บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 คัดเลือกวัสดุหมักที่เหมาะสมในการเติบโตและผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA โดยใช้แผนการทดลองทางสถิติแบบผสม (mixture design) ในระดับฟลาสก์

3.1.1 การเตรียมหัวเชื้อและการหมักแบบแห้ง

ถ่ายแอคติโนมัยสีท *A. keratinilytica* T16-1 จาก stock ในอาหารวุ้นเอียงลง ISP2 นำไปบ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบ 150 rpm อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 3-5 วัน จากนั้นปรับค่าความความขุ่นของเชื้อให้ได้ OD_{600} เท่ากับ 1.0 เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ

3.1.2 การคัดเลือกวัสดุหมักที่เหมาะสมที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์โดยใช้ mixture design

ทำการคัดเลือกวัสดุหมักเพื่อใช้ในกระบวนการหมักแบบแห้งโดยออกแบบการทดลองออกเป็น 2 ชุดการทดลอง ได้แก่ การคัดเลือกวัสดุหมักที่ไม่มี vermiculite และ การคัดเลือกวัสดุหมักที่มี vermiculite เนื่องจาก vermiculite เป็นวัสดุที่ใช้ในการเพาะปลูกดังนั้นจึงสามารถนำมาใช้เป็นวัสดุดูดซับความชื้นและให้รูพรุนในกระบวนการหมักได้

3.1.2.1 วัสดุหมักไม่ผสม vermiculite

นำวัสดุหมัก 3 ชนิด ชนิดละ 10 g ได้แก่ กากถั่วเหลือง มันสำปะหลังเส้นและแหน ใส่ในฟลาสก์ขนาด 250 ml ตามแผนการทดลองแบบผสม (mixture design) ซึ่งจะได้ 7 การทดลอง ที่มีชนิดวัสดุหมักต่างๆ กันตามตารางที่ 3.1 นำไปทำให้ปราศจากเชื้อที่ 120^0C นาน 30 นาที ก่อนนำไปเพาะเลี้ยงจะดูดหัวเชื้อที่มีค่า OD_{600} ของเชื้อ เท่ากับ 1.0 มา 5 mL ใส่ลงในอาหาร basal medium (0.035% PLA, 0.238% gelatin, 0.4% $(NH_4)_2SO_4$, 0.4% K_2HPO_4, 0.2% KH_2PO_4 และ 0.02% $MgSO_4.7H_2O$) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 1 mL รวมปริมาตรทั้งหมด 6 mL จากนั้นนำไปใส่ในวัสดุหมักที่ทำให้ปราศจากเชื้อแล้ว ทำการเพาะเลี้ยงในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลานาน 7 วัน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นนำไปวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ และการเติบโต จากนั้นทำการสร้างภาพคอนทัวร์ของ mixture design ต่อการผลิตเอนไซม์เพื่อหาสัดส่วนที่เหมาะสมของวัสดุหมักที่ทำให้มีการผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด เพื่อนำสัดส่วนที่เหมาะสมของวัสดุหมักไปศึกษาในการทดลองขั้นต่อไป

ตารางที่ 3.1 การทดลองหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของวัสดุหมักที่ไม่ผสม vermiculite ต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA โดยใช้ mixture design

Run	Independent various		
	Soybean meal (X1)	Cassava chip (X2)	Duckweed (X3)
1	1	0	0
2	0	1	0
3	0	0	1
4	0.5	0.5	0
5	0.5	0	0.5
6	0	0.5	0.5
7	0.33	0.33	0.33

3.1.2.2 วัสดุหมักที่ผสม vermiculite (with vermiculite)

การทดลองนี้จะเพิ่ม vermiculite ในแต่ละแผนการลดลองในอัตราส่วนวัสดุหมักแต่ละ run ของการทดลองต่อ vermiculite เท่ากับ 0.95 : 0.05 ทำการทดลองเหมือนกับข้อ 3.1.2.1 และใช้ชนิดวัสดุหมักต่างๆกันตามตารางที่ 3.2 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

ตารางที่ 3.2 การทดลองหาสัดส่วนที่เหมาะสมของวัสดุหมักที่ผสม vermiculite ต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA โดยใช้ mixture design

Run	Independent various		
	Soybean meal mixed vermiculite (0.95 : 0.05) (X1)	Cassava chip mixed vermiculite (0.95 : 0.05) (X2)	Duckweed mixed vermiculite (0.95 : 0.05) (X3)
1	1	0	0
2	0	1	0
3	0	0	1
4	0.5	0.5	0
5	0.5	0	0.5
6	0	0.5	0.5
7	0.33	0.33	0.33

3.2 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA ด้วยการหมักแบบแห้งในระดับฟลาสก์โดยใช้การออกแบบการทดลองแบบ one factor at a time

3.2.1 ปริมาณ PLLA

ทำการชั่งวัสดุหมัก 10 g ตามอัตราส่วนวัสดุหมักที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.1 จากนั้นเติมผง PLLA ที่ความเข้มข้นต่างๆได้แก่ 0.035, 0.07, 0.105, 0.14, 0.175, 0.21, 0.245, 0.28 และ 0.315 g โดยใช้วิธีการเตรียมหัวเชื้อและสภาวะการหมักแบบแห้งตามข้อ 3.1 ทำการเก็บตัวอย่างเมื่อเริ่มต้นการหมักแบบแห้งและวันสุดท้ายของการหมักแบบแห้งตามเวลาที่เหมาะสมในการหมักแบบแห้ง จากนั้นนำตัวอย่างไปวิเคราะห์หาความชื้น และพีเอช รวมทั้งทำการสกัดเอนไซม์เพื่อนำไปวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์

3.2.2 การศึกษาผลของปัจจัยทางกายภาพ

การศึกษาผลของปัจจัยทางกายภาพต่อการผลิตเอนไซม์ โดยนำค่าที่เหมาะสมของสัดส่วนที่เหมาะสมของวัสดุหมักและปริมาณ PLLA ที่ได้จากการศึกษาข้อ 3.2.1 มาศึกษาปัจจัยทางกายภาพต่อการผลิตเอนไซม์ ดังนี้

ความชื้นเริ่มต้น: ปรับให้วัสดุหมักมีความชื้นเริ่มต้นเท่ากับ 50, 60, 70, 80 และ 85 % จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงตามสภาวะการหมักแบบแห้งในข้อ 3.1

การเก็บตัวอย่างไปวิเคราะห์หาความชื้น พีเอช และสกัดเอนไซม์เพื่อนำไปวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ตามข้อ 3.4.1 และวัดการเติบโตตามข้อ 3.4.2

3.3 ศึกษาการขยายขนาด (scale-up) การผลิตเอนไซม์ย่อย PLLA ในระดับถังหมัก

ออกแบบหรือเลือกใช้ถังหมักแบบแห้งตามสภาวะเหมาะสมที่ได้จากการศึกษาในระดับฟลาสก์ โดยอาจเลือกใช้ถังหมักแบบถาด (tray-bioreactor) ที่ออกแบบเองในห้องปฏิบัติ เพื่อขยายขนาดของการหมักแบบแห้งจาก 10 g เป็น 600 g ดังภาพที่ 3.1

ภาพที่ 3.1 รูปแบบของถังหมักแบบถาด (tray bioreactor)

ศึกษาความหนาของวัสดุหมักและการให้อากาศต่อการผลิตเอนไซม์ย่อย PLLA โดยทำการบรรจุวัสดุหมักในแต่ละชั้นของถังหมักแบบถาดให้มีความหนาแตกต่างกัน คือ 1, 2, และ 5 เซนติเมตร ทำการบ่มที่อุณหภูมิแตกต่างกันที่ 37, 40 และ 45 °C ในสภาพที่ให้อากาศที่ระดับต่างๆ คือ 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4 ลิตรอากาศต่อชั่วโมงต่อกรัมวัสดุหมัก โดยผ่านอากาศที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วก่อนเข้าสู่ถังหมักตามภาพที่ 3.1 เก็บตัวอย่างเมื่อเริ่มต้นการเพาะเลี้ยงและระหว่างการเพาะเลี้ยงทุกๆ วันนาน 7 วัน เพื่อนำตัวอย่างไปวิเคราะห์หาความชื้น พีเอช และสกัดเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA เพื่อนำไปวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ตามข้อ 3.4.1 และความชื้นตามข้อ 3.4.2

3.4 การวิเคราะห์

3.4.1 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยลาย PLLA (Tomita, Abe & Kamio, 2001)

การสกัดแยกเอนไซม์จากวัสดุหมัก

เติม 100 mM Tris-HCl buffer (pH 9.0) ลงในฟลาสก์ที่มีวัสดุหมักในอัตราส่วน 1:2 w/v ของวัสดุหมักต่อTris-HCl buffer จากนั้นนำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 1 วัน ทำปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อนำไปใช้วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

สำหรับการวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ จะใช้สารตั้งต้น คือ PLLA emulsion (0.1% w/v) โดยทำการ sonicate กับ 0.1 M Tris-HCl (pH9.0) แล้วทำการเจือจางให้ได้ค่าเท่ากับ

1 โดยวัดค่าความขุ่น (OD) ที่ความยาวคลื่นแสง 630 nm ทำการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โดยผสมสารละลายเอนไซม์ 250 μl กับ PLLA emulsion 2,250 μl ลงในหลอดทดลองและบ่มที่ 60 °C 30 min นำไปวัดค่าความขุ่น (OD) ที่ความยาวคลื่นแสง 630 nm

1U คือปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้ค่าความขุ่น ที่ 630 nm ที่ลดลงหนึ่งหน่วย

3.4.2 การหาเปอร์เซ็นต์ความชื้น

นำวัสดุหมักที่หมักด้วยเชื้อ *Actinomadura keratinilytica* T16-1 มาหาเปอร์เซ็นต์ความชื้นตามสูตรข้างล่าง

$$\% \text{ moisture content} = \frac{W2-W3 \times 100}{W2-W1}$$

W1 = น้ำหนักภาชนะ

W2 = น้ำหนักภาชนะและตัวอย่างก่อนอบแห้ง

W3 = น้ำหนักภาชนะและตัวอย่างหลังอบแห้ง