รายงานการวิจัย

เรื่อง

การผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA โดยเชื้อ *Actinomadura keratinilytica* T16-1 ด้วยการหมักแบบแห้ง

Production of PLLA-degrading Enzyme by *Actinomadura keratinilytica* T16-1 using Solid State Fermentation

ผศ.ดร. ศรีสุดา หาญภาคภูมิ

ผศ.ดร.สุขุมาภรณ์ กระจ่างสังข์

ผศ.ดร.สุชาดา โทผล

รุ่งเกียรติ แก้วเพชร

นเรศ บางศิริ

มหาวิทยาลัยสวนดุสิต

2561

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสวนดุสิต

รายงานการวิจัย

เรื่อง

การผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA โดยเชื้อ *Actinomadura keratinilytica* T16-1 ด้วยการหมักแบบแห้ง

Production of PLLA-degrading Enzyme by *Actinomadura keratinilytica* T16-1 using Solid State Fermentation

ผศ.ดร. ศรีสุดา หาญภาคภูมิ

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสวนดุสิต

ผศ.ดร.สุขุมาภรณ์ กระจ่างสังข์

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ผศ.ดร.สุชาดา โทผล

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสวนดุสิต

รุ่งเกียรติ แก้วเพชร

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสวนดุสิต

นเรศ บางศิริ

โรงเรียนการเรือน มหาวิทยาลัยสวนดุสิต

มหาวิทยาลัยสวนดุสิต

2561

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสวนดุสิต

(งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากงบประมาณแผ่นดินด้านการวิจัยปีงบประมาณ 2560)

หัวข้อวิจัย การผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA โดยเชื้อ *Actinomadura keratinilytica* T16-1 ด้วยการหมักแบบแห้ง

ผู้ดำเนินการวิจัย ผศ.ดร.ศรีสุดา หาญภาคภูมิ
ผศ.ดร.สุขุมาภรณ์ กระจ่างสังข์
ผศ.ดร.สุชาดา โทผล
รุ่งเกียรติ แก้วเพชร
นางสาวนเรศ บางศิริ
ที่ปรึกษา รศ.ดร.วิเชียร กิจปรีชาวนิช
หน่วยงาน คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสวนดุสิต
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
โรงเรียนการเรือน มหาวิทยาลัยสวนดุสิต

ปี พ.ศ. 2561

Poly lactic acid (PLA) เป็นพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ มีรายงานว่าพลาสติกนี้สามารถย่อยได้ด้วยจุลินทรีย์หลายชนิด *Actinomadura keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1 เป็นสายพันธุ์ที่มีความสามารถสูงในการย่อยสลาย PLA ภายใต้สภาวะต่างๆ อย่างไรก็ตามการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLA ภายใต้การเพาะเลี้ยงแบบแห้งยังไม่มีการศึกษา งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLA โดย *Actinomadura keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1 ที่ใช้ของเหลือทิ้งทางการเกษตรเป็นวัสดุหมักภายใต้สภาวะการหมักแบบแห้ง วัสดุหมักทางการเกษตร 3 ชนิดได่แก่ แหน มันสำปะหลังเส้น และกากถั่วเหลืองถูกนำมาทดสอบการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLA โดยวางแผนการทดลองแบบผสม จากการศึกษาผลของ vermiculite ที่เติมลงในวัสดุหมักเพื่อผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย ตามผลจากพื้นผิวตอบสนองสามเหลี่ยมพบว่า วัสดุหมักแหนที่ไม่ผสม vermiculite ให้ค่าการผลิตเอนไซม์สูงสุด (137 U/g substrate) กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 391 U/g substrate ภายใต้สภาวะที่เติม PLA 0.280 g /10g substrate แหน 10 g และความชื้น 60% การขยายขนาดการผลิตเอนไซม์ขนาด 600 g ด้วยการหมักแบบแห้ง พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 76 U/g substrate เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 40 ℃ ใช้เวลานาน 168 ชั่วโมง

คำสำคัญ *Actinomadura keratinilytica* แหน การทดลองแบบผสม การหมักแบบแห้ง ถังหมักแบบถาด เอนไซม์ย่อยสลาย PLLA

Research Title	Production of PLLA-degrading enzyme by *Actinomadura keratinilytica* T16-1 using solid state fermentation
Researcher	Asst. Prof. Srisuda Hanphakphoom
	Asst. Prof. Sukhumaporn Krajangsang
	Asst. Prof. Suchada Thophon
	Rungkiat Kawpet
	Nares Bangsiri
Advisor	**Assoc. Prof. Vichien Kitpreechavanich**
Organization	Science and Technology, Suan Dusit University
	Faculty of Science, Srinakharinwirot university
	Suan Dusit School of Culinary Arts, Suan Dusit University
Year	2017

Poly lactic acid (PLA) is a biodegradable plastic. It was reported to degrade by various microorganisms. *Actinomadura keratinilytica* strain T16-1 was demonstrated high ability to degrade PLA under various conditions. However, PLA-degrading enzyme production under solid state fermentation has not studied so far. This research aimed to optimize PLA-degrading enzyme production by *Actinomadura keratinilytica* strain T16-1 using agricultural wastes as substrate under solid state fermentation. Three agricultural wastes (duckweed, cassava ship, soybean meal) were tested for PLA-degrading enzyme production by statistical method with mixture design. The effect of vermiculite was studied by adding into the substrate for the enzyme production. According to the result of response surface method revealed that duckweed without supplement with vermiculite demonstrated the highest enzyme production (137 U/g substrate). The optimum medium composition was further determined. The maximum enzyme activity of 391 U/g substrate was obtained under the condition as follow 0.280 g PLA/10g substrate, 10 g duckweed and 60% moisture content. The enzyme production was scaled up to 10 kg solid state fermenter. The highest enzyme activity at 76 U/g was achieved after incubation at 40 °C for 168 h.

Keywords: *Actinomadura keratinilytica* Duckweed Mixture design Solid state fermentation Tray fermentation PLLA-degrading enzyme

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ศูนย์เครื่องมือและปฏิบัติการ และคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ที่อนุญาตให้ใช้สถานที่ อุปกรณ์ และเครื่องมือวิทยาศาสตร์ ซึ่งทำให้งานวิจัยดำเนินไปอย่างราบรื่นจนประสบความสำเร็จ สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยสวนดุสิต และคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ และบุคคลทุกท่านที่มีส่วนเกี่ยวข้องซึ่งทำให้งานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอมอบความกตัญญูกตเวทิตาคุณ แด่บิดา มารดา ที่คอยให้กำลังใจและสนับสนุนทุกสิ่งอย่าง สำหรับข้อบกพร่องต่างๆที่อาจจะเกิดขึ้นนั้นผู้วิจัยขอน้อมรับและยินดีที่จะรับฟังคำแนะนำจากทุกท่านที่ได้เข้ามาศึกษา เพื่อเป็นประโยชน์ในการพัฒนางานวิจัยต่อไป

ศรีสุดา ธำรงพิรพงษ์และคณะผู้วิจัย

2561

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
ความเป็นมาและความสำคัญ	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	4
ขอบเขตการวิจัย	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	5
บทที่ 2 แนวคิด ทฤษฎี เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	6
จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลาย PLA ได้	6
เอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการย่อยสลาย PLA	11
การย่อยสลายและการสังเคราะห์ PLA ด้วยกระบวนการทางชีวภาพ	12
การหมักแบบแห้ง	14
วัสดุหมักแบบแห้ง	16
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	22
กรอบแนวคิดในการวิจัย	25

หน้า

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 27

คัดเลือกวัสดุหมักที่เหมาะสมในการเติบโตและผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA โดยใช้แผนการทดลองทางสถิติแบบผสมในระดับฟลาสก์ 27

ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA ด้วยการหมักแบบแห้งในระดับฟลาสก์โดยใช้การออกแบบการทดลองแบบ one factor at a time 29

ศึกษาการขยายขนาดการผลิตเอนไซม์ย่อย PLLA ในระดับถังหมัก 29

การวิเคราะห์ 30

บทที่ 4 ผลการวิจัย 32

การคัดเลือกชนิดและปริมาณวัสดุหมักที่เหมาะสมต่อต่อผลิตเอนไซม์ย่อยสลายPLLA ในระดับฟลาสก์โดยใช้การทดลองแบบผสม mixture design 32

ผลการขยายขนาดกระบวนการหมักเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA 39

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ 41

สรุปผลการวิจัย 41

อภิปรายผล 43

ข้อเสนอแนะในการนำผลการวิจัยไปใช้ 46

ข้อเสนอแนะในการทำวิจัยครั้งต่อไป 46

บรรณานุกรม 47

บรรณานุกรมภาษาไทย 47

บรรณานุกรมภาษาต่างประเทศ 47

ภาคผนวก 55

ภาคผนวก ก 56

ประวัติผู้วิจัย 61

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	แสดงเชื้อจุลินทรีย์ ชนิดของเอนไซม์ และวิธีการตรวจวัดการย่อยสลาย PLA	9
2.2	เปรียบเทียบข้อดี-ข้อเสียของการหมักแบบแห้งกับการหมักในอาหารเหลว	15
2.3	เปรียบเทียบแอคติโนมัยซีทแบคทีเรียที่ใช้กระบวนการหมักแบบแห้งและการหมักในอาหารเหลวเพื่อผลิตสาร	16
2.4	สารอาหารในแหน *Lemna minor* L.	19
2.5	องค์ประกอบของสารต่างๆ ในกากมันสำปะหลัง	20
2.6	สารอาหารที่พบในกากถั่วเหลือง	21
3.1	การทดลองหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของวัสดุหมักที่ไม่ผสม vermiculite ต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA โดยใช้ mixture design	28
3.2	การทดลองหาสัดส่วนที่เหมาะสมของวัสดุหมักที่ผสม vermiculite ต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA โดยใช้ mixture design	28
4.1	การทดลองหาสัดส่วนที่เหมาะสมของวัสดุหมักที่ไม่ผสม vermiculite ต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA โดยใช้ mixture design	32
4.2	การทวนสอบผลการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA จากการหมักวัสดุหมักเหมาะสมที่ไม่ผสม vermiculite ด้วย *Actinomadura keratinilytica* T16-1	34
4.3	การทดลองหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของวัสดุหมักที่ผสม vermiculiteต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA โดยใช้ mixture design	35
4.4	การทวนสอบผลการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA จากการหมักวัสดุหมักเหมาะสมที่ผสม Vermiculite ด้วย *Actinomadura keratinilytica* T16-1	37
5.1	สรุปขั้นตอนการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA ด้วยการหมักแบบแห้งโดย แอคติโนมัยสีท *Actinomadura keratinilytica* T16-1	42

ตารางที่		หน้า
ก-1	สัดส่วนที่เหมาะสมของวัสดุหมักที่ไม่มี vermiculite ต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA โดยใช้ mixture design	57
ก-2	เปอร์เซ็นต์ความชื้นระหว่างการหมักเพื่อหาสัดส่วนที่เหมาะสมของวัสดุหมักที่ไม่มี vermiculite ต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA โดยใช้ mixture design	58
ก-3	การยืนยันผลเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA จากสัดส่วนวัสดุหมักเหมาะสมที่ไม่มีและมี Vermiculite ด้วย *Actinomadura keratinilytica* T16-1	59
ก-4	ปริมาณ PLLA ต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA ในฟลาสก์	60
ก-5	เปอร์เซ็นต์ความชื้นต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA ในฟลาสก์	61
ก-6	ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA ด้วยการหมักแบบแห้งในถังหมักแบบถาด	62

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	การนำ PLA กลับมาใช้ใหม่โดยใช้เอนไซม์ไลเปส ทั้งในกระบวนการย่อยสลาย PLA และการนำกลับมาสังเคราะห์ใหม่	13
3.1	รูปแบบของถังหมักแบบถาด (tray bioreactor)	30
4.1	พื้นผิวตอบสนองของสัดส่วนผสมของวัสดุหมักเหมาะสมที่ไม่ผสม vermiculite ต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA	33
4.2	พื้นผิวตอบสนองของอัตราส่วนผสมของวัสดุหมักเหมาะสมที่ผสม vermiculite ต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA	35
4.3	ผลของปริมาณ PLLA ต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA ด้วยการหมักแบบแห้ง	38
4.4	ผลของความชื้นต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA ด้วยการหมักแบบแห้ง	39
4.5	ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA ด้วยการหมักแบบแห้งในถังหมักแบบถาด	40