

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 การคัดเลือกชนิดและปริมาณวัสดุหมักที่เหมาะสมต่อผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA ในระดับพลาสติกโดยใช้การทดลองแบบผสม mixture design

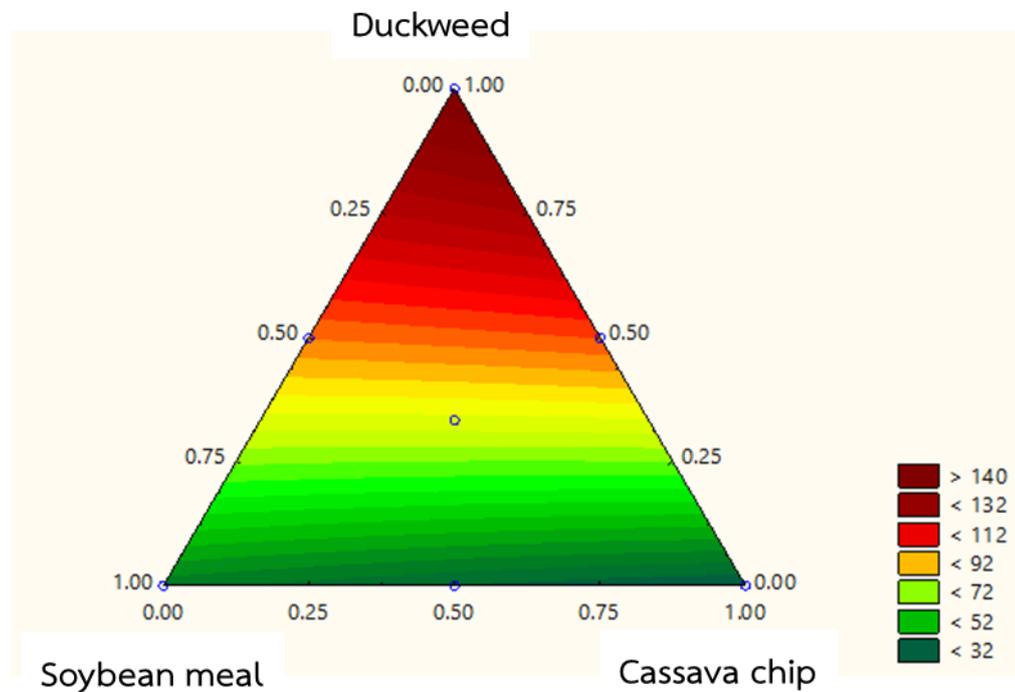
4.1.1 วัสดุหมักไม่ผสม vermiculite

จากผลการทดลองหาสัดส่วนวัสดุหมัก 3 ชนิด ได้แก่ กากถั่วเหลือง มันสำปะหลัง เส้น และแห่น โดยให้ความชื้นประมาณ 80 % พบว่าสัดส่วนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA ได้สูงสุด (137.09 ± 28.27 U / g of substrate) คือ สัดส่วนของถั่วเหลือง มันสำปะหลัง เส้น และแห่น ในสัดส่วนของวัสดุหมักเท่ากับ 0 : 0 : 1 รองลงมา คือ สัดส่วนของถั่วเหลือง มันสำปะหลัง เส้น และแห่น ในสัดส่วนของวัสดุหมักเท่ากับ 0 : 0.5 : 0.5 ผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA ได้ 112.53 ± 18.06 U / g of substrate (ตารางที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 การทดลองหาสัดส่วนที่เหมาะสมของวัสดุหมักที่ไม่ผสม vermiculite ต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA โดยใช้ mixture design

Run	Independent various			Enzyme activity (U/g of substrate)	Dry weight (g)	Moisture content (%)
	Soybean (X1)	Cassava chip (X2)	Duckweed (X3)			
1	1	0	0	34.64 ± 10.55	8.36 ± 0.82	80.52 ± 2.91
2	0	1	0	24.98 ± 12.03	5.82 ± 1.62	78.20 ± 3.51
3	0	0	1	137.09 ± 28.27	8.68 ± 0.06	75.98 ± 0.65
4	0.5	0.5	0	44.09 ± 14.97	5.88 ± 0.34	81.74 ± 2.03
5	0.5	0	0.5	108.67 ± 42.09	8.48 ± 0.63	80.40 ± 1.43
6	0	0.5	0.5	112.53 ± 18.06	7.25 ± 0.35	79.32 ± 1.08
7	0.33	0.33	0.33	51.35 ± 32.60	7.65 ± 0.46	79.47 ± 1.28

เมื่อนำสัดส่วนของวัสดุหมักที่ได้จากการทดลองต่อผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA โดยใช้ mixture design ดังตารางที่ 4.1 จากนั้นนำมาสร้างภาพ contour plots ดังภาพที่ 4.1



ภาพที่ 4.1 พื้นผิวตอบสนองของสัดส่วนผสมของวัสดุหมักที่เหมาะสมที่ไม่ผสม vermiculite ต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA

ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างวัสดุหมัก 3 ชนิด จากการวิเคราะห์การถดถอยโดยสร้างสมการการถดถอย (regression equation) และพิจารณาความเหมาะสมของสมการการถดถอยจากค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination, R^2) นำสมการถดถอยแบบการพหุนาม (polynomial equation) มาทำนายสัดส่วนของวัสดุหมักที่เหมาะสมต่อผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA ได้สูงสุดตั้งสมการที่ 1

$$Y_1 = 37.6857X_1 + 28.0254X_2 + 140.1385X_3 + 3.8409X_1X_2 + 30.2651X_1X_3 + 65.034X_2X_3 \quad \text{สมการที่ 1}$$

เมื่อ Y_1 = ปริมาณเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA

X_1 = กากถั่วเหลือง

X_2 = มันสำปะหลังเส้น

$X_3 =$ แหน

จากภาพพื้นผิวตอบสนองและสมการการถดถอยในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA พบว่า จะต้องใช้วัสดุหมักแหนเพียงชนิดเดียวปริมาณ 10 กรัมเท่านั้น ซึ่งให้ค่าทำนายการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA เท่ากับ 140.14 U/g of substrate แต่ให้ค่าการทวนสอบผลเท่ากับ 102.49 ± 8.99 U/g of substrate ซึ่งน้อยกว่าค่าการทำนายดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 การทวนสอบผลการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA จากการหมักวัสดุหมักเหมาะสมที่ไม่ผสม vermiculite ด้วย *Actinomadura keratinilytica* T16-1

Soybean (X1)	Cassava chip (X2)	Duckweed (X3)	Enzyme activity (U/g of substrate)		Dry weight (g)	Moisture content (%)
			Predicted	Validated value		
0	0	1	140.14	102.49 ± 8.99	8.49 ± 0.07	78.65 ± 1.27

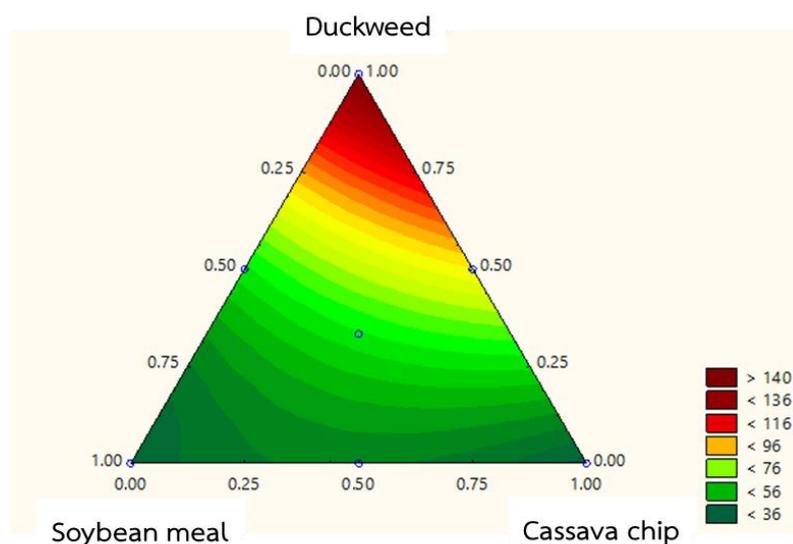
4.1.1 วัสดุหมักที่ผสม vermiculite

จากผลการทดลองหาสัดส่วนวัสดุหมักที่เหมาะสมพบว่าสัดส่วนที่เหมาะสมในการผลิตการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA จากวัสดุหมัก 3 ได้แก่ กากถั่วเหลือง มันสำปะหลังเส้น และแหน ซึ่งแต่ละ run ของการทดลองจะใช้สัดส่วนวัสดุหมักแต่ละชนิดต่อ vermiculite เท่ากับ 0.95 : 0.05 ในทั้ง 7 run ที่ความชื้นประมาณ 80 % พบว่าอัตราส่วนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA ได้สูงสุดเท่ากับ 137.09 ± 28.27 U/g of substrate ที่มีอัตราส่วนของถั่วเหลืองผสม vermiculite มันสำปะหลังเส้นผสม vermiculite และแหนผสม vermiculite ในอัตราส่วนของวัสดุหมักผสมเท่ากับ 0 : 0 : 1 รองลงมา คือ อัตราส่วนของกากถั่วเหลืองผสม vermiculite มันสำปะหลังเส้นผสม vermiculite และแหนผสม vermiculite เท่ากับ 0 : 0.5 : 0.5 และ 0.5 : 0 : 0.5 สามารถผลิตเอนไซม์ได้เท่ากับ 112.53 ± 18.06 และ 108.67 ± 42.09 U/g of substrate ตามลำดับ (ตารางที่ 4.3)

ตารางที่ 4.3 การทดลองหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของวัสดุหมักที่ผสม vermiculite ต่อการผลิต เอนไซม์ย่อยสลาย PLLA โดยใช้ mixture design

Run	Independent variou			Enzyme activity (U/g of substrate)	Dry weight (g)	Moisture content (%)
	Soybean meal mixed vermiculite (0.95:0.05)	Cassava chip mixed vermiculite (0.95:0.05)	Duckweed mixed vermiculite (0.95:0.05)			
	(X1)	(X2)	(X3)			
	1	1	0			
2	0	1	0	32.66±16.63	5.09±0.57	80.66±0.17
3	0	0	1	140.25±29.48	8.80±0.06	78.56±0.64
4	0.5	0.5	0	50.32±15.06	5.84±0.06	82.60±0.13
5	0.5	0	0.5	68.59±39.93	8.10±0.42	80.95±2.50
6	0	0.5	0.5	93.45±58.31	6.72±0.17	80.61±2.01
7	0.33	0.33	0.33	50.68±27.83	7.65±0.78	81.67±2.06

เมื่อนำสัดส่วนของวัสดุหมักที่ได้จากการทดลองต่อผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA โดยใช้ mixture design ดังตารางที่ 4.3 จากนั้นนำมาสร้างภาพ contour plots ดังภาพที่ 4.2



ภาพที่ 4.2 พื้นผิวตอบสนองของอัตราส่วนผสมของวัสดุหมักที่เหมาะสมที่ผสม vermiculite ต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA

ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างวัสดุหมักแต่ละชนิดผสม vermiculite จากการวิเคราะห์การถดถอยโดยสร้างสมการการถดถอย (regression equation) และพิจารณาความเหมาะสมของสมการการถดถอยจากค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination, R^2) นำสมการถดถอยแบบการพหุนาม (polynomial equation) มาทำนายอัตราส่วนของวัสดุหมักที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA ดังสมการที่ 2

$$Y_2 = 36.6354X_1 + 34.0583X_2 + 141.6571X_3 + 37.4575 X_1X_2 - 104.6957X_1X_3 - 0.0656X_2X_3 \quad \text{สมการที่ 2}$$

เมื่อ Y_1 = ปริมาณเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA

X_1 = กากถั่วเหลืองผสม vermiculite

X_2 = มันสำปะหลังเส้นผสม vermiculite

X_3 = แหนผสม vermiculite

จากภาพพื้นผิวตอบสนองและสมการการถดถอยในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA พบว่า จากปริมาณวัสดุหมักที่ใช้ทั้งหมด 10 กรัม จะต้องใช้สับวัสดุหมักแต่ละชนิดผสมกับ vermiculite ในอัตราส่วนวัสดุหมักแต่ละชนิดต่อ vermiculite เท่ากับ 0.95 : 0.05 เพื่อหาค่าอัตราส่วนของวัสดุหมักที่เหมาะสมด้วยพื้นผิวตอบสนองต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA พบว่า ให้ค่าการทำนายอัตราส่วนของวัสดุหมักผสมที่เหมาะสมของกากถั่วเหลืองผสม vermiculite : มันสำปะหลังเส้นผสม vermiculite : แหนผสม vermiculite เท่ากับ 0 : 0 : 1 เมื่อนำค่าอัตราส่วนของวัสดุหมักมาทำการทดลองเพื่อทวนสอบพบว่า ให้ค่าทำนายการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA เท่ากับ 141.66 U/g of substrate แต่ให้ค่าการทวนสอบผลเท่ากับ 67.89 ± 13.68 U/g of substrate ซึ่งน้อยกว่าค่าการทำนายมากดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 การทวนสอบผลการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA จากการหมักวัสดุหมักเหมาะสมที่ผสม Vermiculite ด้วย *Actinomadura keratinilytica* T16-1

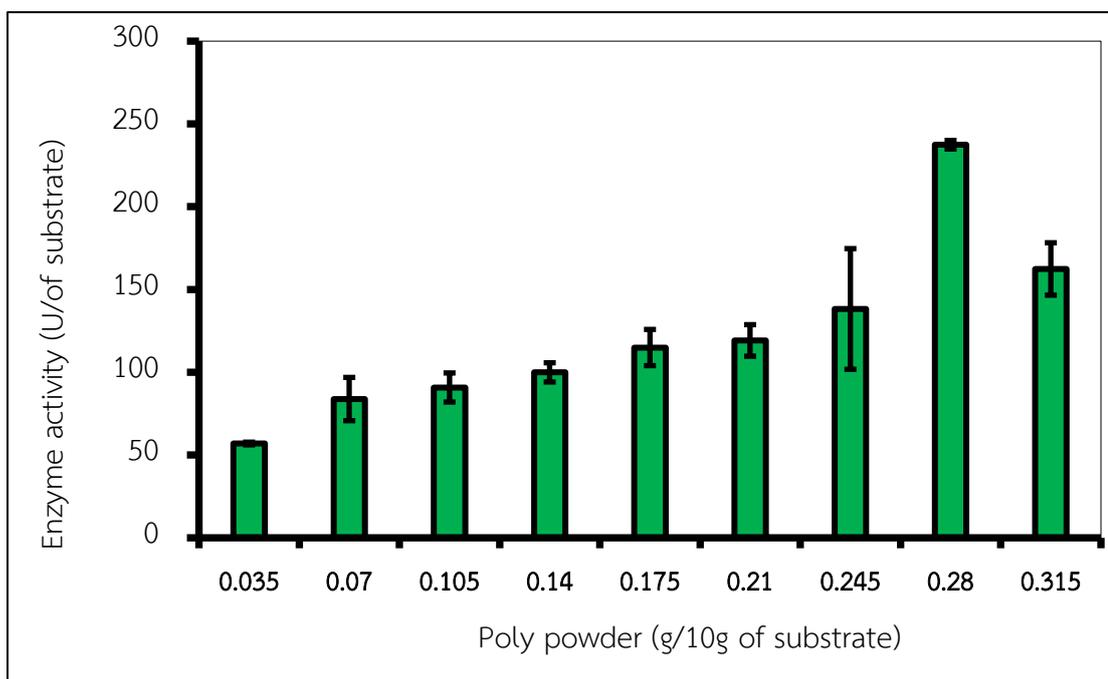
Soybean meal mixed vermiculite (0.95 and 0.05) (X1)	Cassava chip mixed vermiculite (0.95 and 0.05) (X2)	Duckweed and vermiculite (0.95 and 0.05) (X3)	Enzyme activity (U/g of substrate)		Dry weight (g)	Moisture content (%)
			Predicted	Validated value		
0	0	0.95	141.66	67.89±13.68	8.43±0.12	83.19±6.97

4.2 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเติบโตและผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA ด้วยการหมักแบบแห้งในระดับฟลอสก์โดยใช้การออกแบบการทดลองแบบ one factor at a time

คัดเลือกวัสดุหมักที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA โดยวัสดุหมักที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์มากที่สุด คือ แหนปริมาณ 10 กรัม เท่านั้นโดยไม่ผสม vermiculite เพื่อมาศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการเติบโตและผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA

4.2.1 ปริมาณ PLLA

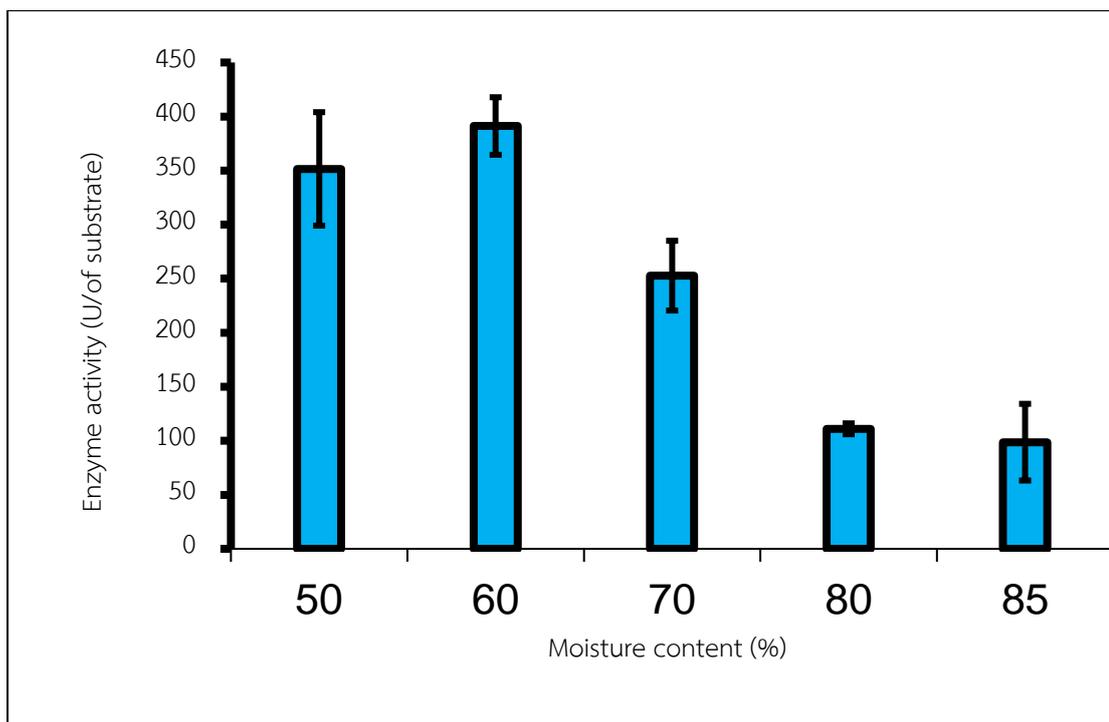
เมื่อนำแหนมาทำการมาทำการหมักแบบแห้งด้วย *Actinomadura keratinilytica* T16-1 เพื่อผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA โดยศึกษาผลของปริมาณ PLLA ต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA พบว่า การผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด 237.92±27.22 U/g DW เมื่อเติมผง PLLA เท่ากับ 0.28 g/10 g of substrate ดังภาพที่ 4.3



ภาพที่ 4.3 ผลของปริมาณ PLLA ต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA ด้วยการหมักแบบแห้ง

4.2.2 ความชื้น

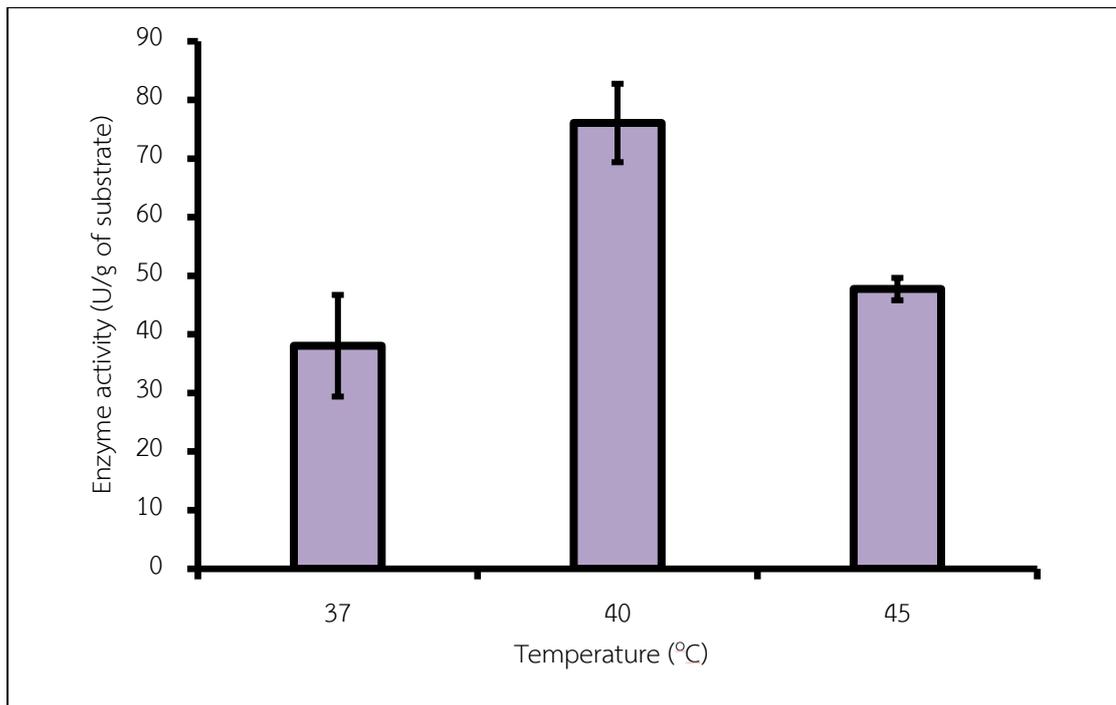
ทำการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA โดยใช้ แหนบปริมาณ 10 g และผง PLLA ปริมาณ 0.28 g เพื่อศึกษาความชื้นที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ พบว่า การผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด 391.234 ± 25.23 U/g of substrate ที่ความชื้น 60 % ดังภาพที่ 4.4



ภาพที่ 4.4 ผลของความชื้นต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA ด้วยการหมักแบบแห้ง

4.3 ผลการขยายขนาดกระบวนการหมักเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยง *Actinomadura keratinilytica* T16-1 ด้วยการนำสภาวะที่เหมาะสมมาขยายขนาดการหมักในถังหมักขนาด 10 กรัม ได้แก่ วัสดุหมักแทน เต็มผง PLLA 0.28 กรัม และให้ความชื้นในการหมัก 60 % เพื่อทำการศึกษาหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงพบว่า สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA ได้ 76.06 ± 16.35 , 42.73 ± 6.33 และ 38.06 ± 12.15 U/g of substrate เมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 40, 45 และ 37 °C ตามลำดับ ดังภาพที่ 4.5



ภาพที่ 4.5 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA ด้วยการหมักแบบแห้งในถังหมักแบบถาด