# บทที่ 5
# สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

## 5.1 สรุปผลการวิจัย

ทำการคัดเลือกวัสดุหมักและปริมาณวัสดุหมักที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA ด้วยการหมักแบบแห้งด้วยแอคติโนมัยสีท *Actinomadura keratinilytica* T16-1 โดยการทดลองแบบผสม mixture design วัสดุหมักที่ใช้ ได้แก่ กากถั่วเหลือง มันสำปะหลังเส้น และแหน ที่ประกอบด้วย 2 ชุดการทดลอง ได้แก่ ชุดการทดลองที่ 1 ใช้วัสดุหมักหมัก 3 ชนิดที่ไม่ผสม vermiculite และชุดการทดลองที่ 2 ใช้วัสดุหมักแต่ละชนิดที่ผสม vermiculite เพื่อหาค่าอัตราส่วนของวัสดุหมักที่เหมาะสมด้วยพื้นผิวตอบสนองต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA พบว่า ชุดการทดลองที่ 1 ที่ใช้วัสดุหมักแหนไม่ผสม vermiculite ให้ค่าทวนสอบผลการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA (102.49±8.99 U/g DW) ดีกว่าอัตราส่วนของวัสดุหมักแหนที่ผสม vermiculite (67.89±13.68 U/g DW) ซึ่งวัสดุหมักที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA คือ วัสดุหมักแหนเพียงชนิดเดียวเท่านั้น เมื่อศึกษาใช้วัสดุหมักแหนเพียงชนิดเดียวเพื่อหาปริมาณ PLLA และความชื้นที่เหมาะสมต่อผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA ด้วยการหมักแบบแห้งในระดับฟลาสก์โดยใช้การออกแบบการทดลองแบบ one factor at a time พบว่า ให้ค่าการผลิตเอนไซม์สูงสุด 391.234±25.23 U/g DW เมื่อเติมผง PLLA 0.28 g/10 g of substrate และเพาะเลี้ยงที่ความชื้น 60 % อุณหภูมิ 45 $^{o}$C นาน 7 วัน

ทำการขยายขนาดของกระบวนการแบบแห้งโดยแอคติโนมัยสีท *Actinomadura keratinilytica* T16-1 โดยเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบถาด พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง คือ 40 $^{o}$C ให้ค่าการผลิตเอนไซม์ 76.06±16.35 เมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 40 $^{o}$C นาน 7 วัน ดังตารางที่ 5.1

**ตารางที่ 5.1** สรุปขั้นตอนการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA ด้วยการหมักแบบแห้งโดย แอคติโนมัยสีท *Actinomadura keratinilytica* T16-1

| Conditions | Ratio of substrates | Substrates content (g) | Medium | PLLA-degrading enzyme production (U/g DW) |
|---|---|---|---|---|
| **Flask scale** | | | | |
| 250 mL Shake flask,<br>Temperature at 45 °C,<br>Initial pH 7.0<br>80 % moisture content<br>7 days | 0 : 0 : 1<br>(Soybean meal :<br>Cassava chip :<br>Duckweed) | 10 | 0.035% PLA<br>0.238% gelatin<br>0.4% $(NH_4)_2SO_4$<br>0.4% $K_2HPO_4$<br>0.2% $KH_2PO_4$<br>0.02% $MgSO_4.7H_2O$ | 102.49±8.99 |
| 250 mL Shake flask,<br>Temperature at 45 °C,<br>Initial pH 7.0<br>80 % moisture content<br>7 days | 0 : 0 : 1<br>(Soybean meal<br>mixed vermiculite,<br>0.95 : 0.05) :<br>(Cassava chip<br>mixed vermiculite,<br>0.95 : 0.05) :<br>(Duckweed mixed<br>vermiculite, 0.95 :<br>0.05) | 10 | 0.035% PLA<br>0.238% gelatin<br>0.4% $(NH_4)_2SO_4$<br>0.4% $K_2HPO_4$<br>0.2% $KH_2PO_4$<br>0.02% $MgSO_4.7H_2O$ | 67.89±13.68 |
| **Flask scale optimization** | | | | |
| 250 mL Shake flask,<br>Temperature at 45 °C,<br>Initial pH 7.0<br>**60 % moisture content**<br>**7 days** | 0 : 0 : 1<br>(Soybean meal :<br>Cassava chip :<br>Duckweed) | **10** | **0.28 % PLA**<br>0.238 % gelatin<br>0.4% $(NH_4)_2SO_4$<br>0.4% $K_2HPO_4$<br>0.2% $KH_2PO_4$<br>0.02% $MgSO_4.7H_2O$ | 391.23±25.23 |
| **Large sale** | | | | |
| Tray-bioreactor,<br>**Temperature at 40 °C,**<br>Initial pH 7.0<br>60 % moisture content<br>**7 days** | 0 : 0 : 1<br>(Soybean meal :<br>Cassava chip :<br>Duckweed) | 600 | **0.28% PLA**<br>0.238% gelatin<br>0.4% $(NH_4)_2SO_4$<br>0.4% $K_2HPO_4$<br>0.2% $KH_2PO_4$<br>0.02% $MgSO_4.7H_2O$ | 76.06±16.35 |

## 5.2 อภิปรายผล

### 5.2.1 การคัดเลือกชนิดและปริมาณวัสดุหมักที่เหมาะสมต่อต่อผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA ในระดับฟลาสก์โดยใช้การทดลองแบบผสม mixture design

#### 5.1.1 วัสดุหมักไม่ผสม vermiculite

จากการคัดเลือกวัสดุหมักและปริมาณวัสดุหมักที่เหมาะสม 3 ชนิด ได้แก่ กาก-ถั่วเหลือง มันสำปะหลังเส้น และแหน โดยไม่ผสม vermiculite ต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA จากผลการทดลองหาสัดส่วนวัสดุหมัก 3 ชนิด ได้แก่ กากถั่วเหลือง กากมันสำปะหลัง และแหน โดยให้ความชื้นประมาณ 80 % พบว่า วัสดุหมักแหนเท่านั้นที่ให้การผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA ได้สูงสุด (137.09±28.27 U / g DW) ซึ่งให้ค่าการทวนสอบผลเท่ากับ 102.49±8.99 U/g DW โดยปกติกากถั่วเหลืองจะช่วยส่งเสริมและเป็นทั้งแหล่งของคาร์บอนและไนโตรเจนการสร้างเอนไซม์โปรติเอสที่ดีของแบคทีเรีย (Saurabh et al., 2007; Mukhtar & Haq, 2013) ดังนั้นกากถั่วเหลืองในการทดลองนี้จะสามารถผลิตเอนไซม์ได้รองลองมาจากแหน ทั้งนี้เนื่องจาก *Actinomadura keratinilytica* T16-1 เป็นแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นเส้นสายและมีการสร้างสปอร์ดังนั้นจึงต้องการแหนเพื่อช่วยในการยึดเกาะซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Panyachanakul et al. (2017) ที่ *Actinomodura keratinilytica* T16-1 ต้องการเส้นใยขัดเป็นวัสดุตรึงที่ดีที่สุดในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLA และเพื่อเป็นแหล่งของสารอาหารซึ่งแหนจะเป็นทั้งแหล่งของคาร์บอนและไนโตรเจน เนื่องจากแหนมีโปรตีนสูง 15-45% โดยเฉพาะกรดอะมิโน Lysine มีอยู่ในปริมาณสูงถึง 10.900 g/ DW และมีกรดอะมิโนหลากหลายชนิดรวมทั้งมีปริมาณแป้ง 3-75% (Bech et al. 2015; Yilmaz et al. 2004) สอดคล้องกับ Bech et al. (2015) ที่เพาะเลี้ยง *Trichoderma asperellum* เพื่อผลิตเอนไซม์ glycoside hydrolase ได้ดีเมื่อเพาะเลี้ยงในแหนมากกว่าอาหารรำข้าวสาลี และอาหาร PDA ในขณะที่กากถั่วเหลืองแม้จะมีทั้งแหล่งของไนโตรเจนและคาร์บอนโดยมีปริมาณโปรตีนสูงถึง 44-49 % และมีแป้งอยู่ 6.3% dry mass (Banaszkiewicz, 2011) แต่ไม่เหมาะสมให้ *Actinomadura keratinilytica* T16-1 ใช้เป็นที่ยึดเกาะสำหรับการเจริญได้ดี สำหรับกากมัน-สำปะหลังจะมีโปรตีนน้อย (1.86%) แต่มีคาร์โบไฮเดรตมาก (79.20%) (Sule et al., 2017) จึงไม่เหมาะสมกับการเจริญและสร้างเอนไซม์โปรติเอสได้ ซึ่งจากการศึกษาของ Lomthong et al. (2017) ในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLA จาก *Laceyella sacchari* LP175 ในอาหารเหลว basal จะใช้กากมันสำปะหลัง (4.64 g/L) และกากถั่วเหลือง (1.53 g/L) เพียงเล็กน้อยเพื่อช่วยส่งเสริมการผลิตเอนไซม์

**5.1.2 วัสดุหมักผสม vermiculite**

จากผลการทดลองหาสัดส่วนวัสดุหมักที่เหมาะสมพบว่าอัตราส่วนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA จากวัสดุหมัก 3 ได้แก่ ถั่วเหลือง กากมันสำปะหลัง และแหน ซึ่งแต่ละ run ของการทดลองจะใช้อัตราส่วนวัสดุหมักแต่ละชนิดต่อ vermiculite เท่ากับ 0.95 : 0.05 ในทั้ง 7 run ที่ความชื้นประมาณ 80 % พบว่าอัตราส่วนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA ได้สูงสุดเท่ากับ 137.09±28.27 U/g DW คือ แหนที่ผสม vermiculite เมื่อนำค่าอัตราส่วนของวัสดุหมักมาทำการทดลองเพื่อทวนสอบ พบว่า ให้ค่าการทวนสอบผลเท่ากับ 67.89±13.68 U/g DW เนื่องจากแหนเป็นวัสดุที่มีทั้งแหล่งของคาร์บอนและไนโตรเจนให้กับจุลินทรีย์แล้วยังช่วยให้จุลินทรีย์ยึดเกาะเพื่อการเจริญได้ดี ดังนั้น vermiculite ที่มีคุณสมบัติช่วยให้จุลินทรีย์ยึดเกาะจุลินทรีย์จึงไม่ต้องการจึงทำให้การผสม vermiculite ลงไปไม่ได้ช่วยให้การผลิตเอนไซม์เพิ่มขึ้น สอดคล้องกับรายงานของ Peñamaría et al. (2017) ที่ศึกษาคัดเลือกจากการคัดเลือกวัสดุค้ำจุนในการหมักแบบแห้งจาก vermiculite กากโกโก้ และแกลบข้าวสาลี เพื่อผลิตเอนไซม์ lipase จาก *Aspergillus niger* พบว่า vermiculite ไม่ช่วยส่งเสริมการผลิตเอนไซม์แต่ แกลบข้าวสาลีให้การผลิตเอนไซม์ lipase ได้สูง

**5.2.2 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเติบโตและผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA ด้วยการหมักแบบแห้งในระดับฟลาสก์โดยใช้การออกแบบการทดลองแบบ one factor at a time**

**5.2.1 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 กรัม ซึ่งใกล้เคียงกับการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLA จาก *Laceyella sacchari* LP175 ในระดับฟลาก์สจะต้องใช้ผง PLLA เท่ากับ 0.31 g/L (Lomthong et al. 2017)

**5.2.2 ความชื้น**

ทำการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA โดยใช้ แหนปริมาณ 10 กรัม และผง PLLA 0.28 g / 10 g of substrate เพื่อศึกษาความชื้นที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ พบว่า การผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด 391.234±25.23 U/g DW ที่ความชื้น 60 % สอดคล้องกับการผลิตเอนไซม์ protease จาก *Engyodontium album* BTMFS10 (Chellappan et al., 2006) และ

*Penicillium godlewskii* SBSS25 (Sindhu et al., 2007) ที่มีความชื้นที่เหมาะสมเท่ากับ 60 % ในการเพาะเลี้ยง ซึ่งความชื้นต้องมีความเหมาะในการลี้ยงเนื่องจากถ้าความชื้นเพิ่มขึ้นจะทำให้ความพรุน (porosity) ของวัสดุหมักลดลงส่งผลให้การถ่ายเทออกซิเจนไม่ดี ในขณะที่ถ้าความชื้นต่ำมากไปจะทำให้การละลายสารอาหารของวัสดุหมักลดลงและการพองตัวของวัสดุหมักลดลงส่งผลให้การผลิตเอนไซม์ลดลง (Sharma et al., 2017)

**5.3 ผลการขยายขนาดกระบวนการหมักเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA**

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยง *Actinomadura keratinilytica* T16-1 ด้วยการนำสภาวะที่เหมาะสมมาขยายนาดการหมักในถังหมักขนาด 600 กรัม ได้แก่ วัสดุหมักแหน PLLA 0.28 g / 10 g of substrate ให้ความชื้นในการหมัก 60 % และบ่มที่อุณหภูมิ 40 °C ให้ค่าการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA 76.06±16.35 U/g DW ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมของการเพาะเลี้ยง *A. keratinilytica* T16-1 เพื่อผลิตเอนไซม์เอนไซม์ย่อยสลาย PLLA จะแตกต่างจากเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเนื่องจากรายงานของ Panyachanakul et al. (2017) ที่รายงานว่าการเพาะเลี้ยง เพาะเลี้ยง *A. keratinilytica* T16-1 อาหารเหลวโดยใช้ถังหมักแบบใบพัดกวนขนาด 5 ลิตร จะใช้อุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 45 °C ทั้งนี้เนื่องจากที่อุณหภูมิสูงจะทำให้ค่าความชื้นในระหว่างการหมักแบบแห้งลดลง จากการทดลองจะเห็นว่าค่าการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA ตำกว่าการผลิตในระดับฟลาสก์ ทั้งนี้เนื่องจากถังหมักแบบถาดยังไม่สามารถควบคุมการให้อากาศได้ดี

## 5.3 ข้อเสนอแนะในการนำผลการวิจัยไปใช้

จากผลการศึกษาวิจัยครั้งนี้พบว่า วัสดุหมักที่เหมาะสมในการหมัก *Actinomadura keratinilytica* T16-1 ด้วยการแบบแห้ง คือ แหน ซึ่งแหนเป็นวัชพืช ดังนั้นการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA จึงเป็นการผลิตที่มีราคาถูก

## 5.4 ข้อเสนอแนะในการทำวิจัยครั้งต่อไป

มีความเป็นไปได้ที่จะนำวัสดุหมักที่ได้ไปใช้ต่อในกระบวนการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพเพื่อให้การย่อยสลายได้เร็วขึ้น

ควรมีการศึกษาการย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์ที่ผลิตได้จากกระบวนการหมักแบบแห้ง