาราง 7 การกำหนดช่วงของปัจจัยที่ศึกษาโดยวิธี central composite design

Factors	-1.68	-1	0	1	1.68
Temperature (°C)	43	50	60	70	77
Time (h)	4	12	24	36	44
Enzyme activity (U/ml)	32	100	200	300	368

ตาราง 8 ผลการทดลองในการย่อยสลาย PLA โดยใช้เอนไซม์จาก *A. keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1 โดยใช้ วิธีการออกแบบการทดลอง central composite design

Treatment	Treatment number	X_1	X_2	X_3	Temperature (°C)	Time (h)	Enzyme activity (U/ml)	Lactic acid concentration (mg/l)
Factorial point	1	-1	-1	-1	50	12	100	841.5
	2	-1	-1	1	50	12	300	1,773.8
	3	-1	1	-1	50	36	100	1,679.2
	4	-1	1	1	50	36	300	1,828.2
	5	1	-1	-1	70	12	100	2,029.7
	6	1	-1	1	70	12	300	1,557.5
	7	1	1	-1	70	36	100	2,102.8
	8	1	1	1	70	36	300	2,344.4

ตาราง 8 (ต่อ)

Treatment	Treatment number	X_1	X_2	X_3	Temperature (°C)	Time (h)	Enzyme activity (U/ml)	Lactic acid concentration (mg/l)
Star point	9	-1.68	0	0	43	24	200	2,225.8
	10	0	-1.68	0	60	4	200	980.7
	11	0	0	-1.68	60	24	32	1,912.0
	12	1.68	0	0	77	24	200	2,018.5
	13	0	1.68	0	60	44	200	2,859.2
	14	0	0	1.68	60	24	368	2,501.5
Center point	15	0	0	0	60	24	200	3,539.1
	16	0	0	0	60	24	200	3,572.8
	17	0	0	0	60	24	200	3,343.0

1.1 การวิเคราะห์การถดถอย (regression analysis)

1.1.1 การประมาณสัมประสิทธิ์การถดถอยเชิงพหุคูณ

ในการสร้างสมการ ถดถอย นำผลการทดลองมา วิเคราะห์ประมาณค่าสัมประสิทธิ์ของ ปัจจัยที่ศึกษา และทดสอบหาทิศทาง และอิทธิพลของตัวแปรว่ามี ทิศทางใดต่อปัจจัยการย่อยสลาย PLA โดยใช้เอนไซม์จาก *A. keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1 รวมทั้งทำการประเมินค่าความน่าจะเป็น ของตัวแปรที่ศึกษา โดยจากการวิเคราะห์พบว่า ตัวแปรอิสระที่มีอิทธิพลต่อการย่อยสลาย PLA โดยใช้ เอนไซม์จาก *A. keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1 ซึ่งมีค่า p -value น้อยกว่า 0.05 คือ อุณหภูมิ (X_1), พจน์อิทธิพลร่วมระหว่างอุณหภูมิและเวลา (X_1X_2), พจน์กำลังสองของอุณหภูมิ (X_1^2), พจน์กำลังสอง ของเวลา (X_2^2) และพจน์กำลังสองของกิจกรรมของเอนไซม์ (X_3^2) ซึ่งตัวแปรที่มีอิทธิพลนั้นแสดงให้เห็น ว่าส่วนของ quadratic term (ตัวแปรกำลังสอง) ที่ได้จากการออกแบบการทดลองด้วยวิธี CCD มีอิทธิพล ต่อการเปลี่ยนแปลงของตัวแปรตาม และตัวแปรอิสระที่ไม่มีอิทธิ พลต่อการย่อยสลาย PLA โดยใช้ เอนไซม์จาก *A. Keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1 ซึ่งมีค่า p -value มากกว่า 0.05 ได้แก่ เวลา (X_2), ค่า กิจกรรมของเอนไซม์ (X_3), อิทธิพลร่วมระหว่างอุณหภูมิ และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ (X_1X_3) และอิทธิพล ร่วมระหว่างเวลา และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ (X_2X_3) ดังแสดงในตาราง 10 ซึ่งจากตารางนำมาเขียน เป็นสมการถดถอยแสดง ดังสมการที่ 5

$$Y = 3,499.507 - 13.423X_1 - 4.258X_1X_2 - 716.839X_1^2 - 588.460X_2^2 - 335.114X_3^2 \quad (5)$$

โดยจากสมการที่ 5 พบว่าสัมประสิทธิ์หน้าตัวแปร (X_1), (X_1X_2), (X_1^2), (X_2^2) และ (X_3^2) มีค่าเป็นลบ หมายความว่าตัวแปรดังกล่าว มีอิทธิพล ทางลบ กับตัวแปรตาม (ปริมาณกรดแลกติก) กล่าวคือ หาก เพิ่มค่าสัมประสิทธิ์หน้าตัวแปรอิสระเหล่านี้ (X_1), (X_1X_2), (X_1^2), (X_2^2) และ (X_3^2) จะส่งผลให้ตัวแปร ตาม หรือปริมาณกรดแลกติก มีค่าลดลง

1.1.2 การทดสอบสมมติฐานของสมการการถดถอยหรือสมการความสัมพันธ์

นำผลปริมาณแลคติก ของแต่ละการทดลอง ที่ได้ไปวิเคราะห์หาสมการการถดถอยเชิงพหุคูณเพื่อประเมินผล ของปัจจัยที่มี ต่อการย่อยสลาย PLA โดยใช้เอนไซม์จาก *A. keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1 โดยนำมาวิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธี ANOVA ซึ่งจากผลการวิเคราะห์พบว่า การออกแบบการทดลองนี้ มีค่าสถิติ F (F-test) เท่ากับ 18.654 โดยมี degree of freedom (df) เป็น 9, 41 และ 50 ตามลำดับ โดยมีค่าความน่าจะเป็นของการทดลอง (p -value) น้อยกว่า 0.05 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าปัจจัยที่เลือกในการศึกษามีผลต่อการย่อยสลาย PLA โดยใช้เอนไซม์จาก *A. keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1 ได้อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังแสดงผลในตาราง 9

ตาราง 9 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของการวิเคราะห์การถดถอยเชิงพหุคูณ

Model		Sum of squares	df	Mean square	F	Sig.
1	Regression	24140000.00	9	2681721	18.654	0.000
	Residual	5894312.91	41	143763.7		
	Total	30030000.00	50			

df = degree of freedom, F = 18.654

ตาราง 10 ค่าการวิเคราะห์สัมประสิทธิ์ของสมการการถดถอยและค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ

Model	Unstandardize coefficient		Standardize coefficient	<i>t</i>	Sig.
	B	Std. error	Beta		
Constant	3499.507	126.122		27.747	0.000
X_1	-13.423	59.263	-.016	-.227	0.022
X_2	141.471	59.263	.165	2.387	0.822
X_3	18.101	59.263	.021	.305	0.762
X_1X_2	-4.258	77.396	-.004	-.055	0.040
X_1X_3	-163.834	77.396	-.146	-2.117	0.956
X_2X_3	-8.308	77.396	-.007	-.107	0.915
X_1^2	-716.839	65.288	-.816	-10.980	0.000
X_2^2	-588.460	65.288	-.670	-9.013	0.000
X_3^2	-335.114	65.288	-.382	-5.133	0.000

A significant at 95% level ($p < 0.05$), $R^2 = 0.804$; $R^2_{adj} = 0.761$ and $R = 0.897$

นอกจากนี้ ตาราง 10 สามารถหาค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) เนื่องจากมีจำนวนการทดลองทั้งสิ้น 51 การทดลองโดยจำนวนการทดลองที่ทำจริงมีค่าน้อยกว่า 58.8 ซึ่งคำนวณมาจาก $R^2 = 0.804$ คิดเป็นร้อยละ 80.4 อีกร้อยละ 19.6 ไม่สามารถอธิบายได้ และค่าที่ไม่สามารถ อธิบายได้ เป็นผลมาจากตัวแปรอิสระ 3 ตัวแปร ดังนั้นจึงคิดเป็น $19.6 \times 3 = 58.8$ ซึ่งหากจำนวนการทดลองทั้งหมดมากกว่า 58.8 จะต้องใช้ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจที่ปรับค่าแล้ว ($R^2 \text{ adj.}$) แต่จากผลการวิเคราะห์นี้พบว่าจำนวนการทดลองเป็น 51 ซึ่งน้อยกว่า 58.8 จึงสามารถสรุปได้ว่า ตัวแปรอิสระทั้ง 3 ตัวแปรมีอิทธิพลต่อการย่อยสลาย PLA ได้เป็นกรดแลกติกโดยใช้เอนไซม์จาก *A. keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1 ซึ่งรูปแบบสมการถดถอยที่สร้างขึ้นสามารถอธิบายตัวแปรตาม ได้ร้อยละ 80.4 ในขณะที่อีกร้อยละ 19.6 ไม่สามารถใช้ในการอธิบายได้หมายความว่า การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นเป็นผลจากตัวแปรอิสระอื่นที่ไม่สามารถควบคุมได้

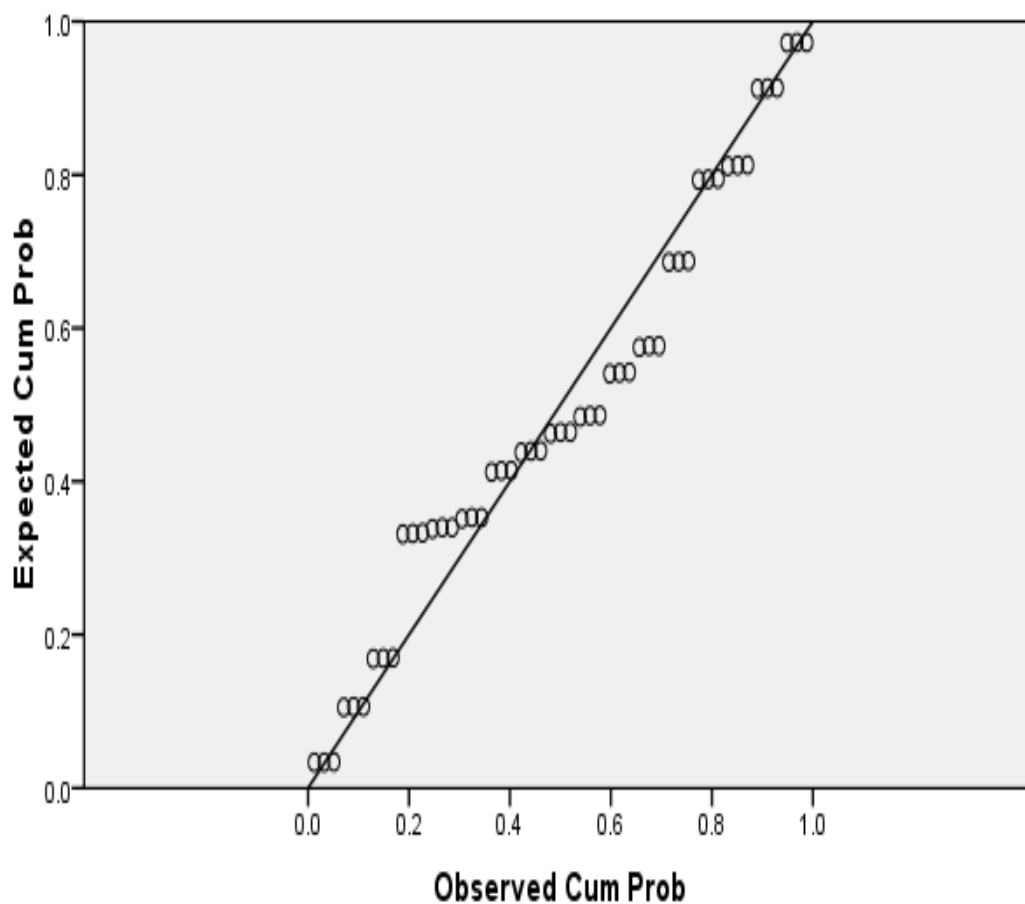
1.2 การตรวจสอบความเหมาะสมของข้อมูลที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์การถดถอย

เมื่อหา สมการการถดถอย ได้แล้วจึงทำ การตรวจสอบความเหมาะสมของ สมการการถดถอย (model adequacy checking) ซึ่งตรวจสอบโดยการวิเคราะห์ความคลาดเคลื่อน (residual analysis) หากแบบจำลองถูกต้อง ความคลาดเคลื่อนจะต้องไม่มีรูปแบบ โดยตรวจสอบความเหมาะสมมีดังนี้

1.2.1 การทดสอบความคงที่ของความคลาดเคลื่อน

1.2.1.1 การทดสอบการแจกแจงแบบปกติ (normal distribution)

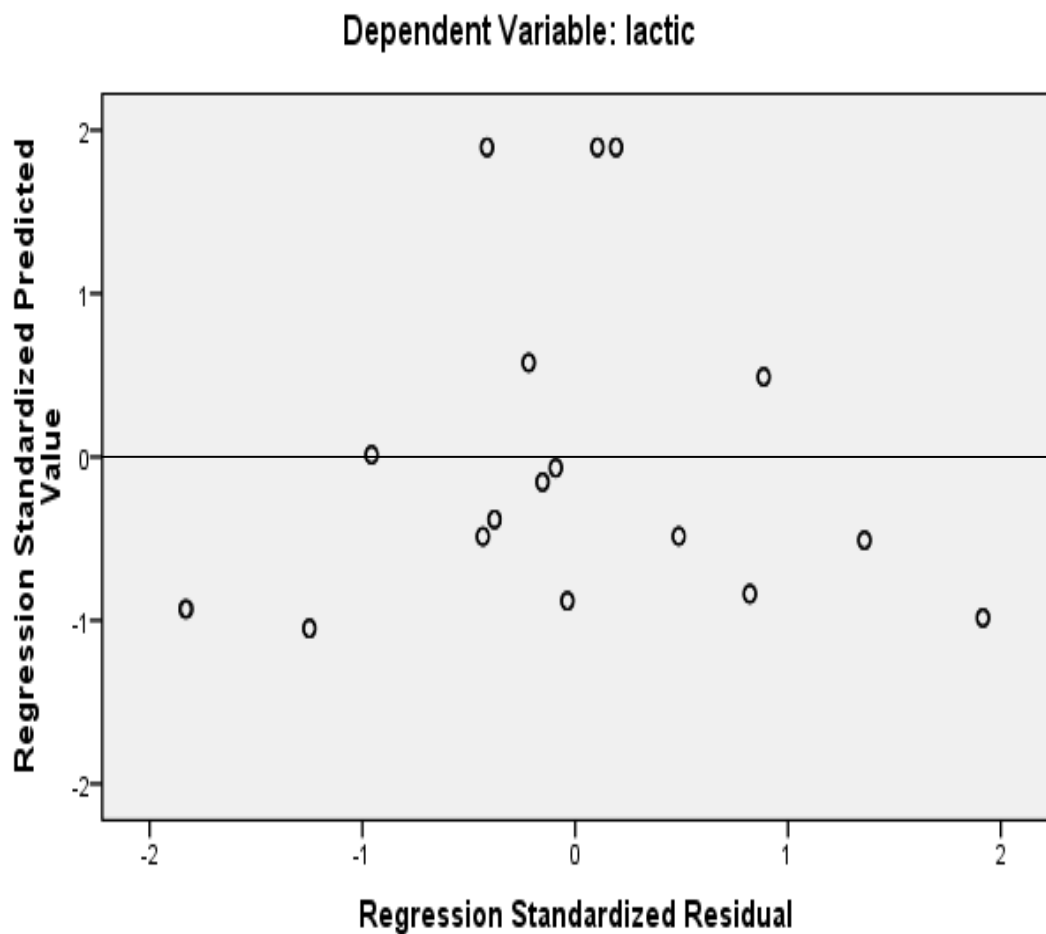
จากการตรวจสอบความเหมาะสมของสมการการถดถอยโดยวิธี normal probability plot พบว่าลักษณะของจุดของข้อมูลบนกราฟส่วนใหญ่มีการกระจายตัวใกล้แนวเส้นตรงซึ่งเป็นค่ามาตรฐาน ดังแสดงในภาพประกอบ 10 จากกราฟจึงสรุปได้ว่า ความคลาดเคลื่อนจากการทดลอง มีการแจกแจงเป็นแบบปกติ



ภาพประกอบ 10 normal probability plot ของค่าความคลาดเคลื่อน

1.2.2 การทดสอบความคงที่ความแปรปรวนของความคลาดเคลื่อน

จากกราฟการกระจาย (scatter plot) ระหว่างค่า regression standardized residual บนแกน X กับค่า regression predicted value บนแกน Y พบว่า จุดของกราฟมีการกระจายอย่างไม่มีรูปแบบที่แน่นอนและกระจายอยู่รอบศูนย์ ทำให้ทราบว่าความแปรปรวนของความคลาดเคลื่อนค่อนข้างมีความคงที่ดังภาพประกอบ 11



ภาพประกอบ 11 scatter plot ของค่าความคลาดเคลื่อนกับค่าทำนาย

จากการตรวจสอบความเหมาะสมของรูปแบบสมการการถดถอยด้วยวิธีวิเคราะห์ ความคงที่ ของความแปรปรวนความคลาดเคลื่อนจาก กราฟ scatter plot พบว่า รูปแบบสมการการถดถอยหรือสมการ ความสัมพันธ์ที่ได้จากการทดลองนั้นเป็นรูปแบบที่เหมาะสม จึงสามารถนำสมการ การถดถอยที่ได้ไปใช้ในการทำนายการสลาย PLA โดยใช้เอนไซม์จาก *A. keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1 ได้ต่อไป

ตาราง 11 ผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติกจากการย่อยสลาย PLA โดยใช้เอนไซม์จาก *A. keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1 และค่าทำนายปริมาณกรดแลกติกที่ได้จากสมการถดถอย

Treatment	Treatment number	X_1	X_2	X_3	Temperature (°C)	Time (h)	Enzyme Activity (U/ml)	Lactic acid concentration (mg/l)	Predict
Factorial point	1	-1	-1	-1	50	12	100	841.5	1,966.4
	2	-1	-1	1	50	12	300	1,773.8	2,348.3
	3	-1	1	-1	50	36	100	1,679.2	2,274.8
	4	-1	1	1	50	36	300	1,828.2	2,622.1
	5	1	-1	-1	70	12	100	2,029.7	2,276.0
	6	1	-1	1	70	12	300	1,557.5	2,002.0
	7	1	1	-1	70	36	100	2,102.8	2,568.3
	8	1	1	1	70	36	300	2,344.4	2,259.6

ตาราง 11 (ต่อ)

Treatment	Treatment number	X_1	X_2	X_3	Temperature (°C)	Time (h)	Enzyme Activity (mg/l)	Lactic acid concentration (mg/l)	Predict
Star point	9	-1.68	0	0	43	24	200	2,225.8	1,903.8
	10	0	-1.68	0	60	4	200	980.7	1,859.4
	11	0	0	-1.68	60	24	32	1,912.0	2,005.9
	12	1.68	0	0	77	24	200	2,018.5	2,481.4
	13	0	1.68	0	50	44	200	2,859.2	2,928.0
	14	0	0	1.68	50	24	368	2,501.5	2,989.5
Center point	15	0	0	0	60	24	200	3,539.1	3,499.9
	16	0	0	0	60	24	200	3,572.8	3,499.9
	17	0	0	0	60	24	200	3,343.0	3,499.9

1.3 การเปรียบเทียบค่าจริงจากการทดลอง และค่าทำนายปริมาณกรดแลกติกจากการย่อยสลาย PLA โดยใช้เอนไซม์จาก *A. keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1

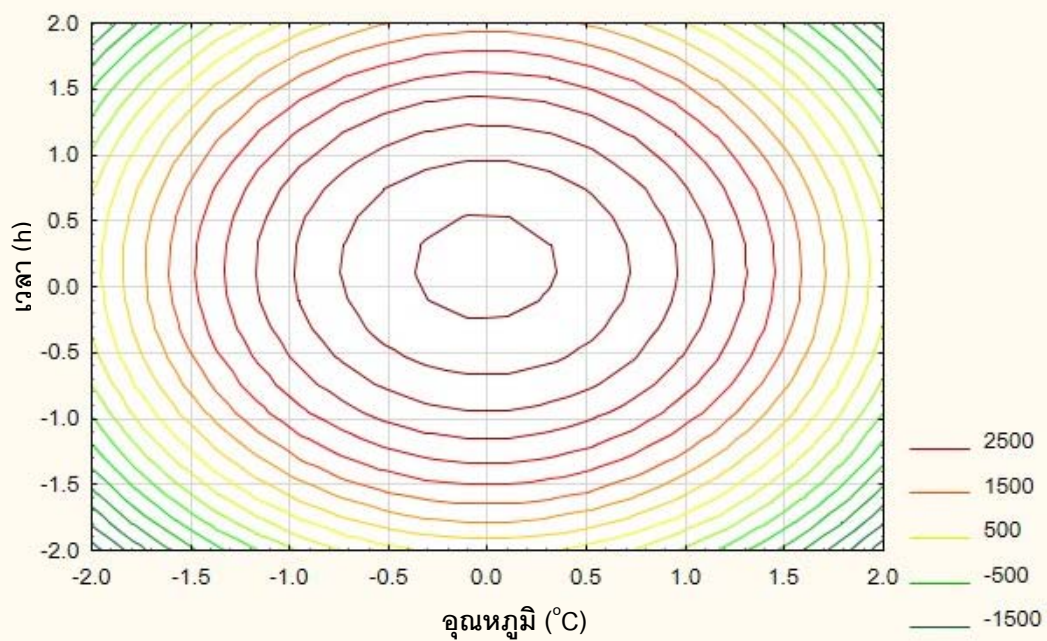
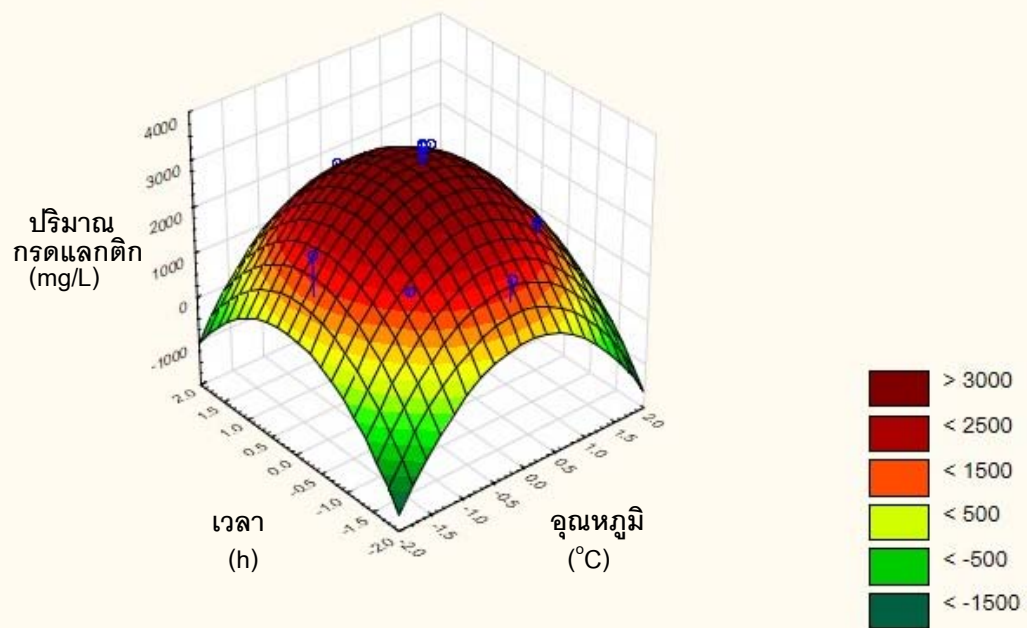
เมื่อทำการตรวจสอบความเหมาะสมของสมการการถดถอยแล้วพบว่าสมการที่ได้มีความเหมาะสมสำหรับการนำมาใช้ในการทำนายผลของตัวแปรตาม จากนั้นนำสมการการถดถอยที่ได้ (สมการที่ 5) ไปทำนายผลของตัวแปร อุณหภูมิ (X_1), เวลา (X_2) และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ (X_3) พบว่า ได้ผลการทำนายดังแสดงในตาราง 11 จากสมการการถดถอยที่ได้ใช้ในการทำนายปริมาณกรดแลกติกจากการย่อยสลาย PLA โดยใช้เอนไซม์จาก *A. keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1 พบว่า ค่าทำนายมีแนวโน้มของทิศทางสอดคล้องกับค่าจริงจากการทดลอง

2. การหาจุดที่เหมาะสมของตัวแปรที่ ศึกษาต่อการสลาย PLA โดยใช้เอนไซม์จาก *A. keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1

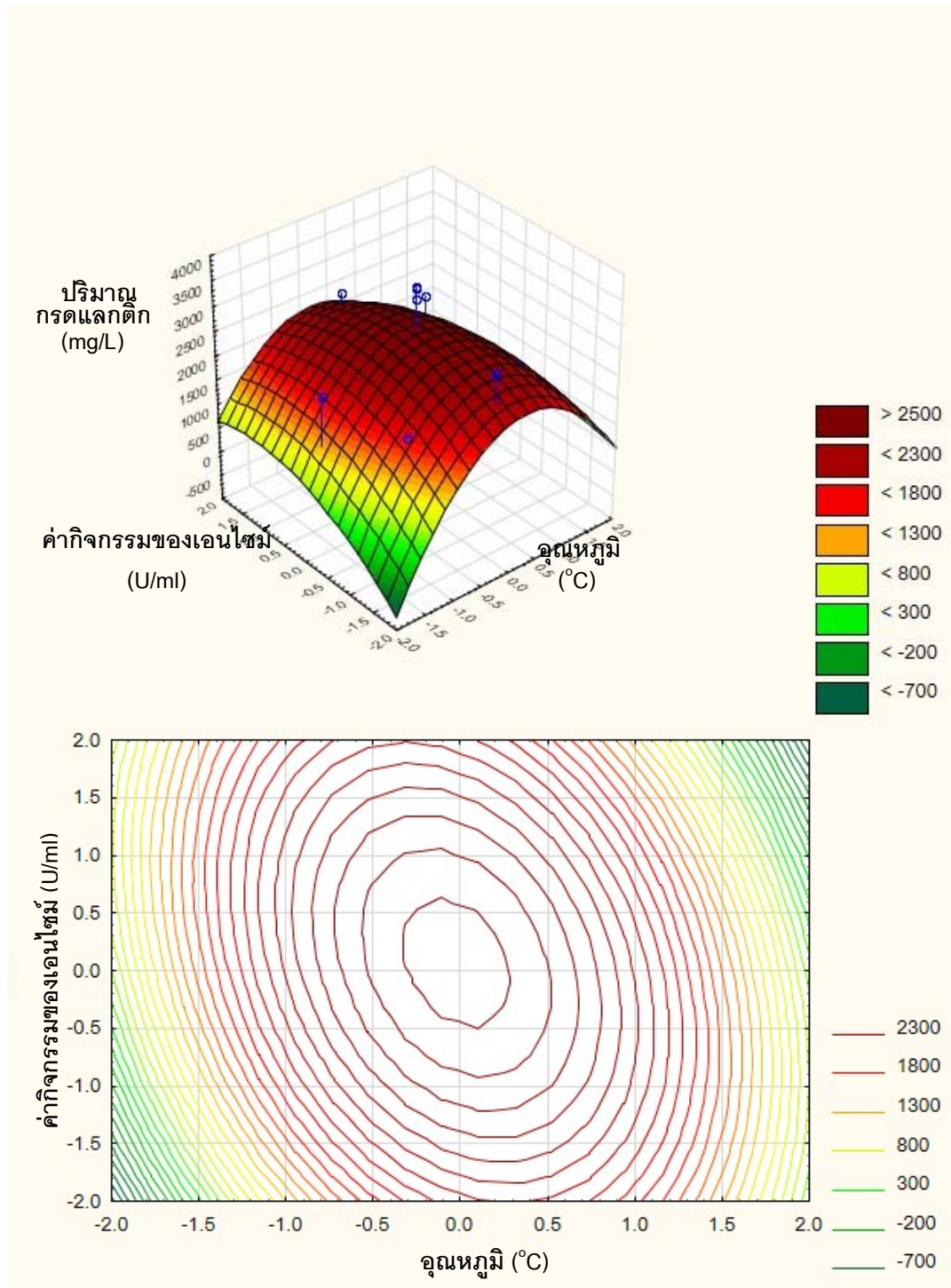
การศึกษาจุดที่เหมาะสมของปัจจัยทั้ง 3 คือ อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) เวลา (ชม.) และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ (U/ml) ซึ่งมีผลต่อการย่อยสลาย PLA ทำได้โดยนำสมการถดถอยที่ได้จากข้อ 4.1.1.2 (สมการที่ 5) มาใช้ในการสร้างกราฟพื้นที่ผิวตอบสนอง แบบภาพ 3 มิติ และแผนภาพคอนทัวร์ พล็อต (ภาพ 2 มิติ) เพื่อหาตำแหน่งที่ทำให้ได้ค่าตัวแปรตาม (ปริมาณกรดแลกติก) สูงที่สุด ซึ่งจากภาพประกอบ 12 แสดงให้เห็นว่า เมื่อควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 58-62 องศาเซลเซียส และใช้เวลาในการย่อยสลายเท่ากับ 24-27.6 ชม. โดยกำหนดให้กิจกรรมของเอนไซม์คงที่ ที่ค่ากลางของการทดลอง คือ 200 U/ml ทำให้ได้ค่าทำนายปริมาณกรดแลกติกสูงที่สุด นอกจากนี้ เมื่อพิจารณากราฟพื้นที่ตอบสนองและคอนทัวร์พล็อตระหว่างอุณหภูมิ และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ (ภาพประกอบ 13) พบว่าเมื่อทำการเพิ่มอุณหภูมิ และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ถึงช่วงประมาณค่ากลางของการทดลอง (code value = 0) จะทำให้ได้ปริมาณกรดแลกติกสูงเมื่อกำหนดเวลาเท่ากับ 24 ชม.

เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่าง เวลา กับค่ากิจกรรมของเอนไซม์ (ภาพประกอบ 14) พบว่าเมื่อเพิ่มระยะเวลาตั้งแต่ค่ากลางของข้อมูล (24 ชม.) จนถึง 30 ชม. และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ เป็น จะทำให้ได้ปริมาณกรดแลกติกสูงที่สุด เมื่อกำหนดให้อุณหภูมิเป็นค่ากลาง (60 องศาเซลเซียส.)

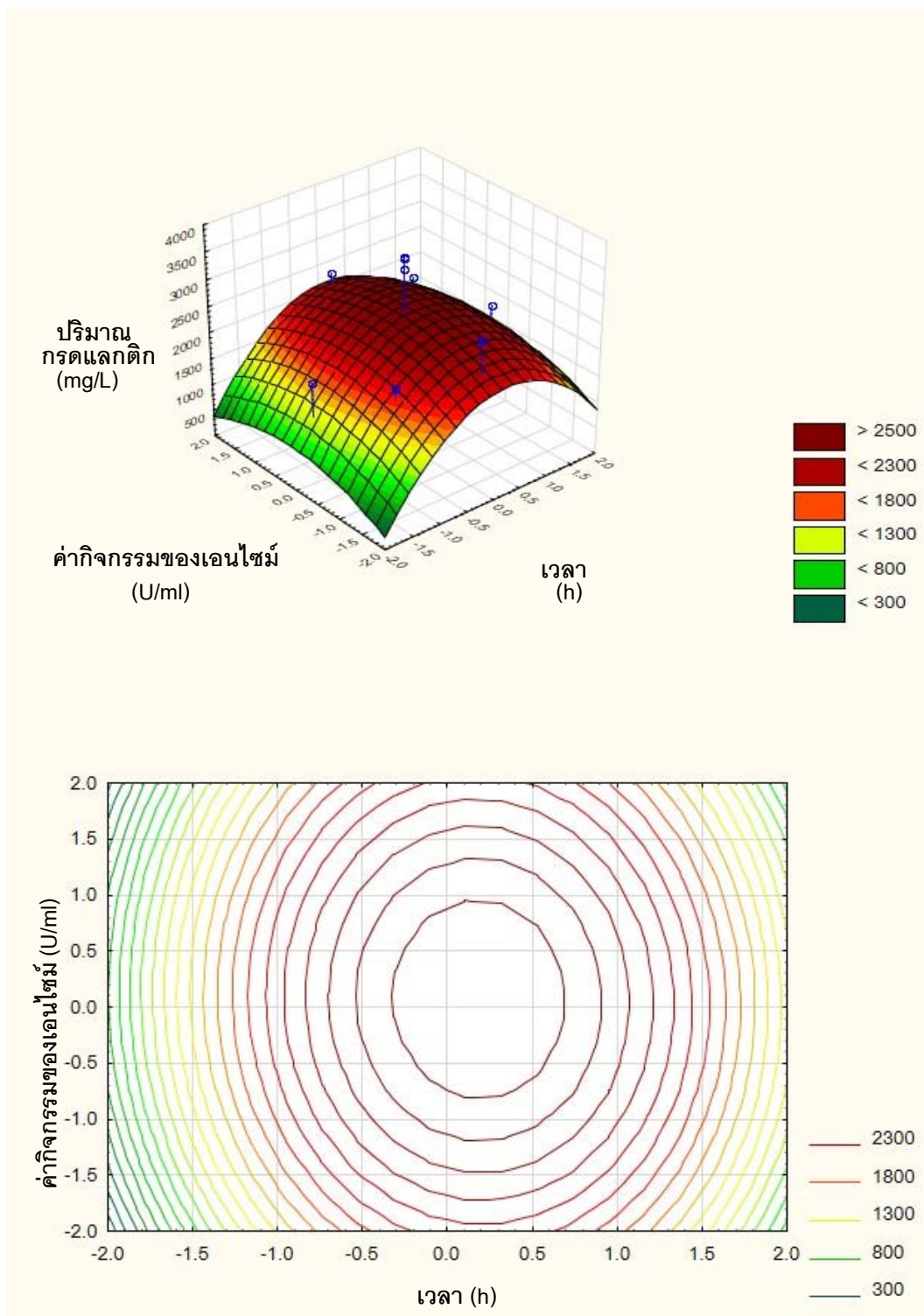
ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าจุดที่เหมาะสมในการย่อยสลาย PLA โดยใช้เอนไซม์จาก *A. keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1 คือ อุณหภูมิเท่ากับ 60 องศาเซลเซียส และใช้เวลาในการย่อยสลายเท่ากับ 24 ชม. โดยกำหนดให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์คงที่ที่ค่ากลางของการทดลอง คือ 200 U/ml ซึ่งสภาวะดังกล่าวส่งผลให้คำนวณค่าทำนายปริมาณกรดแลกติก จากสมการถดถอยได้เท่ากับ 3,510 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อทำการทดลองจริง พบว่า ได้ปริมาณกรดแลกติก จากการสลาย PLA โดยใช้เอนไซม์จาก *A. keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1 เท่ากับ 3,426.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมีความใกล้เคียงจากค่าทำนาย นอกจากนี้ยังพบว่า เอนไซม์ที่ได้จาก *A. keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1 มีความสามารถย่อยสลาย PLA ได้เท่ากับร้อยละ 85.6



ภาพประกอบ 12 ภาพพื้นผิวตอบสนอง (response surface plot) และคอนทัวร์พล็อตของผลอุณหภูมิ และเวลา ซึ่งตัวแปรตาม คือ ความเข้มข้นของกรดแลกติกที่ได้จากการย่อยสลาย PLA โดยใช้เอนไซม์ จาก *A. keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1 โดยกำหนดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ระดับกลางเท่ากับ 200 U/ml



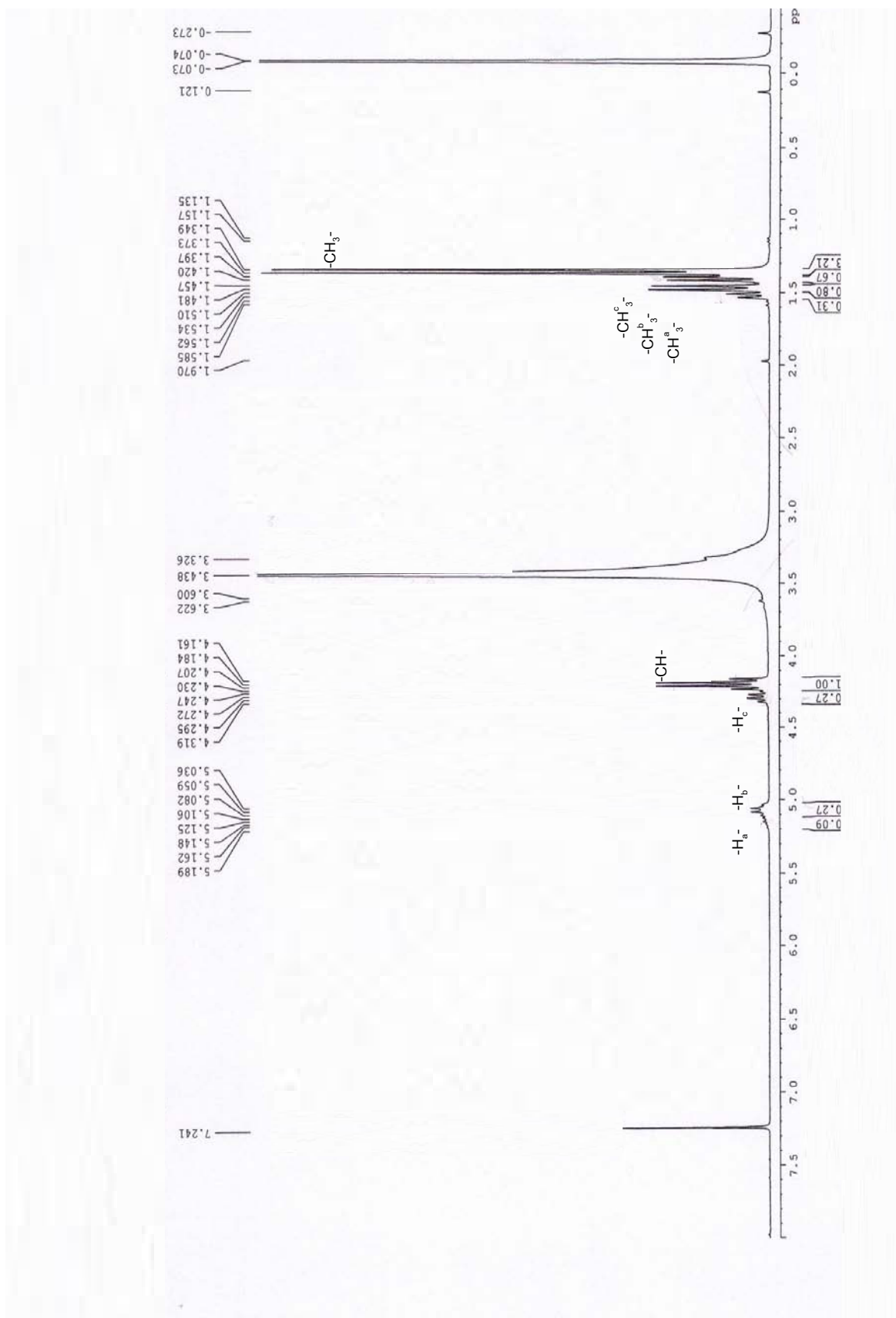
ภาพประกอบ 13 ภาพพื้นผิวตอบสนอง (response surface plot) และคอนทัวร์พล็อตของผลอุณหภูมิ และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ซึ่งตัวแปรตาม คือ ความเข้มข้นของกรดแลกติกที่ได้จากทรายย่อยสลาย PLA โดยใช้เอนไซม์จาก *A. keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1 โดยกำหนดเวลาที่ระดับกลางเท่ากับ 24 ชม.



ภาพประกอบ 14 ภาพพื้นผิวตอบสนอง (response surface plot) และคอนทัวร์พล็อตของผลเวลา และ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ซึ่งตัวแปรตาม คือ ความเข้มข้นของกรดแลกติก ที่ได้จากการย่อยสลาย PLA โดยใช้เอนไซม์ *A. keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1 โดยกำหนดอุณหภูมิที่ระดับกลางเท่ากับ 36 องศาเซลเซียส

3. การประเมินการสังเคราะห์ PLA จากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลาย PLA โดยใช้ เอนไซม์ไลเปสทางการค้าเป็นคะตะลิสต์

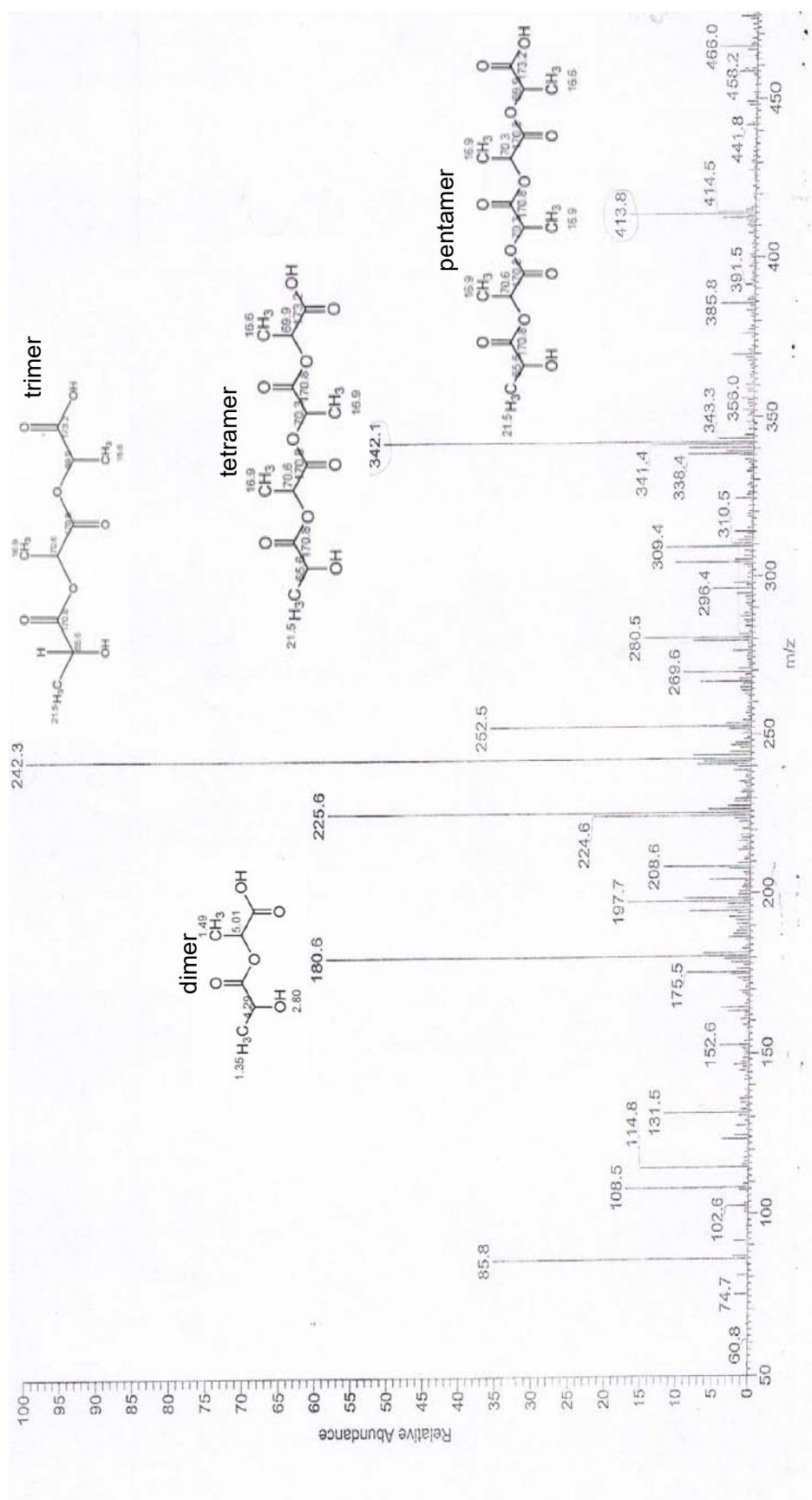
การประเมินการสังเคราะห์ PLA ด้วยกระบวนการทางชีวภาพทำได้โดยนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายภายใต้สภาวะที่เหมาะสมมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ PLA โดยใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ในขวดก้นกลมที่เติมเอนไซม์ไลเปสร้อยละ 15 ปริมาตรโดยใช้โหลอี นให้ได้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 70 องศาเซลเซียส ทำการกวนต่อเนื่องภายใต้บรรยากาศของก๊าซไนโตรเจน 0.1 vvm เป็นเวลา 6 ชม. แยกส่วนตะกอน PLA ออก และวิเคราะห์ด้วยเครื่อง NMR แสดงผลในภาพประกอบ 15 จากภาพแสดงโปรตอน NMR spectrum ของการวิเคราะห์ผล ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสังเคราะห์ PLA โดยกระบวนการทางชีวภาพพบว่า พีคสัญญาณที่ชัดเจนที่สุดเป็นพีคของ $-CH-$ ซึ่งมีค่า chemical shift เป็น 4.19 ppm, q, 2H, $J = 6.8\text{H}_z$ และพีคของ $-CH_3-$ มีค่า chemical shift เป็น 1.35 ppm d, 3H, $J = 6.8\text{H}_z$ ซึ่งพีคเหล่านี้สรุปได้ว่าเป็นโครงสร้างของกรดแลคติกซึ่งเป็น มอนอเมอร์ ในขณะที่พีคสัญญาณอื่นๆ ที่ต่ำกว่าเป็นพีค ของโอลิโกเมอร์ ซึ่งรายละเอียดดังนี้คือ ที่ chemical shift เท่ากับ 5.15 ppm, q, 0.09H, $J = 7.0\text{H}_z$ (แสดงโปรตอนของ H ตำแหน่ง a, H_a) ที่ chemical shift เท่ากับ 5.06 ppm, q, 0.27H, $J = 7.1\text{H}_z$ (แสดงโปรตอนของ H ตำแหน่ง b, H_b) ที่ chemical shift เท่ากับ 4.28 ppm แสดงไฮโดรเจนอะตอม ตำแหน่ง C (แสดงโปรตอนของ H ตำแหน่ง c, H_c) ที่ 1.52 ppm, d, $J = 7.1\text{H}_z$, 0.31H แสดงหมู่ $-CH_3-$ ตำแหน่ง a (CH^a_3) ที่ 1.47 ppm, d, $J = 7.1\text{H}_z$, 0.8H แสดงหมู่ $-CH_3-$ ที่ H3 ตำแหน่ง b (CH^b_3) และที่ chemical shift เป็น 1.40 ppm, d, $J = 7.0\text{H}_z$ แสดงหมู่ $-CH_3-$ ที่ H3 ตำแหน่ง c (CH^c_3) โดยตำแหน่งของโปรตอน และหมู่ต่างๆแสดงในภาพประกอบ 16



ภาพประกอบ 15 ^1H -NMR spectrum ของการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสังเคราะห์ PLA โดยใช้กระบวนการทางชีวภาพ

ภาพประกอบ 16 ภาพโครงสร้างโมเลกุลจำลองของโพลิโกเมอร์ PLA ($n=5$)

จากภาพประกอบ 17 แสดงน้ำหนักโมเลกุลของผลิตภัณฑ์ ที่ได้จากการสังเคราะห์ PLA โดยกระบวนการทางชีวภาพ พบว่า พีคที่มีค่า relative abundance สูงมีทั้งหมด 4 พีค ด้วยกันคือ พีค A, B, C และ D โดยที่พีค A มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 180.6 ซึ่งเป็นค่าน้ำหนักโมเลกุลของ PLA ไดเมอร์ (dimer) พีค B มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 242.3 ซึ่งเป็นค่าน้ำหนักโมเลกุลของ PLA ไตรเมอร์ (trimer) พีค C มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 342.1 ซึ่งเป็นค่าน้ำหนักโมเลกุลของ PLA เตตระเมอร์ (tetramer) และพีค สุดท้ายคือ พีค D มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 413.8 ซึ่งเป็นค่าน้ำหนักโมเลกุลของ PLA เพนตะเมอร์ (pentamer) ซึ่งน้ำหนักโมเลกุลที่ได้เป็นน้ำหนักโมเลกุลที่รวมน้ำหนักของโพแทสเซียมไอออน $[M+K]^+$ ที่อยู่ในระบบวิเคราะห์ ดังนั้นสรุปได้ว่า จำนวน n ของ กรดแลกติกที่เชื่อมต่อกันเป็น โพลิโกเมอร์ นั้นมี n ตั้งแต่ 2 ไปจนถึง n สูงที่สุดเท่ากับ 5



ภาพประกอบ 17 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุล ของโพลิแลกติกแอซิดที่ได้จากการสังเคราะห์ PLA โดยใช้ กระบวนการทางชีวภาพ โดยใช้ LC/MS

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

การศึกษาการย่อยพลาสติกชนิด PLA โดยใช้เอนไซม์ย่อยสลาย PLA (โปรติเอส) จาก *A. keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1 จากการทดลองพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการนำมาใช้ย่อยสลาย PLA โดยใช้ PLA เริ่มต้น 4,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ผลดังนี้คือ ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมเท่ากับ 58-62 องศาเซลเซียส โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาคือ 60 องศาเซลเซียส ช่วงเวลาที่เหมาะสมในการบ่ม 24-30 ชม. และจุดของเวลาที่เหมาะสมคือ 24 ชม และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เหมาะสมคือ 200 U/ml และเมื่อนำผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลาย มาทำการวิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติกโดยใช้เครื่อง HPLC พบว่าค่าความเข้มข้นของกรดแลคติกสูงสุดเท่ากับ 3,426.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเมื่อเทียบกับค่าที่ทำนายปริมาณกรดแลคติก จากการออกแบบการทดลองทางสถิติ ด้วยวิธี CCD ซึ่งมีค่าเท่ากับ 3,510 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าผลที่ได้ใกล้เคียงกัน และสามารถคำนวณหาร้อยละ การย่อยสลาย PLA ได้สูงถึงร้อยละ 85.6 จากสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลาย PLA จึงนำสภาวะนี้มาทำการย่อยสลาย PLA โดยเอนไซม์จาก *A. keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1 และนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายนำมาทำการสังเคราะห์ PLA ใหม่ด้วยกระบวนการทางชีวภาพ โดยใช้เอนไซม์ไลเปส ทางการค้าเป็นตัวคะตะลิสต์ ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ภายใต้บรรยากาศของก๊าซไนโตรเจน หลังจากทำปฏิกิริยา แยกส่วนตะกอน ที่เกิดขึ้นมาทำการวิเคราะห์หาโครงสร้างโมเลกุล โดยใช้เครื่อง NMR และวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลโดยใช้เครื่อง LC/MS ซึ่งจากการวิเคราะห์โดยเครื่อง NMR พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสังเคราะห์ นั้นมีหลายชนิด ซึ่งประกอบด้วย มอนอเมอร์ และ โอลิโกเมอร์ ของ PLA และเมื่อวิเคราะห์ด้วย LC/MS พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้ มีจำนวนโครงสร้าง โมเลกุลมากที่สุดเท่ากับ 5 โมเลกุล และเมื่อวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลพบว่า มีน้ำหนักโมเลกุล มากที่สุดเท่ากับ 413 Da ซึ่งน้ำหนักโมเลกุลที่ได้เป็นน้ำหนักโมเลกุลที่รวมน้ำหนักของ โฟแทสเซียมไ ออกอน $[M+K]^+$ ที่อยู่ในระบบวิเคราะห์ ซึ่งเห็นได้ว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้นั้นเป็นโอลิโกเมอร์สายสั้น ๆ ของพลาสติกชนิด PLA

มีรายงานการศึกษาสภาวะการย่อยสลาย PLA โดยใช้จุลินทรีย์ Tomita; et al. (2004: 433-438) รายงานว่า ใช้ crude enzyme ที่ผลิตได้จาก *Geobacillus thermocatenulatus* สามารถย่อยสลาย PLA ขนาดโมเลกุล 47,000 หน่วย ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสโดยใช้ระยะเวลา 20 วัน Sukkhum; et al. (2009a: 459-467) ค้นพบแอคติโนมัยซีทชอปร้อน *Actinomadura keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1 ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLA ได้ และระบุว่าเอนไซม์ชนิดนี้เป็นเอนไซม์กลุ่มเซอรินโปรติเอส Sukkhum; et al. (2009b: 302-306) พบว่าอุณหภูมิที่ดีที่สุดในการย่อยสลาย PLA อยู่ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ต่อมา Hanparkphoom; et al. (2014: 13-22) พบ *Laceyella sacchari* สายพันธุ์ LP175 สามารถผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลาย PLA ซึ่งมีสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลาย PLA คือ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และสภาวะความเป็นกรด-เบสอยู่ที่ pH จากรายงานการศึกษาข้างต้นทำให้ในงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้ *Actinomadura keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1 เพื่อทำการผลิตเอนไซม์ในการย่อยสลาย PLA และหาสภาวะที่เหมาะสมของเอนไซม์สำหรับการย่อยสลาย PLA พบว่าสภาวะที่เหมาะสมของอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสมีความสอดคล้องกับรายงานอื่นๆ ที่ใช้ในการย่อยสลาย PLA ที่อุณหภูมิสูง ซึ่งโดยปกติแล้วเอนไซม์จะมีความจำเพาะ และมีความสามารถในการทำปฏิกิริยา เคมีกับสารตั้งต้นได้ดีที่สุดในช่วงอุณหภูมิหนึ่ง หากอุณหภูมิไม่เหมาะสม จะทำให้การเกิดปฏิกิริยาได้ไม่ดี หรืออาจไม่เกิดปฏิกิริยา แต่หากอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาเคมีสูงเกินระดับที่เหมาะสมจะส่งผลต่อโครงสร้างของโปรตีนที่เป็นเอนไซม์ซึ่งอาจทำให้เอนไซม์เสียสภาพได้ (denature) ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถใช้ในการทำปฏิกิริยาได้ เพราะฉะนั้น ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิที่สามารถย่อยสลาย PLA ให้ปริมาณกรดแลคติกสูงสุดในขณะที่เอนไซม์ยังไม่เสียสภาพนอกจากนี้เวลาที่เหมาะสมที่ได้ คือ 24 ชม. แสดงให้เห็นว่าเวลาที่ 24 ชม. เป็นเวลาที่เอนไซม์ย่อยสลาย PLA จาก *A. keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1 สามารถย่อยสลาย PLA ตั้งต้น ให้ได้ เป็นผลิตภัณฑ์กรดแลคติกได้สูงที่สุด กล่าวคือ เวลาในการเกิดปฏิกิริยาเคมี มีความสัมพันธ์กับ ปริมาณสาร ตั้งต้น และปริมาณของเอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยาเคมี ในทิศทางเดียวกัน โดยอัตราการเกิดปฏิกิริยาเคมีสามารถหาได้จากอัตราส่วนของสารตั้งต้นที่ลดลงต่อเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาเคมี หรือ จากอัตราส่วนของ ปริมาณสารผลิตภัณฑ์ที่เพิ่ม ต่อเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาเคมี ซึ่งหมายความว่า หากใช้เวลาในการเกิดปฏิกิริยาเคมี น้อยเกินไป ส่งผลให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารตั้งต้นกับเอนไซม์ น้อยตามไปด้วย ส่งผลให้ปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาอาจได้เพียงเล็กน้อย แต่หากใช้เวลามากเกินไป จุดที่เหมาะสม จะส่งผลให้ ปริมาณผลิตภัณฑ์ที่

เกิดขึ้นอาจไม่มากขึ้น อันเนื่องมาจากปริมาณสารตั้งต้นที่ใช้ในการ เกิดปฏิกิริยาเคมี ถูกใช้ในการทำปฏิกิริยากับเอนไซม์หมดไปแล้ว ทำให้ไม่สามารถเกิดผลิตภัณฑ์เพิ่มขึ้นได้อีก เพราะฉะนั้น ที่เวลาคือ 24 ชม. จึงเป็นเวลาที่เหมาะสมที่สุดในการย่อยสลาย PLA โดยเอนไซม์จาก *A. keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1 และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เหมาะสมในการย่อยสลาย PLA โดยเอนไซม์จาก *A. keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1 คือ 200 U/ml จากผลการวิจัยพบว่าค่าปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์ แปรผันตามปริมาณผลิตภัณฑ์กรดแลกติกที่เกิดขึ้น กล่าวคือเมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์สูงขึ้นผลที่ตามมาคือปริมาณผลิตภัณฑ์กรดแลกติกจะเพิ่มขึ้นเช่นกัน และจะน้อยลงเมื่อ PLA ตั้งต้นลดลงจนหมด (ปราณี พัฒนพิพิธโพลศาสตร์ . 2556: 27-41)

นอกจากนี้มีรายงานเกี่ยวกับ การศึกษากระบวนการ การสังเคราะห์ พลาสติกชนิด PLA ด้วยกระบวนการต่างๆ Achmad. et al. (2009: 342–350) ศึกษากระบวนการสังเคราะห์ PLA โดยกระบวนการทางเคมี โดยการควบแน่นภายใต้สภาวะสุญญากาศ พบว่าสามารถทำให้เกิด PLA ได้แต่จำเป็นต้องใช้อุณหภูมิสูงในการทำปฏิกิริยา Piemonte; & Gironi (2013: 313-318) รายงานถึงกระบวนการสังเคราะห์ PLA โดยกระบวนการทางเคมี ซึ่งในการสังเคราะห์นั้นได้ใช้อุณหภูมิ 160-180 องศาเซลเซียส และใช้ปริมาณกรดแลกติกที่ได้จากการย่อยสลาย PLA สูงถึงร้อยละ 95 นอกจากนี้ยังมีการรายงานเกี่ยวกับการนำพลาสติกชนิด PLA กลับมาใช้ใหม่โดยกระบวนการทางชีวภาพโดย Takahashi; et al. (2004: 346-353) ศึกษาการย่อยสลาย PLA ชนิด DL-PLA โดยใช้เอนไซม์ไลเปส ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ซึ่ง PLA จะถูกเปลี่ยนให้เป็น โอลิโกเมอร์ที่เป็นวงแหวนแลกไทด์ และสามารถนำกลับมาใช้ผลิต PLA ได้เช่นเดียวกันโดยใช้เอนไซม์ไลเปสทางการค้าที่มีชื่อว่า lipase CA (Novozyme 435) ในการย่อยสลาย PLA และการสังเคราะห์ โดยทำปฏิกิริยา ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ซึ่งจากการศึกษานี้พบว่า โอลิโกเมอร์ ที่มีลักษณะเป็นวงแหวน สามารถนำกลับมาใช้ในการผลิต PLA ได้อีกครั้ง จากรายงานการศึกษาข้างต้นเห็นได้ว่ากระบวนการนำพลาสติกชนิด PLA กลับมาใช้ใหม่โดยกระบวนการทางเคมีใช้อุณหภูมิสูงกว่ากระบวนการทางชีวภาพ ส่งผลให้ในการวิจัย ครั้งนี้จึงเลือกกระบวนการสังเคราะห์ PLA โดยกระบวนการทางชีวภาพ ในปัจจุบันการสังเคราะห์ PLA ใหม่ด้วยวิธีการทางชีวภาพนั้นยังมีการศึกษาไม่มากนัก โดยมีรายงานเกี่ยวกับสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา Kondabagil; & Soundar (2003: 859-865) พบว่า เอนไซม์ไลเปสทางการค้า สามารถใช้เป็นตัวคะตะลิสต์ ในการสังเคราะห์ PLA โดยพบว่า PLA ที่ได้น้ำหนักโมเลกุลสูงถึง 3,300 Da เมื่อไม่นานมานี้มีการศึกษาเกี่ยวกับสภาวะที่ใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ PLA โดยกระบวนการทางชีวภาพ Chuensangjun; et al. (2012: 154-157)

รายงานว่ สามารถสังเคราะห์ PLA โดยใช้เอนไซม์ไลเปสทางการค้าเป็นตัวคะตะลิสต์ (Lipozyme TL IM) และใช้กรดแลกติกทางการค้า ซึ่งในปฏิกิริยาใช้ระยะเวลา 5 ชม. ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศของก๊าซไนโตรเจน พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์จะส่งผลให้น้ำหนักโมเลกุลของผลิตภัณฑ์ PLA เพิ่มขึ้นโดยผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ไลเปสมีผลนั้นมี น้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 2,600-4,500 Da จากรายงานการศึกษาข้างต้นทำให้ในการวิจัยครั้งนี้เลือกใช้ เอนไซม์ไลเปสทางการค้าเป็นตัวคะตะลิสต์ (Lipozyme TL IM) และได้นำสภาวะที่ใช้ในการสังเคราะห์ดังกล่าวมาใช้ในการทำปฏิกิริยาการสังเคราะห์ PLA โดยกระบวนการทางชีวภาพในงานวิจัยนี้

จากผลการวิจัย พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสังเคราะห์ PLA โดยกระบวนการทางชีวภาพ โดยใช้เอนไซม์ไลเปสทางการค้าเป็นตัวคะตะลิสต์มีจำนวนโครงสร้างโมเลกุลที่สูงที่สุดเท่ากับ 5 โมเลกุล และมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 413 Da ซึ่งเห็นได้ว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นโพลิเมอร์สายสั้น ๆ ของพลาสติกชนิด PLA สาเหตุที่ผลิตภัณฑ์ มีขนาดเล็กและมีน้ำหนักโมเลกุลน้อย อาจเป็นมาจากหลายปัจจัย เช่น ในการศึกษาก่อนหน้านี้ ใช้ สารตั้งต้นในการ สังเคราะห์ PLA เป็นกรดแลกติกทางการค้า ซึ่งมีความบริสุทธิ์ของสารมากกว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลาย PLA (Chuensangjun; et al. 2012: 154-157)

แต่อย่างไรก็ตามถึงแม้ผลิตภัณฑ์จากการสังเคราะห์ PLA จะมีจำนวนโมเลกุลสูงสุดเพียง 5 โมเลกุล และมีน้ำหนักเพียง 413 Da แต่พบว่าสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้หลายด้าน โดยพบว่า ได้มีงานวิจัยของ Jamshidian; & Xiao. (2010: 552-572) และ Xiao; et al. (2010: 1057-1065) รายงานว่าโพลิเมอร์ชนิด PLA สายสั้น ๆ นั้นสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการสังเคราะห์เป็นสารส่งถ่ายยาระดับนาโน รวมทั้งสามารถนำไปใช้สังเคราะห์ พอลิเมอร์รวม (copolymer) ระหว่างพลาสติกชนิด PLA และพลาสติกชนิดอื่น ๆ ได้เช่น PCL หรือ PBS เป็นต้น

จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลาย PLA โดยใช้เอนไซม์ย่อยสลาย PLA จาก *A. keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1 สามารถนำกลับมาสังเคราะห์ได้ใหม่ ด้วยกระบวนการทางชีวภาพ โดยทำการสังเคราะห์โดยใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่ง PLA ที่สังเคราะห์ได้เป็นโพลิเมอร์สายสั้น ๆ แต่สามารถนำมาทำการประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ต่อไปในอนาคต รวมถึงอาจพัฒนาสภาวะ และกระบวนการ ที่ใช้ในการ สังเคราะห์ PLA โดยกระบวนการทางชีวภาพเพื่อให้ได้ขนาด และน้ำหนักโมเลกุลที่มากขึ้นต่อไป



บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

- จตุพร วุฒิกนกกาญจน์. (2555). งานวิจัยและสถิติบัตรที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาบรรจุภัณฑ์จากพลาสติกชีวภาพชนิด PLA. (เอกสารประกอบการสอน). หน้า 2.
- ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล. (2556). เอนไซม์เทคโนโลยี. สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. หน้า 27-41.
- Achmad, F.; Yamane, K.; Quan, S.; & Kokugan, T. (2007). Synthesis of polylactic acid by direct polycondensation under vacuum without catalysts, solvents and initiators. *Chemical Engineering Journal*. 151: 342-350.
- Anders, S.; & Mikael, S. (2002). Properties of lactic acid based polymers and their correlation with composition. *Progress in Polymer Science*. 27: 1123 -1163.
- Averous, L. (2008). *Polylactic acid: synthesis, properties and applications*. Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources. Chennai, India. Charon Tec., Ltd (Macmillan Company). 21: 433-450.
- Auras, R.; Harte, B.; & Selke, S. (2004). An overview of polylactides as packaging materials. *Macromolecular Bioscience*. 9: 835-864.
- Box, G.E.P.; & Wilson, K.B. (1951). On the experimental attainment of optimum conditions. *Journal of the Royal Statistical Society Series B*. 13: 1-45.
- Chuensangjun, C.; Pechyen, C.; Chisti, Y.; & Sirisansaneeyakul, S. (2012). Lipase-catalysed polymerization of lactic acid and the properties of the polymer. *Advanced Materials Research*. 506: 154-157.
- Chen, G.-X.; Kim, H.-S; Kim; E. S.; & Yoon, J.-S. (2006). Synthesis of high-molecular weight poly(L-lactic acid) through the direct condensation polymerization of L-lactic acid in bulk state. *European Polymer Journal*. 42: 468-472.

- Datta, R.; & Henry, M. (2006). Lactic acid: recent advances in products, processes and technologies-a review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 81: 1119-1129.
- Dorgan, J.R.; Lehermeier, H.; & Mang, M. (2000). Thermal and rheological properties of commercial-grade poly (lactic acid). *Journal of Polymers and the Environment*. 8: 1-9.
- Du, G.; Chen, J.; Yu, J.; & Lun, S. (2001). Continuous production of poly-3- hydroxybutyrate by *Ralstonia eutropha* in a two-stage culture system. *Journal of Biotechnology*. 88: 59-65.
- Dutkiewicz, S.; Grochowska-Lapienis, D.; & Tomaszewski, W. (2003). Synthesis of poly(L(+) lacticacid) by polycondensation method in solution. *Fibres and Textiles in Eastern Europe*. 43: 66–70.
- Eguiburu, J.L.; & Berridi, M.J.F. (1999). Ring-opening polymerization of L-lactide initiated by (2-methacryloxy) ethyloxy-aluminum trialkoxides. *Macromolecules*. 32: 8252-8258.
- Fan, Y.; Nishida, H.; Hoshihara, S.; Yoshihito, S.; Tokiwa, Y.; & Endo, T. (2003). Pyrolysis kinetics of poly(L-lactide) with carboxyl and calcium salt end structures. *Polymer Degradation and Stability*. 79: 547–562.
- Flieger, M.; Kantorová, M.; Prell, A.; Rezanka, T.; & Votruba, J. (2003). *Biodegradable plastics from renewable sources*. *Folia Microbiologica*. 48: 27-44.
- Garlotta, D. (2001). Literature review of poly(lactic acid). *Journal of Polymers and the Environment*. 9: 63–84.
- Gupta, B.; Revagade, N.; & Hilborn, J. (2007). Poly(lactic acid) fiber: an overview. *Progress in Polymer Science*. 34: 455-482.
- Hanphakphoom, S.; Maneewong, N.; Sukkhum, S.; Shinji, T.; & Kitpreechavanich, V. (2014). Characterization of poly(L-lactide)-degrading enzyme produced by thermophilic filamentous bacteria *Laceyella sacchari* LP175. *The Journal of General and Applied Microbiology*. 60: 13-22.

- Hans, L.; John, D.; & Douglas, W. (2001). Gas permeation properties of poly(lactic acid). *Journal of Membrane Science*. 19: 243-251.
- Harshe, Y.M.; Storti, G.; Morbidelli, M.; Gelosa, S.; & Moscatelli, D. (2007). Polycondensation kinetics of lactic Acid. *Macromolecular Reaction Engineering*. 1: 611–621.
- Horacek, I.; & Kalisek, V. (2003). Polylactide. I. Continuous dry spinning-hot drawing preparation of fibers. *Journal of Applied Polymer Science*. 54 (11): 1751–1757.
- Hyon, S.H.; Jamshidi, K.; & Ikada, Y. (1984). *Melt spinning of poly-L-lactic acid and hydrolysis of the fiber in vitro*. In *Polymers as biomaterials*. Shalaby, S.W.; Hoffman, A.S.; Ratner, B.D., & Horbett, T.A., Eds. Plenum Press, New York. p. 52-65.
- Ikura, Y.; & Toshiaki, K. (1999). Isolation of a microorganism capable of degrading poly (L-lactide). *The Journal of General and Applied Microbiology*. 45: 247–251.
- Jaeger, K.-E.; Stéphane, R.; Bauke, W. D.; Charles, C.; Margreet, van H.; & Onno, M. (1994). Bacterial lipases. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews*. 15: 29-63.
- Jamshidian, M.; Arab, T.; Imran, E.; Jacquot, M.; Desobry, S. (2010). Poly-lactic acid; production, applications, nanocomposites and release studies, comprehensive *Review in Food Science and Food Safety*. 9: 552-572.
- Jararat, A.; Pranamuda, H.; & Tokiwa, Y. (2002). Poly(L-lactide)-degrading activity in various actinomycetes. *Macromolecular Biology Science*. 2: 420–428.
- Jararat, A.; Tokiwa, Y.; & Tanaka H. (2003). Poly(L-lactide) degradation by *Kibdelosporangium aridum*. *Biotechnology*. 25: 2035–2038.
- Jararat, A.; Tokiwa, Y.; & Tanaka, H. (2006). Production of poly(L-lactide)-degrading enzyme by *Amycolatopsis orientalis* for biological recycling of poly(L-lactide). *Applied Microbiology and Biotechnology*. 72: 726-731.
- Kaitian, X.; Kozluca, A.; Denkba, E.B.; & Piskin, E. (1996). Poly (D,L-lactic acid) homopolymers: Synthesis and characterization. *Turkish Journal of Chemistry*. 20: 43-53.

- Khuri, A.I.; & Cornell, J.A. (1987). *Response surface designs and analyses*. Marcel Dekber, New York.
- Kim, M.; Wan, G.K.; Hang, Y.W.; & Sun H.L. (2007). Poly(L-lactide)-degrading activity of a newly isolated bacterium. *Journal of Applied Polymer Science*. 109: 234–239.
- Kondabagil, R.K.; & Soundar D. (2003). Lipase-catalysed polymerization of lactic acid and its film forming properties. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 19: 859–865.
- Kricheldorf, H.R.; & Kreiser-Saunders, I. (1996). Polylactides-synthesis, characterization and medical application. *Macromolecular Symposia*. 103: 85-102.
- Laitinen, O.; Törmälä, P.; Taurio, R; Skutnabb, K.; Saarelainen, K.; Iivonen T.; & Vainionpää, S. (1992). Mechanical properties of biodegradable ligament augmentation device of poly(L-lactide) in vitro and in vivo. *Biomaterial*. 13: 1012-1016.
- Lasprilla, A, J.R.; Martinez, G.A.; Lunelli, B.H.; Jardini, A.L.; & Filho, R.M. (2012). Poly-lactic acid synthesis for application in biomedical devices. *Biotechnology Advances*. 30: 321–328.
- Lassalle, V.L.; & Ferreira, M.L. (2008). Lipase-catalyzed synthesis of polylactic acid: an overview of the experimental aspects. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 83: 1493-1502.
- Langer, R.; & Nikolaos, P. (1983). Chemical and physical structure of polymers as carriers for controlled release of bioactive agents: a review. *Journal of Macromolecular Science*. Part C: Polymer Reviews. 23: 61-126.
- Lehermeier, H.; Dorgan, J.; & Douglas, J.W. (2001). Gas permeation properties of poly(lactic acid). *Journal of Membrane Science*. 190: 243-251.
- Lim, H.-A; Takao, R.; & Yutaka, T. (2005). Hydrolysis of polyesters by serine proteases. *Biotechnology Letters*. 27: 459–464.

- Lin, X.; Wang, B.; Guang, Y.; & Mario, G. (2012). Poly(lactic acid)-based biomaterials: synthesis, modification and applications. *Biomedical Science, Engineering and Technology*. 11: 247-282.
- Lunt, J. (1998). Large-scale production, properties and commercial applications of polylactic acid polymers. *Polymer Degradation and Stability*. 59: 145-152.
- Lunt, J.; & Andrew, L.S. (2000). Polylactic acid polymers from corn, applications in the textiles industry. *Journal of Industrial Textiles*. 29: 191-205.
- McDonald, R.T.; Stephen, M.; & Richard, A.G. (1996). Enzymatic degradability of poly(lactide): effects of chain stereochemistry and material crystallinity. *Macromolecules*. 29: 7356–7361.
- Marten, E.; Muller, R.-J.; & Deckwer, W.-D. (2003). Studies on the enzymatic hydrolysis of polyesters I. Low molecular mass model esters and aliphatic polyesters. *Polymer Degradation and Stability*. 80: 485–501.
- Mehta, R.; Vineet, K.; Haripada, B.; & Upadhyay, S.N. (2005). Synthesis of poly(lactic acid). *Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews*. 45: 325–349.
- Maytiya, K.; Jarerat, A.; Khanongnuch, C.; Lumyong, S.; & Pathom-aree, W. (2012). Poly(lactide) Degradation By *Pseudonocardia alni*AS4.1531T. *Journal Science of ChiangMai University*. 39: 128-132.
- Mayumi, D.; Yukie, A.-S.; Hiroo, U.; Nobuhiko, N.; & Toshiaki, N.-K. (2008). Identification and characterization of novel poly(DL-lactic acid) depolymerases from metagenome. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 79: 743–750.
- Miura, S.; Tomohiro, A.; Noriaki, I.; Lies, D.; Jin; B.F.; Cui, H.B.; & Mitsuyasu, O. (2004). Production of L-Lactic acid from corncob. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 97: 153-157.

- Moon, S.I; Urayama, H; & Kimura, Y. (2003). Structural characterization and degradability of poly (L-lactic acid) incorporating phenylsubstituted alpha-hydroxy acids as comonomers. *Macromolecular Bioscience*. 3: 301–309.
- Nakamura, K.; Toshio, T.; Naoki, A.; & Yoshiyuki K. (2001). Purification and characterization of an extracellular poly(L-lactic acid) depolymerase from a soil isolate, *Amycolatopsis* sp. strain K104-1. *Applied and Environment Microbiology*. 67: 345–353.
- Nishida, H.; Mariko, K.; Ayumi, I.; & Yutaka T. (2000). Microbial degradation of poly (p-dioxanone). I. Isolation of degrading microorganisms and microbial decomposition in pure culture. *Polymer Degradation and Stability*. 68: 205–217.
- Oda, Y.; Asari, H.; Urakami, T.; & Kenzo, T. (1995). Microbial degradation of poly (3-hydroxybutyrate) and polycaprolactone by filamentous fungi. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 80: 265-269.
- Oda, A.; Yonetsu, A.; Urakami, T. & Tonomura, K. (2000). Degradation of polylactide by commercial proteases. *Journal of Polymers and the Environment*. 8: 29–32.
- Ohkouchi, Y.; & Yuzo, I. (2006). Direct production of L(+)-lactic acid from starch and food wastes using *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18011. *Bioresource Technology*. 97: 1554–1562.
- Oh, H; Wee, Y.-J.; Yun, J.-S.; Seung, H.H.; Jung, S.; & Ryu, H.-W. (2005). Lactic acid production from agricultural resources as cheap raw materials. *Bioresource Technology*. 96: 1492–1498.
- Okamoto, N.; & Matsuo, T. (2008). Two-step process for continuous polymerization of polylactic acid. *Journal of Chemical Engineering of Japan*. 41: 474-484.
- Piemonte, V.; & Gironi, F. (2013). Kinetics of hydrolytic degradation of PLA. *Journal of Polymers and Environment*. 21(2): 313-318.
- Pillai, C.K.S.; Willi, P.; & Chandra, P.S. (2009). Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science*. 34: 641–678.

- Postema, A.R.; Luiten, A.H.; & Pennings, A.J. (2003). High-strength poly (L-lactide) fibers by a dry-spinning/hot-drawing process. I. Influence of the ambient temperature on the dry-spinning process. *Journal of Applied Polymer Science*. 39: 1265 – 1274.
- Pranamuda, H.; Tokiwa, Y.; & Tanaka, H. (1997). Polylactide degradation by an *Amycolatopsis* sp. *Applied and Environment Microbiology*. 63: 1637–1640.
- Pyda, M.; Bopp, R.C.; & Wunderlich, B. (2004). Heat capacity of poly(lactic acid). *The Journal of Chemical Thermodynamic*. 36: 731–742.
- Radano, C.P.; Baker, G.L.; & Smith, M.R. (2000). Stereoselective polymerization of a racemic monomer with a racemic catalyst: direct preparation of the polylactic acid stereocomplex from racemic lactide. *Journal of American Chemical Society*. 122: 1552-1553.
- Rafler, G.; Lang, J.; Jobmann, M.; & Bechthold, I. (2001). Technologically relevant aspects of kinetics and mechanism of ring-opening polymerization of L,L-dilactide. *Macromolecular Materials and Engineering*. 286: 761-768.
- Rathin. D.; & Michae, H. (2006). Lactic acid: recent advances in products, processes and technologies-a review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 81: 1119-1129.
- Roeb, G.-A.; López-Guerrero, D.A.; Gimeno, M.; & Bárzana, E. (2009). Lipase-catalyzed synthesis of poly-L-lactide using supercritical carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*. 5: 197–201.
- Södergård, A.; & Stöl, M. (2002). Properties of lactic acid based polymers and their correlation with composition. *Progress in Polymer Science*. 27: 1123 -1163.
- Reeve, M.S.; Stephen, P.M.; Milton, J.D.; & Richard, A.G. (1994). Polylactide stereochemistry: effect on enzymatic degradability. *Macromolecules*. 27: 825–831.
- Rinaudo; M. (2006). Chitin and chitosan: properties and applications. *Progress in Polymer Science*. 31: 603–632.

- Sakai, K.; Kawano, H.; Iwami, A.; Nakamura, M.; & Moriguchi, M. (2001). Isolation of a thermophilic poly-L-lactide degrading bacterium from compost and its enzymatic characterization. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 92: 298–300.
- Sangwan, P.; & Wu, D.Y. (2008). New insights into polylactide biodegradation from molecular ecological techniques. *Macromolecular Bioscience*. 8: 304–315.
- Shigeno, Y.A.; Teeraphatpornchai, T.; Teamtisong, K.; Nomura, N.; Uchiyama, H.; Nakahara, T.; & Kambe, T.N. (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: 2498–2504.
- Suyama, T.; Tokiwa, Y.; Ouichanpagdee, P.; Kanagawa, T.; & Kamagata Y. (1998). Phylogenetic affiliation of soil bacteria that degrade aliphatic polyesters available commercially as biodegradable plastics. *Applied and Environment Microbiology*. 64: 5008–5011.
- Sukkhum, S.; Tokuyama, S.; Tamura, T.; & Kitpreechavanich, V. (2009a). A novel poly(L-lactide) degrading actinomycetes isolated from Thai forest soils, phylogenic relationship and the enzyme characterization. *The Journal of General and Applied Microbiology*. 55: 459-467.
- Sukkhum, S.; Tokuyama, S.; & Kitpreechavanich, V. (2009b). Development of fermentation process for PLA-degrading enzyme production by a new thermophilic *Actinomadura* sp. T16-1. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 14: 302-306.
- Tang, Z.; Chen, X.; Yang, Y.; Pang, X.; Sun, J.; Zhang, X.; & Jing, X. (2004). Stereoselective polymerization of rac-lactide with a bulky aluminum/Schiff base complex. *Journal of Polymer Science*. 42 (23): 5974 – 5982.

- Takahashi, Y.; Okajima, S.; Toshima, K.; & Matsumura, S. (2004). lipase-catalyzed transformation of poly(lactic acid) into cyclic oligomers. *Macromolecular Bioscience*. 4: 346-353.
- Tezuka, Y.; Ishii, N.; Kasuya, K.; & Mitomo, H. (2004). Degradation of poly(ethylene succinate) by mesophilic bacteria. *Polymer Degradation and Stability*. 84: 115-121.
- Tokiwa, Y.; & Buenaventurada, P.C. (2006). Biodegradability and biodegradation of poly(lactide). *Applied Microbiology and Biotechnology*. 72: 244–251.
- Tokiwa, Y.; & Jarerat, A. (2003). Microbial degradation of aliphatic polyesters. *Macromolecular Symposia*. 201: 283–289.
- 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 microorganism and its poly(l-lactide) degradability. *Chemistry Letters*. 28: 355-356
- Tomita, K.; Yutaka, K.; & Kota N. (1999). Isolation of thermophiles degrading poly(L-lactic acid). *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 87: 752–755.
- Tomita, H.K.; Hideto, T.; Tomohiro, N.; Yumi, K.; Kensaku, I.; & Noritoshi, I. (2003). Degradation of poly(D-lactic acid) by a thermophile. *Polymer Degradation and Stability*. 81: 167-171.
- Tomita, K.; Tomohiro, N.; Yumi, K.; & Naoko, M. (2004). Degradation of poly(L-lactic acid) by a newly isolated thermophile. *Polymer Degradation and Stability*. 84: 433-438.
- Tserki, V.; Matzinos, P.; Pavlidou, E.; Vachliotis, D.; & Panayiotou, C. (2006a). Biodegradable aliphatic polyester. Part I. properties and biodegradation of poly(butylene succinate-co-butylene adipate). *Polymer Degradation and Stability*. 91: 367- 376.
- Tserki, V.; Matzinos, P.; Pavlidou, E.; & Panayiotou, C. (2006b). Biodegradable aliphatic polyester. Part II. Synthesis and characterization of chain extended poly(butylene succinate-co-butylene adipate). *Polymer Degradation and Stability*. 91: 377-384.

- Tsuji, H.; & Takeharu, I. (2001). Porous biodegradable polyesters, Preparation of porous poly(ϵ -caprolactone) films from blends by selective enzymatic removal of poly(L-lactide). *Macromolecular Bioscience*. 1: 59–65.
- Urayama, H.; Sung, M.; & Yoshiharu, K. (2003). Microstructure and thermal properties of polylactides with different L- and D-unit sequences: importance of the helical nature of the L-sequenced segments. *Macromolecular Materials and Engineering*. 288: 137–143.
- Vink, T.H.E.; Rábago, K.R.; David, A.G.; & Patrick, R.G. (2002). Application of life cycle assessment to Nature Works™ polylactide (PLA) production. *Polymer Degradation and Stability*. 80: 403-419.
- Williams, D.F. (1981). Enzymatic hydrolysis of polylactic acid. *Engineering in Medicine and Biology Society*. 10: 5-7.
- Wood, A.D. (1980). Biodegradable drug delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics*. 7: 1–18.
- Xiao, R. Z. X.; Zhao, W.Z.; Guand, L.Z.; Jun, J.W.; Fan, M.W. (2010). Recent advance in PEG-PLA block copolymer nanoparticle. *Journal of Nanomedicine*. 5: 1057-1065.
- Xiaodong, W.; Xuan, G.; & Rakshit, S.K. (1997). Direct fermentative production of lactic acid on cassava and other starch substrates. *Biotechnology Letters*. 19: 841–843.
- Yun, J.-S.; Wee, Y.-J.; Kim, J.-N.; & Ryu, H.-W. (2004). Fermentative production of DL-lactic acid from amylase-treated rice and wheat brans hydrolyzate by a novel lactic acid bacterium, *Lactobacillus* sp. *Biotechnology Letters*. 26: 1613–1616.





ภาคผนวก ก
สูตรอาหารและวิธีการเตรียมอาหาร

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Basal medium

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	4.0	กรัมต่อลิตร
K_2HPO_4	4.0	กรัมต่อลิตร
KH_2PO_4	2.0	กรัมต่อลิตร
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2	กรัมต่อลิตร
Gelatine	2.38	กรัมต่อลิตร
PLA powder	0.35	กรัมต่อลิตร

ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกรอง และละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. ISP-2 agar

yeast extract	4	กรัมต่อลิตร
malt extract	10	กรัมต่อลิตร
dextrose	4	กรัมต่อลิตร
agar	15	กรัมต่อลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกรองให้มีปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. ISP-2 broth

yeast extract	4	กรัมต่อลิตร
malt extract	10	กรัมต่อลิตร
dextrose	4	กรัมต่อลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกรองให้มีปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข
บัพเพอร์และวิธีการเตรียมอาหาร



บัฟเฟอร์และวิธีการเตรียม

1. Tris-HCl Buffer pH 9

Solution A 0.2 M Tris

Tris-HCl	24.2	กรัม
H ₂ O	1.0	ลิตร

Solution B 0.2 M HCl

Conc HCl	0.16	มิลลิลิตร
H ₂ O	100	มิลลิลิตร

เตรียมสารละลาย A และสารละลาย B ตามขั้นตอนด้านบน จากนั้นผสมสารละลาย A 100 มิลลิลิตร ในสารละลาย B 10 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เท่ากับ 9 จากนั้น ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ให้เป็น 400 มิลลิลิตร







ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ ชื่อสกุล	นายอนุพันธ์ ยังปรีดา
วันเดือนปีเกิด	18 สิงหาคม พ.ศ. 2530
สถานที่เกิด	เขต บางแค กรุงเทพมหานคร
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	34/1 หมู่ 9 ต.อ้อมน้อย อ.กระทุ่มแบน จ.สมุทรสาคร 74130
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2548	จบการศึกษาในระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย จาก โรงเรียนมัธยมสาธิตมหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา กรุงเทพฯ
พ.ศ. 2552	จบการศึกษาในระดับปริญญาตรี สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ (วท.บ.) จาก มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี กรุงเทพฯ
พ.ศ. 2558	จบการศึกษาในระดับปริญญาโท สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ (กศ.ม.) จาก มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพฯ
ผลงาน	เข้าร่วมการประชุมงานวิชาการ ระดับ นานา ชาติ “วิทยาศาสตร์วิจัย ” The 7th National Science Conference และจัดแสดงผลงานวิจัยเรื่อง “ Study of poly(L-lactide)(PLA)recycle process by using biological method ” ณ มหาวิทยาลัยนเรศวร จ.พิษณุโลก ได้รับรางวัลชมเชย การนำเสนอผลงานวิจัยยอดเยี่ยม สาขา วิทยาศาสตร์และ เทคโนโลยีชีวภาพ การประชุมงานวิชาการระดับนานาชาติ “วิทยาศาสตร์ วิจัย” The 7th National Science Conference ณ มหาวิทยาลัยนเรศวร จ. พิษณุโลก เข้าร่วมการประชุมงานวิชาการระดับนานาชาติ “FEMS 2015 ” The 6th Congress of European Microbiologist จัดโดย FEMS (Fedration of European Microbiologist Societies) และจัดแสดงผลงานวิจัยเรื่อง “ Biological recycling of poly(L-lactide)(PLA) by Microbial Enzyme ” ณ. ศูนย์การประชุม MECC เมือง Maastricht ประเทศ เนเธอร์แลนด์