



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การใช้ประโยชน์ทางน้ำยางที่แยกยางสกีมออกเพื่อการผลิต
 เอนไซม์อุตสาหกรรมโดยจุลินทรีย์ด้วยกระบวนการหมักแบบเปิด
 Utilization of non-rubber skim latex for roduction
 of industrial enzymes by microorganisms through
 open fermentation process

โดย

- | | |
|---------------------------------|-------------------|
| 1. รศ. ดร. วิเชียร กิจปรีชาวนิช | ผู้อำนวยการแผนงาน |
| 2. ดร. สุขุมารณ์ สุขชุม | ผู้ร่วมวิจัย |
| 3. ผศ.ดร. จุฑาพร แสงแก้ว | ผู้ร่วมวิจัย |

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

และ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เดือน ตุลาคม 2556

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)

และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การใช้ประโยชน์จากน้ำยางที่แยกยางสกินออกเพื่อการผลิต
 เอนไซม์อุตสาหกรรมโดยจุลินทรีย์ด้วยกระบวนการหมักแบบเปิด

Utilization of non-rubber skim latex for roduction
of industrial enzymes by microorganisms through
open fermentation process

คณะผู้วิจัย

- | | |
|---------------------------------|----------------------------|
| 1. รศ. ดร. วิเชียร กิจปรีชาวนิช | มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ |
| 2. ดร. สุขุมารณ์ สุขชุม | มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ |
| 3. ผศ.ดร. จุฑาพร แสงวงแก้ว | มหาวิทยาลัยขอนแก่น |

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)

และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย วช.-สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณผู้ทรงคุณวุฒิ เป็นอย่างสูงที่ได้ให้คำปรึกษาให้ข้อเสนอแนะตลอดจน
แก้ไขปัญหาต่างๆของแผนงานวิจัย การใช้ประโยชน์ทางน้ำยางที่แยกยางสกีมออกเพื่อการผลิตเอโนไซม์
อุตสาหกรรมโดยจุลินทรีย์ด้วยกระบวนการหมักแบบเปิดจนทำงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และภาควิชาชีววิทยา
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ให้ความอนุเคราะห์และสนับสนุนในการวิจัย

สุดท้ายนี้คณะผู้วิจัยจึงขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยที่ได้มอบทุนอุดหนุนการ
วิจัยประจำปีงบประมาณ 2555-2556 ที่สนับสนุนงบประมาณสำหรับแผนงานวิจัยนี้ให้สำเร็จลุล่วงไป
ด้วยดี

คณะผู้วิจัย

ตุลาคม 2556

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร

ปริมาณหางน้ำย่างที่ได้จากกระบวนการทำให้น้ำย่างเข้มข้นในอุตสาหกรรมนั้นมีปริมาณมาก ซึ่มีหรือหางน้ำย่างที่แยกเนื้ออย่างออกโดยการตกตะกอนด้วยกรดซัลฟูริกจัดว่าเป็นน้ำเสียอย่างหนึ่งที่ได้จากโรงงานผลิตยางพาราซึ่งยังคงมีองค์ประกอบสารอาหารหลายชนิดที่สามารถใช้เป็นอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อการผลิตเอนไซม์ทางอุตสาหกรรม เช่น เอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส และเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลกไทด์ ซึ่งเป็นพลาสติกชีวภาพชนิดหนึ่ง งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหากระบวนการผลิตที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ทั้งสองชนิดโดยใช้หางน้ำย่างที่แยกเนื้ออย่างออกเป็นวัตถุดิบในการหมักแบบไม่ฆ่าเชื้อ (ระบบเปิด) สำหรับการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจาก *Bacillus licheniformis* (KU-K2) เมื่อศึกษาปัจจัยทางโภชนาการและหาค่าที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสในระดับพลาสก์โดยการออกแบบการทดลองทางสถิติที่ใช้ Plackett-Burman design (PB) และ Central Composite Design (CCD) พบว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถผลิตเอนไซม์ได้ 5.09 หน่วยต่อมล ในอาหารหางน้ำย่างที่แยกเนื้ออย่างออกที่ประกอบด้วย skim milk 9.82 กรัมต่อลิตร glucose 0.97 กรัมต่อลิตร K_2HPO_4 0.82 กรัมต่อลิตรเมื่อเพาะเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในถังหมักแบบกวนผสมขนาด 5 ลิตรปริมาตร 2.5 ลิตรด้วยกระบวนการหมัก พบว่าเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ได้ 5.97 หน่วยต่อมล เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่ค่าพีเอชเริ่มต้น 7.0 และควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวนที่ 250 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศเท่ากับ 2.0 ปริมาตรอาหารต่อปริมาตรต่อนาที ส่วนการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลกไทด์จากเชื้อ *Actinomadura keratinolytica* T16-1ที่ใช้แผ่นใยขัด (สก็อตไบร์ท) เป็นวัสดุตั้งในระดับพลาสก์ เมื่อทำการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ พบว่าผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด 35 หน่วยต่อมล ที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 4 วัน ค่าพีเอชเริ่มต้นคือ 7.0 ทำการเขย่าที่ 150 รอบต่อนาทีจากนั้นทำหมักในถังหมักแบบกวนผสมโดยใช้การหมัก พบว่าเชื้อชนิดนี้สามารถผลิตเอนไซม์ได้ 40.5 หน่วยต่อมล ซึ่งคิดเป็นอัตราการผลิต เท่ากับ 0.56 หน่วยต่อมล ต่อชั่วโมง เมื่อใช้อัตราการกวนเท่ากับ 150 รอบต่อนาทีโดยไม่ต้องให้อากาศ เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 วัน เมื่อทำการผลิตเอนไซม์ในถังหมักแบบต่อเนื่อง พบว่าเชื้อสายพันธุ์ T16-1สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด 45 หน่วยต่อมล คิดเป็นอัตราการผลิตเท่ากับ 0.6 หน่วยต่อมล ต่อ ชั่วโมงที่อัตราการไหลเท่ากับ 0.013 ต่อชั่วโมง การศึกษานี้เป็นแนวทางที่ชี้ให้เห็นว่ากระบวนการผลิตเอนไซม์โดยใช้หางน้ำย่างที่แยกยางเป็นวัตถุดิบช่วยลดต้นทุนในการผลิตและเพิ่มคุณค่าของหางน้ำย่างที่เหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมยางพารา

Executive summary

Large quantity of skim latex is obtained from the process of concentrated rubber production by centrifugation of rubber juice. Serum (non rubber skim latex) obtained after precipitation of skim rubber with sulfuric acid is categorized as wastewater which still consist of nutrients for cultivation microorganism to produce industrial enzymes such as alkaline proteases and PLA degrading enzyme. The research aimed to investigate the optimal fermentation process for both enzyme productions using non rubber skim latex as raw material in the non sterile system (open fermentation). To optimize nutritional factors and physical factors on the alkaline protease production by *Bacillus licheniformis* (KU-K2) using serum as basal medium in shaking flask employed Plackett-Burman design (PB) and central composite design (CCD) found that the bacterial strain produced 5.09 U/mL in the non rubber skim latex basal medium consisted of 9.82 g/L skim milk, 0.97 g/L glucose, and 0.82 g/L K_2HPO_4 and 0.12 g/L $CoCl_2$ at 48 h incubation. The maximum activity of 5.97 U/mL was achieved within 48 h cultivation with uncontrolled pH, agitation rate of 250 rpm and an aeration rate of 2.0 vvm in the 5-L stirrer fermenter. For PLA-degrading enzyme production by *Actinomadura keratinilytica* T16-1, 35 U/mL was achieved at 4 days cultivation in basal medium containing 0.035% (w/v) PLA powder and 1% (w/v) scrub pad as a supporter for bacterial cells in shake flask at 150 rpm, temperature at 45°C and pH 7.0. To scale up of the enzyme production, the maximum enzyme production, 40.5 U/mL with 0.56 U/mL/h was achieved in 2L stirrer fermenter by using the agitation speed at 150 rpm without aeration control and cultivated for 3 days. Moreover, the strain T16-1 could produce the enzyme about 45 U/mL with 0.6 U/mL/h under continuous fermentation of dilution of $0.013\ h^{-1}$. This study indicated the tendency of the process for enzyme production from non rubber skim latex as raw material that reduced the cost of production and increased value of agroindustrial waste.

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการผลิตเอนไซม์ทั้งเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสและเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลกไทด์จากแบคทีเรียในระบบเปิดโดยใช้หางน้ำย่างที่แยกยางสกิมเป็นวัตถุดิบ สำหรับการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสนั้น ได้คัดเลือกแบคทีเรีย *Bacillus licheniformis* (KU-K2) ที่สามารถผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสได้สูงเท่ากับ 2.3 หน่วยต่อมิล เมื่อศึกษาปัจจัยทางโภชนาการและค่าที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ในระดับพลาสม์โดยใช้ Plackett-Burman design (PB) และ Central Composite Design (CCD) ผลการคัดกรองปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส พบว่า Skim milk glucose K_2HPO_4 และ $CoCl_2$ มีผลต่อการผลิตอย่างมีนัยสำคัญ และจากการศึกษาด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนองของปัจจัยที่มีนัยสำคัญทั้ง 4 พบว่าองค์ประกอบของอาหารที่เหมาะสมนั้นให้ค่ากิจกรรมเท่ากับ 5.09 หน่วยต่อมิล ซึ่งประกอบด้วย skim milk 9.82 กรัมต่อลิตร glucose 0.97 กรัมต่อลิตร K_2HPO_4 0.82 กรัมต่อลิตร พบว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถผลิตเอนไซม์ได้ 5.97 หน่วยต่อมิล เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในถังหมักแบบกวนผสมขนาด 5 ลิตร ปริมาตร 2.5 ลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่ค่าพีเอชเริ่มต้น 7.0 โดยไม่ควบคุมพีเอช และควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวนที่ 250 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศเท่ากับ 2.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรต่อหน้าที่ พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ให้ค่ากิจกรรมสูงสุดที่พีเอชและอุณหภูมิเท่ากับ 10.0 และ 60.0 องศาเซลเซียสตามลำดับ และเอนไซม์ดังกล่าวถูกยับยั้งด้วย 10 mM Zn^{2+} 10 mM Fe^{3+} และ 10 mM Hg^{2+}

การผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลกไทด์จากเชื้อ *Actinomadura keratinilytica* T16-1 ที่ใช้แผ่นใยขัด (สก็อตไบร์ท) เป็นวัสดุตั้งในระดับพลาสม์ พบว่าผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด 35 หน่วยต่อมิล เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อโดยใช้หางน้ำย่างที่แยกยางสกิมซึ่งผสม basal medium ที่ซึ่งประกอบด้วย PLA 0.35 กรัมต่อลิตร, เจลาติน 2.38 กรัมต่อลิตร, $(NH_4)_2SO_4$ 4.0 กรัมต่อลิตร, K_2HPO_4 4.0 กรัมต่อลิตร, KH_2PO_4 2.0 กรัมต่อลิตร และ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 กรัมต่อลิตร และใช้ 1% (w/v) แผ่นใยขัดเป็นวัสดุตั้งในระดับพลาสม์ ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ค่าพีเอชเริ่มต้นคือ 7.0 ทำการเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที จากนั้นทำการขยายขนาดการผลิตเป็น 2 ลิตร ในถังหมักแบบกวนผสมขนาด 5 ลิตร โดยใช้การหมักแบบเปิด พบว่าเชื้อชนิดนี้สามารถผลิตเอนไซม์ได้ 40.5 หน่วยต่อมิล เมื่อใช้อัตราการกวนเท่ากับ 150 รอบต่อนาทีโดยไม่ต้องให้อากาศเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 วัน นอกจากนี้เมื่อทำการผลิตเอนไซม์ในถังหมักแบบต่อเนื่องพบว่าเชื้อสายพันธุ์ T16-1 สามารถผลิตเอนไซม์ได้คงที่สูงสุด 45 หน่วยต่อมิล คิดเป็น อัตราการผลิตเท่ากับ 0.6 หน่วยต่อมิล ต่อ ชั่วโมง ที่อัตราการไหล เท่ากับ 0.013 ต่อ ชั่วโมง

Abstract

This research is to study the open fermentation process for alkaline protease and PLA degrading enzyme production by bacteria using non rubber skim latex as raw material. For alkaline protease production, *Bacillus licheniformis* (KU-K2) was selected as a potent strain that was able to produce 2.3 U/mL in the non rubber skim latex basal medium. To optimize nutritional factors and physical factors on the alkaline protease production using serum as basal medium in shaking flask employed Plackett-Burman design (PB) and central composite design (CCD) found that skim milk, glucose, K_2HPO_4 and $CoCl_2$ were significant fermentation parameters. The maximum activity of 5.09 U/mL was achieved within 48 h cultivation in the basal medium consisted of 9.82 g/L skim milk, 0.97 g/L glucose, 0.82 g/L K_2HPO_4 and 0.12 g/L $CoCl_2$. The maximum activity of 5.97 U/mL was achieved within 48 h cultivation with uncontrolled pH, agitation rate of 250 rpm and an aeration rate of 2.0 vvm in the 5-L stirrer fermenter. The optimal pH and temperature for alkaline protease activity were 10.0 and 60°C, respectively. The alkaline protease retained its activity over wide ranges of pH (9-12) and temperature up to 60°C. The crude alkaline protease was strongly inhibited by 10 mM Zn^{2+} , 10 mM Fe^{3+} and 10 mM Hg^{2+} .

PLA-degrading enzyme production by *Actinomadura keratinolytica* T16-1 was investigated using non-rubber skim latex as a nutrient and mineral sources. PLA-degrading activity, 35 U/mL was achieved in the basal medium containing 0.035% PLA, 0.238% gelatin, 0.4% $(NH_4)_2SO_4$, 0.4% K_2HPO_4 , 0.2% KH_2PO_4 and 0.02% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ and 1% (w/v) scrub pad as a supporter for bacterial cells in shake flask at 150 rpm at temperature of 45°C, pH 7.0, shaking at 4 days cultivation. The maximum enzyme production, 40.5 U/mL with 0.56 U/mL/h was achieved 2L stirrer fermenter by using the agitation speed at 150 rpm without aeration control and cultivated for 3 days. Moreover, the strain T16-1 could produce the enzyme about 45 U/mL with 0.6 U/mL/h under continuous fermentation of dilution of $0.013\ h^{-1}$.

คำสำคัญ (Key words)

ภาษาไทย: การใช้ประโยชน์ทางน้ำยางที่แยกยางสกิน, เอนไซม์อุตสาหกรรม, กระบวนการหมักแบบเปิด, เอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส, เอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลกไทด์

ภาษาอังกฤษ: Utilization of non-rubber skim latex, industrial enzymes, open fermentation, alkaline protease enzyme, PLA degrading enzyme

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทสรุปสำหรับผู้บริหาร	ข
บทคัดย่อแผนงานวิจัย	ง
คำสำคัญ	ฉ
เนื้อหางานวิจัย(รวม)	ิ
1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา	ii
2. วัตถุประสงค์	ii
3. ทางเลือกและแนวทางการแก้ปัญหา/กรอบแนวคิดของการวิจัย	ii
4. แนวทางการดำเนินการวิจัย	v
5. ผลการดำเนินงานวิจัย และการวิจารณ์ผล	vi
โครงการย่อยที่ 1 การใช้ประโยชน์จากหางน้ำยางเพื่อผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส โดย Bacillus สายพันธุ์ทนร้อนด้วยกระบวนการหมักแบบเปิด	
บทคัดย่อ	2
เนื้อหางานวิจัย	5
1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา	5
2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย	6
3. ทางเลือกและแนวทางการแก้ปัญหา/กรอบแนวคิดของการวิจัย	6
4. แนวทางการดำเนินการวิจัย	9
4.1 เชื้อจุลินทรีย์	9
4.2 การคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียที่มีความสามารถ	10
ในการย่อยโปรตีนโดยเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส	
4.3 การระบุชนิดของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิต	13
เอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส	
4.4. ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส	12
โดยใช้วิธี Plackett-Burman design	

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

4.5 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส	14
โดยวางแผนการทดลองแบบ Central composite design (CCD)	
และวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยวิธีพื้นผิวตอบสนอง (RSM)	
4.6 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส	15
ในถังหมักขนาด 2.5 ลิตรในการหมักแบบเปิด	
4.7 การศึกษาสมบัติของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส	15
5. ผลการวิจัยและอภิปรายผล	18
5.1 การคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อย	18
โปรตีนโดยเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส	
5.2 การบ่งชนิดแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์	19
อัลคาไลน์โปรติเอส	
5.3 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสโดย	21
ใช้วิธี Plackett-Burman design	
5.4 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส	23
โดยวางแผนการทดลองแบบ Central composite design (CCD)	
และวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยวิธีพื้นผิวตอบสนอง (RSM)	
5.5 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส	28
ในถังหมักขนาด 5.0 ลิตรในการหมักแบบเปิด	
5.6 ศึกษาสมบัติของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส	30
6. สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	37
โครงการย่อยที่ 2 การใช้ประโยชน์จากน้ำยางที่แยกจากสกิมออกเพื่อการผลิตเอนไซม์	43
ย่อยสลายพอลิแลกไทด์จากเชื้อแอคติโนมัยซิสโดยใช้กระบวนการหมักแบบเปิด	
บทคัดย่อ	44
เนื้อหางานวิจัย	47
1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา	47
2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย	48
3. ทางเลือกและแนวทางการแก้ปัญหา/กรอบแนวคิดของการวิจัย	48

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

	หน้า
4. แนวทางการดำเนินการวิจัย	51
4.1 การเตรียมน้ำยางที่แยกจากสกิมและการศึกษาลักษณะ	51
ของทางน้ำยาง ทางน้ำยางที่แยกจากสกิม และทางน้ำยางที่ผ่าน	
กระบวนการหมัก	
4.2 การศึกษาการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลกไทด์แบบต่อเนื่อง	53

5. ผลการดำเนินงานวิจัย และการวิจารณ์ผล	54
5.1 การศึกษาลักษณะของหางน้ำยาง และหางน้ำยางที่แยกยางสกิม	54
5.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย	55
พอลิแลกไทด์ระดับฟลาस्कโดยใช้หางน้ำยางที่แยกยางสกิมเป็น	
วัตถุดิบด้วยกระบวนการหมักแบบเปิด	
5.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์	59
ย่อยสลายพอลิแลกไทด์ในถังหมักแบบไบโอดิกวน ขนาด 2 ลิตร	
5.4 การศึกษาการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลกไทด์แบบต่อเนื่อง	61
ในถังหมักแบบไบโอดิกวน ขนาด 2 ลิตร	
5.5 การศึกษาคุณสมบัติของหางน้ำยางที่ผ่านกระบวนการหมัก	62
6. สรุปผลการวิจัย	63
7. ภาคผนวก	66

สารบัญตาราง (List of Tables)

	หน้า
ตารางที่ 1.1 สมบัติของหางน้ำยางและหางน้ำยางที่ผ่านการแยกเอายางด้วยด้วยไคโดซาน	ii
ตารางที่ 1.2 คุณภาพน้ำทิ้งหลังกระบวนการจับตัวน้ำยางสกิมด้วยสาร GRASS และกรดซัลฟูริก	iv
ตารางที่ 1.3 สมบัติของหางน้ำยางและหางน้ำยางที่แยกยางสกิม	vi
ตารางที่ 1.4 ความสามารถของเชื้อแบคทีเรียในการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนบนอาหารวุ้น skim milk	9
ตารางที่ 1.5 การกำหนดระดับต่ำสุด และ สูงสุดของชนิดสารอาหารและปัจจัยที่ศึกษาเพื่อใช้แผนการทดลองแบบ Plackett-Burman	13
ตารางที่ 1.6 แบบการทดลองในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสโดยใช้แผนการทดลอง Plackett-Burman	13
ตารางที่ 1.7 การกำหนดระดับของแต่ละปัจจัยที่ศึกษาโดยการวางแผนการทดลองแบบ Central composite design (CCD) เพื่อหาจุดที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส	14
ตารางที่ 1.8 สมบัติทางชีวเคมีของ <i>B. licheniformis</i> และ <i>Bacillus</i> สายพันธุ์ KU-K2	20
ตารางที่ 1.9 ผลการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสของเชื้อแบคทีเรีย <i>B. licheniformis</i> (KU-K2) ในแต่ละการทดลอง	21
ตารางที่ 1.10 ผลวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้วิธี Plackett-Burman ออกแบบการทดลองต่อการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจากเชื้อแบคทีเรีย <i>B. licheniformis</i> KU-K2	22
ตารางที่ 1.11 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสนำมากำหนดระดับของปัจจัยเพื่อหาจุดที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส	23
ตารางที่ 1.12 กิจกรรมเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสที่ได้จากการทดลองและการคำนวณในแต่ละการทดลอง	24
ตารางที่ 1.13 แสดงวัตถุดิบและต้นในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส 1 ลิตร	27
ตารางที่ 1.14 อุณหภูมิที่เหมาะสมและความคงตัวของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส	30
ตารางที่ 1.15 พีเอชที่เหมาะสมและความคงตัวของพีเอชต่อเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส	33
ตารางที่ 1.16 ผลของสารเคมีต่อกิจกรรมเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส	34

สารบัญตาราง (ต่อ)

	หน้า
ตารางที่ 1.17 ปริมาณไทโรซีนที่เกิดขึ้นหลังจากการย่อยสลายโปรตีนออกจากน้ำยางด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส	35
ตารางที่ 2.1 แสดงคุณสมบัติของหางน้ำยางและหางน้ำยางที่แยกยางสกิม	55

ตารางที่ 2.2 แสดงลักษณะของหางน้ำยาง หางน้ำยางที่แยกยางสกิม และหางน้ำยางที่
แยกยางสกิมหลังจากผ่านกระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง

63

สารบัญภาพ (List of illustration)

	หน้า
ภาพที่ 1.1 ขั้นตอนการผลิตน้ำยางข้นและยางสกิม	5
ภาพที่ 1.2 การเตรียม Serum ที่ใช้เป็น basal medium เพื่อผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส	11
ภาพที่ 1.3 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสของเชื้อทั้ง 26 ไอโซเลท ที่พีเอช 7.0 และ พีเอช 9.0	18
ภาพที่ 1.4 ลักษณะของเซลล์แบคทีเรียสายพันธุ์ KU-K2 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง	19
ภาพที่ 1.5 ต้นไม้ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแบคทีเรีย สายพันธุ์ KU-K2	19
ภาพที่ 1.6 กราฟพื้นผิวตอบสนอง และคอนทัวร์แสดงปฏิสัมพันธ์ระหว่างปัจจัย A: Glucose และ skim milk B: Glucose และ K_2HPO_4 C: Skim milk และ K_2HPO_4	25

ภาพที่ 1.7 กราฟพื้นผิวตอบสนอง และคอนทัวร์ของปฏิสัมพันธ์ระหว่างปัจจัย	26
A: Skim milk และ $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ B: Glucose และ $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ C: K_2HPO_4 และ $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	
ภาพที่ 1.8 กิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสที่ระยะเวลาต่างๆ	28
ภายใต้สภาวะการให้อากาศ 1.0 vvm และอัตราการกวน 250 รอบต่อนาที	
ภาพที่ 1.9 กิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสที่ระยะเวลาต่างๆ	29
ภายใต้สภาวะการให้อากาศ 2.0 vvm และอัตราการกวน 250 รอบต่อนาที	
ภาพที่ 1.10 กิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสที่ระยะเวลาต่างๆ	29
ภายใต้สภาวะการให้อากาศ 1.0 vvm และอัตราการกวน 350 รอบต่อนาที	
ภาพที่ 1.11 กิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสที่ระยะเวลาต่างๆ	30
ภายใต้สภาวะการให้อากาศ 2.0 vvm และอัตราการกวน 350 รอบต่อนาที	
ภาพที่ 1.12 อุณหภูมิที่เหมาะสม และความคงตัวของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส	32
ภาพที่ 1.13 พีเอชที่เหมาะสม และความคงตัวของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส	33
ภาพที่ 1.14 ปริมาณไทโรซีนที่เกิดขึ้นภายหลังจากการย่อยสลายโปรตีนออกจากน้ำยาง	36
ด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส	
ภาพที่ 2.1 กระบวนการผลิตน้ำยางข้น	49
ภาพที่ 2.2 แผนภาพแสดงการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแล็กไทด์แบบต่อเนื่อง	54
ด้วยกระบวนการหมักแบบเปิด	
ภาพที่ 2.3 แสดงระยะเวลาในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแล็กไทด์จากเชื้อ	56
<i>Actinomadura keratinolytica</i> สายพันธุ์ T16-1	

สารบัญภาพ (ต่อ)

	หน้า
ภาพที่ 2.4 แสดงผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแล็กไทด์	57
ภาพที่ 2.5 แสดงผลของค่าพีเอชต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแล็กไทด์	58
ภาพที่ 2.6 แสดงผลของไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแล็กไทด์	58
ภาพที่ 2.7 แสดงระยะเวลาที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์ในถังหมักแบบ stirrer ขนาด 2 ลิตร	60
ภาพที่ 2.8 แสดงผลของอัตราการกวนที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์	60
ภาพที่ 2.9 แสดงการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแล็กไทด์ด้วยการหมักแบบต่อเนื่อง	62

เนื้อหางานวิจัย (รวม)

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

น้ำยางประกอบด้วยปริมาณของแข็งทั้งหมด 22-48% ซึ่งประกอบด้วย ปริมาณเนื้อยางแห้ง 25-45% สารจำพวกโปรตีน 1.5 % สารพวกเรซิน 2.0 % คาร์โบไฮเดรต 1.0 % และสารอนินทรีย์ 0.5 % น้ำยางที่ได้จากการกรีดยางซึ่งส่วนใหญ่จะเติมแอมโมเนียเพื่อรักษาสภาพน้ำยางแต่เนื่องจากองค์ประกอบส่วนใหญ่ของน้ำยางสด คือ น้ำ ซึ่งมีประมาณ 50-80 เปอร์เซ็นต์และมีเนื้อยางเพียง 20-45 เปอร์เซ็นต์ทำให้น้ำยางสดไม่เหมาะจะนำไปผลิตเป็นผลิตภัณฑ์และไม่นิยมนขนส่งน้ำยางในรูปน้ำยางสดเนื่องจากสิ้นเปลืองค่าขนส่งในปัจจุบันได้มีการพัฒนาและส่งเสริมอุตสาหกรรมน้ำยางชั้น โดยทั่วไปน้ำยางสดจะถูกนำไปผ่านกระบวนการปั่นเหวี่ยงให้ได้น้ำยางชั้นที่มีเนื้อยางประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ ก่อนจะนำไปใช้ผลิตเป็นผลิตภัณฑ์หรือขนส่งส่วนน้ำที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงเรียกว่าหางน้ำยาง (skim latex) นั้นมีปริมาณมากถึง 1 ล้านตันต่อปีโรงงานส่วนมาก ยังนำหางน้ำยางมาผลิตยางสกิม โดยการตะกอนหางน้ำยางด้วยกรดซัลฟิวริกหรือสารเคมี ทำให้อย่างตกตะกอนแยกออกจากของเหลว ส่วนใสที่ยางสกิมแยกตัวออกที่เรียกว่า ซีรัม ซึ่งจะมีปริมาณ 580 มิลลิลิตรจากน้ำยาง 1 กิโลกรัมดังนั้นคิดเป็นปริมาณซีรัมที่เกิดขึ้น ประมาณ 5.8 แสนตันต่อปีซีรัมนี้ซึ่งมียังมีคุณค่าทางอาหาร คือมีปริมาณน้ำตาลและโปรตีน และมีค่า BOD 570-13,463 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่า COD ระหว่าง 672-23,300 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังนั้นหากซีรัมซึ่งเป็นส่วนน้ำเหลือทิ้ง ที่หากปล่อยทิ้งในแหล่งธรรมชาติจะเกิดการบูดเน่า โปรตีนส่วนนี้จะสลายตัวให้สารประกอบพวกไฮโดรเจนซัลไฟด์และสารเมอร์แคปแทนทำให้มีกลิ่นเหม็นเนื่องจากโปรตีนมีกำมะถันอยู่ประมาณ 5% ดังนั้นแผนงานวิจัยจึงมีแนวคิดที่จะนำ “ซีรัม”(น้ำทิ้ง) ที่เป็นส่วนที่เป็นหางน้ำยางที่ได้แยกยางสกิมออก”ไปใช้ประโยชน์ ทั้งนี้เนื่องจากส่วนนี้ยังมีสารอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อผลิตสารเคมีที่มีมูลค่าและเป็นประโยชน์ซึ่งนอกจากเป็นการเพิ่มมูลค่ากับวัสดุเหลือทิ้งแล้วยังช่วยลดการปล่อยน้ำเหลือใช้ลงสู่แหล่งธรรมชาติอันจะก่อให้เกิดมลภาวะกับสิ่งแวดล้อมอีกด้วย ผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์ในกลุ่มเอนไซม์อุตสาหกรรม ได้แก่ เอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส (alkaline protease) เป็นเอนไซม์ที่มีมูลค่าทางการค้าสูงและมีความสำคัญทางอุตสาหกรรมหลายชนิด เช่น ผงซักฟอก อาหาร ยาเครื่องหนัง ผ้าไหม และ การกู้คืนโลหะเงินจากฟิล์มเอ็กซีเรย์ที่ใช้แล้ว (Gupta *et al.*, 2002) สำหรับประเทศไทยหากสามารถผลิตโปรติเอสมาใช้ในสารซักล้างได้ในประเทศจะช่วยลดปริมาณการนำเข้าโปรติเอสได้โดยในปัจจุบันประเทศไทยมีการนำเข้าเอนไซม์มากกว่า 700 ล้านบาทต่อปีจุลินทรีย์เป็นแหล่งที่เหมาะสมในการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสในปริมาณมากและสกัดได้ง่ายเนื่องจากผลิตส่งออกนอกเซลล์ นอกจากนั้นเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายพอลิแลกไทด์เป็น

เอนไซม์ที่น่าสนใจที่จะไปเร่งการย่อยสลายพลาสติกพอลิแลกไทด์ที่กำลังจะมีการใช้อย่างมากซึ่งจะลดมลภาวะทางสิ่งแวดล้อมได้และยังใช้เป็นวิธีการตรวจสอบมาตรฐานพลาสติกในกลุ่มนี้ได้รวดเร็ว

แบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* เป็นแบคทีเรียที่สามารถในการผลิตเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนได้ ซึ่งได้แยกและเก็บรักษาในห้องปฏิบัติการของคณะวิจัย (Talak *et al*, 2012) และ แอคติโนมัยซีท *Actinomadura keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1 เป็นเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลกไทด์ได้สูงซึ่งทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูง (Sukhumet *et al*, 2009) ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจศึกษาวิจัยกระบวนการหมักด้วยแบคทีเรีย กลุ่ม *Bacillus* และ แอคติโนมัยซีท *A. keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1 โดยใช้หางน้ำยางที่เป็นส่วนใสซึ่งได้แยกจากยางสกีมออกแล้ว ไปใช้ประโยชน์โดยเป็นวัตถุดิบเพื่อการผลิตเอนไซม์ดังกล่าวทั้งสองชนิดซึ่งเป็นการสร้างมูลค่าเพิ่มและลดค่าใช้จ่ายในการบำบัดน้ำเสีย หรือทดแทนการปล่อยน้ำทิ้งสู่ธรรมชาติที่สร้างมลพิษกับสิ่งแวดล้อม

2. วัตถุประสงค์

เพื่อหากระบวนการหมักแบบเปิดโดยใช้ส่วนที่เป็นน้ำที่แยกจากยางสกีมซึ่งเป็นน้ำเหลือทิ้งที่ผ่านกระบวนการผลิตยางสกีมเป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตเอนไซม์อัลคาไลโอโปรติเอสและเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลกไทด์

3. ทางเลือกและแนวทางการแก้ปัญหา/กรอบแนวคิดของการวิจัย

ในปัจจุบันนี้อุตสาหกรรมผลิตน้ำยางแบบข้นได้มีการพัฒนาและมีเทคโนโลยีการผลิตสะอาดสำหรับอุตสาหกรรมน้ำยางข้นน้ำยางสดจะถูกนำไปผ่านกระบวนการปั่นเหวี่ยงให้ได้น้ำยางข้นที่มีเนื้อยางประมาณ 60 เปอร์เซนต์ก่อนจะนำไปใช้ผลิตเป็นผลิตภัณฑ์หรือขนส่ง ส่วนน้ำที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงเรียกว่าหางน้ำยาง (skim latex) นั้นมีปริมาณมาก กล่าวคือน้ำยางสดทุกๆ 100 กรัมจะได้น้ำทิ้ง 50 กรัม ซึ่งน้ำทิ้งนี้ยังมีคุณค่าทางอาหาร คือมีปริมาณน้ำตาลและโปรตีน ปริมาณแอมโมเนีย เล็กน้อยดังแสดงในตารางที่ 1.1 และมีเนื้อยางเหลืออยู่ประมาณ 5%

ตารางที่ 1.1 สมบัติของหางน้ำยางและหางน้ำยางที่ผ่านการแยกเอายางด้วยด้วยไคโตซาน

Samples	พารามิเตอร์ (mg/L)						
	BOD	COD	TKN	NH ₃	Organic-N	SS	pH
Skim latex	34,500	147,260	9,000	1,770	7,230	4,756	9.5
1.2% chitosan							
in 1.5%acetic acid solution	7,500	28,486	1,982	566	1,416	500	6.0

ในปัจจุบันมีการนำยางในหางน้ำยางกลับมาใช้ประโยชน์เช่น การใช้เยื่อกรองแบบพันทาง (นฤมล , 2552) การใช้กรดซัลฟูริกช่วยในการจับตัวของหางน้ำยาง กระบวนการนี้นอกจากจะต้องเสียค่าใช้จ่ายจากการใช้ปริมาณกรดซัลฟูริกแล้ว ยางที่ได้ไม่ได้มาตรฐาน โดยยางเปื่อยและเสื่อมง่ายและน้ำทิ้งที่เกิดจากการจับตัวมีผลเสียต่อระบบบำบัดน้ำเสียเนื่องจากมีปริมาณซัลเฟตมากซึ่งทำให้เกิดก๊าซไข่เน่าซึ่งมีมลพิษทางกลิ่น แต่ในปัจจุบันได้มีการใช้ ไคโตซาน (chitosan) หรือ พอลิอะคริลาไมด์ (polyacrylamide) มาตกตะกอนแยกเอายางออกได้ถึง 80% เช่นเดียวกับการใช้กรดซัลฟูริกแต่ไม่ก่อให้เกิดมลพิษ (Danwanichakul, 2011; Werathirachot, 2008) และสามารถลดความเน่าเสียได้ชัดเจนดังแสดงในตารางที่ 1.1 นอกจากนั้นห้องปฏิบัติการยางศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ ได้พัฒนาโดยใช้ สารเคมีที่เรียกว่า GRASS แทนการใช้กรดกำมะถันในการแยกยางสกีมออก และคุณภาพน้ำทิ้งที่เรียกว่า ซีรัมนั้นได้แสดงในตารางที่ 1.2 ซึ่งชี้ให้เห็นว่าในแง่ความสกปรกไม่แตกต่างกัน ยกเว้น ปริมาณสารแขวนลอย ซัลเฟตและความเป็นกรดต่าง จากการวิเคราะห์คุณภาพของซีรัมจะเห็นได้ว่าหากมีปลดปล่อยลงสู่ธรรมชาติจะมีผลเสียต่อสิ่งแวดล้อมหากไม่ได้มีการกำจัด และยังชี้ให้น้ำทิ้งนี้มีสารอาหารที่สามารถจะนำไปใช้ประโยชน์การผลิตเอนไซม์โปรติเอสซึ่งเอนไซม์อัลคาไลด์โปรติเอสเป็นหนึ่งในเอนไซม์ที่สำคัญที่สุดในอุตสาหกรรมและการประยุกต์ใช้ที่แตกต่างกัน

ตารางที่ 1.2 คุณภาพน้ำทิ้งหลังกระบวนการจับตัวน้ำยางสกิมด้วยสาร GRASS และกรดซัลฟูริก

ดัชนีน้ำทิ้ง	สารจับตัวน้ำยางสกิม		
	GRASS0.1	GRASS0.2	กรดซัลฟูริก
COD (mg/L)	17,280	17,280	17,579
BOD (mg/L)	10,580	10,340	10,515
Total dissolved solid (mg/L)	24,780	24,600	24,700
Total soluble solid (mg/L)	100	140	510
Sulfate (mg/L)	8,467	5,451	8,210
pH	4.5	6.6	4.5

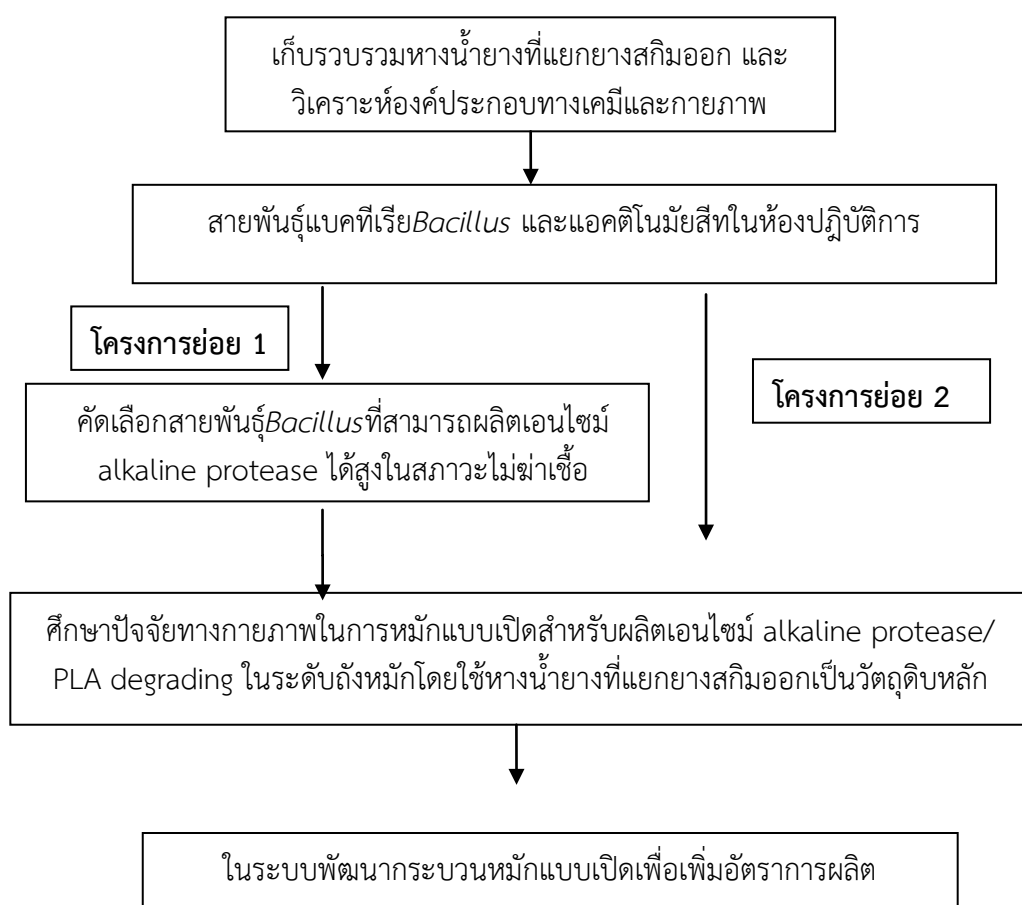
ที่มา : ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ

สำหรับประเทศไทยหากสามารถผลิตโปรตีนเอสมาใช้ในสารชักล้างได้ภายในประเทศจะช่วยลดปริมาณการนำเข้าโปรตีนเอสได้โดยในปัจจุบันประเทศไทยมีการนำเข้าเอนไซม์มากกว่า 700 ล้านบาทต่อปี จุลินทรีย์เป็นแหล่งที่เหมาะสมในการผลิตอัลคาไลน์โปรตีนเอสในปริมาณมากและสกัดได้ง่ายเนื่องจากผลิตแล้วส่งออกภายนอกเซลล์คณะวิจัยได้แยก *Bacillus* และ แอคติโนมัยซีทซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนและเอนไซม์ย่อย PLA ได้ตามลำดับ และเก็บรักษาในห้องปฏิบัติการของคณะวิจัย

Talak *et al.*(2012) ได้แยกแบคทีเรียที่ความสามารถในการส่งเสริมการเติบโตของข้าวโพดจำนวน 26 สายพันธุ์ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่เติบโตที่อุณหภูมิ 40-50 °C และสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนได้ ส่วน Sukkhum *et al.*(2009)ได้แยกและคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทชอบร้อน *A. keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1 เป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากตัวอย่างดินในประเทศไทย และสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลกไทด์ได้สูงที่อุณหภูมิ 45 °C เมื่อทำการศึกษสมบัติของเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลกไทด์พบว่าเอนไซม์ serine protease สามารถย่อย เคซีน เจลาติน ที่ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 70°C พีเอช 10 ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงจะได้คัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ทนร้อนซึ่งได้เชื้อในกลุ่ม *Bacillus* และเชื้อในกลุ่มแอคติโนมัยซีท *A. keratinilytica* ที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อย PLA ในอาหารที่ใช้ทางน้ำยางที่แยกยางสกิมออกเป็นวัตถุดิบหลัก ณ อุณหภูมิสูง (40-50 °C) ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เชื้อชนิดอื่นไม่สามารถเติบโตได้ ดังนั้นจึงทำให้สามารถหมักได้ในสภาวะเปิดที่ไม่จำเป็นต้องกำจัดเชื้อโดยใช้หัวเชื้อในปริมาณสูง การศึกษานี้จึงได้กระบวนการหมักแบบเปิดโดยใช้ทางน้ำยางที่แยกยางสกิมออกเป็นวัตถุดิบหลัก

สำหรับการผลิตเอนไซม์โดยกระบวนการหมักแบบเปิดสามารถ ลดต้นทุนการทำให้ปลอดเชื้อซึ่งจะต้องใช้ความร้อนในการกำจัดเชื้อก่อนหมักซึ่งในปัจจุบันยังไม่มีรายงานการหมักแบบเปิดเพื่อผลิตเอนไซม์มาก่อน การศึกษานี้จะศึกษาในระดับถึงหมักเพื่อหาปัจจัยโภชนาการที่จำเป็นต่อการผลิตเอนไซม์โดยใช้ทางน้ำยางหลักจากการผลิตยางสกีเป็นวัตถุดิบหลัก และ ศึกษาปัจจัยทางกายภาพในระดับถึงหมักเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์นอกจากยังได้มีการศึกษาพัฒนากระบวนการหมักแบบต่อเนื่องเพื่อเพิ่มอัตราการผลิต

4. แนวทางการดำเนินการวิจัย



5. ผลการดำเนินงานวิจัย และการวิจารณ์ผล

ผลสมบัติของหางน้ำยาง และหางน้ำยางที่แยกยางสกิม

จากการศึกษาสมบัติของหางน้ำยาง และหางน้ำยางที่แยกยางสกิมจากตารางที่ 1.3 พบว่า ลักษณะต่างๆของหางน้ำยางที่ทำการทดสอบมีค่าสูงกว่าหางน้ำยางที่แยกยางสกิม เช่น ค่า BOD, TKN ปริมาณโปรตีน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เป็นต้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่าหลังจากทำการตกตะกอนยางด้วยกรด H_2SO_4 ทำให้คุณสมบัติต่างๆของหางน้ำยางลดลงซึ่งเป็นผลมาจากการใช้กรด ทำให้โปรตีนเสียสภาพ เนื่องจากค่าพีเอชต่ำประมาณ 2-3 และโปรตีนต่างๆส่วนใหญ่จะยึดเกาะกับส่วนของ rubber ทำให้การตกตะกอนแยก rubber ออกมีผลให้ปริมาณสารต่างๆโดยเฉพาะโปรตีนลดลง จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าหางน้ำยางที่แยกยางสกิมนั้นมีคุณสมบัติต่างๆที่น้อยกว่าหางน้ำยางเช่นกันเมื่อใช้วิธีการตกตะกอนยางด้วยวิธีต่างๆ เช่นการใช้ 1.2% chitosan ในสารละลาย 1.5% acetic acid เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามจากตารางที่ 1 พบว่าหางน้ำยางที่แยกยางสกิมออกยังคงมีสมบัติที่ดีในการนำมาใช้ให้เกิดประโยชน์ โดยการนำมาใช้เป็นแหล่งสารอาหารเสริมในการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อผลิตเอนไซม์ที่สำคัญทางอุตสาหกรรมเช่นเอนไซม์ โปรติเอส และเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลกไทด์ได้

ตารางที่ 1.3 สมบัติของหางน้ำยางและหางน้ำยางที่แยกยางสกิม

Parameter	Skim latex	Non-rubber skim latex
COD (mg/L)	91,775	18,456
BOD (mg/L)	62,000	12,825
TKN (mg/L)	4,953	2,680
Ammonia Nitrogen (mg/L)	3,217	2,111
Zinc (mg/L)	144	71
Protein concentration (mg/L)	831	531
Reducing sugar (mg/L)	1,197	16
pH	11-12	2-3

จากตารางสามารถสรุปได้ว่าหางน้ำยางที่แยกยางสกิม มีสมบัติที่ดีสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตเอนไซม์ที่สำคัญต่างๆได้ดี ซึ่งจากแผนงานวิจัยได้แบ่งงานวิจัยย่อยออกเป็น 2 กลุ่มด้วยกันคือ

การศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอส และเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลกไทด์ เพื่อเป็นแนวทางในการนำไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

ผลการใช้ประโยชน์จากหางน้ำยางเพื่อผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสโดย *Bacillus* สายพันธุ์ทนร้อนด้วยกระบวนการหมักแบบเปิด

การผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจาก *Bacillus licheniformis* (KU-K2) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่คัดเลือกจากโครงการวิจัยนี้เป็นสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสได้ดีที่สุดเมื่อใช้หางน้ำยางที่แยกยางสกิมเป็นวัตถุดิบที่เติมหางน้ำนม เมื่อศึกษาปัจจัยทางโภชนาการและค่าที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสในระดับฟลasks โดยการออกแบบการทดลองทางสถิติที่ใช้ Plackett-Burman design (PB) และ Central Composite Design (CCD) พบว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถผลิตเอนไซม์ได้ 5.09 หน่วยต่อมล ในอาหารหางน้ำยางที่แยกเนื้อเยื่อออกที่ประกอบด้วย skim milk 9.82 กรัมต่อลิตร glucose 0.97 กรัมต่อลิตร K_2HPO_4 0.82 กรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในถังหมักแบบกวนผสมขนาด 5 ลิตร ปริมาตร 2.5 ลิตร ด้วยกระบวนการหมัก พบว่าเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ได้ 5.97 หน่วยต่อมล เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่ค่าพีเอชเริ่มต้น 7.0 โดยไม่ควบคุมพีเอช และควบคุมอุณหภูมิ 37 อัตราการกวนที่ 250 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศเท่ากับ 2.0 ปริมาตรอาหารต่อปริมาตรต่อนาที

ผลการใช้ประโยชน์หางน้ำยางที่แยกยางสกิมออกเพื่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลกไทด์จากเชื้อแอคติโนมัยซิส โดยใช้กระบวนการหมักแบบเปิด

การผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลกไทด์จากเชื้อ *Actinomadura keratinolytica* T16-1 ที่ใช้แผ่นใยขัด (สก็อตไบร์ท) เป็นวัสดุตั้งในระดับฟลasks เมื่อทำการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ พบว่าผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด 35 หน่วยต่อมล ที่อุณหภูมิ 45 เป็นเวลา 4 วัน ค่าพีเอชเริ่มต้นคือ 7.0 ทำการเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย หางน้ำยางที่แยกยางสกิมซึ่งผสม basal medium ซึ่งประกอบด้วย PLA 0.35 กรัมต่อลิตร, เจลาติน 2.38 กรัมต่อลิตร, $NH_4)_2SO_4$ 4.0 กรัมต่อลิตร, K_2HPO_4 4.0 กรัมต่อลิตร, KH_2PO_4 2.0 กรัมต่อลิตร และ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 กรัมต่อลิตร จากนั้นทำหมักในถังหมักแบบกวนผสมโดยใช้การหมัก พบว่าเชืชนิดนี้สามารถผลิตเอนไซม์ได้ 40.5 หน่วยต่อมล ซึ่งคิดเป็นอัตราการผลิต เท่ากับ 0.56 หน่วยต่อมล ต่อชั่วโมง เมื่อใช้อัตราการกวนเท่ากับ 150 รอบต่อนาทีโดยไม่ต้องให้อากาศ เลี้ยงเชื้อเป็น

เวลา 3 วัน เมื่อทำการผลิตเอนไซม์ในถังหมักแบบต่อเนื่อง พบว่าเชื้อสายพันธุ์ T16-1 สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด 45 หน่วยต่อมล คิดเป็น อัตราการผลิตเท่ากับ 0.6 หน่วยต่อมล ต่อ ชั่วโมงที่อัตราการไหลเท่ากับ 0.013 ต่อชั่วโมง

บทสรุป

เมื่อวิเคราะห์/สังเคราะห์ ผลการวิจัยจากทั้งสองโครงการย่อยแล้ว จะเห็นว่าทางน้ำยางที่เหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมยางพาราที่มีการแยกยางสกปรมออก ยังมีคุณค่าทางโภชนาการที่จะใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตเอนไซม์ทั้งสองชนิดได้ แต่อย่างไรก็ตาม จำเป็นต้องมีการเติมสารอาหารหลักลงไปในน้ำเหลือทิ้งดังกล่าวซึ่งเป็นต้นทุนที่เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนในการผลิตเอนไซม์ สารอาหารที่มีการเติมลงไปในน้ำทิ้งสำหรับการผลิตเอนไซม์อัลลาไลน์โปรติเอส ได้แก่ skim milk 9.82 กรัมต่อลิตร glucose 0.97 กรัมต่อลิตร K_2HPO_4 0.82 กรัมต่อลิตร ส่วนการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลกไทด์ มีการเติม PLA 0.35 กรัมต่อลิตร, เจลาติน 2.38 กรัมต่อลิตร, $(NH_4)_2SO_4$ 4.0 กรัมต่อลิตร, K_2HPO_4 4.0 กรัมต่อลิตร, KH_2PO_4 2.0 กรัมต่อลิตร และ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 กรัมต่อลิตร การศึกษานี้ยังได้ภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แบบเปิดในระดับถังหมักห้องปฏิบัติการเพื่อการพัฒนาการผลิตเอนไซม์ดังกล่าวในระดับอุตสาหกรรมต่อไป ผลงานวิจัยทั้งสองโครงการย่อยเป็นแนวทางที่ชี้ให้เห็นว่ากระบวนการผลิตเอนไซม์โดยใช้ทางน้ำยางที่แยกยางเป็นวัตถุดิบช่วยลดต้นทุนในการผลิตและเพิ่มมูลค่าของทางน้ำยางที่เหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมยางพาราที่ไม่เพียงลดปริมาณน้ำเหลือทิ้งดังกล่าวและค่าใช้จ่ายในการบำบัดแล้ว ยังช่วยให้เกิดผลิตภัณฑ์เอนไซม์สองชนิดที่มีมูลค่าต่อไป ซึ่งควรมีพิจารณาในการลงทุนเพื่อผลิตเอนไซม์ดังกล่าวต่อไป

สัญญาเลขที่ RDG5550104

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการย่อยที่ 1 การใช้ประโยชน์จากหางน้ำยางเพื่อผลิตเอนไซม์
อัลคาไลน์โปรติเอสโดย *Bacillus* สายพันธุ์ทน
ร้อนด้วยกระบวนการหมักแบบเปิด

Utilization of skim latex for production of
alkaline protease by thermotolerant
Bacillus through open fermentation process

คณะวิจัย

1. รศ. ดร. วิเชียร กิจปรีชาวนิช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
2. ผศ.ดร. จุฑาพร แสงวงแก้ว มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ชุดโครงการ การใช้หางน้ำยางที่แยกยางสกิมออกเพื่อการผลิตเอนไซม์
อุตสาหกรรมโดยจุลินทรีย์ด้วยกระบวนการหมักแบบเปิด

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)

และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย วช.-สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะใช้หางน้ำย่างที่แยกสกิมออก (ซีรัม) เป็น basal medium สำหรับการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสโดยคัดเลือกแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสภายใต้สภาวะการหมักที่ไม่ฆ่าเชื้อ ซีรัมที่เตรียมได้ในห้องปฏิบัติการพบว่าประกอบด้วยโปรตีน 0.53 กรัมต่อลิตร น้ำตาลรีดิวซ์ 1.28 กรัมต่อลิตร และมีค่า BOD และ COD เท่ากับ 16.27 และ 18,456 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ จากการคัดเลือกแบคทีเรียพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ KU-K2 เป็นสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสได้สูงที่สุดจากแบคทีเรียทั้งหมดจำนวน 108 สายพันธุ์ที่เก็บรักษาที่ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสของแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวได้ใช้ซีรัมหางน้ำย่างเป็น basal medium ในอัตราส่วน 1:1 โดยใช้ Plackett-Burman design (PB) ในการคัดกรองปัจจัยที่มีผลและหาค่าที่เหมาะสมจากวิธีพื้นผิวตอบสนองด้วย central composite design (CCD) จากการคัดกรองปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสพบว่า Skim milk glucose K_2HPO_4 และ $CoCl_2$ มีผลต่อการผลิตอย่างมีนัยสำคัญจากทั้งหมด 7 ปัจจัย และจากการศึกษาด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนองของปัจจัยที่มีนัยสำคัญทั้ง 4 พบว่าองค์ประกอบของอาหารที่เหมาะสมนั้นให้ค่ากิจกรรมเท่ากับ 5.09 หน่วยต่อมิล ซึ่งประกอบด้วย skim milk 9.82 กรัมต่อลิตร glucose 0.97 กรัมต่อลิตร K_2HPO_4 0.82 กรัมต่อลิตร ซึ่งให้ค่าทำนายเท่ากับ 6.67 หน่วยต่อมิล ยิ่งไปกว่านั้นความเหมาะสมของโมเดลยังสนับสนุนด้วยค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจด้วยค่า (R^2) เท่ากับ 0.937 สำหรับการศึกษากระบวนการหมักแบบครั้งคราวพบว่าเชื้อ KU-K2 ให้กิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสสูงที่สุด (5.97 หน่วยต่อมิล) ที่ 48 ชั่วโมงในถังหมักขนาด 5 ลิตรที่ไม่ควบคุมพีเอช อัตราการกวนที่ 250 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศเท่ากับ 2.0 ปริมาตรอาหารต่อปริมาตรต่อนาทีโดยกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสสูงขึ้น 2.6 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับสูตรอาหารที่ยังไม่ได้หาค่าที่เหมาะสม โดยจากการศึกษาสมบัติของเอนไซม์พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ให้ค่ากิจกรรมสูงสุดที่พีเอชและอุณหภูมิเท่ากับ 10.0 และ 60.0 องศาเซลเซียสตามลำดับ และเอนไซม์ดังกล่าวถูกยับยั้งด้วย 10 mM Zn^{2+} , 10 mM Fe^{3+} และ 10 mM Hg^{2+}

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสามารถผลิตเอนไซม์ alkaline protease ด้วยกระบวนการหมักแบบเปิดจากเชื้อ *B.licheniformis* (KU-K2) โดยใช้หางน้ำย่างที่แยกสกิมออกเป็นวัตถุดิบหลักได้ แต่จำเป็นต้องเพิ่มสารอาหารเพื่อช่วยให้ผลิตเอนไซม์ได้มากขึ้น โดยพบว่าต้นทุนในการผลิตในระดับห้องปฏิบัติการต่อลิตรเท่ากับ 18.9 บาท ซึ่งสามารถนำกระบวนการหมักแบบเปิดดังกล่าวไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมเพื่อให้ได้ประโยชน์เชิงพาณิชย์ได้ โดยเมื่อขยายขนาดการผลิตในระดับใหญ่จะช่วยลดปริมาณของเสียจากโรงงานผลิตยางเข้มข้นให้ลดลงอย่างมาก ซึ่งนอกจากจะช่วยลดความยุ่ง

ยางในการบำบัดน้ำเสียให้กับโรงงานแล้วยังเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับทางน้ำยางที่แยกยางสกิมออกได้เป็นอย่างดี

Abstract

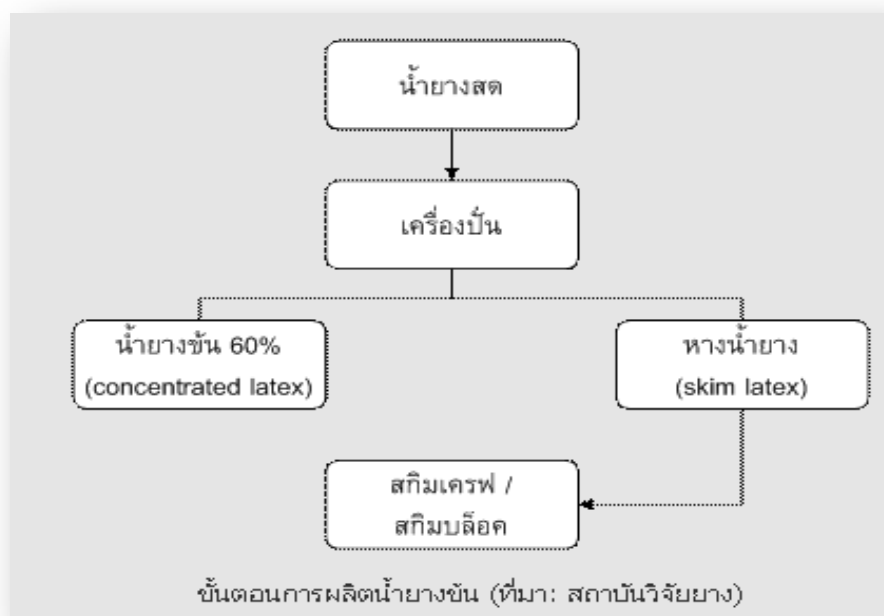
The objective is to explore the non rubber serum as basal medium for alkaline protease production by the selected alkaline protease producing bacterium in genus *Bacillus* under non-sterile fermentation. The imitated serum prepared from skim later in laboratory consist of 0.53 g/L of protein, 1.28 g/L of reducing sugars with BOD and COD of 16.27 and 18,456 mg/L, respectively. A strain of *Bacillus* sp. KU-K2 was selected as a potent strain for alkaline protease production among 108 isolates of aerobic spore forming bacteria kept in the culture collection of Department of Microbiology, Kasetsart University. To optimize the alkaline protease production of this bacterial strain using serum in ratio 1:1 as basal medium, Plackett-Burman design (PB) and response surface methodology based on central composite design (CCD) were employed. Skim milk, glucose, K_2HPO_4 and $CoCl_2$ were significant fermentation parameters among 7 parameters by using PB. These four significant parameters were then further optimized through response surface methodology based on central composite design. It was shown that 2 variables; (skim milk and interaction with skim milk and glucose) affected on enzyme production at significant level 95%. Experimental results derived from CCD (5.09 units/mL) in optimized medium consisted of 9.82 g/L skim milk, 0.97 g/L glucose, 0.82 g/L K_2HPO_4 and 0.12 g/L $CoCl_2$ were accordance with predicted value of quadratic model (6.67 unit/mL). Moreover, the suitability of model was supported by coefficient of determination (R^2) of 0.937. The maximum activity of 5.97 U/mL was achieved within 48 h cultivation with uncontrolled pH, agitation rate of 250 rpm and an aeration rate of 2.0 vvm in the 5-L stirrer fermenter, which increased by 2.6 folds compared to the un-optimized medium. The optimal pH and temperature for alkaline protease activity were 10.0 and 60°C, respectively. The alkaline protease retained its activity over wide ranges of pH (9-12) and temperature up to 60°C. The crude alkaline protease was strongly inhibited by 10 mM Zn^{2+} , 10 mM Fe^{3+} and 10 mM Hg^{2+} . This process for produced alkaline protease enzyme from non rubber skim latex can apply for many industries as reduced the cost of production and increased valued of industrial waste.

เนื้อหางานวิจัย

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ในอุตสาหกรรมการทำยางให้เข้มข้น ส่วนใส่ที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงน้ำยางสดหรือหางน้ำยาง (skim latex) นั้นมีปริมาณมาก และยังมีคุณค่าทางอาหาร คือมีปริมาณน้ำตาล โปรตีน ปริมาณแอมโมเนีย

อยู่เล็กน้อย และมีเนื้อยางเหลืออยู่ประมาณ 4-8% DRC (dry rubber content) ในปัจจุบันนั้นมีการนำยางในส่วนนี้กลับมาใช้ประโยชน์โดยการใส่กรดซัลฟิวริกช่วยในการจับตัวของยางน้ำยาง ดังแสดงในภาพที่ 1.1 กระบวนการนี้นอกจากจะต้องเสียค่าใช้จ่ายจากการใช้ปริมาณกรดซัลฟิวริกแล้ว ยางที่ได้ยังไม่ได้มาตรฐาน โดยยางที่ได้จะเปื่อยและเสื่อมง่าย และน้ำทิ้งที่เกิดจากการจับตัวมีผลเสียต่อระบบบำบัดน้ำเสียเนื่องจากมีปริมาณซัลเฟตมาก



ภาพที่ 1.1 ขั้นตอนการผลิตน้ำยางข้นและยางสกิม

นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาการใช้เทคนิคการปรับสภาพหางน้ำยางก่อนป้อนเข้าระบบการกรอง เช่น การทำให้เนื้อยางมีการกระจายตัวด้วย การเติมสารลดแรงตึงผิว การทำให้เกิดการรวมตัวของเนื้อยาง (coagulation) จึงเป็นแนวทางเทคโนโลยีที่เรียกว่า “hybrid membrane process” อันจะเป็นแนวทางการพัฒนา และเป็นเครื่องมือให้ภาคการผลิตในระบบอุตสาหกรรมน้ำยางข้น-ยางสกิม และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมในรูปแบบของการพัฒนาอย่างยั่งยืนภายใต้แนวคิดหลักของเทคโนโลยีการผลิตที่สะอาด (clean technology, CT concept) โดยจะสามารถแยกเอาส่วนที่เป็นซีรัมไปพร้อมๆ กับการลดการใช้สารเคมีที่เป็นพิษคือ กรดซัลฟิวริกในปริมาณสูง ลดการใช้น้ำในกระบวนการผลิต

เนื่องจากเชื้อในกลุ่ม *Bacillus* เป็นสายพันธุ์แบคทีเรียที่มีรายงานว่า เป็นสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์อัลคาไลโดโปรติเอสได้ดีโดยเฉพาะสายพันธุ์ *Bacillus* มีบทบาทสำคัญในทางอุตสาหกรรมประมาณเกือบครึ่งหนึ่งของการผลิตโปรติเอสที่ใช้ในทางการค้าได้มาจากสายพันธุ์นี้ ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจที่นำ

แบคทีเรียดังกล่าวมาใช้ในการผลิตเอนไซม์ด้วยกระบวนการหมักแบบเปิดโดยใช้ skim latex เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอนไซม์ดังกล่าว เอนไซม์ที่ได้มีประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่างๆและยังสามารถนำมาย่อยโปรตีนในส่วนที่ยังติดค้างในน้ำยางชั้นอีกด้วย ดังนั้นแนวทางการใช้ประโยชน์ที่นำทางน้ำยางที่แยกยางสกิมออกมาเป็นวัตถุดิบโดยตรงสำหรับการหมักด้วยเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* ที่สามารถผลิตเอนไซม์ alkaline protease ที่มีมูลค่าสูงซึ่งเป็นประโยชน์ในอุตสาหกรรมซักล้างนี้ และกระบวนการหมักดังกล่าวจะลดต้นทุนการผลิตเนื่องจากเป็นกระบวนการหมักที่ใช้พลังงานน้อยและเป็นการใช้ประโยชน์จากของเหลือทิ้งจากกระบวนการทำให้ในทางน้ำยางชั้นซึ่งมีคุณค่าทางอาหารและลดมลพิษจากการปล่อยทิ้งให้น้ำไปบำบัดที่มีค่าใช้จ่าย

2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

คัดเลือกสายพันธุ์ *Bacillus* ที่มีในท้องปฏิบัติการที่สามารถผลิตเอนไซม์ alkaline protease ที่อุณหภูมิสูงได้สูงและเพื่อผลิตเอนไซม์ alkaline protease ด้วยกระบวนการหมักแบบเปิดจากเชื้อ *Bacillus* โดยใช้ทางน้ำยางเป็นวัตถุดิบหลัก

3. ทางเลือกและแนวทางการแก้ปัญหา/กรอบแนวคิดของการวิจัย

เชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* เป็นสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีรายงานว่าเป็นสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์อัลคาไลด์โปรติเอสได้ดี เช่น *Bacillus licheniformis* (Ferrero et al. , 1996; Manachini and Fortins, 1998; Sinha and Satyanarayana et al.,1991), *Bacillus subtilis* (Kembhavi AA et al.,1993; Yang et al., 2000), *Bacillus pumilus* (Vetter R et al.,1993) *Bacillus amyloliquefaciens* (George et al. , 1995) *B. mycoides* (Abdel-Naby et al., 1998) *B. stearothermophilus* F1 (Rahman et al. , 1994) alkalophilic *Bacillus* sp. NO221 (Hirokoshi, 1971) และ *Bacillus* sp. KSM-K16 (Kobayashi et al. , 1995) เป็นต้น

จากการศึกษาของ Vaithanomsat et al. (2008) ที่ได้คัดเลือกสายพันธุ์ เชื้อรา *Aspergillus flavus* และ เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus licheniformis* TISTR 1010 พบว่าเชื้อ *B. licheniformis* TISTR 1010 เป็นสายพันธุ์ที่มีกิจกรรมโปรติเอสสูงสุดเมื่อเจริญบนอาหารวุ้นที่มีเคซีน เป็นส่วนประกอบ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวพีเอช10.0 ที่มีส่วนประกอบของโปรตีนที่จากน้ำหังขาวไหม 6%, มอลท์สก็ด 1% พอลิเปปไทด์ 1% และ Na_2CO_3 . 1% เป็นเวลา 36 ชม ได้กิจกรรมเอนไซม์สูงสุด ฟิมล และคณะ (2548) ได้รายงานการใช้ alkalotolerant *Bacillus* sp. B12 ซึ่งคัดแยกได้จากระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานเยื่อและกระดาษสามารถเจริญและผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสได้สูงเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารราคาถูกโดยใช้กากถั่วเหลืองบดร้อยละ 0.5 ในน้ำที่ปรับพีเอชเป็น 9.0 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง โดยการ

ผลิตเอนไซม์สัมพันธ์กับการเจริญ ซึ่งจัดเป็น growth-associated enzyme เชื้อชนิดนี้สามารถผลิตโปรตีนเอสได้สูงและค่อนข้างคงที่ในช่วง stationary phase เอนไซม์จากสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถทำงานได้ดีในช่วงพีเอช 8.0 ถึง 11.0 และทนต่อพีเอชในช่วง 6.0 ถึง 11.0 อุณหภูมิที่สามารถทำงานได้และเสถียรภาพอยู่ในช่วง 30 ถึง 60 องศาเซลเซียส crude enzyme จาก *Bacillus* sp. B12 สามารถทนต่อสารซักล้างได้หลายชนิด โดยเมื่อเติม crude enzyme ลงในสารซักล้างสามารถขจัดคราบเลือดจากผ้าด้ายดิบขาวได้ดีกว่าเมื่อใช้สารซักล้างเพียงอย่างเดียว ดังนั้นอัลคาไลน์โปรตีเอสที่ผลิตจากสายพันธุ์ B12 จึงมีสมบัติที่ดีที่จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมสารซักล้างได้ Romsomsa *et al.* (2010) ได้ใช้การทดลองด้วยการออกแบบ Plackett-Burman ในระดับพลาซกโดยคัดกรองตัวแปร 7 ชนิด ที่มีผลต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตโปรตีนเอสใหม่ลอกขาวโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* C4 ที่แยกได้จากน้ำเสียจากโรงงานย้อมสีผ้าไหมไทยซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีศักยภาพ พบว่ามีตัวแปร 3 ชนิด ที่สำคัญคือ แป้งถั่วเหลือง, นมไขมันต่ำ และอัตราการเหวี่ยงมีผลต่อการผลิตเอนไซม์ และเมื่อใช้การออกแบบการทดลองแบบ central composite design เพื่อหาค่าเหมาะสมที่สุด พบว่าแป้งถั่วเหลือง 2.0%, นมไขมันต่ำ 0.1% และความเร็วในเหวี่ยง 280 รอบต่อนาที ได้เอนไซม์โปรตีเอสสูงสุดเท่ากับ 1537 หน่วยต่อมิล และเมื่อเลี้ยงในเครื่องถังหมักแบบกวน สามารถให้เอนไซม์ได้สูงสุดเท่ากับ 1891 หน่วยต่อมิล เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 27 ชม นอกจากนั้น สุทธิกมล (2521) ได้รายงานการศึกษาการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวของ *Endomycopsis fibuligera* TISTR 5097 และ *Candida utilis* TISTR 5001 ร่วมกับการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสจาก *Bacillus subtilis* TISTR 25 ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าใช้แป้งมันสำปะหลัง 15 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียซัลเฟต 10 กรัมต่อลิตรจากการเลี้ยงโดยเชื้อผสมทั้งสามชนิดที่ เพาะเลี้ยงในช่วงเวลาที่ต่างกัน กล่าวคือใช้เชื้อตั้งต้นของ *E. fibuligera* 7 เพอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (เข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร) เลี้ยงเชื้อในถังหมักเป็นเวลา 16 ชั่วโมง จึงเติมเชื้อตั้งต้นของ *C. utilis* 3 เพอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (เข้มข้น 7 กรัมต่อลิตร) โดยควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดต่าง 5.5 อัตราการกวน 250 รอบ/นาที อัตราให้อากาศ 1.0 vvm เมื่อเลี้ยงเชื้อต่อจนครบ 40 ชั่วโมง จึงเติมเชื้อตั้งต้นแบบ cell suspension ของ *B. subtilis* 10 เพอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ควบคุมค่าความเป็นกรดต่างที่ 7.0 เลี้ยงจนครบ 72 ชั่วโมง พบว่าได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 7.91 กรัมต่อลิตร โปรตีนจริงภายในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 49.5 เพอร์เซ็นต์ มวลเซลล์ต่อกรัมแป้งมันสำปะหลังสูงสุดเท่ากับ 0.527 และโปรตีเอสแอกติวิตีสูงสุดเท่ากับ 2.57 หน่วยต่อมิล หลังจากหมักเสร็จจึงลั่นน้ำตัวเซลล์ที่ตกตะกอนออก แล้วเติมน้ำยางสด 35% DRC ปริมาณ 40 เพอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ร่วมกับสารละลายโซเดียมโอดีเติลซัลเฟตเข้มข้น 10% ปริมาณ 1 phr (part per hundrund of rubber) ใช้อัตราการกวน 100 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่าสามารถลดปริมาณไนโตรเจนของยางดิบได้ 70 เพอร์เซ็นต์ ซึ่งยางดิบที่ได้มีปริมาณเถ้า ไนโตรเจน สิ่งสกปรก และสิ่งระเหยเท่ากับ 0.05, 0.17, 0.002 และ 0.23

เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ มีค่าการอ่อนตัวเริ่มต้น 30.7 ค่าดัชนีการอ่อนตัว 86.6 ค่าความหนืด 52.9 และดัชนีสี 5 โดยที่ได้มีลักษณะพื้นผิวและภาคตัดขวางไม่แตกต่างจากยางดิบชุดควบคุม

Isolate	Ratio of clear zone diameter to colony diameter			
	pH 7		pH9	
	Room temp	50°C	Room temp	50°C
061	1.8	2.0	1.4	2.2
3/2/2	1.6	4.0	1.4	5.0

คณะวิจัยได้นำเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ได้แก่ สายพันธุ์ *Bacillus* จากห้องปฏิบัติการที่เป็นแบคทีเรียชอบร้อนที่ส่งเสริมการเติบโตของข้าวโพดจำนวน 8 สายพันธุ์ และสายพันธุ์ที่ได้มาจากหน่วยเก็บเชื้อ TISTR ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร skim milk ที่มีพีเอช 7 และพีเอช 9 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้อง และ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง พบเชื้อที่นำมาทดสอบสามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดยสังเกตการสร้างบริเวณใสบนอาหารดังแสดงในตารางที่ 1.4

ดังนั้น จึงเป็นที่น่าสนใจที่คัดเลือกแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* โดยเฉพาะกลุ่มที่ทนร้อนในการผลิตเอนไซม์ด้วยกระบวนการหมักโดยใช้หางน้ำยางเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอนไซม์ซึ่งยังมีคุณค่าทางอาหารและมีปริมาณสำหรับการเลี้ยงแบคทีเรียและการผลิตเอนไซม์ดังกล่าวซึ่งเอนไซม์มีประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่างๆ โดยทำการหมักในลักษณะเปิดที่ไม่ต้องทำการใช้ความร้อนฆ่าเชื้อด้วยเพื่อลดต้นทุนการผลิต

ตารางที่ 1.4 ความสามารถของเชื้อแบคทีเรียในการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนบนอาหารวุ้น skim milk

BKU31	7.0	12.0	4.0	6.0
KKU11	1.5	3.0	1.5	3.0
008	4.5	7.0	3.5	6.0
KKU2	3.3	2.3	3.3	2.4
27/1/7	2.0	2.6	3.0	2.4
TISTR1045	2.3	No growth	2.5	No growth
4/3/3	3.0	2.2	4.0	2.0
TISTR 1010	3.6	2.5	3.2	2.7
CM5	4.0	7.0	2.2	10.0

4. แนวทางการดำเนินการวิจัย

4.1 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสโดยแบ่งออกเป็น 3 แหล่งที่มาด้วยกันจำนวนทั้งหมด 26 สายพันธุ์ ดังนี้

- เชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* ที่เก็บรักษาในห้องปฏิบัติการภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ซึ่งมีรายงานว่าเป็นแบคทีเรียทนร้อนและมีความสามารถในการส่งเสริมการเติบโตของพืช (Talek *et al.* 2012)

- แบคทีเรียจากแหล่งเก็บรักษาเชื้อในประเทศไทย (หน่วยเก็บเชื้อ TISTR) ที่มีรายงานว่ามีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ alkaline protease

- แบคทีเรียที่ได้ทำการคัดแยกจากแหล่งต่างๆ โดยมี รายละเอียดการคัดแยกแบคทีเรีย ดังนี้

นำตัวอย่างดินจากสวนยาง บริเวณใต้ต้นยางหรือดินบริเวณที่ทำยางแผ่น ตัวอย่างเศษขี้ยาง และบริเวณอื่นๆ ที่มีแบคทีเรียย่อยโปรตีน เช่น ดินและน้ำทิ้งจากบริเวณโรงงานอุตสาหกรรมนมและผลิตภัณฑ์นม โรงฆ่าสัตว์ โรงงานผลิตภัณฑ์ซีอิ๊ว และ เต้าเจี้ยว น้ำทิ้งตลาดสด และ ดินจากป่าประเภทต่างๆ เป็นต้น มาคัดแยกโดยใช้วิธี plate diffusion method ซึ่งดัดแปลงจาก Horikoshi, 1991 โดยชั่งตัวอย่างดิน 1 กรัม หรือ ปิเปตตัวอย่างน้ำทิ้ง 1 มิลลิลิตรเจือจางในสารละลายน้ำเกลือความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ (normal saline) ที่ปลอดเชื้อและทำให้มีระดับการเจือจางที่เหมาะสม จากนั้นแยกเชื้อโดยวิธี pour plate technique บนอาหาร Skim milk agar ที่มีองค์ประกอบดังนี้ Glucose 2.0 กรัมต่อลิตร K_2HPO_4 0.2 กรัมต่อลิตร $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 กรัมต่อลิตร Skim milk 2.0 กรัมต่อลิตร $FeSO_4$ 0.05 กรัมต่อลิตร และ

วัน 15.0 กรัมต่อลิตร พีเอช 7.0 และ 9.0 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที และอาหารที่มีหางน้ำยางที่เติมวัน บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 40 - 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นคัดเลือกเฉพาะโคโลนีที่มีวงใสอยู่รอบๆ ทำเชื้อให้บริสุทธิ์โดยวิธี cross streak แล้วเก็บเชื้อบริสุทธิ์ไว้ในหลอดอาหารวันผิวเอียง Nutrient agar เพื่อใช้ศึกษาต่อไป

4.2 การคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยโปรตีนโดยเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส

นำเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดจำนวน 26 สายพันธุ์มาคัดเลือกความสามารถในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์ โปรติเอสโดยแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอนดังนี้คือ

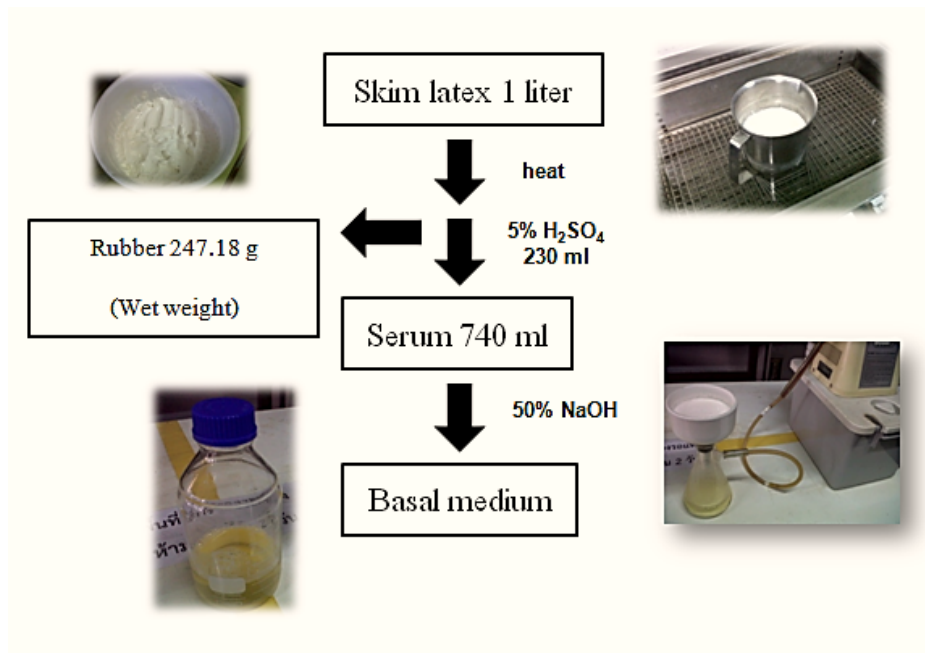
4.2.1 การคัดเลือกเชื้อที่ผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสบนอาหารแข็ง

นำเชื้อแบคทีเรียแต่ละไอโซเลทมาปลูกเชื้อแบบ Point inoculation ลงบน skim milk agar พีเอช 7 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นตรวจสอบความสามารถในการย่อยโปรตีนของแต่ละสายพันธุ์โดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี (CO) และวงใสที่เกิดรอบโคโลนีของเชื้อ (CZ) แล้วนำมาเปรียบเทียบระหว่างค่าผลต่างระหว่าง CZ และ CO (CZ - CO) และเปรียบเทียบอัตราส่วนระหว่าง CZ และ CO (CZ/CO) แล้วคัดเลือกเฉพาะเชื้อที่ให้ทั้งสองค่าสูงประมาณ 10 สายพันธุ์

4.2.2 การเตรียมหางน้ำยางที่แยกยางสกิม

เตรียมหางน้ำยางที่แยกยางสกิมทำได้โดย เติม 5% H_2SO_4 ปริมาตร 230mL ลงในหางน้ำยาง ปริมาตร 1 ลิตร บ่มที่ $60^{\circ}C$ เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำการกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 เพื่อแยกสกิมเครฟ ออกจากหางน้ำยาง ปรับพีเอชของหางน้ำยางที่แยกยางสกิมให้มีค่าเท่ากับ 6.8-7.0 ดังแสดงในภาพที่ 1.2 หางน้ำยางที่แยกยางสกิมนำไปใช้เป็น basal ต่อไป

ภาพที่ 1.2 แสดงการเตรียม Serum ที่ใช้เป็น basal medium เพื่อผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส



4.2.3 การคัดเลือกเชื้อที่ผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสในอาหารเหลว

เชื้อเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 4.2.1 แต่ละไอโซเลทประมาณ 2 ลูบ มาเลี้ยงในอาหาร nutrient broth ปรับปริมาตร 25 มิลลิลิตรที่บรรจุใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 170 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 12 ชั่วโมงเพื่อทำเป็นกล้าเชื้อ จากนั้นปิเปตมา 5 มิลลิลิตรเลี้ยงใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหาร serum medium และ nutrient supplement ที่มีองค์ประกอบดังนี้ K_2HPO_4 0.2 กรัมต่อลิตร $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 กรัมต่อลิตร Skim milk 2.0 กรัมต่อลิตร และ $FeSO_4$ 0.05 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสที่พีเอช 7 และ 9 บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 170 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 48 ชั่วโมงจากนั้นนำมาปั่นแยกเซลล์ออกจากด้วยเครื่อง refrigerated centrifuge ที่ 10,000 รอบต่อนาทีอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาทีนำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส เปรียบเทียบความสามารถในการผลิตเอนไซม์จากเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบ คัดเลือกสายพันธุ์ *Bacillus* ที่สามารถผลิตเอนไซม์ในอาหารหางนํ้ายางได้สูงสุด 1 สายพันธุ์เพื่อนำไปศึกษาต่อไป

4.3 การระบุชนิดของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส

4.3.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการทดสอบทางชีวเคมี

นำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากข้อ 2 มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาซึ่งได้แก่การศึกษารูปร่างของเซลล์ การติดสีแกรม การสร้างสปอร์ และ ทดสอบสมบัติทางชีวเคมีตามวิธีของ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Holt *et al.*, 1994) ซึ่งได้แก่การทดสอบการสร้างเอนไซม์อะไมเลส การสร้างเอนไซม์ออกซิเดสและความสามารถในการหมักคาร์โบไฮเดรต โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

4.3.2 การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16s rRNA

สกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากข้อ 2 ที่ดัดแปลงวิธีจาก Hopwood *et al.* (1985) จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์ 8F (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) และ 1492R (GGTTACCTTGTTACCACTT) การหาลำดับเบสของ 16S rRNA จะใช้เครื่องหาลำดับเบสอัตโนมัติและทำการเปรียบเทียบลำดับเบสของ 16S rRNA จากแบคทีเรียที่คัดเลือกกับแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆโดยการนำ alignment และวิเคราะห์ผลในรูปแบบ phylogenetic tree โดยใช้โปรแกรม MEGA5

4.4. ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสโดยใช้วิธี Plackett-Burman design

ทำการคัดเลือกชนิดของสารอาหารและปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจากเชื้อแบคทีเรียทนร้อน *Bacillus* โดยวางแผนการทดลองแบบ Plackett-Burman ปัจจัยที่ทำการศึกษามีทั้งหมด 7 ปัจจัย ได้แก่ Skim milk (X_1), Glucose (X_2), K_2HPO_4 (X_3), $MgSO_4$ (X_4), $FeSO_4$ (X_5),

Variable	Symbol	Level	
		+1	-1
Skim milk (g/L)	X_1	5.00	2.00
Glucose (g/L)	X_2	5.00	2.00
K_2HPO_4 (g/L)	X_3	0.50	0.20
$MgSO_4$ (g/L)	X_4	0.50	0.20
$FeSO_4$ (g/L)	X_5	0.05	0.005
Temperature ($^{\circ}C$)	X_6	42	37
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	X_7	0.238	0

temperature (X_6), และ $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ (X_7) โดยแต่ละปัจจัยจะทำการศึกษา 2 ระดับ ได้แก่ ระดับต่ำ (-1) และระดับสูง (+1) แสดงดังตารางที่ 5 ออกแบบการทดลองได้ทั้งหมด 12 สิ่งทดลอง

ตารางที่ 1.5 การกำหนดระดับต่ำสุด และ สูงสุดของชนิดสารอาหารและปัจจัยที่ศึกษาเพื่อใช้กำหนดแผนการทดลองแบบ Plackett-Burman

เมื่อนำปัจจัยที่ต้องการศึกษาในระดับต่ำสุด (-1) และสูงสุด (+1) ที่กำหนดได้ไปออกแบบการทดลองโดยใช้วิธี Plackett-Burman ซึ่งสามารถออกแบบการทดลองได้ทั้งหมด 12 การทดลอง การทดลองละ 3 ซ้ำ ดังแสดงในตารางที่ 1.6 ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ตามการทดลองที่ออกแบบการทดลองไว้ จากนั้นนำผลการทดลองที่ได้ไปวิเคราะห์ทางสถิติ โดยใช้โปรแกรมทางสถิติ SPSS 11.5 for Windows และนำตัวแปรที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสศึกษาเพื่อหาค่าที่เหมาะสมต่อไป ด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง

ตารางที่ 1.6 แบบการทดลองในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสโดยใช้แผนการทดลอง Plackett-Burman

Run no.	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀	X ₁₁
1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1
2	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1
3	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1
4	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1
5	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1
6	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1
7	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1
8	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1
9	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1
10	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1
11	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

4.5 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสโดยวางแผนการทดลองแบบ Central composite design (CCD) และวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยวิธีพื้นผิวตอบสนอง (RSM)

นำปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจากการคัดกรองด้วย Plackett-Burman มาวางแผนการทดลองแบบ central composite design (CCD) ซึ่งประกอบด้วย 3 ส่วน คือ จุดที่อยู่บนแกน coordinate จุดที่อยู่บนแกนหลัก และจุดศูนย์กลาง รวมเป็นหน่วยการทดลองทั้งหมด โดยทำการทดลอง

Variable	Symbol	Code level				
		-2	-1	0	1	2

แต่ละจุดๆละ 3 ซ้ำ โดยแสดงค่าของแต่ละระดับดังตารางที่ 1.7

Skim milk (g/L)	X_1	4	6	8	10	12
Glucose (g/L)	X_2	0	0.5	1	1.5	2.0
K_2HPO_4 (g/L)	X_3	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$ (g/L)	X_7	0	0.06	0.12	0.18	0.24

ตารางที่ 1.7 การกำหนดระดับของแต่ละปัจจัยที่ศึกษาโดยการวางแผนการทดลองแบบ Central composite design (CCD) เพื่อหาจุดที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส

4.6 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสในถังหมักขนาด 2.5 ลิตรในการหมักแบบเปิด

ศึกษาการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจากเชื้อที่คัดเลือกในอาหารหางน้ำยางปริมาตร 2.5 ลิตร ในถังหมักแบบกวนผสมขนาด 5 ลิตรด้วยกระบวนการหมักแบบเปิดโดยศึกษาผลทางกายภาพ ได้แก่ อัตราการให้อากาศ 0.2 1.0 และ 2.0 vvm อัตราการกวน 170 250 และ 350 รอบต่อนาที (Sen, *et al.*, 1993, Chu, *et al.*, 1992, Fujiwara *et al.*, 1987) ต่อการผลิตเอนไซม์ การทดลองละ 2 ชั่วโมง ทำการศึกษาผลของปัจจัยต่อการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ พิจารณปัจจัยที่มีผลให้การผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดไปศึกษาต่อไป

4.7 การศึกษาสมบัติของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส

4.7.1 การเลี้ยงเชื้อ

เลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. KU-K2 ลงในอาหาร Nutrient agar พีเอช 7.0 ที่มี 1% skim milk เป็นองค์ประกอบของ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง จากนั้นใช้ loop เขี่ยเชื้อมาจำนวน 2 loop full Skim milk ลงในอาหาร BMSM broth พีเอช 7.0 (8.0 g/L, Glucose 1.0 g/L, K_2HPO_4 0.5 g/L, $CoCl_2 \cdot H_2O$ 0.02 g/L, $FeSO_4$ 0.005 g/L และ Rubber serum พีเอช 7.0 ปริมาตร 1 ลิตร) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มแบบเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เพื่อทำเป็นกล้าเชื้อ จากนั้นปิเปตมา 2.5 มิลลิลิตร เลี้ยงใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร BMSM broth พีเอช 7.0 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำมาปั่นแยกเซลล์ออกจากด้วยเครื่อง refrigerated centrifuge ที่ 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์กิจกรรมและคุณลักษณะของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส

4.7.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส

นำ crude enzyme มาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส ที่อุณหภูมิ 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80 องศาเซลเซียส โดยใช้ 0.5% azo casein (ละลายใน 0.05 M glycine-NaOH buffer, pH 9.0) เป็น substrate ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ

4.7.3 ความคงตัวของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสต่ออุณหภูมิ

บ่ม crude enzyme ที่อุณหภูมิ 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส โดยใช้ 0.5% azo casein (ละลายใน 0.05 M glycine-NaOH buffer, pH 9.0) เป็น substrate วิเคราะห์กิจกรรมที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ

4.7.4 พีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส

วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส โดยเตรียม 0.5% azocasin ในบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ ที่พีเอชต่างๆ กัน โดยพีเอช 6.0-9.0 เตรียมใน 0.05 M phosphate buffer และพีเอช 9.0-12.0 เตรียมใน 0.05 M glycine-NaOH buffer วิเคราะห์กิจกรรมที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ

4.7.5 ความคงตัวของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสต่อพีเอช

บ่ม crude enzyme ในสภาวะที่มีค่าพีเอช 6.0-12.0 ด้วยในบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ ที่มีค่าพีเอชต่างๆ กัน โดยพีเอช 6.0-9.0 ใช้ 0.05 M phosphate buffer และพีเอช 9.0-12.0 ใช้ 0.05 M glycine-NaOH buffer บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส โดยใช้ 0.5% azo casein (ละลายใน 0.05 M glycine-NaOH buffer, pH 9.0) เป็น substrate วิเคราะห์กิจกรรมที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ

4.7.6 การศึกษาผลของสารเคมีและ metal ion ต่อกิจกรรมเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส

เตรียมสารละลาย 1mM PMSF, 10mM $MgCl_2$, 10mM $BaCl_2$, 10mM $ZnCl_2$, 10mM $FeCl_3$, 5mM Phenanthroline, 10mM $HgCl_2$, 5mM EDTA, 10mM $CaCl_2$ (ความเข้มข้นสุดท้ายของการเกิดปฏิกิริยา) ลงใน 0.5% azo casein (ละลายใน 0.05 M glycine-NaOH buffer, pH 9.0) เพื่อใช้เป็น substrate ปิเปิดสารละลายมา มา 200 ไมโครลิตร ลงในหลอด micro centrifuge และอุ่นสารละลาย azo casein ที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วทำปฏิกิริยากับสารละลายเอนไซม์ 100 ไมโครลิตร (ที่เจือจางได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วย phosphate buffer 0.05 M พีเอช 7) บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศา

เซลล์เชื้อส เป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 10% tricholoacetic acid ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ปั่น เหวี่ยงที่ 5,000 rpm 5 นาที เพื่อแยกตะกอนโปรตีนออกสารละลาย นำส่วนใส 600 ไมโครลิตร เติมลงในสารละลาย 0.1 N NaOH 700 ไมโครลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 440 นาโนเมตร ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ นำข้อมูลผลของสารเคมีแต่ละชนิดต่อเอนไซม์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับตัวควบคุม

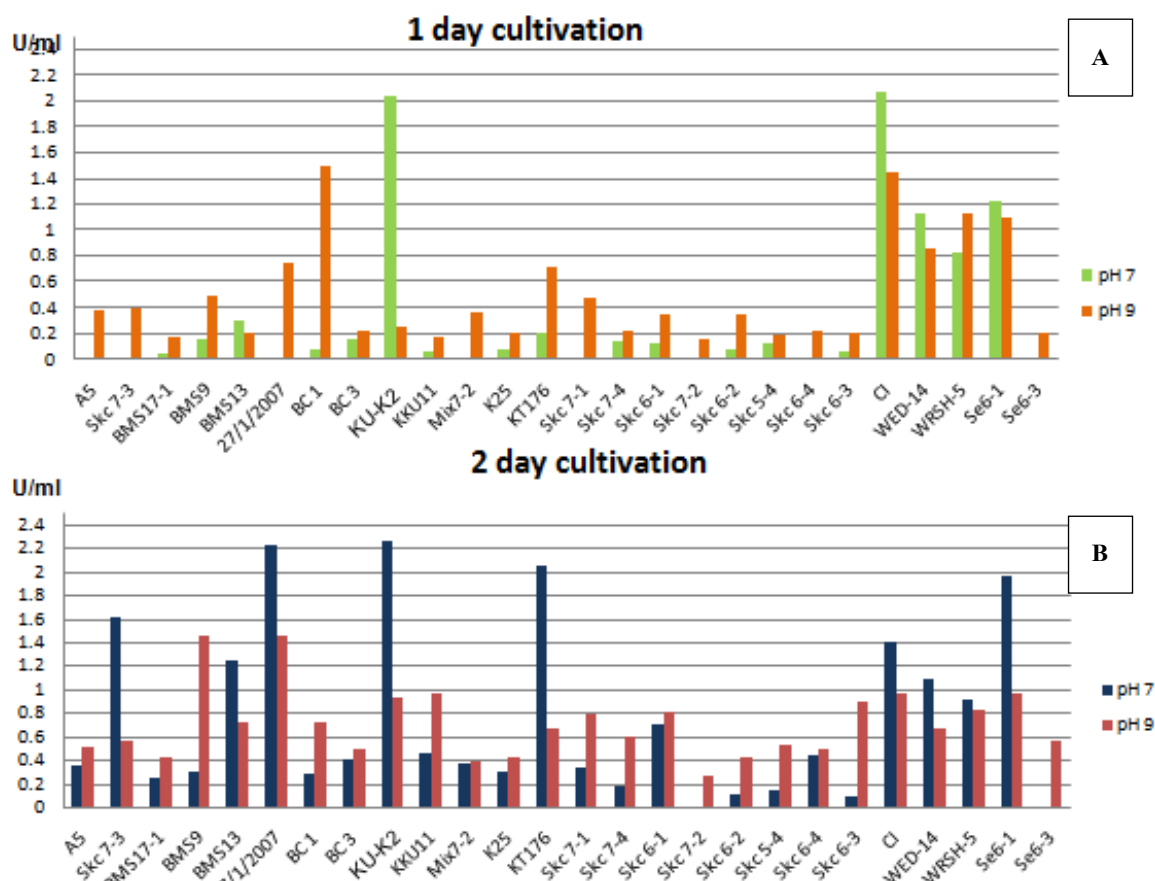
4.7.7 การใช้เอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสย่อยโปรตีนออกจากน้ำยางสด

นำน้ำยางสดปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร มาเจือจางด้วย 0.05 M glycine-NaOH buffer, pH 9.0 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส (2.54 U/mL) ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร บ่มที่ 50 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 1, 2, 4, 6, 8 ชั่วโมง จากนั้นเติม 10% tricholoacetic acid ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อตกตะกอนโปรตีน จากนั้นนำไป 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะมิโนที่เกิดขึ้น โดยวิธีการของ Lowry ในที่นี้จะวัดปริมาณไทโรซีนที่เกิดขึ้นโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานไทโรซีน เปรียบเทียบปริมาณไทโรซีนที่เกิดขึ้นในเวลาต่าง เทียบกับตัวอย่างที่บ่มเวลาที่ 0 ชั่วโมง หากมีปริมาณไทโรซีนเกิดขึ้น แสดงว่าเกิดปฏิกิริยาการย่อยโปรตีนที่อยู่ในน้ำยาง ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ

5. ผลการวิจัยและอภิปรายผล

5.1 การคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยโปรตีนโดยเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส

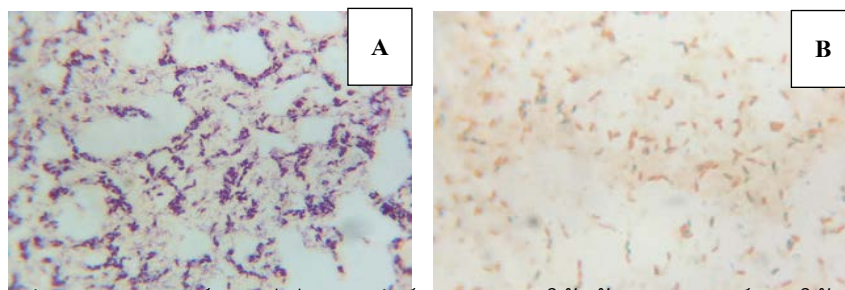
จากการคัดเลือกแบคทีเรียจำนวนทั้งหมด 26 สายพันธุ์ในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสโดยใช้หางน้ำยาเป็น basal medium ที่พีเอช 7.0 และ 9.0 และบ่มเป็นเวลา 24 และ 48 ชม นั้นพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ KU-K2 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสสูงที่สุด (2.23 หน่วยต่อมล) หลังจากเพาะเลี้ยงในอาหาร Serum medium พีเอช 7.0 เป็นเวลา 48 ชม ดังภาพที่ 1.3



ภาพที่ 1.3 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสของเชื้อทั้ง 26 ไอโซเลทที่พีเอช 7.0 และพีเอช 9.0 A: ระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ 24 ชั่วโมง และ B: ระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ 48 ชั่วโมง

5.2 การบ่งชนิดแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส

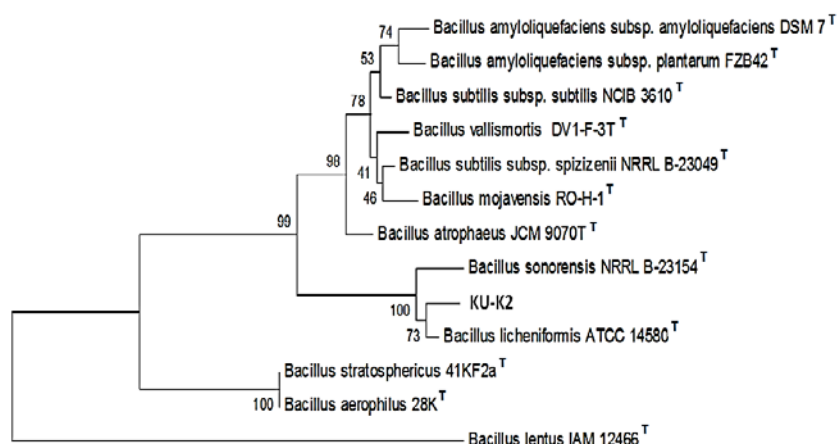
จากการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ KU-K2 ให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุดจึงได้นำแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวมาจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยลักษณะทางสัณฐานวิทยา สมบัติทางชีวเคมี และ 16s rRNA gene ดังที่อธิบายในวิธีการทดลอง โดยจากผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ KU-K2 เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปทรงแท่ง สร้างสปอร์ ดังภาพที่ 1.4



ภาพที่ 1.4 ลักษณะของเซลล์แบคทีเรียสายพันธุ์ KU-K2 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

ภาพ A: ย้อมสีแบบ Gram' stain และ B: ย้อมสปอร์

และจากการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแบคทีเรียโดยใช้ 16s rRNA gene พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ KU-K2 มีการเรียงลำดับเบสของยีน 16s RNA ใกล้เคียงกับ *B. licheniformis* โดย ดังแสดงในภาพที่ 5 และผลการทดสอบทางชีวเคมีเทียบกับ *B. licheniformis* ดังตารางที่ 8



ภาพที่ 1.5

ความสัมพันธ์

0.005

วิวัฒนาการของแบคทีเรีย สายพันธุ์ KU-K2

ตารางที่ 1.8 สมบัติทางชีวเคมีของ *B. licheniformis* และ *Bacillus* สายพันธุ์ KU-K2

ต้นไม้

ทาง

	<i>B. licheniformis</i>	KU-K2	
Catalase	+	+	
Anaerobic growth	+	ND	
VP test	+	+	
Acid formation from			
D-glucose	+	+	
L-arabinose	+	+	
D-xylose	+	+	
D-mannitol	+	+	
Hydrolysis			
Casein	+	+	
Gelatin	+	+	
Starch	+	+	
Utilization			
Citrate	+	+	
Propionate	+	-	
Phenylalanine	-	-	
Nitrate	+	ND	
Growth in NaCl			
5%	+	+	
7%	+	+	
5.3. ปัจจัยที่มี	10%	ND	+
ผลต่อการ			

ผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสโดยใช้วิธี Plackett-Burman design

เมื่อศึกษาชนิดของสารอาหาร และปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจากเชื้อแบคทีเรีย *B.licheniformis* (KU-K2) ตามแผนการทดลองที่ออกแบบโดยวิธี Plackett-Burman โดยทำการเพาะเลี้ยงในฟลาस्कขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารปริมาตร 25 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่

ความเร็วรอบ 170 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าในแต่ละการทดลองมีค่าของกิจกรรมเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส แตกต่างกัน โดยพบว่าการทดลองที่ 2 ที่ประกอบด้วย Skim milk 5 กรัมต่อลิตร Glucose 2 กรัมต่อลิตร K_2HPO_4 0.5 กรัมต่อลิตร $MgSO_4$ 0.5 กรัมต่อลิตร $FeSO_4$ 0.05 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 37 องศาและ $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0 กรัมต่อลิตร ให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด ดังตารางที่ 1.9

ตารางที่ 1.9 ผลการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสของเชื้อแบคทีเรีย *B.licheniformis* (KU-K2) ในแต่ละการทดลอง

เมื่อนำผลการทดลองที่ได้ทั้ง 12 การทดลองไปวิเคราะห์ผลทางสถิติ โดยใช้โปรแกรมทางสถิติ SPSS 11.5 เพื่อคัดเลือกปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส จากเชื้อแบคทีเรีย *B.licheniformis* (KU-K2) จากตารางที่ 1.10 แสดงค่า Mean square ค่าสถิติ F (F-value) และค่านัยสำคัญของการทดสอบ (P-value) โดยการคัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสนั้นจะพิจารณาจากค่า P-value ที่น้อยกว่าระดับนัยสำคัญที่ 0.05 ซึ่งจากการวิเคราะห์พบว่ามีเพียง 4 ตัว

Run	Experimental variable							Protease activity (units/mL)*
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	
1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	2.98 ±0.218
2	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	3.22 ±0.379
3	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	2.81 ±0.122
4	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	2.88 ±0.081
5	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	2.57 ±0.011
6	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	1.99 ±0.609
7	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	0.30 ±0.081
8	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	1.83 ±0.103
9	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	2.05 ±0.115
10	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	2.11 ±0.184
11	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	2.37 ±0.023
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1.94 ±0.218

แปร ได้แก่ Skim milk (X₁), Glucose (X₂), K_2HPO_4 (X₃) และ $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ (X₇) เป็นปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ($P < 0.05$)

ตารางที่ 1.10 ผลวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้วิธี Plackett-Burman ออกแบบการทดลองต่อการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจากเชื้อแบคทีเรีย *B. licheniformis* (KU-K2)

*Values are indicated as mean $\pm$ SD (n=2)

5.4 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสโดยวางแผนการทดลองแบบ Central composite design (CCD) และวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยวิธีพื้นผิวตอบสนอง (RSM)

หลังจากทำการศึกษาคัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ อัลคาไลน์โปรติเอส โดยใช้วิธีทางสถิติ Plackett-Burman ออกแบบการทดลอง โดยนำปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสมาศึกษาหาค่าที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสโดยใช้วิธีพื้นผิวตอบสนอง สำหรับรูปแบบที่ใช้ในการออกแบบการทดลอง คือ Central composite design (CCD) สำหรับปัจจัยที่นำมาศึกษามีทั้งหมด 4 ปัจจัย ได้แก่ ได้แก่ Skim milk (X_1), Glucose (X_2), K_2HPO_4 (X_3) และ $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ (X_7) โดยแต่ละปัจจัยที่ทำการศึกษาก็จะแบ่งออกเป็น 5 ระดับ ได้แก่ -2, -1, 0, 1 และ 2 แสดงดังตารางที่

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	6.153 ^(a)	7	.879	9.580	.023
Intercept	61.038	1	61.038	665.203	.000
X_1 :Skim milk	1.668	1	1.668	18.179	.013
X_2 :Glucose	1.518	1	1.518	16.543	.015
X_3 : K_2HPO_4	.958	1	.958	10.437	.032
X_4 : $MgSO_4$	.001	1	.001	.013	.914
X_5 : $FeSO_4$	.278	1	.278	3.028	.157
X_6 :Temperature	.619	1	.619	6.749	.060
X_7 : $CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1.111	1	1.111	12.112	.025
Error	.367	4	.092		
Total	67.559	12			
Corrected Total	6.520	11			

ตารางที่ 1.11 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์อัลคาไลโนโปรติเอสนำมากำหนดระดับของปัจจัยเพื่อหาจุดที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลโนโปรติเอส

ในแต่ละการทดลองทำ 2 ซ้ำ ซึ่งสามารถออกแบบการทดลองได้ทั้งหมด 30 การทดลอง โดยทำการทดลองในระดับกลางจำนวน 6 ซ้ำ (การทดลองที่ 25-30) เมื่อทำการทดลองตามแผนที่ย่อแบบการทดลองทั้ง 30 การทดลอง พบว่าในแต่ละการทดลองมีค่าของกิจกรรมเอนไซม์อัลคาไลโนโปรติเอส ที่แตกต่างกัน โดยการทดลองที่ 23 ประกอบด้วย Skim milk (X_1) เท่ากับ 8 กรัมต่อลิตร, Glucose (X_2) เท่ากับ 1 กรัมต่อลิตร, K_2HPO_4 (X_3) เท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตรและ $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ (X_7) เท่ากับ 0 กรัมต่อลิตร โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลโนโปรติเอสเท่ากับ 6.67 หน่วยต่อมิล แสดงดังตารางที่ 1.12

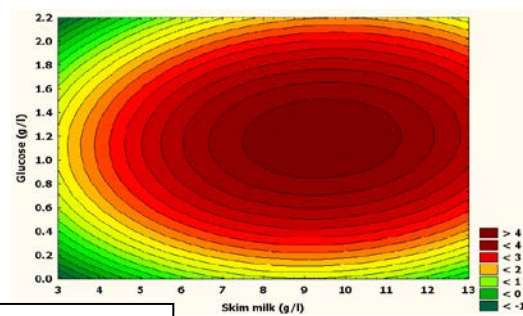
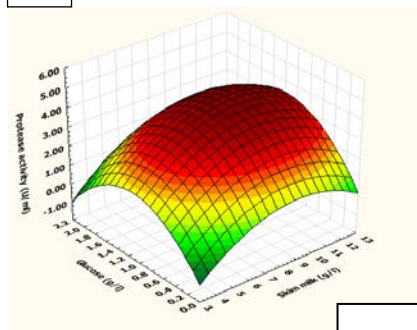
Variable	Symbol	Code level				
		-2	-1	0	1	2
Skim milk (g/L)	X_1	4	6	8	10	12
Glucose (g/L)	X_2	0	0.5	1	1.5	2.0
K_2HPO_4 (g/L)	X_3	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$ (g/L)	X_7	0	0.06	0.12	0.18	0.24

ตารางที่ 1.12 กิจกรรมเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จากการทดลองและการคำนวณจากสมการ
ในแต่ละการทดลอง

Run	Variable				Protease activity (u/mL)	
	Skim milk	Glucose	K ₂ HPO ₄	CoCl ₂ .H ₂ O	Mean Observed	Predicted
1	-1	-1	-1	-1	4.32	3.43
2	+1	-1	-1	-1	4.75	4.65
3	-1	+1	-1	-1	3.93	3.54
4	+1	+1	-1	-1	4.86	4.95
5	-1	-1	+1	-1	4.52	4.13
6	+1	-1	+1	-1	5.12	4.57
7	-1	+1	+1	-1	4.57	4.32
8	+1	+1	+1	-1	4.89	4.96
9	-1	-1	-1	+1	1.01	1.05
10	+1	-1	-1	+1	0.91	1.83
11	-1	+1	-1	+1	0.88	2.09
12	+1	+1	-1	+1	2.57	3.06
13	-1	-1	+1	+1	0.88	1.45
14	+1	-1	+1	+1	0.94	1.45
15	-1	+1	+1	+1	2.37	2.58
16	+1	+1	+1	+1	1.20	2.76
17	-2	0	0	0	2.15	2.47
18	+2	0	0	0	4.99	3.88
19	0	-2	0	0	1.01	1.33
20	0	+2	0	0	3.87	2.76
21	0	0	-2	0	3.20	2.89
22	0	0	+2	0	3.77	3.30
23	0	0	0	-2	5.09	6.67
24	0	0	0	+2	4.47	2.10
25	0	0	0	0	4.68	4.38
26	0	0	0	0	4.60	4.38
27	0	0	0	0	4.19	4.38
28	0	0	0	0	4.29	4.38
29	0	0	0	0	4.39	4.38
30	0	0	0	0	4.13	4.38

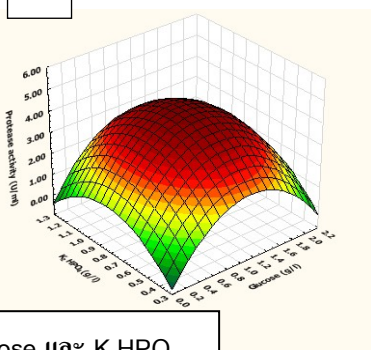
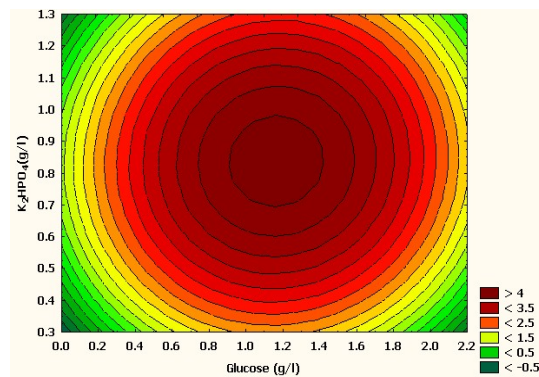
การหาจุดที่เหมาะสมของตัวแปรที่ศึกษาต่อการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส

A

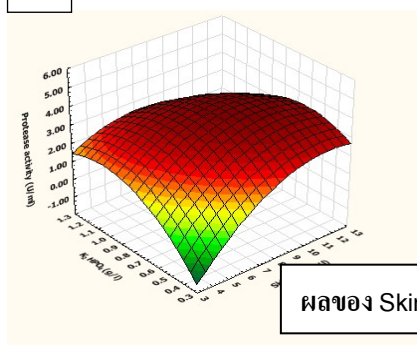
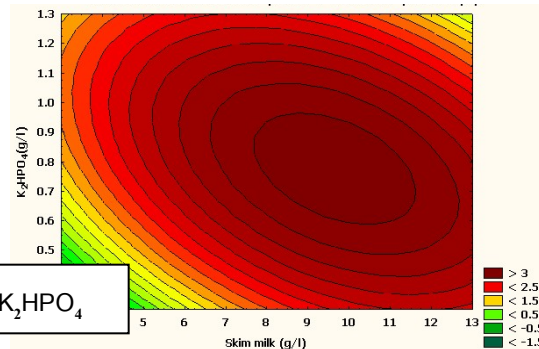


ผลของ Glucose และ Skim milk

B

ผลของ Glucose และ K_2HPO_4 

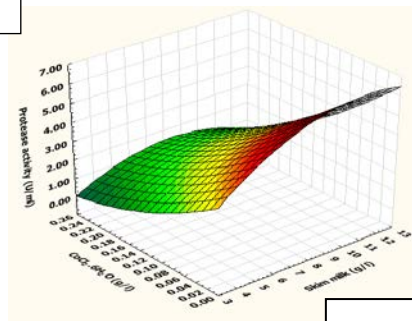
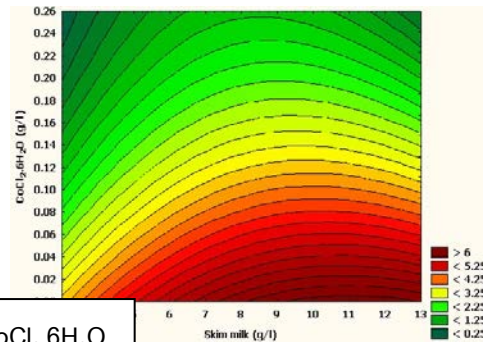
C

ผลของ Skim milk และ K_2HPO_4 

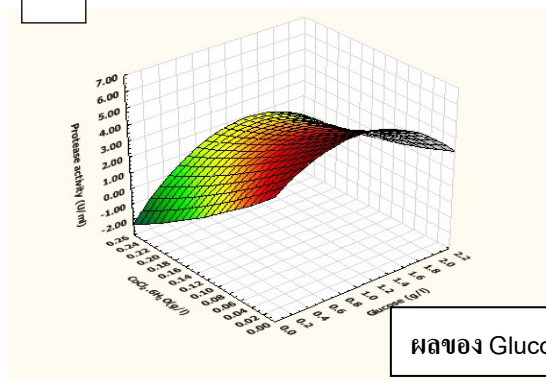
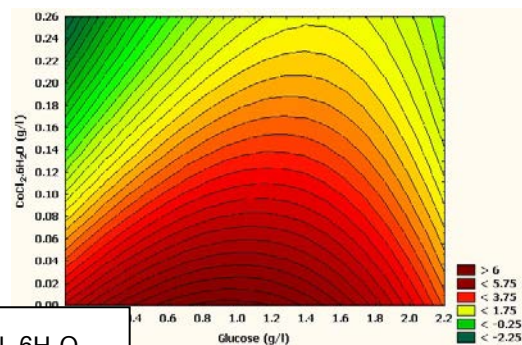
ภาพที่ 1.6 กราฟพื้นผิวตอบสนอง และคอนทัวร์แสดงปฏิสัมพันธ์ระหว่างปัจจัย

A: Glucose และ skim milk B: Glucose และ K_2HPO_4 C: Skim milk และ K_2HPO_4

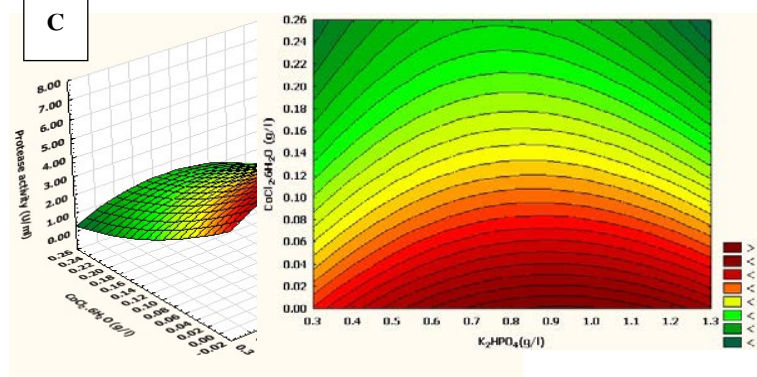
A

ผลของ Skim milk และ $CoCl_2.6H_2O$ 

B

ผลของ Glucose และ $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 

C

ผลของ K_2HPO_4 และ $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

ภาพที่ 1.7 กราฟพื้นผิวตอบสนอง และคอน

ทัวร์ของปฏิสัมพันธ์ระหว่างปัจจัย

A: Skim milk และ $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ B: Glucose และ $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ C: K_2HPO_4 และ $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

ภาพพื้นผิวตอบสนอง (ภาพ 3 มิติ) และคอนทัวร์พล็อต (ภาพ 2 มิติ) จะแสดงถึงอิทธิพลของแต่ละตัวแปร และปฏิสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรต่อการผลิตเอนไซม์ ภาพที่ 1.6 และ 1.7 แสดงผลของภาพพื้นผิวตอบสนอง (ภาพ 3 มิติ) และคอนทัวร์พล็อต (ภาพ 2 มิติ)

จากการวิเคราะห์พื้นผิวตอบสนองทั้ง 6 ภาพ พบว่าจุดที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสคือ ใช้ความเข้มข้นของสารอาหารใน non rubber serum 1 ลิตร ประกอบด้วย Skim milk 9.82 กรัมต่อลิตร Glucose 0.97 กรัมต่อลิตร K_2HPO_4 0.82 กรัมต่อลิตร MgSO_4 0.2 กรัมต่อลิตร FeSO_4 0.05 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 7.0 ความเร็วรอบ 170 รอบต่อนาที และระยะเวลาการบ่ม 48 ชั่วโมง โดยอัตราส่วนระหว่างทางน้ำยากับน้ำสำหรับผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสในหนึ่งลิตรคือ 1:1 คือทางน้ำยาก 0.5 ลิตรกับน้ำที่เติมสารอาหาร 0.5 ลิตร โดยสาเหตุที่ต้องเจือจางน้ำยากในอัตราส่วน 1:1 นั้นเพื่อลดความเข้มข้นของ COD และสารอินทรีย์ที่มีอยู่ในทางน้ำยากเนื่องสารอินทรีย์ทั้งโปรตีน น้ำตาล และสารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาจมีผลในการยับยั้งการเจริญและผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปร

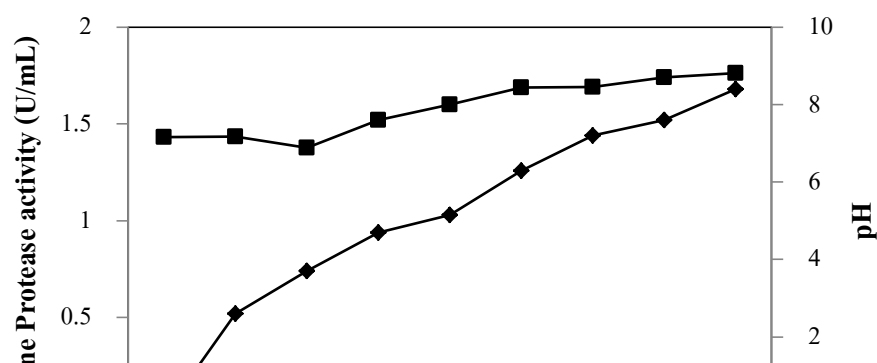
รติเอสได้ โดยต้นทุนในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจากสูตรอาหารที่เหมาะสมในระดับห้องปฏิบัติการนั้นแสดงดังตารางที่ 10 ซึ่งพบว่าเอนไซม์ 1 ลิตรจะใช้ต้นทุนในการผลิตประมาณ 18.9 บาท 1 อย่างไรราคากาหราน้ำมนเป็นารคามนห้องปฏิบัติการซึ่งถ้าเป็นราคาระดับโรงงานจะมีต้นทุนต่ำกว่า

ตารางที่ 1.13 วัตถุดิบและต้นทุนในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส 1 ลิตร

วัตถุดิบ	จำนวนต่อลิตร/ หน่วย	ราคาต้นทุนต่อลิตร (บาท)	รวม (บาท)
1. หางน้ำยางที่แยกยางสกีม	500/มล.	0	0
2. Skim milk	9.82/กรัม	13.16	13.16
3. Glucose	0.97/กรัม	0.5	13.66
4. K_2HPO_4	0.82/กรัม	0.74	14.4
5. $MgSO_4$	0.2/กรัม	0.14	14.54
6. $FeSO_4$	0.05/กรัม	0.05	14.59
7. ค่าน้ำ	500/กรัม	0.02	14.61
8. ค่าไฟ	3/วัน	4.27	18.9

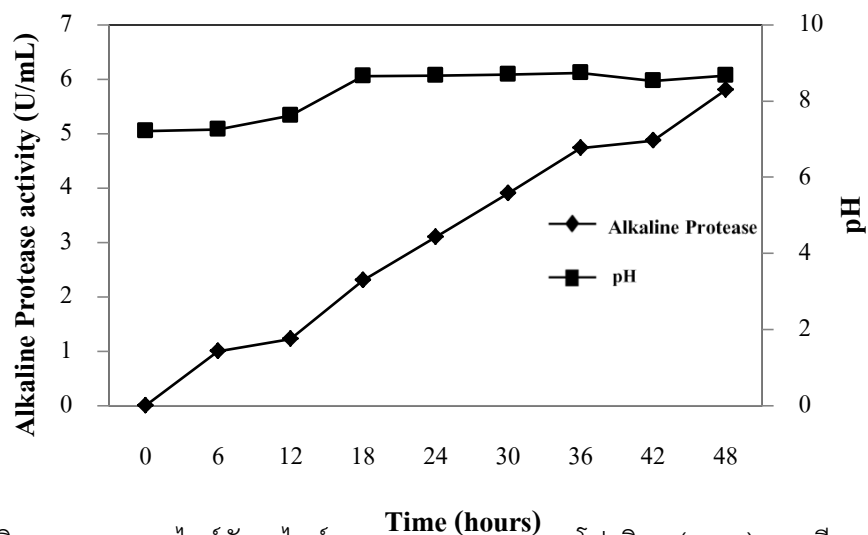
5.5 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสในถังหมักขนาด 5.0 ลิตรในการหมักแบบเปิด

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *B. licheniformis* (KU-K2) ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมในถังหมักแบบกวนขนาด 5.0 ลิตร ซึ่งบรรจุปริมาณอาหารเท่ากับ 2.5 ลิตร ด้วยอัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.0 และ 2.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาณอาหารต่อนาที ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และให้อัตราการกวนเท่ากับ 250 และ 350 รอบต่อนาที จำนวน 2 ชั่วโมง โดยพบว่าทั้ง 3 batch กิจกรรมของเอนไซม์จะสูงที่สุดที่ชั่วโมงที่ 48 ซึ่งสภาวะที่ให้อัตราการกวนเท่ากับ 250 รอบต่อนาทีและอัตราการให้อากาศเท่ากับ 2.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาณอาหารต่อนาที ให้กิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสสูงที่สุดเมื่อเทียบกับการให้อัตราการกวน 350 รอบต่อนาทีและอัตราการให้อากาศ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาณอาหารต่อนาที แสดงว่าเชื้อแบคทีเรีย *B. licheniformis* (KU-K2) ต้องการอากาศในปริมาณสูงสำหรับการเจริญแต่ไม่ต้องการการกวนที่มากเกินไป ดังแสดงในภาพที่ 1.8, 1.9, 1.10 และ 1.11

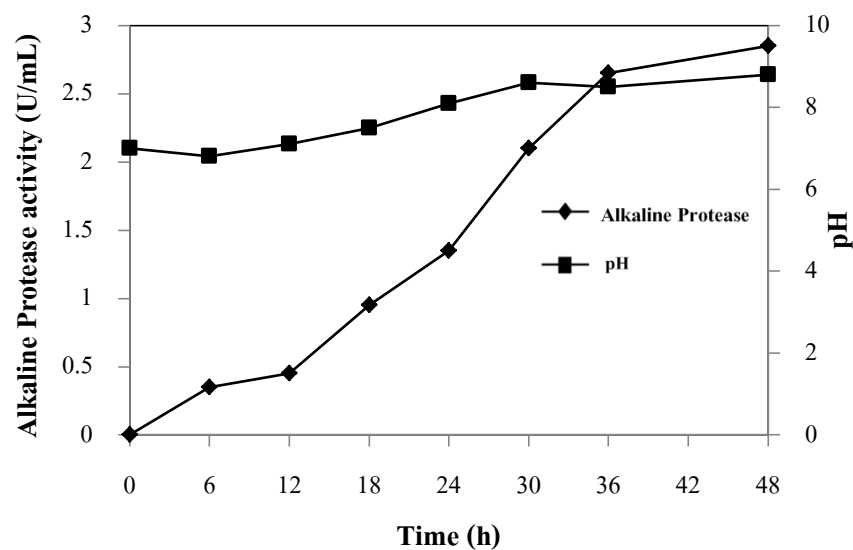


◆ Alkaline Protease
■ pH

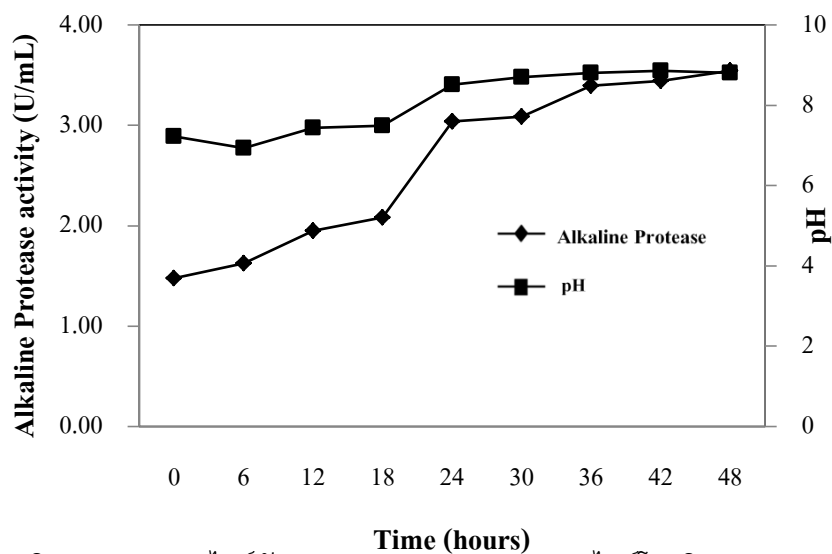
ภาพที่ 1.8 กิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส (◆) และ พีเอช (■) ที่ระยะเวลาต่างๆ ภายใต้สภาวะการให้อากาศ 1.0 vvm และอัตราการกวน 250 รอบต่อนาที



ภาพที่ 1.9 กิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส (◆) และ พีเอช (■) ที่ระยะเวลาต่างๆ ภายใต้สภาวะการให้อากาศ 2.0 vvm และอัตราการกวน 250 รอบต่อนาที



ภาพที่ 1.10 กิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส (—◆—) และพีเอช (—■—) ที่ระยะเวลาต่างๆ ภายใต้สภาวะการให้อากาศ 1.0 vvm และอัตราการกวน 350 รอบต่อนาที



ภาพที่ 1.11 กิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส (—◆—) และพีเอช (—■—) ที่ระยะเวลาต่างๆ ภายใต้สภาวะการให้อากาศ 2.0 vvm และอัตราการกวน 350 รอบต่อนาที

5.6 ศึกษาสมบัติของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส

5.6.1 การเลี้ยงเชื้อ

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. KU-K2 ลงในอาหาร BMSM broth พีเอช 7.0 ที่มีองค์ประกอบของ Rubber serum พบว่าเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสผลิตได้สูงสุดเมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 วัน ได้เอนไซม์เท่ากับ 2.54 U/mL

5.6.2 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส

ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส โดยวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ในช่วงอุณหภูมิ 30-80 องศาเซลเซียส (พีเอช 9.0) พบว่าเมื่อวิเคราะห์กิจกรรมใน

สภาวะที่มีอุณหภูมิขึ้นกิจกรรมของเอนไซม์ก็จะมีค่าเพิ่มขึ้น โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสคือ 60 องศาเซลเซียส แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อกิจกรรมของเอนไซม์จะมีค่าลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 60 องศาเซลเซียส โดยพบกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 80 และ 75 เปอร์เซ็นต์เมื่ออุณหภูมิ 70 และ 80 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

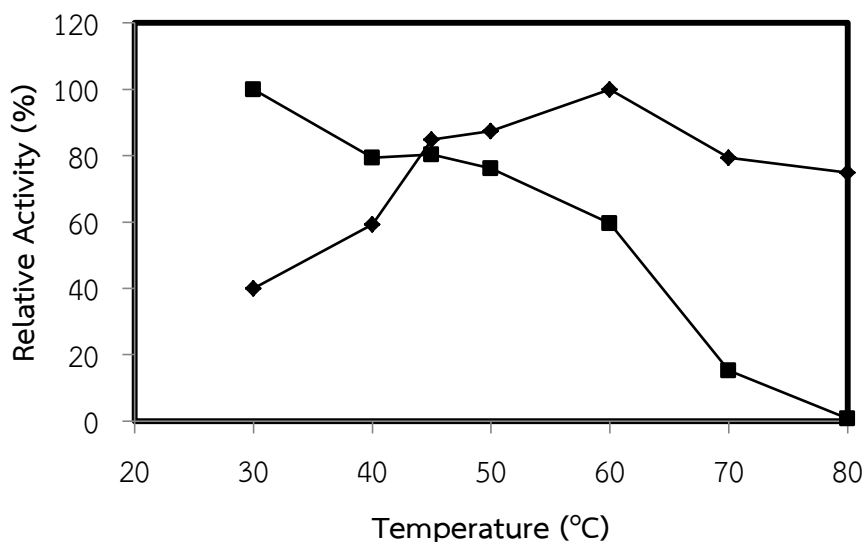
Serine alkaline protease จาก *Bacillus* sp. SSR1 มีค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ที่ 45 องศาเซลเซียส (Singh และคณะ, 2001)

โดยการทดลองนี้อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส คือ 60 องศาเซลเซียส ซึ่งสอดคล้องกับเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสที่ผลิตจาก *B. clausii* GMBAE 42 (Kazan และคณะ, 2005), *B. mojavensis* A21 (Haddar และคณะ, 2009) และ *Bacillus* sp. B001 (Deng และคณะ, 2010)

เมื่อนำเอนไซม์บ่มที่ 30-80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที พบว่าเอนไซม์มีค่าความคงตัวในช่วง 30-50 องศาเซลเซียส และเมื่ออุณหภูมิขึ้นค่ากิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงโดยเอนไซม์มีค่าครึ่งชีวิตหรือมีค่ากิจกรรมเหลือ 50 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับเอนไซม์เริ่มต้น คือ 62 องศาเซลเซียส เมื่อบ่มเอนไซม์ที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที พบว่าตรวจไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์

ตารางที่ 1.14 อุณหภูมิที่เหมาะสมและความคงตัวของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส

อุณหภูมิ (°C)	อุณหภูมิที่เหมาะสม (% relative)	ความคงตัว (% relative)
30	39.98 ± 0.67	100.00 ± 3.20
40	59.38 ± 3.56	79.36 ± 3.04
45	84.94 ± 3.75	80.30 ± 1.89
50	87.51 ± 0.67	76.09 ± 0.66
60	100.00 ± 5.31	59.52 ± 0.85
70	79.47 ± 3.88	15.15 ± 1.34
80	74.87 ± 6.44	6.78 ± 4.27



ภาพที่ 1.12 อุณหภูมิที่เหมาะสม (—◆—) และความคงตัว (—■—) ของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส

5.6.3 ผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส

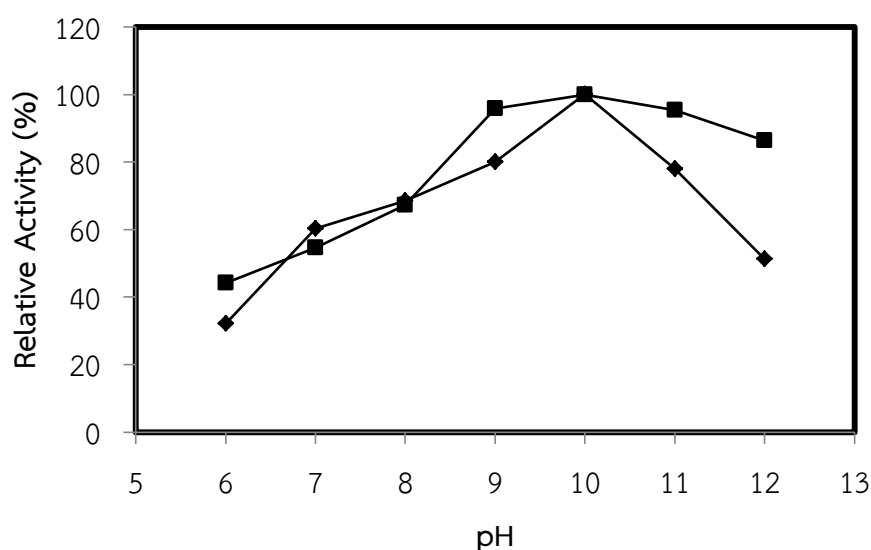
ผลการศึกษาค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส โดยวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ในช่วงพีเอช 6.0-12.0 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่อวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ในสภาวะที่มีค่าพีเอชสูงขึ้น ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ก็จะสูงตามขึ้นไป โดยมีค่ากิจกรรมสูงสุดที่พีเอช 10.0 และ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงเมื่อมีค่าพีเอชสูงกว่า 10.0 ซึ่งในสภาวะพีเอช 12.0 กิจกรรมของเอนไซม์จะเหลือเพียง 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับค่าเอนไซม์สูงสุด

โดยการทดลองนี้สอดคล้องกับเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. SSR1 (Singh และคณะ, 2001), *B. mojavensis* A21 (Haddar และคณะ, 2009), thermophilic bacterium EP1001 (Wilson และ Remigio, 2012) โดยมีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสเท่ากับ 10.0

เมื่อบ่มเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสในสภาวะที่มีพีเอชในช่วง 6.0-12.0 ที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้น นำเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสภายหลังจากการบ่มในสภาวะที่มีพีเอชในช่วงมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ในสภาวะพีเอช 9.0 ที่ 45 องศาเซลเซียส พบว่า เอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสมีความคงตัวอยู่ในช่วงพีเอช 9.0-12.0 จะเห็นได้ว่าเอนไซม์มีศักยภาพในการเกิดกิจกรรมและทนสภาวะความเป็นด่างได้ ซึ่งสามารถนำไปใช้ได้ ในอุตสาหกรรมต่างได้ เช่น อุตสาหกรรมผงซักฟอก หรือ อุตสาหกรรมฟอกหนังสัตว์ เป็นต้น

ตารางที่ 1.15 พีเอชที่เหมาะสมและความคงตัวของพีเอชต่อเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส

พีเอช	พีเอชที่เหมาะสม (% relative)	ความคงตัว (% relative)
6	32.64 ± 1.75	44.03 ± 4.07
7	60.74 ± 8.77	54.53 ± 2.04
8	69.42 ± 2.34	67.08 ± 1.75
9	81.20 ± 1.46	95.68 ± 4.36
10	100.00 ± 5.84	100.00 ± 0.29
11	81.40 ± 8.77	95.27 ± 2.04
12	52.07 ± 1.17	86.21 ± 2.62



ภาพที่ 1.13 พีเอชที่เหมาะสม (—◆—) และความคงตัว (—■—) ของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส

5.6.4 ผลการทดลองผลของสารเคมีต่อกิจกรรมเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส

เมื่อป้อนเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสในสภาวะที่มี metal ions และ protease inhibitor พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสมีปริมาณลดลงในสภาวะที่มี 1mM PMSF, 10mM Mg^{2+} , 10mM Ba^{2+} , 10mM Zn^{2+} , 10mM Fe^{3+} , 5mM Phenanthroline, 10mM Hg^{2+} , 5mM EDTA และ 10 mM Ca^{2+}

PMSF เป็นสารยับยั้ง serine protease โดยเกิดปฏิกิริยา sulphonation บริเวณ serine ที่อยู่ บริเวณเร่งของเอนไซม์ จากการทดลองเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสถูกยับยั้งโดย 1mM PMSF โดยมีกิจกรรม

ของเอนไซม์เหลือ 50 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับตัวควบคุม แต่อย่างไรก็ตามโดยทั่วไปแล้ว serine protease จะไม่พบการถูกยับยั้งด้วย EDTA ซึ่งเป็น metal chelating agent แต่จากการทดลองพบการยับยั้ง 54 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับตัวควบคุม จึงสรุปได้ว่าเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสชนิดนี้ต้องการ metal ions ในการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Wilson และ Remigio (2012)

เมื่อพิจารณาถึงผลของ metal ions ต่อกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส พบว่า divalent metal ions มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ คือทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Huddus และ Ramteke (2008) และ Haddar และคณะ (2009)

ตารางที่ 1.16 ผลของสารเคมีต่อกิจกรรมเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส

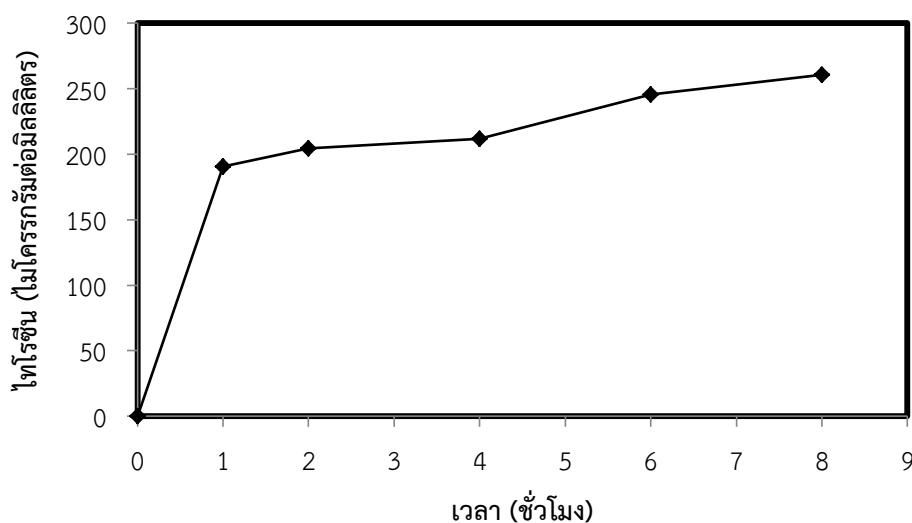
สารเคมี (final concentration assay)	Relative activity	Protease inhibited
Control	100.00 ± 2.68	-
1 mM PMSF	50.13 ± 6.11	Serine protease
10 mM Mg ²⁺	56.21 ± 2.99	-
10 mM Ba ²⁺	45.52 ± 2.50	-
10 mM Zn ²⁺	23.37 ± 3.98	-
10 mM Fe ³⁺	9.03 ± 4.53	-
5 mM Phenanthroline	54.04 ± 1.59	Metallo-protease
10 mM Hg ²⁺	11.03 ± 1.43	-
5 mM EDTA	53.69 ± 9.51	Metallo-protease
10 mM Ca ²⁺	61.51 ± 11.09	-

5.6.5 การใช้เอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสย่อยโปรตีนออกจากน้ำยางสด

เมื่อนำเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสมาย่อยโปรตีนในน้ำยางสดโดยบ่มที่ 50 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 1, 2, 4, 6, 8 ชั่วโมง จากนั้นเติม 10% trichloroacetic acid เพื่อตกตะกอนโปรตีน จากนั้นวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะมิโนที่เกิดขึ้น ในการทดลองนี้จะวัดปริมาณไทโรซีนที่เกิดขึ้นเปรียบเทียบกับปริมาณไทโรซีนที่เกิดขึ้นในเวลาต่าง เทียบกับตัวอย่างที่บ่มเวลาที่ 0 ชั่วโมง หากมีปริมาณไทโรซีนเกิดขึ้น แสดงว่าเกิดปฏิกิริยาการย่อยโปรตีนที่อยู่ในน้ำยาง ผลการทดลองพบว่าเมื่อบ่มเอนไซม์นานเพิ่มขึ้นจะพบว่ามีปริมาณไทโรซีนเพิ่มมากขึ้นตามไปด้วย แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสมีศักยภาพในการย่อยโปรตีนที่อยู่ในน้ำยางสดได้ ดังนั้นเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจากเชื้อที่แยกได้ สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับน้ำยางได้ในอนาคต

ตารางที่ 1.17 ปริมาณไทโรซีนที่เกิดขึ้นภายหลังจากการย่อยสลายโปรตีนออกจากน้ำยางด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส

เวลา (ชั่วโมง)	ไทโรซีน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
0	0.00 ± 0.51
1	190.54 ± 14.91
2	204.59 ± 0.38
4	211.89 ± 12.99
6	245.41 ± 7.64
8	260.54 ± 0.76



ภาพที่ 1.14 ปริมาณไทโรซีนที่เกิดขึ้นภายหลังจากการย่อยสลายโปรตีนออกจากน้ำยางด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส

แนวทางการนำเอนไซม์ไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม

จากงานวิจัยนี้จะเห็นได้ว่าการนำ Rubber serum มาเป็นองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงสำหรับผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจะเป็นมาเพิ่มมูลค่าของทั้งของกระบวนการผลิตยาง โดยสามารถมาผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีราคาแพง ประกอบปัจจุบันประเทศยังนำเข้าเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส จากต่างประเทศเป็นจำนวนมาก

เมื่อพิจารณาถึงคุณลักษณะของเอนไซม์จะเห็นได้ว่าเอนไซม์มีความคงตัวและเกิดกิจกรรมได้ที่อุณหภูมิสูง และ พีเอชในช่วงต่าง ดังนั้นเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสที่ผลิตได้มีความเหมาะสมสำหรับการนำไปพัฒนาและใช้ในอุตสาหกรรมผงซักฟอก หรือ อุตสาหกรรมฟอกหนังสัตว์ นอกจากนั้นเมื่อพิจารณาถึงคุณสมบัติในการย่อยโปรตีนออกนํ้าจากนํ้ายางสด จะเห็นได้ว่าเอนไซม์ชนิดนี้มีศักยภาพในการย่อยโปรตีนออกจากรนํ้ายางสดได้ โดยสามารถลดปริมาณโปรตีนในนํ้ายางสด และเพิ่มความบริสุทธิ์ให้นํ้ายางได้ ส่งผลให้นํ้ายางสดมีคุณภาพเพิ่มมากขึ้น

6. สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสโดยใช้หางนํ้ายางที่แยกยางสกีมออกเป็นแหล่งของสารอาหารและแร่ธาตุ โดยจากการคัดแยกสายพันธุ์ *Bacillus* ในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส พบว่าสายพันธุ์ KU-K2 เป็นสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสได้สูงที่สุด (2.3 หน่วยต่อ มล.) โดยเมื่อระบุชนิดสายพันธุ์ KU-K2 ด้วยการเปรียบเทียบลำดับเบสของ 16s rRNA gene และการทดสอบทางชีวเคมีพบว่าสายพันธุ์ *B. licheniformis* จากนั้นได้ศึกษาปัจจัยทางโภชนาการและหาค่าที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสของ *B. licheniformis* (KU-K2) ในระดับพลาสก์ด้วยการออกแบบการทดลองทางสถิติโดยใช้ Plackett-Burman design (PB) และ Central Composite Design (CCD) พบว่าเชื้อสายพันธุ์ KU-K2 สามารถผลิตเอนไซม์ได้ 6.67 หน่วยต่อ มล. จากการใช้หางนํ้ายางที่แยกยางสกีมออกความเข้มข้นในอัตราส่วน 1:1 และเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อในถังหมักแบบกวนผสมขนาด 5.0 ลิตรปริมาตร 2.5 ลิตร โดยใช้องค์ประกอบของสารอาหารเช่นเดียวกับในระดับพลาสก์พบว่าเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ได้ 5.97 หน่วยต่อ มล. หลังจากการหมักเป็นเวลา 48 ชั่วโมงโดยไม่ควบคุมพีเอช และควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวนที่ 250 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศเท่ากับ 2.0 ปริมาตรอาหารต่อปริมาตรต่อนาที และเมื่อนำเอนไซม์ที่ผลิตได้ไปศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์เพื่อรู้ข้อมูลสำหรับนำไปประยุกต์ใช้นั้นพบว่า เอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสที่ผลิตได้ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และ พีเอช 10.0 มีความคงทนที่ ช่วงอุณหภูมิ 30-50 องศาเซลเซียส และ ช่วงพีเอช 9.0-11.0 ซึ่งมีความเหมาะสมที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมสิ่งทอ (textile) และอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์ซักล้าง (detergent) ได้เป็นอย่างดี

จากผลของงานวิจัยดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าหางนํ้ายางที่แยกยางสกีมออกนั้นมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้สำหรับผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสด้วยกระบวนการหมักแบบเปิดโดยใช้ในอัตราส่วน 1:1 เนื่องจากมีสารอาหารและแร่ธาตุที่ช่วยให้เชื้อจุลินทรีย์สามารถเจริญและผลิตเอนไซม์ได้ (2.3 หน่วยต่อ มล.) แต่เพื่อเพิ่มความสามารถในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจึงจำเป็นต้องเติมสารอาหารและแร่ธาตุ

เพิ่มเข้าไปเพื่อเหนี่ยวนำให้ผลิตเอนไซม์ได้มากขึ้น (6.67 หน่วยต่อ มล.) โดยเมื่อคำนวณต้นทุนในการผลิตเอนไซม์ดังกล่าวสำหรับนำไปใช้ในอุตสาหกรรมมีความเป็นไปได้สูง (18.9บาทต่อลิตร) เพราะกระบวนการหมักไม่ซับซ้อน หมักในกระบวนการหมักแบบเปิด นอกจากนี้ในเชิงสิ่งแวดล้อมกระบวนการหมักดังกล่าวมีส่วนช่วยในการลดของเสียจากโรงงานผลิตยางขึ้น นอกจากนั้นเซลล์แบคทีเรีย *B. licheniformis* (KU-K2) ที่ได้จากกระบวนการหมักยังมีสมบัติในการส่งเสริมการเติบโตของพืช ที่มีสมบัติในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางการเกษตรได้อีกด้วย โดยเมื่อขยายขนาดการผลิตในระดับใหญ่นอกจากจะช่วยลดความยุ่งยากในการบำบัดน้ำเสียให้กับโรงงานผลิตยางขึ้นให้ลดลงอย่างมากแล้ว ยังเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับทางน้ำยางที่แยกยางสกีมออกให้มีมูลค่าสูงขึ้นได้เป็นอย่างดี

7. แนวทางการนำเอนไซม์ไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม

จากงานวิจัยนี้จะเห็นได้ว่าการนำ ทางน้ำยางที่แยกยางสกีมออกมาเป็นองค์ ประกอบของอาหารเลี้ยงสำหรับผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจะเป็นมาเพิ่มมูลค่าของทั้งของกระบวนการผลิตยาง โดยสามารถผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีราคาแพง ประกอบปัจจุบันประเทศยังนำเข้าเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส จากต่างประเทศเป็นจำนวนมาก

เมื่อพิจารณาถึงคุณลักษณะของเอนไซม์จะเห็นได้ว่าเอนไซม์มีความคงตัวและเกิดกิจกรรมได้ที่อุณหภูมิสูง และ พีเอชในช่วงต่าง ดังนั้นเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสที่ผลิตได้มีความเหมาะสมสำหรับการนำไปพัฒนาและใช้ในอุตสาหกรรมผงซักฟอก หรือ อุตสาหกรรมฟอกหนังสัตว์ นอกจากนั้นเมื่อพิจารณาถึงคุณสมบัติในการย่อยโปรตีนออกน้ำจากน้ำยางสด จะเห็นได้ว่าเอนไซม์ชนิดนี้มีศักยภาพในการย่อยโปรตีนออกจากน้ำยางสดได้ โดยสามารถลดปริมาณโปรตีนในน้ำยางสด และเพิ่มความบริสุทธิ์ให้แก่ น้ำยางได้ ส่งผลให้น้ำยางสดมีคุณภาพเพิ่มมากขึ้น

ข้อเสนอแนะ

1. สำหรับการผลิตเอนไซม์ในระดับอุตสาหกรรมจำเป็นที่จะต้องมีการพัฒนากระบวนการเตรียมน้ำยางให้ง่ายขึ้น ใช้สารเคมีให้น้อยลงเพื่อลดระยะเวลาและต้นทุนในการผลิต และที่สำคัญการขยายขนาดการผลิตนั้นระบบของถังหมักที่ประกอบด้วยปัจจัยทางกายภาพต่างๆต้องมีความเหมาะสมกับสรีรวิทยาของเชื้อจุลินทรีย์เพื่อให้เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงที่สุด
2. การประยุกต์ใช้ในระดับชุมชนเพื่อผลิตทั้งเอนไซม์และหัวเชื้อที่มีสมบัติในการส่งเสริมการเติบโตนั้นสามารถทำได้โดยเชื้อ *B. licheniformis* (KU-K2) มีสมบัติในการส่งเสริมการเติบโตของพืชอยู่หลายประการ แต่เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจำเป็นต้องมีการศึกษาองค์ประกอบของอาหารที่ต้องเติมลงไปสำหรับเหนี่ยวนำการผลิตสารออกฤทธิ์เช่น การเติม tryptophan เพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิต IAA (auxin hormone) การเติม Hydroxyapatite สำหรับเหนี่ยวนำการผลิตกรดเพื่อละลายฟอสเฟตในธรรมชาติ เป็นต้น

8. เอกสารอ้างอิง

- พิมล จำนงค์ กนก รัตน์กนกชัย และ คิน เลย์ คู 2547อัลคาไลน์โปรตีเอสจาก *alkalotolerant Bacillus sp. B12*และการนำไปใช้ในสารซักล้างวารสารวิจัยและพัฒนา มจร.27(2): 227-243.
- Abdel-Naby, M.A., A-M.S. Ismail, S.A. Ahmed and A.F.A. Fattah. 1998. Production and immobilization of alkaline protease from *Bacillus mycoides*. Bioresource Technol. 64 : 205-210.
- Chu I. M., Lee C. and Li T. S. 1992. Production and degradation of alkaline protease in batch cultures of *Bacillus subtilis* ATCC 14416. Enzyme .Microb. Technol.14:755–61.
- Danwanichakul, P, Werathirachot, R, Kongkaew, C. and Loykulnant S. 2011Coagulation of skim natural rubber latex using chitosan orpolyacrylamide as an alternative to sulfuric acid. Eur . J. Sci. Res. 62 (4):537-547.
- Deng A., Wu J., Zhang Y., Zhang G., Wen T. 2010. Purification and characterization of a surfactant-stable high-alkaline protease from *Bacillus* sp. B001. BioresourTechnol, 101: 7100-7106.
- Ferrero, M. A., G. R. Castro, C. M. Abate, M. D. Baigori and F. Sineriz. 1996. Thermostable alkaline protease of *Bacillus licheniformis* MIR 29 : isolation, production and characterization. Appl. Microbiol. Biotechnol. 45 : 327-332.
- Fujiwara N. and Yamamoto K. 1987 . P roduction of alkaline protease in a low-cost medium by alkalophilic *Bacillus* sp. and properties of the enzyme. J Ferment Technol;65:345–48.
- Gupta R , Beg Q. K., and Lorenz P.2002. Bacterial alkaline proteases: molecular approachesand industrial applicationsAppl Microbiol Biotechnol 59:15–32
- Haddar A., Arebi R., Bougatef A., Hmidet N., Sellami-Kamoun A., Nasri M. 2009. Two detergent stable alkaline serine-proteases from *Bacillus mojavensis*

A21: Purification, characterization and potential application as a laundry detergent additive. *BioresourTechnol*, 100: 3366-3373.

Huddus M., Ramteke P.W. 2008. Cold-active extracellular metalloprotease from *Curtobacterium Luteum* (MTCC 7529): Enzyme production and characterization. *J Gen Appl Microbiol*, 54: 385-392.

Horikoshi, K. 1991. *Microorganisms in Alkaline Environments*. Kodansha Ltd, Tokyo. 275 p.

Kazan D., Denizci A.A., KerimakÖner M.N., Erarslan A. 2005. Purification and characterization of a serine alkaline protease from *Bacillus clausii* GMBAE42. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 32: 335-344.

Kembhavi A .A., Kulkarni A., Pant A. 1993 Salt tolerance and thermostable alkaline protease from *Bacillus subtilis* NCIM No. 64. *Appl Biochem Biotechnol* 38:83–92.

Khosravi-Darani, K., Falahatpishe H.R., and Jalali, M. 2008. Alkaline protease production on date waste by an alkalophilic *Bacillus* sp. 2-5 isolated from soil. *Afr. J. Biotech.* 7 (10): 1536-1542.

Kobayashi, T., Y. Hakamada, S. Adachi, J. Hitomi, T. Yoshimatsu, K. Koike, S. Kawai and S. Ito. 1995. Purification and properties of alkaline protease from alkaline *Bacillus* sp. KSM-K16. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43 : 473-481.

Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. 1951. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J BiolChem*, 193:265-275.

Manachini, P.L. and M.O. Fortina. 1998. Production in sea-water of thermostable alkaline protease by a halotolerant strain of *Bacillus licheniformis*. *Biotechnol. Lett.* 20 (6) : 565-568.

- Mao W., Pan R., Freedman D. 1992. High production of alkaline protease by *Bacillus licheniformis* in a fed-batch fermentation using a synthetic medium. J. Ind. Microbiol. 11:1–6.
- Moon S.H., Parulekar S.J. 1991. A parametric study of protease production on batch and fed-batch cultures of *Bacillus firmus*. Biotechnol. Bioeng. 37: 467-483.
- Rhaman, R.N.Z.A., C.N. Razak, K. Ampon, M. Basri, W.M.Z.W. Yunus and A.B. Salleh. 1994. Purification and characterization of heat-stable alkaline protease from *Bacillus stearothermophilus* F1. Appl. Microbiol. Biotechnol. 40 : 822-827.
- Romsomsa N., Chim-anagae P., and Jangchud A . 2010. Optimization of silk degumming protease production from *Bacillus subtilis* C4 using Plackett-Burman design and response surface methodology ScienceAsia 36: 118–124.
- Sen S. and Satyanarayana T. 1993 Optimization of alkaline protease production by thermophilic *Bacillus licheniformis* S-40. Ind. J. Microbiol. 33:43–47.
- Sinha N. and Satyanarayana T. 1991. Alkaline protease production by thermophilic *Bacillus licheniformis*. Indian. J. Microbiol. 31:425–30.
- Singh J., Batra N., Sobti R.C. 2001. Serine alkaline protease from a newly isolate *Bacillus* sp. SSR1. ProcBiochem, 36: 781-785.
- Talek A., Suthirawut S., Sakai K. and Kitpreechavanich V. 2012 Screening and Characterization of Plant Growth Promoting Bacteria isolated from Kanchanaburi Research Station, The First ASEAN Plus Three Graduate Research Congress , Chiangmai, Thailand
- Vaithanomsat P. , Malapant T. and Apiwattanapiwat, W.2008. Silk Degumming Solution as Substrate for Microbial Protease Production. Kasetsart Journal (Natural Science) 42 (3): 543-551.

Vetter, R., Wilke D., Moeller B., Lerch M., Muecke C. ,et al. 1993. Alkaline protease from *Bacillus pumilus*. European Patent Appl EP 0572992.

Werathirachot, R., Danwanichakul, P., Kongkaew, C. and Loykulnant S. 2008. Water Soluble Chitosan as an Environment-Friendly Coagulant in Removal of Rubber Particles from Skim Rubber Latex. J. Metals, Materials and Minerals. 18 : 93-97

Wilson P., Remigio Z. 2012. Production and characterization of protease enzyme produced by a novel moderate thermophilic bacterium (EP1001) isolated from an alkaline hot spring, Zimbabwe. Afr J Microbiol Res, 6: 5542-5551

Yang, J.-K., I.-L Shih, Y.-M. Tzeng and S.-L. Wang. 2000. Production and purification of protease from a *Bacillus subtilis* that can deproteinize crustacean wastes. Enzyme. Microbiol. Technol. 26(5-6) : 406-413.

สัญญาเลขที่ RDG5550104

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการย่อยที่ 2 การใช้ประโยชน์ทางน้ำยางที่แยกยางสกีมออกเพื่อ
การผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแล็กไทด์จากเชื้อ
แอคติโนมัยซีท โดยใช้กระบวนการหมักแบบเปิด

Utilization of non-rubber skim latex for PLA-
degrading enzyme production by actinomycetes
using open fermentation process

คณะวิจัย

ดร.สุขุมารณ์ สุขชุม

มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ชุดโครงการ การใช้หางน้ำย่างที่แยกยางสกิมออกเพื่อการผลิตเอนไซม์ อุตสาหกรรมโดยจุลินทรีย์ด้วยกระบวนการหมักแบบเปิด

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)

และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย วช.-สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

หางน้ำย่างที่แยกยางสกิมเป็นของเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมน้ำย่างซึ่งพบว่ามีปริมาณมากถึง 580,000 ตันต่อปี จากรายงานที่ผ่านมาพบว่าหางน้ำย่างที่แยกยางสกิมเป็นแหล่งของสารอาหารต่างๆ สำหรับเชื้อจุลินทรีย์ เช่น น้ำตาล และโปรตีน นอกจากนี้ยังพบว่าค่า BOD และ COD ของหางน้ำย่างที่แยกยางสกิมนั้นมีค่ามากกว่า 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร แสดงให้เห็นว่าสามารถนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์จากเชื้อจุลินทรีย์ได้โดยใช้เทคโนโลยีการหมัก ซึ่งเอนไซม์ที่เข้ามามีบทบาทมากขึ้นในปัจจุบัน และอนาคตข้างหน้าคือเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพเช่นเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลกไทด์ เชื้อ *Actinomadura keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1 ได้มีรายงานว่ามีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลกไทด์ทั้งในระดับฟลาस्क และถังหมักขนาด 3 ลิตร เอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อชนิดนี้พบว่าเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม serine protease และสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการนำพลาสติกชนิดนี้กลับมาใช้ใหม่ด้วยกระบวนการทางชีวภาพ ดังนั้นในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์ชนิดนี้โดยใช้หางน้ำย่างที่แยกยางสกิมเป็นแหล่งของสารอาหารและแร่ธาตุ จากงานวิจัยพบว่าเมื่อทำการผลิตเอนไซม์โดยใช้หางน้ำย่างที่แยกยางสกิมซึ่งผสม basal medium ที่ประกอบด้วย PLA powder ความเข้มข้น 0.035% (น้ำหนักต่อปริมาตร) และใช้ แผ่นใยขัด (สก็อตไบรท์) ความเข้มข้น 1% (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นวัสดุตั้งในระดับฟลาस्कพบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ได้ 29.6 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และเมื่อทำการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์โดยใช้หางน้ำย่างที่แยกยางสกิมพบว่าเชื้อแอสคิโนมัยซิส สายพันธุ์ T16-1 ผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด 35 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ค่าพีเอชเริ่มต้นคือ 7.0 ทำการเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที จากนั้นทำการขยายขนาดการผลิตเป็น 2 ลิตร ในถังหมักแบบ ไบพัตควอน

โดยใช้การหมักแบบเปิด พบว่าเชื้อชนิดนี้สามารถผลิตเอนไซม์ได้ 40.5 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้อัตราการกวนเท่ากับ 150 รอบต่อนาที โดยไม่ต้องให้อากาศ เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 วัน นอกจากนี้เมื่อทำการผลิตเอนไซม์ในถังหมักแบบต่อเนื่องพบว่าเชื้อสายพันธุ์ T16-1 สามารถผลิตเอนไซม์ได้คงที่ที่ 45 หน่วยต่อลิตรเป็นเวลา 3 วัน ดังนั้นจะเห็นได้ว่าหางน้ำยางที่แยกยางสกิมมีความสามารถในการนำมาใช้ผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแล็กไทด์ได้โดยใช้เชื้อ *Actinomadura keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1 ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้สามารถนำมาใช้ในการนำพลาสติคชนิดพอลิแล็กไทด์กลับมาใช้ใหม่ได้ในอนาคต นอกจากนี้กระบวนการหมักที่ได้จากงานวิจัยสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการนำหางน้ำยางที่แยกยางสกิมซึ่งเป็นของเหลือทิ้งจากโรงงานน้ำยางข้นมาใช้เพิ่มมูลค่าให้เป็นเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแล็กไทด์ได้

Abstract

Owing to non-rubber skim latex or rubber serum is an agro-industrial waste which collected from concentrated latex industry about 580,000 tons/years. It's containing a lot of nutrient such as sugar and protein for bacterial growth. Moreover, BOD and COD of this serum were higher than 10,000 mg/L indicated that it might be used for wastes utilization by using microbial fermentation technology. Poly(L-lactide) (PLA)-degrading enzyme is one of important enzyme in the future. Because biodegradable plastics will be recently replace another conventional petrochemical plastic. *Actinomadura keratinolytica* strain T16-1 was isolated and reported as a potential PLA-degrading enzyme production both in shake flasks and 3L fermenter. The enzyme produced by the strain was identified as a serine protease and should be applied for PLA biological recycling process. In our work, PLA-degrading enzyme production and growth of the strain was investigated by using non-rubber skim latex as a nutrient and mineral sources. PLA-degrading activity, 29.6 U/ml was obtained by using basal medium containing 0.035% (w/v) PLA powder and 1% (w/v) scrub pad as a supporter for bacterial cell in shake flask. Moreover, the effect of physical parameters and nitrogen sources were determined. The results indicated that the maximum PLA-degrading enzyme produced by strain T16-1 with 35 U/ml was achieved at the condition as follow: temperature at 45°C, pH 7.0, shaking speed at 150 rpm and cultivated for 4 days. To scale up of the enzyme production, 2L stirrer fermenter was used to determine the optimization of PLA-degrading enzyme production under open batch fermentation. The maximum enzyme production, 40.5 U/ml was achieved by using the

agitation speed at 150 rpm without aeration control and cultivated for 3 days. Moreover, the strain T16-1 could produce the enzyme about 45 U/ml under continuous fermentation condition for 3 days. This recent work is demonstrated that non-rubber skim latex has a potential to produce PLA-degrading enzyme from *Actinomadura keratinolytica* strain T16-1 for dispose or recycle of plastic wastes in the future. The process can apply for utilization of non-rubber skim latex waste for value added product such as PLA-degrading enzyme by using practical method.

เนื้อหางานวิจัย

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

น้ำยางประกอบด้วย ปริมาณของแข็งทั้งหมด 22-48% ซึ่งประกอบด้วย ปริมาณเนื้อยางแห้ง 25-45% สารจำพวกโปรตีน 1.5 % สารพวกเรซิน 2.0% คาร์โบไฮเดรต 1.0% สารอนินทรีย์ 0.5% โดยทั่วไป น้ำยางสด จะถูกนำไปผ่านกระบวนการปั่นเหวี่ยงในโรงงานอุตสาหกรรมการผลิตน้ำยางข้นเพื่อให้ได้น้ำยางที่มีเนื้อยางประมาณ 60% ก่อนจะนำไปใช้ผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ หรือขนส่ง ส่วนน้ำที่เหลือจากการปั่นเหวี่ยงเรียกว่าหางน้ำยาง (skim latex) เป็นผลผลิตพลอยได้จากกระบวนการปั่นน้ำยางข้น เนื้อยางที่อยู่ในหางน้ำยางจะมีอยู่ประมาณ ไม่เกิน 8% ขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพของเครื่องปั่น มีปริมาณน้ำตาลและโปรตีน ปริมาณแอมโมเนียสูงหางน้ำยาง ที่ออกจากเครื่องปั่นนั้นจะทำการจับเนื้อยางด้วยกรดซัลฟิวริก แล้วจะถูกแปรรูปเป็นยางสกินเครฟ (skim crepe) ส่วนหางน้ำยางที่แยกยางสกินออกนั้นมีสภาพเป็นกรด (พีเอช 2.33-5.05) มีค่า BOD 570-13,463 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่า COD ระหว่าง 672-23,300 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่า SS ในช่วง 54-1,478 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่า TKN 70-1,358 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่า TP 2.66-5.52 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีค่าซิลิเฟต 16.3-1,085 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังนั้นจะเห็นได้ว่าหางน้ำยางที่แยกยางสกินออกนั้นมีสารอาหารเพียงพอที่จะนำมาใช้ประโยชน์ จึงควรนำหางน้ำยางที่แยกยางสกินออกและสามารถนำไปใช้ประโยชน์ เนื่องจากยังคงมีสารอาหารที่เพียงพอสำหรับการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อการผลิตสารอื่นที่มีมูลค่า ซึ่งนอกจากเป็นการเพิ่มมูลค่ากับวัสดุเหลือทิ้งแล้วยังช่วยลดการปล่อยน้ำเสียลงสู่แหล่งธรรมชาติที่ก่อให้เกิดมลภาวะกับสิ่งแวดล้อมอีกด้วยเชื้อแอสคิโนมัยซิส สายพันธุ์ T16-1 เป็นเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลกไทด์ได้สูง ซึ่งทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูงนำมาใช้ ในการผลิตเอนไซม์ด้วยกระบวนการหมักแบบเปิดโดยใช้หางน้ำยางที่แยกยางสกินเป็นวัตถุดิบในการผลิตเพราะเป็นของเหลือทิ้งจากกระบวนการทำให้ในน้ำยางข้นซึ่งยังมีคุณค่าทางอาหารและมีปริมาณเพียงพอสำหรับการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์และการผลิตเอนไซม์ดังกล่าวเป็นเอนไซม์ที่มีประโยชน์ สามารถนำมาใช้ในการกำจัดขยะ ลดมลภาวะทางสิ่งแวดล้อมได้ โดยทำการหมักในลักษณะเปิดไม่ต้องใช้ความร้อนในการฆ่าเชื้อเพื่อเป็นการลดต้นทุนได้อีกทางหนึ่งด้วย

2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 2.1. เพื่อศึกษาการนำหางน้ำยางที่แยกยางสกินออกมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลกไทด์ โดยเชื้อแอสคิโนมัยซิส

3. ทางเลือกและแนวทางการแก้ปัญหา/กรอบแนวคิดของการวิจัย

ยางพาราเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศ โดยประเทศไทยเป็นประเทศที่มีการผลิตและส่งออกเป็นจำนวนมากทั้งในรูปแบบของยางแผ่นรมควัน ยางแท่งมาตรฐาน และน้ำยางข้น โดยอุตสาหกรรมน้ำยางข้นเป็น การแปรรูปน้ำยางสดให้เป็นน้ำยางข้นเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมต่อเนื่องอื่นๆ เช่นถุงมือยางหรือยางรถยนต์ เป็นต้น ในกระบวนการผลิตน้ำยางข้นนั้นมีขั้นตอนที่ก่อให้เกิดน้ำเสียหลายขั้นตอน เช่น การล้างทำความสะอาด การเติมสารให้น้ำยางจับตัว หรือการปั่นเหวี่ยงเพื่อให้ได้น้ำยางเข้มข้น ซึ่งในขั้นตอนนี้ส่งผลให้ได้ส่วนเหลือทิ้งที่เรียกว่า “หางน้ำยาง” โดยจากน้ำยางสด 100% หลังจากปั่นเหวี่ยงจะประกอบด้วย น้ำยางข้น 50% และหางน้ำยาง 50% ในส่วนของหางน้ำยางนั้นประกอบด้วย dry rubber content 5% ส่วนของซีรัม 85.5% และแมกนีเซียม 80 พีพีเอ็ม จากรูปที่ 1 แสดงกระบวนการผลิตน้ำยางข้นในอุตสาหกรรมเห็นได้ว่า หลังจากการปั่นเหวี่ยงและได้น้ำยางข้นแล้วในส่วนของหางน้ำยางจะถูกนำมาเติมกรดซัลฟิวริกเพื่อให้เกิดการจับตัวกันของยางที่ปนมาอีกครั้งหนึ่งจากนั้นส่วนหางน้ำยางที่เหลือจะกลายเป็นน้ำเสียซึ่งโรงงานต้องมีการบำบัดก่อนปล่อยทิ้งสู่สิ่งแวดล้อม (กรมควบคุมมลพิษ, 2005) น้ำยางประกอบด้วย ปริมาณของแข็งทั้งหมด 22-48% ซึ่งประกอบด้วย ปริมาณเนื้อยางแห้ง 25-45% สารจำพวกโปรตีน 1.5% สารพวกเรซิน 2.0% คาร์โบไฮเดรต 1.0% สารอนินทรีย์ 0.5% โดยทั่วไปน้ำยางสดจะถูกนำไปผ่านกระบวนการปั่นเหวี่ยงในโรงงานอุตสาหกรรมการผลิตน้ำยางข้นเพื่อให้ได้น้ำยางที่มีเนื้อยางประมาณ 60% ก่อนจะนำไปใช้ผลิตเป็นผลิตภัณฑ์หรือขนส่งส่วนน้ำที่เหลือจากการปั่นเหวี่ยงเรียกว่าหางน้ำยาง (skim latex) เป็นผลผลิตพลอยได้จากกระบวนการปั่นน้ำยางข้น เนื้อยางที่อยู่ในหางน้ำยางจะมีอยู่ประมาณไม่เกิน 8% ขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพ ของเครื่องปั่น มีปริมาณน้ำตาลและโปรตีน ปริมาณแอมโมเนียสูง หางน้ำยางที่ออกจากเครื่องปั่นนั้นจะถูกนำไปผสมกับกรดซัลฟิวริกเพื่อให้ยางจับตัวกันเป็นก้อน แล้วจะถูกแปรรูปเป็นยางสกินเครป (skim crepe) ส่วนหางน้ำยางที่แยกยางสกินออกนั้นมีสภาพเป็นกรด (ค่าพีเอช 2.33-5.05) มีค่า BOD 570-13,463 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่า COD ระหว่าง 672-23,300 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่า SS ในช่วง 54-1,478 มิลลิกรัมต่อลิตรค่า TKN 70-1,358 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่า TP 2.66-5.52 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีค่าซัลเฟต 16.3-1,085 มิลลิกรัมต่อลิตร

ซึ่งในส่วนของหางน้ำยางยังคงมีสารอาหารเพียงพอที่จะนำไปใช้ประโยชน์เพื่อผลิตสารมูลค่าเพิ่มได้หลายชนิดโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ เช่น การนำมาใช้ในการผลิตเอนไซม์ทางการค้าต่าง ๆ เป็นต้น

เชื้อจุลินทรีย์หลากหลายชนิด เช่น *Bacillus brevis*, *B. stearothermophilus*, *B. licheniformis*, *Geobacillus thermocatenulatus*, *Micromonospora echinospora*, *M. viridifaciens*, *Nonomurea terrinata*, *N. fastidiosa*, *Laceyella sacchari*, *Thermoactinomyces vulgaris* และ *Actinomadura keratinilytica* (Tomita et al., 1999, 2003, 2004; Sukkhum et al., 2009a) เชื้อแอคติโนมัยซิสที่พบในจีส *Actinomadura keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1 เป็นสายพันธุ์ที่มีรายงานว่าสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลกไทด์ได้สูง ซึ่งในระดับพลาสติกสามารถผลิตเอนไซม์ได้ 44.6 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ในระดับถังหมักแบบอากาศลอยตัวผลิตเอนไซม์ได้ 150 หน่วยต่อมิลลิลิตร (Sukkhum et al., 2009b)

การศึกษาการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลกไทด์จากเชื้อจุลินทรีย์ยังพบว่ามีรายงานไม่มากนัก เช่น สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายฟิล์มพอลิแลกไทด์ คืออุณหภูมิ 43 องศาเซลเซียส พีเอช 7.0 ในอาหาร mineral salt medium ที่เติมสารสกัดของยีสต์ ความเข้มข้น 0.002% (Jarerat and Tokiwa, 2001) ต่อมา Jarerat et al, 2001 ได้รายงานว่าเมื่อใช้ silk fibroin เป็นสับสเตรทในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลกไทด์ในอาหารเหลวโดยเชื้อ *A.orientalis* พบว่าได้ปริมาณสารอินทรีย์คาร์บอนทั้งหมดเท่ากับ 600 มิลลิกรัมต่อลิตร และในถังหมักขนาด 5 ลิตรพบว่าเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลกไทด์ได้ค่าปริมาณสารอินทรีย์คาร์บอนทั้งหมดเท่ากับ 550 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากทำการเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน ในส่วนของการวิจัยก่อนหน้านี้ โดย Sukkhum et al (2009) ได้คัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซิสที่พบในจีส *Actinomadura keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลกไทด์ได้สูง ซึ่งในระดับพลาสติกสามารถผลิตเอนไซม์ได้ 44.6 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้เจลาตินเป็นแหล่งไนโตรเจน และใช้พอลิแลกไทด์เป็นสับสเตรท ในขณะที่ในระดับถังหมักแบบอากาศลอยตัวขนาด 3 ลิตรพบว่าเชื้อชนิดนี้สามารถผลิตเอนไซม์ได้ 150 หน่วยต่อมิลลิลิตร ต่อมาในปี 2012 ได้มีรายงานการศึกษาปัจจัยทางกายภาพที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ในระดับถังหมัก พบว่าเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงที่สุดคือ 257 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อทำการเลี้ยงในถังหมักขนาด 3 ลิตร อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 0.43 vvm และควบคุมค่าพีเอชที่ 6.8 โดยเอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อชนิดนี้พบว่าสามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูง (70 องศาเซลเซียส) พีเอช 10.0 และจากการศึกษาเอนไซม์บริสุทธิ์พบว่า เป็นเอนไซม์ชนิด serine protease นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อสายพันธุ์ T16-1 สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลกไทด์ได้เมื่อทำการตรึงด้วยวัสดุที่เป็นสก็อตไบรท์ โดยสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการผลิตเอนไซม์ด้วยการหมักแบบต่อเนื่องได้

ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจที่จะนำเชื้อแอคติโนมัยซิสสายพันธุ์ T16-1 ซึ่งเป็นเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลกไทด์ได้สูง ซึ่งทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูงนำมาใช้ในการผลิตเอนไซม์ด้วยกระบวนการหมักแบบเปิดโดยใช้หางน้ำยางที่แยกยางสกิม เป็นวัตถุดิบในการผลิตเนื่องจากเป็นของเหลือทิ้งจากกระบวนการทำให้น้ำยางข้นซึ่งยังมีคุณค่าทางอาหารและมีปริมาณเพียงพอสำหรับการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์และการผลิต

เอนไซม์ดังกล่าวเป็นเอนไซม์ที่มีประโยชน์เนื่องจากสามารถนำมาใช้ในการกำจัดขยะ ลดมลภาวะทางสิ่งแวดล้อมได้ โดยทำการหมักในลักษณะเปิดไม่ต้องใช้ความร้อนในการฆ่าเชื้อเพื่อเป็นการลดต้นทุนได้อีกทางหนึ่งด้วย

4. แนวทางการดำเนินการวิจัย

4.1 การเตรียมหางน้ำยางที่แยกยางสกิมและการศึกษาลักษณะของหางน้ำยาง หางน้ำยางที่แยกยางสกิม และหางน้ำยางที่ผ่านกระบวนการหมัก

การเตรียมหางน้ำยางที่แยกยางสกิมทำได้โดย เติม 5% H_2SO_4 ปริมาตร 230 มิลลิลิตร ลงในหางน้ำยางปริมาตร 1 ลิตร ปั่นที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำการกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 เพื่อแยกสกิมเครฟ ออกจากหางน้ำยาง ปรับพีเอชของหางน้ำยางที่แยกยางสกิมให้มีค่าเท่ากับ 6.8-7.0 การศึกษาลักษณะของหางน้ำยาง หางน้ำยางที่แยกยางสกิม และหางน้ำยางที่ผ่านการหมัก เช่น ค่า COD, BOD, TKN, แอมโมเนีย, ความเข้มข้นของโปรตีน, น้ำตาลรีดิวซ์ และ Zinc ทำได้โดยส่งตัวอย่างทั้งหมดไปวิเคราะห์ที่ศูนย์ทดสอบและมาตรวิทยา สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

4.1.1 เชื้อจุลินทรีย์และอาหารเลี้ยงเชื้อ

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษาการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแล็กไทด์คือ *Actinomadura keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1ซึ่งมีรายงานว่าสามารถผลิตเอนไซม์ได้ดี โดยทำการเลี้ยงเชื้อในอาหาร ISP-2 slant ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นทำการเตรียมหัวเชื้อโดยเลี้ยงในอาหาร ISP-2 broth ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 ล้างด้วย น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 2 ครั้ง ปรับปริมาณเชื้อให้ได้ค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 1.0

4.1.2 การศึกษาการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแล็กไทด์จากเชื้อแอคติโนมัยซีท สายพันธุ์ T16-1 โดยการตรึงเซลล์

ศึกษาการผลิตเอนไซม์ด้วยการตรึงเซลล์แอคติโนมัยซีทสายพันธุ์ T16-1 ด้วยสก็อตไบรท์ ทำได้โดยนำหางน้ำยางที่แยกยางสกิม ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใส่ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ตัดสก็อตไบรท์ ให้เป็นชิ้นขนาด 5x5 มิลลิเมตร ชั่ง 0.1 กรัม PLA film 0.035% w/v และอาหาร basal medium

ซึ่งประกอบด้วย 0.035% PLA, 0.238% เจลาติน, 0.4% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.4% K_2HPO_4 , 0.2% KH_2PO_4 และ 0.02% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ใส่ในฟลาสก์ จากนั้นทำการเติมหัวเชื้อที่เตรียมไว้ 5 มิลลิลิตร ทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 168 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมงเพื่อศึกษาการผลิตเอนไซม์ โดยนำตัวอย่างที่ได้มาปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลกไทด์

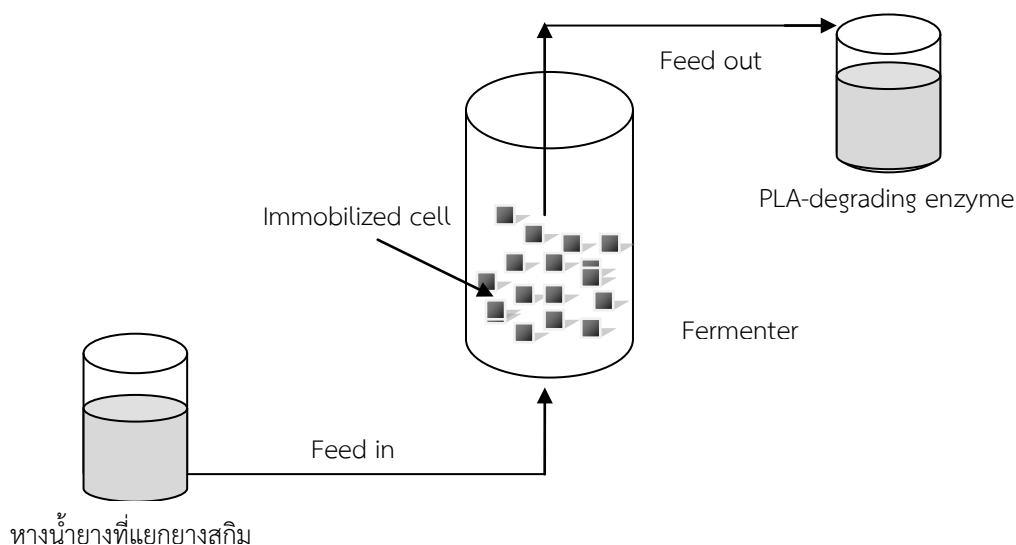
4.1.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลกไทด์ในระดับฟลาสก์ และในถังหมักแบบไบโอดักวอน

ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลกไทด์ในระดับฟลาสก์ โดยใช้เซลล์ตรึง โดยนำหางน้ำยางที่แยกยางสกิม ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใส่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ตัดสก็อตไบรท์ให้เป็นชิ้นขนาด 5x5 มิลลิเมตร ชั่ง 0.1 กรัม และ PLA film 0.035% น้ำหนักต่อปริมาตร ใส่ในฟลาสก์ จากนั้นทำการเติมหัวเชื้อที่เตรียมไว้ 5 มิลลิลิตร ทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ทำการศึกษารูปร่างที่เหมาะสมในการเจริญและผลิตเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 45, 50 และ 55 องศาเซลเซียส และทำการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมเช่น เปปโทน สารสกัดจากยีสต์ หางนม สารสกัด จากมอลต์ เคซีน และ เจลาติน รวมทั้งทำการศึกษาค่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ จากน้ำยาง ที่แยกยางสกิม โดยทำการศึกษาในช่วงพีเอช 4-9 จากนั้นทำการขยายสเกลในระดับถังหมัก โดยใช้เซลล์ตรึงด้วยกระบวนการหมักแบบเปิด นำหางน้ำยางปริมาตร 1.5 ลิตร สก็อตไบรท์ 4 กรัม และ PLA film 0.035% (น้ำหนักต่อปริมาตร) จากนั้นเติมหัวเชื้อปริมาตร 150 มิลลิลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 45 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้น 7.0 จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง โดยนำตัวอย่างที่ได้ในแต่ละช่วงเวลามาปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 อาร์พีเอ็ม เป็นเวลา 5 นาที นำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ โดยการทดลองนี้ได้ทำการศึกษาระยะเวลาที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์ ศึกษาอัตราการการกวนที่ 100, 150 และ 200 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ คือ 0.25, 0.5, 0.75 และ 1 vvm

4.2 การศึกษาการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลกไทด์แบบต่อเนื่อง

ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์แบบต่อเนื่องโดยใช้เซลล์ตรึงจากเชื้อสายพันธุ์ T16-1 โดยการเลี้ยงเชื้อในหางน้ำยางที่แยกยางสกิมออก ปริมาตร 1.5 ลิตร ที่เติม สก็อตไบรท์ 4 กรัมและ PLA film 0.035% (น้ำหนักต่อปริมาตร) จากนั้นเติมหัวเชื้อปริมาตร 150 มิลลิลิตร ทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมงวัดกิจกรรม ของเอนไซม์จนถึงเวลาที่เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงที่สุด จากนั้นทำการเก็บหางน้ำยางที่แยกยางสกิมที่ผ่าน การหมักออกและทำการเติมหางน้ำยางที่แยกยางสกิม เข้าสู่ถังหมักอีกครั้งเพื่อใช้ในการหมักเพื่อผลิตเอนไซม์ ย่อยสลายพอลิแลกไทด์ จากนั้นทำการศึกษาอัตราการไหลของหางน้ำยางที่

แยกยางสกิม เท่ากับ 10, 20, 30, 40 และ 50 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เข้าและออกเพื่อใช้ในการผลิตเอโนไซม์
แบบต่อเนื่องแสดงดังภาพที่ 2.2



ภาพที่ 2.2 แผนภาพแสดงการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลกไทด์แบบต่อเนื่อง
ด้วยกระบวนการหมักแบบเปิด

4.2.1 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลกไทด์

ทำการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ตามวิธีของ Sukkhum และคณะ (2009) โดยใช้ emulsified PLA เป็นสับสเตรท โดยทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส พีเอช 9 จากนั้นวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 630 นาโนเมตร เพื่อนำมาคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ โดย 1 หน่วยของเอนไซม์คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการลดค่าดูดกลืนแสงที่ 630 นาโนเมตร ลง 1 หน่วยภายใต้สภาวะที่ทดสอบ

5. ผลการดำเนินงานวิจัย และการวิจารณ์ผล

5.1 การศึกษาลักษณะของทางน้ำยาง และทางน้ำยางที่แยกยางสกิม

จากการศึกษาคุณสมบัติของทางน้ำยาง และทางน้ำยางที่แยกยางสกิมจากตารางที่ 1 พบว่า ลักษณะต่าง ๆ ของทางน้ำยางที่ทำการทดสอบมีค่าสูงกว่าทางน้ำยางที่แยกยางสกิม เช่น ค่า BOD, TKN ปริมาณโปรตีน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เป็นต้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่าหลังจากทำการตกตะกอนยางด้วยกรด H_2SO_4 ทำให้คุณสมบัติต่าง ๆ ของทางน้ำยางลดลงซึ่งเป็นผลมาจากการใช้กรด ทำให้โปรตีนเสียสภาพ เนื่องจากค่าพีเอชต่ำประมาณ 2-3 และโปรตีนต่าง ๆ ส่วนใหญ่จะยึดเกาะกับส่วนของ rubber ทำให้การตกตะกอนแยก rubber ออกมีผลให้ปริมาณสารต่าง ๆ โดยเฉพาะโปรตีนลดลง จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าทางน้ำยางที่แยกยางสกิมนั้นมีคุณสมบัติต่าง ๆ ที่น้อยกว่า ทางน้ำยางเช่นกันเมื่อใช้วิธีการตกตะกอนยางด้วยวิธีต่าง ๆ เช่นการใช้ 1.2% chitosan ในสารละลาย 1.5% acetic acid เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามจากตารางที่ 2.1 พบว่าทางน้ำยางที่แยกยางสกิมออกยังคงมีคุณสมบัติที่ดีในการนำมาใช้

ให้เกิดประโยชน์โดยการนำมาใช้เป็นแหล่งสารอาหารเสริมในการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแล็กไทด์ได้

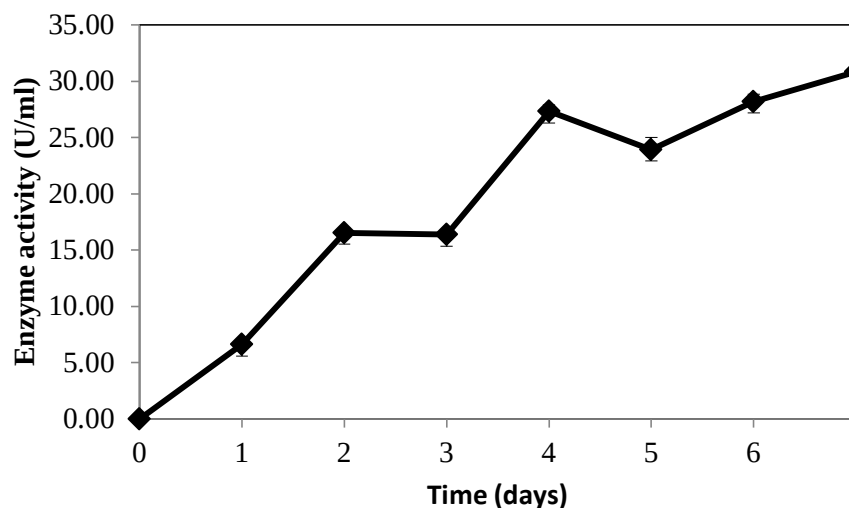
ตารางที่ 2.1 แสดงคุณสมบัติของทางน้ำยางและทางน้ำยางที่แยกยางสกิม

Parameter	Non-rubber skim latex	Skim latex
COD (mg/L)	18,456	91,775
BOD (mg/L)	12,825	62,000
TKN (mg/L)	2,680	4,953
Ammonia Nitrogen (mg/L)	2,111	3,217
Zinc (mg/L)	71	144
Protein concentration (mg/L)	531	831
Reducing sugar (mg/L)	16	1,197
pH	2-3	11-12

5.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแล็กไทด์ระดับฟลาस्कโดยใช้ทางน้ำยางที่แยกยางสกิมเป็นวัตถุดิบด้วยกระบวนการหมักแบบเปิด

จากการศึกษาการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแล็กไทด์ระดับฟลาस्कโดยใช้ทางน้ำยางที่แยกยางสกิม เป็นวัตถุดิบด้วยกระบวนการหมักแบบเปิดพบว่าเมื่อทำการผลิตเอนไซม์โดยมีการเติมสารอาหาร basal medium ลงในทางน้ำยางที่แยกยางสกิมและมีการใช้แผ่นใยขัด หรือสก็อตโบรทเป็นวัสดุตรึง จากภาพที่ 2.3 พบว่าระยะเวลา ที่ดีที่สุดในการผลิตเอนไซม์จากเชื้อสายพันธุ์ T16-1 คือ 4 วัน โดยเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ได้ 27 หน่วยต่อมิลลิลิตร

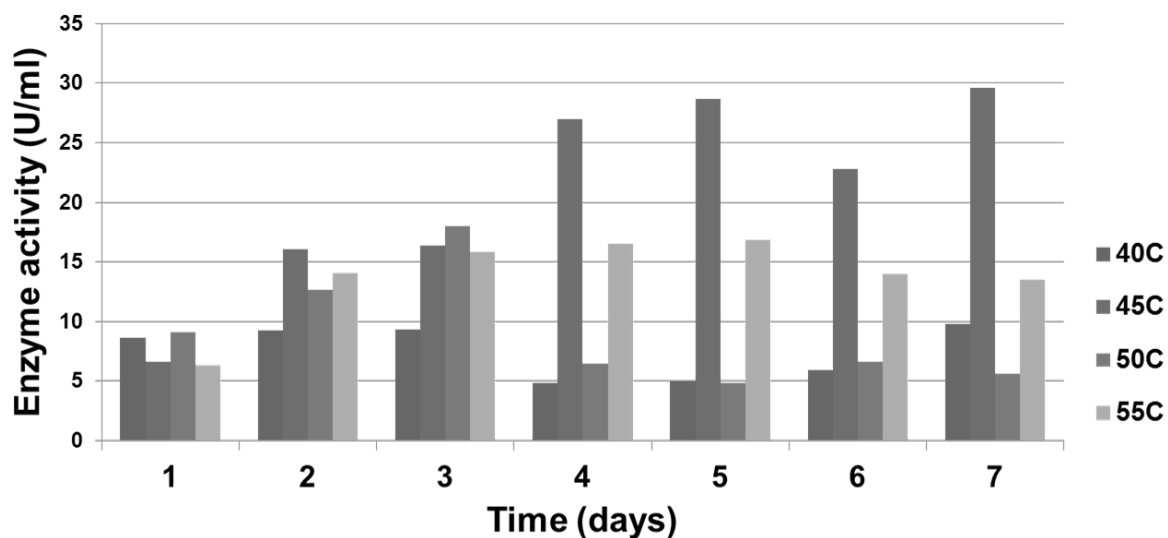
แต่อย่างไรก็ตามหลังจากการผลิตที่เวลา 4 วันนั้นเชื้อยังสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงประมาณ 30 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในปี 2009 ได้มีรายงานโดย Sukkhum และคณะพบว่าเชื้อแอคติโนมัยซิสสายพันธุ์ T16-1 สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแล็กไทด์ได้สูงที่สุด 45 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อในอาหาร basal medium เป็นเวลา 4 วัน ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ทางน้ำยางที่แยกยางสกิมในการเลี้ยงเชื้อพบว่าได้ปริมาณเอนไซมน้อยกว่าอาจเป็นผลมาจากในทางน้ำยางที่แยกยางสกิมนั้นมีองค์ประกอบของ Zn^{2+} ซึ่งพบว่าโลหะนี้สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ ซึ่ง Sukkhum และคณะในปี 2009 ได้รายงานไว้ว่ากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแล็กไทด์จากเชื้อสายพันธุ์ T16-1 ถูกยับยั้งเหลือเพียงแค่ 76%



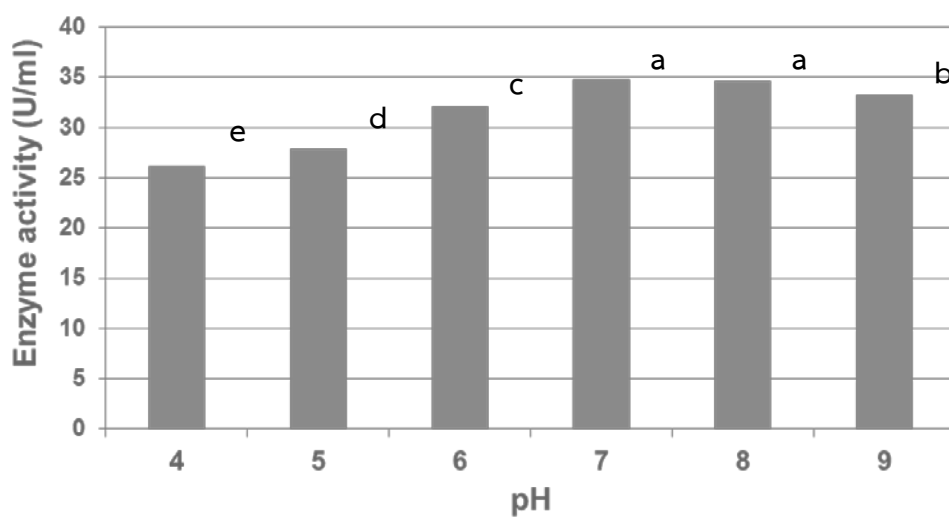
ภาพที่ 2.3 แสดงระยะเวลาในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลกไทด์จากเชื้อ *Actinomadura keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1 โดยใช้ทางน้ำยางที่แยกยางสกิมเป็นวัตถุดิบ และเติม basal medium เป็นองค์ประกอบ ของอาหารโดยใช้แผ่นสก็อตไบรท์เป็นวัสดุตรึงเซลล์ ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

เมื่อทำการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลกไทด์ จากภาพที่ 2.4 พบว่าเมื่อ ทำการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ T16-1 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงที่สุดคือ 27 ยูนิต ต่อมิลลิลิตร เมื่อทำการเลี้ยงเป็นเวลา 4 วันในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร

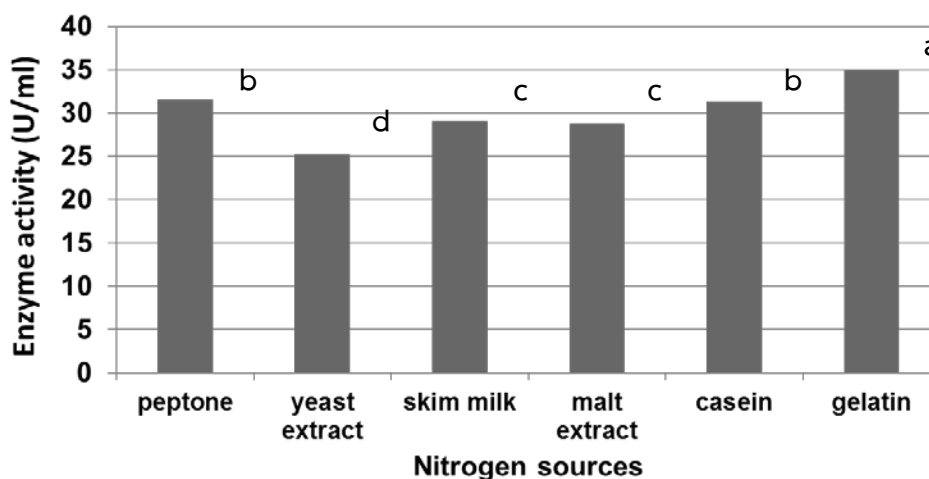
นอกจากนี้ยังเห็นได้ว่าเชื้อสายพันธุ์นี้สามารถผลิตเอนไซม์ได้ที่อุณหภูมิสูงคือในช่วง 40-55 องศาเซลเซียส ซึ่งจากรายงานของ Sukkhum และคณะในปี 2009 พบว่าเชื้อสายพันธุ์ T16-1 เป็นเชื้อแอคติโนมัยสัทชอบร้อนและสามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีที่อุณหภูมิสูง ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมที่มีการรายงานไว้คือ 45 องศาเซลเซียส เช่นกัน เมื่อพิจารณาผลของค่าพีเอชต่อการผลิตเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วันพบว่าค่าพีเอชที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเอนไซม์คือพีเอช 7.0 ซึ่งได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์คือ 35 หน่วยต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้พบว่าเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ที่พีเอชเริ่มต้น 4.0-9.0 เชื้อสายพันธุ์ T16-1 สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% แสดงให้เห็นว่าเชื้อชนิดนี้สามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีทั้งที่ค่าพีเอชเริ่มต้นเป็นกรด กลางและด่าง ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆได้



ภาพที่ 2.4 แสดงผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลกไทด์จากเชื้อ *Actinomadura keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1 โดยใช้หางน้ำย่างที่แยกยางสกิมเป็นวัตถุดิบ และเติม basal medium เป็นองค์ประกอบของอาหารโดยใช้แผ่นสก็อตไบรท์เป็นวัสดุตั้งเซลล์ เมื่อทำการเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน



ภาพที่ 2.5 แสดงผลของค่าพีเอชต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลกไทด์จากเชื้อ *Actinomadura keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1 โดยใช้หางน้ำย่างที่แยกยางสกิมเป็นวัตถุดิบ และเติม basal medium เป็นองค์ประกอบของอาหารโดยใช้แผ่นสก็อตไบรท์เป็นวัสดุตั้งเซลล์ เมื่อทำการเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส



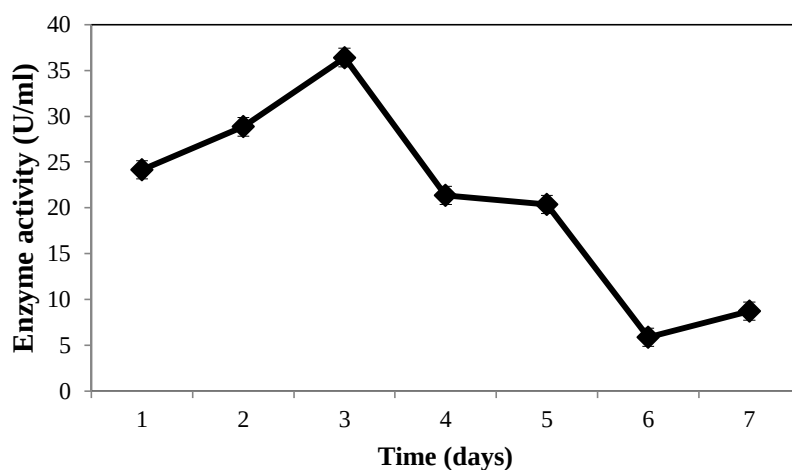
ภาพที่ 2.6 แสดงผลของไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลกไทด์จากเชื้อ *Actinomadura keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1 โดยใช้หางน้ำย่างที่แยกจากสกิมเป็นวัตถุดิบ และเติม basal medium เป็นองค์ประกอบของอาหารโดยใช้แผ่นสก็อตไบรท์เป็นวัสดุตั้งเซลล์ เมื่อทำการเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้น 7.0

จากการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลกไทด์พบว่าจากแหล่งของไนโตรเจนต่างๆที่นำมาทดสอบคือ เปปโทน สารสกัดจากยีสต์ หางนม สารสกัดจากมอลต์ เคซีน และเจลาติน แหล่งไนโตรเจนต่างๆสามารถนำมาเป็นแหล่งสารอาหารเพิ่มเติมให้กับเชื้อได้ซึ่งจากภาพที่ 2.6 จะเห็นได้ว่าเมื่อใช้เจลาตินเป็นแหล่งไนโตรเจนเชื้อสายพันธุ์ T16-1 สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงที่สุดคือ 35 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 4 วัน ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้น 7.0

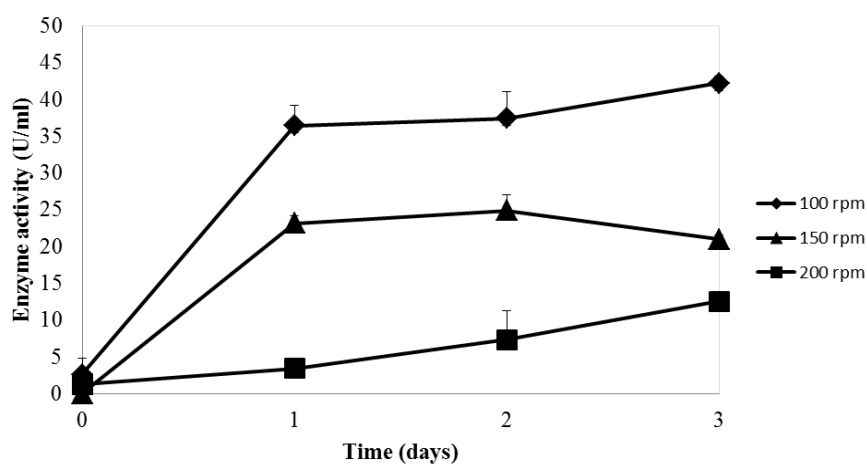
5.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลกไทด์ในถังหมักแบบไบพัตกวน ขนาด 2 ลิตร

เมื่อทำการขยายขนาดการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลกไทด์จากระดับฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เป็น ถังหมักแบบไบพัตกวน ขนาด 2 ลิตร โดยใช้หางน้ำย่างที่แยกจากสกิม และ basal medium รวมทั้งมีการตรึงเซลล์ด้วยสก็อตไบรท์ และทำการหมักแบบเปิด จากภาพที่ 2.7 เป็นการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์พบว่าเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 วัน เชื้อสายพันธุ์ T16-1 สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงที่สุดคือ 36 หน่วยต่อมิลลิลิตร productivity เท่ากับ 0.5 หน่วยต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้น 7.0 จากนั้นทำการศึกษาอัตราการกวนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์พบว่า จากภาพที่ 2.8 เมื่อใช้อัตราการกวนเท่ากับ 150 รอบต่อนาที จะทำให้เชื้อ *A. keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1 สามารถผลิตเอนไซม์ได้

สูงที่สุดคือ 40.5 หน่วยต่อมิลลิลิตร ได้ค่า productivity เท่ากับ 0.56 หน่วยต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้น 7.0 เป็นเวลา 3 วัน และเมื่อทำการเพิ่มอัตราการกวนเป็น 150 รอบต่อนาที และ 200 รอบต่อนาที จะเห็นได้ว่าการผลิตเอนไซม์ลดลงอย่างเห็นได้ชัดซึ่งมีค่า productivity เท่ากับ 0.46 และ 0.14 หน่วยต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ แสดงว่าการกวนโดยใบพัดในถังหมักนั้นเป็นการเพิ่มแรงเฉือนซึ่งมีผลต่อจุลินทรีย์ที่มีลักษณะเป็นเส้นใย ซึ่งแอคติโนมัยซิสเป็นแบคทีเรียที่สร้างเส้นใยได้ ดังนั้นเมื่อเพิ่มอัตราเร็วในการกวน เป็นการเพิ่มแรงเฉือนส่งผลให้เชื้อจุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ได้น้อยลง



ภาพที่ 2.7 แสดงระยะเวลาที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์จากเชื้อ *Actinomadura keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1 โดยใช้หางน้ำย่างที่แยกยางสกิมเป็นวัตถุดิบ และเติม basal medium เป็นองค์ประกอบของอาหารโดยใช้แผ่นสก็อตไบรท์เป็นวัสดุตั้งเซลล์ ในถังหมักแบบ stirrer ขนาด 2 ลิตรที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสค่าพีเอชเริ่มต้น 7.0



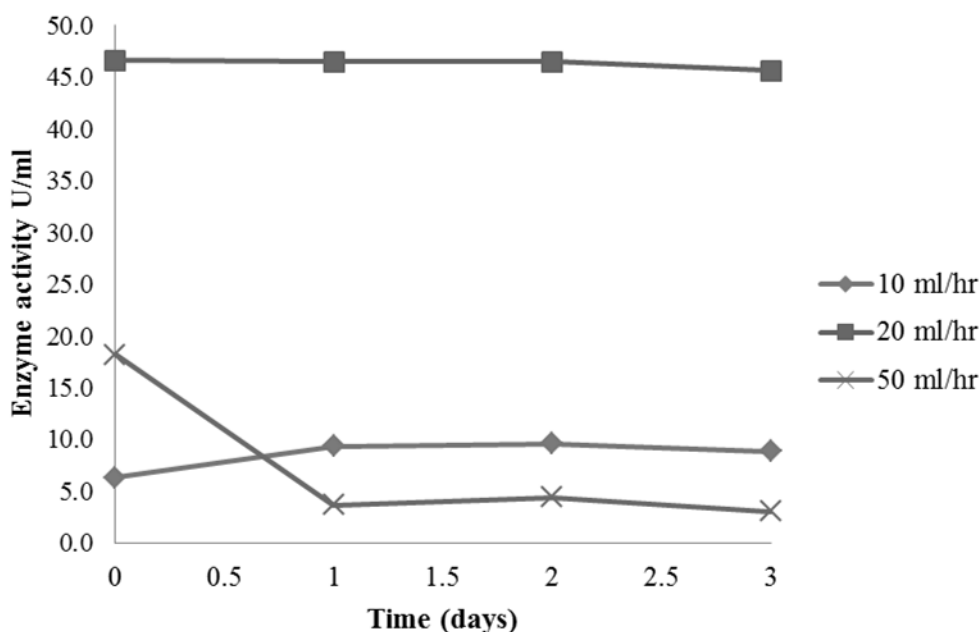
ภาพที่ 2.8 แสดงผลของอัตราการกวนที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์จากเชื้อ *Actinomadura keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1 โดยใช้หางน้ำย่างที่แยกยางสกิมเป็นวัตถุดิบ และเติม basal medium เป็นองค์ประกอบของอาหารโดยใช้แผ่นสก็อตไบรท์เป็นวัสดุตรึงเซลล์ ในถังหมักแบบไบพัคกวน ขนาด 2 ลิตรที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ค่าพีเอชเริ่มต้น 7.0

จากนั้นทำการศึกษาอัตราการให้อากาศในถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยใช้หางน้ำย่างที่แยกยางสกิม และ basal medium รวมทั้งมีการตรึงเซลล์ด้วยสก็อตไบรท์ และทำการหมักแบบเปิด พบว่าเมื่อเพิ่ม การให้อากาศเข้าสู่ถังหมักจะทำให้การผลิตเอนไซม์ลดลงอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด 30.9 หน่วยต่อมิลลิลิตร productivity เท่ากับ 0.64 หน่วยต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง เมื่อใช้อัตราการให้อากาศเท่ากับ 0.5 vvm แสดงให้เห็นว่าการให้อากาศมากเกินไปในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลกไทด์ในระบบเปิดทำให้ปริมาณการผลิตเอนไซม์ลดลงเมื่อเทียบกับการทดลองที่ไม่ทำการให้อากาศ ซึ่งเมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาทำการศึกษานิตของเชื้อจุลินทรีย์ พบว่าเมื่อทำการเพิ่มอัตราการให้อากาศมากขึ้นปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในระบบการหมักยิ่งมากขึ้นเนื่องจากการหมักแบบเปิด ไม่มีการกำจัดเชื้อก่อนทำการเลี้ยงเพื่อผลิตเอนไซม์ จึงมีการปนเปื้อนได้ง่ายเมื่อในระบบมีอากาศมาก ดังนั้นจากการทดลองนี้จึงสรุปได้ว่า การผลิตเอนไซม์ด้วยระบบเปิด ไม่มีการกำจัดเชื้ออื่น โดยใช้หางน้ำย่างที่แยกยางสกิมเป็นวัตถุดิบนั้นไม่จำเป็นต้องใช้การให้อากาศในระบบการหมัก จึงเป็นข้อดีในการที่จะนำไปประยุกต์ใช้ได้ง่าย ไม่สิ้นเปลืองพลังงานในการให้อากาศ ใช้เพียงแค่การกวนเพื่อให้เชื้อสัมผัสกับอาหารและผลิตเอนไซม์ได้มากขึ้นเท่านั้น

5.4 การศึกษาการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลกไทด์แบบต่อเนื่องในถังหมักแบบไบพัคกวน ขนาด 2 ลิตร

จากสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลกไทด์ในถังหมักแบบไบพัคกวน ขนาด 2 ลิตร ได้สภาวะที่เหมาะสมคือ อัตราการกวน 100 ppm อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ค่าพีเอชเริ่มต้น 7.0 และทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำสภาวะที่ได้มาทำการทดลองการผลิตเอนไซม์โดยใช้การหมักแบบต่อเนื่องจากภาพที่ 2.9 แสดงการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลกไทด์แบบต่อเนื่องในถังหมักขนาด 2 ลิตร พบว่าเมื่อใช้อัตราการไหลของหางน้ำย่างที่แยกยางสกิมผสมกับ basal medium เข้าสู่ถังหมัก และอัตราการดึงเอนไซม์ที่ได้จากการหมักออกเท่ากับ 20 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง หรือค่า dilution rate เท่ากับ 0.013 ต่อชั่วโมง จะทำให้เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงที่สุดคือ 45 หน่วยต่อมิลลิลิตร คิดเป็น productivity เท่ากับ 0.6 หน่วยต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งจากกราฟจะเห็นได้ว่าสามารถผลิตเอนไซม์ได้คงที่จนถึงวันที่ 3 ของการหมัก ในขณะที่เมื่อใช้ค่า dilution rate เท่ากับ 0.007 และ 0.033 ต่อชั่วโมง ได้ค่า productivity เพียงแค่ 0.07 และ 0.17 หน่วยต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง

ตามลำดับ และเมื่อทำการเปรียบเทียบการหมักแบบ batch และการหมักแบบต่อเนื่องจะได้ค่า productivity ของการผลิตเอนไซม์โดยใช้การหมักแบบต่อเนื่องมีค่าสูงกว่า การหมักแบบ batch



ภาพที่ 2.9 แสดงการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลกไทด์จากเชื้อ *Actinomadura keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1 ด้วยการหมักแบบต่อเนื่อง โดยใช้หางน้ำย่างที่แยกยางสกีเป็นวัตถุดิบ และเติม basal medium เป็นองค์ประกอบของอาหารโดยใช้แผ่นสก็อตไบรท์เป็นวัสดุตรึงเซลล์ ในถังหมักแบบ stirrer ขนาด 2 ลิตรที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ค่าพีเอชเริ่มต้น 7.0 อัตราการกวน 100 rpm

5.5 การศึกษาคุณสมบัติของหางน้ำย่างที่ผ่านกระบวนการหมัก

จากการศึกษาคุณสมบัติของหางน้ำย่างที่ผ่านกระบวนการหมัก แสดงดังตารางที่ 2.2 พบว่า เมื่อนำหางน้ำย่างที่แยกยางสกีไปใช้ในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลกไทด์ แล้วนั้น ค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ลดลงอย่างเห็นได้ชัดเช่น ค่าความเข้มข้นของโปรตีน และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า การนำหางน้ำย่างที่แยกยางสกีมาใช้ประโยชน์โดยการนำมาผลิตเอนไซม์นั้นสามารถนำน้ำเหลือทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำยางข้นมาเพิ่มคุณค่าโดยการนำมาผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลกไทด์และยังสามารถลดค่า ปริมาณสารอาหารอื่น ๆ ทำให้ช่วยลดมลพิษทางสิ่งแวดล้อมแทนการบำบัดในโรงงานแบบเดิมได้อีกด้วย

ตารางที่ 2.2 แสดงลักษณะของหางน้ำย่าง หางน้ำย่างที่แยกยางสกี และหางน้ำย่างที่แยกยางสกีหลังจากผ่านกระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง

Parameter	Skim latex	Non-rubber skim latex	Fermented Non-rubber skim latex
Protein concentration (mg/L)	831	531	7
Reducing sugar (mg/L)	1,197	16	0.3
pH	11-12	2-3	6.8-7.0

6. สรุปผลการวิจัย

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลกไทด์โดยใช้หางน้ำย่างที่แยกยางสгимเป็นแหล่งของสารอาหารและแร่ธาตุ จากงานวิจัยพบว่าเมื่อทำการผลิตเอนไซม์โดยใช้หางน้ำย่างที่แยกยางสгимซึ่งผสม basal medium ที่ประกอบด้วย 0.035% (น้ำหนักต่อปริมาตร) PLA powder และใช้ 1% (น้ำหนักต่อปริมาตร) แผ่นใยขัด (สก๊อตไบร์ท) เป็นวัสดุตั้งในระดับฟลาสก์พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ได้ 29.6 ยูนิตต่อลิตร และเมื่อทำการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์โดยใช้หางน้ำย่างที่แยกยางสгимพบว่าเชื้อแอคติโนมัยสีท สายพันธุ์ T16-1 ผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด 35 ยูนิตต่อลิตร เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ค่าพีเอชเริ่มต้นคือ 7.0 ทำการเขย่าที่ 150 ออฟเอ็ม จากนั้นทำการขยายขนาดการผลิตเป็น 2 ลิตรในถังหมักแบบ stirrer โดยใช้การหมักแบบเปิด พบว่าเชื้อชนิดนี้สามารถผลิตเอนไซม์ได้ 40.5 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้อัตราการกวนเท่ากับ 150 ออฟเอ็ม โดยไม่ต้องให้อากาศ เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 วัน นอกจากนี้เมื่อทำการผลิตเอนไซม์ในถังหมักแบบต่อเนื่องพบว่าเชื้อสายพันธุ์ T16-1 สามารถผลิตเอนไซม์ได้คงที่ที่ 45 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 3 วัน ดังนั้นจะเห็นได้ว่าหางน้ำย่างที่แยกยางสгимมีความสามารถในการนำมาใช้ผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลกไทด์ได้โดยใช้เชื้อ *Actinomadura keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1 ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้สามารถนำมาใช้ในการนำพลาสติกชนิดพอลิแลกไทด์กลับมาใช้ใหม่ได้ในอนาคต นอกจากนี้กระบวนการหมักที่ได้จากงานวิจัยสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการนำหางน้ำย่างที่แยกยางสгимซึ่งเป็นของเหลือทิ้งจากโรงงานน้ำย่างขึ้นมาใช้เพิ่มมูลค่าให้เป็นเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลกไทด์ได้

7. เอกสารอ้างอิง

- Jararat, A. and Y. Tokiwa. 2001. Degradation of poly(L-lactide) by a fungus. *Macromol. Biosci.* 1: 136–140.
- Jararat, A. and Y. Tokiwa. 2003. Degradation of poly(L-lactide) by *Saccharothrix waywayandensis*. *Biotechnol. Lett.* 25: 401–404.

- Jarerat, A., Y. Tokiwa and H. Tanaka. 2003. Poly(L-lactide) degradation by *Kibdelosporangium aridum*. Biotechnol. Lett. 25: 2035–2038.
- Jarerat, A. , Y. Tokiwa and H. Tanaka. 2006. Production of poly(L-lactide)-degrading enzyme by *Amycolatopsis orientalis* for biological recycling of poly(L-lactide). Appl. Microbiol. Biotechnol. 72:726-731.
- Kim, M. N., W. G. Kim, H. Y. Weon and S. H. Lee. 2007. Poly(L-lactide)-degrading activity of a newly isolated bacterium. J. Appl. Polym. Sci. 109: 234–239.
- Pollution control department. Guidelines for protection and reduction of pollution in concentrated latex industry. (2005), No. 6/8
- Tomita, K., Y. Kuroki and K. Nakai. 1999. Isolation of thermophiles degrading poly(L-lactic acid). J. Biosci. Bioeng. 87: 752–755.
- Tomita, K., T. Nakajima, Y. Kikuchi and N. Miwa. 2004. Degradation of poly(L-lactic acid) by a newly isolated thermophile. Polym. Degrad. Stab. 84: 433-438.
- Tomita, K., H. Tsuji, T. Nakajima, Y. Kikuchi, K. Ikarashi and N. Ikeda. 2003. Degradation of poly(D-lactic acid) by a thermophile. Polym. Degrad. Stab. 81: 167-171.
- Sukkhum, S., S. Tokuyama, T. Tamura and V. Kitpreechavanich. 2009. A novel poly(L-lactide) degrading actinomycetes isolated from Thai forest soils, phylogenetic relationship and enzyme characterization. J. Gen. Appl. Microbiol. 55: 459-467.
- Sukkhum, S., Kongsaree, P., Tokuyama, S., Ishida, Y., Tamura, T., Kitpreechavanich, V. 2011. A novel poly (L-lactide) degrading thermophilic actinomycetes, *Actinomadura keratinilytica* strain T16-1 and *pla* gene sequencing. Afr. J. Microbial research. 5(18), 2575-2582.

- S. Sukkhum, S. Tokuyama and V. Kitpreechavanich. Poly(L-Lactide)-Degrading Enzyme Production by *Actinomadura keratinilytica* T16-1 in 3 L Airlift Bioreactor and Its Degradation Ability for Biological Recycle. J. Microbiol. Biotechnol. (2012), 22(1), 92–99.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Skim milk agar

Glucose	2.0	กรัมต่อลิตร
K ₂ HPO ₄	0.2	กรัมต่อลิตร
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2	กรัมต่อลิตร
Skim milk	2.0	กรัมต่อลิตร
FeSO ₄	0.05	กรัมต่อลิตร
Agar	15.0	กรัมต่อลิตร

พีเอช 7.0 และ 9.0 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที

2. Non-rubber skim latex agar

Non-rubber skim latex	1000	มิลลิลิตร
Agar	15.0	กรัมต่อลิตร

พีเอช 7.0 และ 9.0 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที

3. Nutrient broth

Peptone	5	กรัมต่อลิตร
Beef extract	3	กรัมต่อลิตร

เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

หมายเหตุ การเตรียมอาหารแข็งต้องเติมผงวุ้นร้อยละ 1.5

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส

การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์โปรตีเอสทำโดยวัดปริมาณสี azo dye ที่เกิดขึ้นเทียบกับตัวควบคุม ในการทดลองนี้ใช้ 0.5% azo casein ปริมาตร 0.5 เป็นสับสเตรท (ละลายใน 0.05 M phosphate buffer, pH 7.0) จากนั้นปิเปตสารละลาย 0.5% azo casein มา 200 ไมโครลิตร ลงในหลอด micro centrifuge และอุ่นสารละลาย azo casein ที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วทำปฏิกิริยากับสารละลายเอนไซม์ 100 ไมโครลิตร (ที่เจือจางได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วย phosphate buffer 0.05 M พีเอช 7) บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 10% trichloroacetic acid ปริมาตร 600 ไมโครลิตร บั่นเหวี่ยงที่ 5,000 rpm 5 นาที เพื่อแยกตะกอนโปรตีนออกสารละลาย นำส่วนใส 600 ไมโครลิตร เติมนลงในสารละลาย 0.1 N NaOH 700 ไมโครลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 440 นาโนเมตร โดยกำหนดให้ 1 ยูนิต ของเอนไซม์ คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้น 0.1 หน่วย ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ใช้ในการทดลอง

หลอดควบคุมเอนไซม์ โดย เติมเอนไซม์ 100 ไมโครลิตร ลงใน buffer 200 ไมโครลิตร เติม 10% trichloroacetic acid ปริมาตร 600 ไมโครลิตร บั่นเหวี่ยงที่ 5,000 rpm 5 นาที เพื่อแยกตะกอนโปรตีนออกสารละลาย นำส่วนใส 600 ไมโครลิตร เติมนลงในสารละลาย 0.1 N NaOH 700 ไมโครลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 440 นาโนเมตร

ทำหลอดควบคุม substrate โดย เติม azo casein 200 ไมโครลิตร ลงใน buffer 100 ไมโครลิตร และเติม 10% trichloroacetic acid ปริมาตร 600 ไมโครลิตร บั่นเหวี่ยงที่ 5,000 rpm 5

นาที่ เพื่อแยกตะกอนโปรตีนออกสารละลาย นำส่วนใส 600 ไมโครลิตร เติมลงในสารละลาย 0.1 N NaOH 700 ไมโครลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 440 นาโนเมตร

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Lowry (Lowry และคณะ, 1951)

การเตรียมสารละลาย

สารละลาย A : ละลาย copper sulfate 0.5 กรัม และ sodium citrate 1 กรัม
ในน้ำ 100 มิลลิลิตร

สารละลาย B : ละลาย sodium carbonate 20.0 กรัม และ NaOH 4.0 กรัม ในน้ำ 1
ลิตร

สารละลาย C : นำสารละลาย A มา 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย B 50 มิลลิลิตร

สารละลาย D : สารละลาย 1N Folin-ciocalteu

วิธีการวิเคราะห์

1. นำตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณโปรตีน (มีปริมาณโปรตีนอยู่ในช่วง 25-100 ไมโครกรัม ต่อ มิลลิลิตร) ใส่ลงในหลอดทดลอง ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร
2. เติมสารละลาย C (จะต้องเตรียมใหม่ ก่อนใช้ทุกครั้ง) 2.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองตัวอย่าง ผสมให้เข้ากันทันที ทิ้งไว้ 5 ถึง 10 นาที
3. เติมสารละลาย D 0.25 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 20 ถึง 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปหาปริมาณไทโรซีน โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน
4. เตรียมกราฟมาตรฐานของไทโรซีน โดยเจือจางสารละลายมาตรฐานไทโรซีนให้มีความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร ทำการวิเคราะห์ตามวิธีในข้อ 1-3 เขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของไทโรซีน

ภาคผนวก ค
เอกสาร สรุปผลการดำเนินงานวิจัยตามวัตถุประสงค์คำชี้แจงรายละเอียดการปรับปรุงและแก้ไข
โครงการย่อยที่ 1

ระยะเวลา	กิจกรรมที่นำเสนอในข้อเสนอโครงการ	ผลการปฏิบัติงาน
8 เดือน ปีที่ 1	1. วิเคราะห์สมบัติทางเคมีและกายภาพบางประการของหางน้ำยางที่แยกยาง สกิมออก 2. คัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียในกลุ่ม <i>Bacillus</i> ที่สามารถผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส จากหางน้ำยางที่แยกยางสกิมออกได้สูง 3. ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ในถังหมัก	1. ผลการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลและโปรตีนทั้งหมด (Total sugar & Total protein) เท่ากับ 55 และ 0.67 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ 2. แบคทีเรียสายพันธุ์ KU-K2 สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงที่สุด ซึ่งเมื่อจำแนกโดย 16s rRNA gene และทดสอบทางชีวเคมี พบว่าเป็นสายพันธุ์ <i>B.licheniformis</i>
9-14 เดือน ปีที่ 1	3.1 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสและการเติบโตของแบคทีเรียที่ได้คัดเลือกในระดับฟลาสก์ โดยใช้แผนการทดลองแบบ <i>Plackett-Burman Designs</i> 3.2 ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารอาหารที่มีอิทธิพลต่อการผลิตเอนไซม์ด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนองโดยการออกแบบการทดลองแบบ <i>central composite design</i> 4. พัฒนาระบบการหมักจากในระดับ ฟลาสก์ เป็น 2.5 ลิตร ในถังหมักแบบกวนขนาด 5.0 ลิตรในระบบการหมักแบบเปิด โดยใช้สูตรอาหารที่เหมาะสมจากในระดับฟลาสก์ ศึกษาอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศที่เหมาะสม	3.1 ทราบปัจจัยทางเคมีและกายภาพที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ได้แก่ปริมาณ Skim milk, Glucose, FeSO_4, และอุณหภูมิ 3.2 ทราบความเข้มข้นของปัจจัยทางเคมีที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์จากกราฟ contour plot และกราฟ 3 มิติ 4. การศึกษากระบวนการหมักแบบครั้งคราวพบว่า เชื้อ KU-K2 ให้กิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสสูงที่สุด (5.97 units/mL) ที่ 48 ชั่วโมงในถังหมักขนาด 5 ลิตรที่ไม่ควบคุมพีเอช อัตราการกวนที่ 250 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศเท่ากับ 2.0 ปริมาตรอาหารต่อปริมาตรต่อนาทีโดยกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสสูงขึ้น 2.6 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับสูตรอาหารที่ยังไม่ได้หาค่าที่เหมาะสม

	5. กระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง	5. ไม่มีการทดลองแบบต่อเนื่อง ทั้งนี้ เนื่องจากน้ำทิ้งที่ได้ไม่ได้เกิดขึ้นในสภาพจริงไม่ได้เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง ต้องมีการพัก เพื่อให้ ส่วนที่ยางตะกอนก่อน
--	------------------------------	---

เอกสาร สรุปผลการดำเนินงานวิจัยตามวัตถุประสงค์คำชี้แจงรายละเอียดการปรับปรุงและแก้ไข

โครงการย่อยที่ 2

ระยะเวลา	กิจกรรมตามแผน	กิจกรรมที่ดำเนินการ	ผลที่ได้รับตลอดโครงการ
----------	---------------	---------------------	------------------------

6 เดือนที่ 1	1. การศึกษาการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแล็กไทด์จากเชื้อแอคติโนมัยสีท สายพันธุ์ T16-1 โดยการตรึงเซลล์ 2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแล็กไทด์ในระดับฟลาสก์และในถังหมักแบบ stirrer	1. ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแล็กไทด์จากเชื้อแอคติโนมัยสีท สายพันธุ์ T16-1 โดยการตรึงเซลล์ 2. ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแล็กไทด์ในระดับฟลาสก์และในถังหมักแบบ stirrer	1. สามารถผลิตเอนไซม์โดยเชื้อสายพันธุ์ T16-1 โดยการตรึงเซลล์ได้กิจกรรมของเอนไซม์ 29.6 ยูนิตต่อมิลลิลิตร 2. สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด 35 ยูนิตต่อมิลลิลิตร คือทำการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ค่าพีเอชเริ่มต้นคือ 7.0 ทำการเขย่าที่ 150 ออฟเอ็ม จากนั้นทำการขยายขนาดการผลิตเป็น 2 ลิตร ในถังหมักแบบ stirrer โดยใช้การหมักแบบเปิด พบว่าเชื้อชนิดนี้สามารถผลิตเอนไซม์ได้ 40.5 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้อัตราการกวนเท่ากับ 150 ออฟเอ็ม โดยไม่ต้องให้อากาศ เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 วัน
6 เดือนที่ 2	1. ศึกษาการผลิตเอนไซม์โดยใช้การหมักแบบต่อเนื่องโดยใช้เซลล์ตรึง 2. รวบรวมผลงานวิจัยเพื่อสรุปผล	1. ศึกษาการผลิตเอนไซม์โดยใช้การหมักแบบต่อเนื่องโดยใช้เซลล์ตรึง 2. รวบรวมผลงานวิจัยเพื่อสรุปผล	1. เชื้อสายพันธุ์ T16-1 สามารถผลิตเอนไซม์ได้คงที่ที่ 45 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 3 วัน 2. สามารถรวบรวมผลการทดลองและสรุปผลการวิจัยทั้งหมดได้

ภาคผนวก ง

บทความสำหรับเผยแพร่

Suntornnimit, P. Sukkhum, S. and Kitpreechavanich, V., 2013. Utilization of non-rubber skim latex for production of alkaline protease by thermotolerant *Bacillus* through open fermentation process. pp. 188, the first asia-pacific rubber conference (ARPC). Prince of Songkla University Surattani campus, Surattani, Thailand, 5-6 Sep. 2013.

Sukkhum, S. and Kitpreechavanich, V., 2013. Utilization of non-rubber skim latex for PLA-degrading enzyme production by *Actinomadura keratinilytica* Strain T16-1, pp. 189, The first asia-pacific rubber conference (ARPC). Prince of Songkla University Surattani campus, Surattani, Thailand, 5-6 Sep. 2013.

ภาคผนวก จ

สรุปข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะต่อร่างรายงานฉบับสมบูรณ์ของโครงการ
 “การใช้หางน้ำยาง เพื่อการผลิตเอนไซม์อุตสาหกรรมโดยจุลินทรีย์ด้วยกระบวนการหมักแบบเปิด”
 โดยมี รศ.ดร.วิเชียร กิจปรีชาวนิช เป็นหัวหน้าโครงการ

ข้อคิดเห็น/ข้อเสนอแนะของผู้ทรงคุณวุฒิ	ตอบข้อคิดเห็น ของผู้ทรงคุณวุฒิ โดยนักวิจัย
ความเห็นด้านการพิมพ์ (Editorial) แผนงานวิจัย : การใช้หางน้ำยางเพื่อการผลิตเอนไซม์อุตสาหกรรมโดยจุลินทรีย์ด้วยกระบวนการหมักแบบเปิด - ควรตรวจสอบตัวสะกดคำผิดและการใช้คำแล้วแก้ไขให้ถูกต้องตัวอย่างเช่น - คำว่า “จุลินทรีย์ทนร้อน” หรือ “จุลินทรีย์ชอบร้อน” ควรเลือกใช้อย่างใดอย่างหนึ่งให้เหมือนกันทั้งรายงาน แต่ควรจะใช้คำว่า “ทนร้อน” เหมาะสมกว่า - ตารางที่ 2 และ 3 ควรเขียนให้เหมือนกัน จะเป็นภาษาไทย หรือภาษาอังกฤษ เช่น ซีโอดี (มิลลิกรัมต่อลิตร) หรือ COD(mg/L) - ควรตรวจสอบการอ้างอิงให้ถูกต้อง โครงการย่อยที่ 1: การใช้หางน้ำยางเพื่อผลิตเอนไซม์อัลคาไลด์โปรติเอสโดย <i>Bacillus</i> สายพันธุ์ทนร้อนด้วยกระบวนการหมักแบบเปิด - การเขียนรายงานมีคำผิดตกหล่นหลายแห่งควรตรวจทานความถูกต้องของรายงาน การรายงานควรให้ผู้อ่านเข้าใจง่ายไม่สับสน นอกจากนี้ข้อมูลบางแห่งเช่นสูตรอาหารไม่ชัดเจนว่ามีการใช้หางน้ำยางปริมาณเท่าไร และในตารางที่ 2 ; X_6 และ X_7 ไม่ตรงกับคำบรรยาย ควรตรวจสอบและแก้ไข - ควรระบุเลขหน้าในรายงานทุกหน้า โครงการย่อยที่ 2: การใช้ประโยชน์จากหางน้ำยาง เพื่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลกไทด์จากเชื้อแอคติโนมัยสีท โดยใช้กระบวนการหมักแบบเปิด	1.1 ได้ตรวจสอบตัวสะกดและใช้คำตามคำแนะนำของผู้ทรงคุณวุฒิได้แก่คำว่า “จุลินทรีย์ชอบร้อน” ได้เปลี่ยนเป็น “จุลินทรีย์ทนร้อน” ครบ 1.2 ได้แก้ไข

ข้อคิดเห็น/ข้อเสนอแนะของผู้ทรงคุณวุฒิ	ตอบข้อคิดเห็น ของผู้ทรงคุณวุฒิ โดยนักวิจัย
1. การเขียนหน่วยนับ จะเขียนเป็นภาษาอังกฤษหรือไทย ควรเลือกอย่างใดอย่างหนึ่ง และควรเขียนให้เหมือนกัน เช่น มล. หรือ มิลลิลิตร หรือ ml, U/ml 2. ควรตรวจสอบรูปแบบการเขียนเอกสารอ้างอิงในเนื้อเรื่องให้ถูกต้อง บางเรื่องมีในเนื้อหา แต่ไม่มีในเอกสารอ้างอิงท้ายเรื่อง 3. ควรตรวจสอบการเขียนคำว่า “Actinomadura keratinolytica” ให้ถูกต้องทุกที่ในรายงาน (ควรเขียนแยกกันเป็น Actinomadura keratinolytica) 4. บทคัดย่อ : ขนาดตัวอักษรควรแก้ไขให้เหมือนกับในเนื้อหา 5. ควรมีเลขหน้ากำกับในรายงานทุกหน้า 6. แนวทางการดำเนินงาน 6.1 ข้อ 4.4 ควรทบทวนการใช้คำซ้ำ เช่น คำว่า“ทำการ”ควรตัดออกบ้างควรใช้ให้เหมาะสมกับข้อความที่เขียน 6.2 ข้อ 4.5 คำว่าfeed ควรเขียนเป็นภาษาไทย 7. ผลการดำเนินงาน 7.1 ควรตรวจสอบข้อความใต้ภาพที่ 3 – 9 และแก้ไขให้ถูกต้อง 7.2 อัตราการกวนในผลการทดลองควรตรวจสอบให้ตรงกับภาพที่ 8 7.3 ผลการทดลองข้อ 5.4 ควรแสดงตารางหรือกราฟอัตราการไหลของหางน้ำยางที่แยกยางสกิม 10, 20, 30, 40, และ 50 ml/h ในการผลิตเอนไซม์ด้วย	ตารางที่ 2 และ 3 ในส่วน of แผน วิจัยให้เหมือนกัน โดยใช้คำศัพท์ เป็นภาษาอังกฤษ ครับ 2. ได้แก้ไขการ อ้างอิง 1. ได้แก้ไขข้อมูล การศึกษาปัจจัย ที่มีความสำคัญ ในการผลิต เอนไซม์โปรติเอส ดังแสดงในตาราง ที่ 5 ซึ่งเดิมนั้น X6 และ X7 ไม่ ตรงกับคำ บรรยาย

ข้อคิดเห็น/ข้อเสนอแนะของผู้ทรงคุณวุฒิ	ตอบข้อคิดเห็น ของผู้ทรงคุณวุฒิ โดยนักวิจัย
	2. ได้มีกา ระบุเลขหน้า ทุกหน้าตาม สารบัญ 1. ทำการ แก้ไขหน่วย ให้เหมือนกัน ทั้งหมดเช่น มิลลิลิตร หน่วยต่อ มิลลิลิตร เป็นต้น 2. ทำการ ตรวจสอบ แก้ไขอ้างอิง ให้ตรงกับใน

ข้อคิดเห็น/ข้อเสนอแนะของผู้ทรงคุณวุฒิ	ตอบข้อคิดเห็น ของผู้ทรงคุณวุฒิ โดยนักวิจัย
	เนื้อเรื่อง 3.เนื่องจากมี การเปลี่ยน คอมพิวเตอร์ อาจเกิดการ เลื่อนของ ตัวอักษร ดังนั้นจึงขอ ส่งไฟล์ใน แบบ pdf มา ด้วย 4. ได้ทำการ แก้ไขขนาด ตัวอักษรให้ ตรงตาม เนื้อหา 5. ใส่เลขหน้า เพิ่มเติม

ข้อคิดเห็น/ข้อเสนอแนะของผู้ทรงคุณวุฒิ	ตอบข้อคิดเห็น ของผู้ทรงคุณวุฒิ โดยนักวิจัย
	6.1 แก้ไขโดย ลบคำว่าทำ การออกให้ เหมาะสม 6.2 เปลี่ยน จากคำว่า feed เป็นคำ ว่า ดึงอาหาร เข้า และออก 7.1 ข้อความ ใต้ภาพที่ 3-9 ถูกต้อง เรียบร้อยแล้ว 7.2 แก้ไข อัตราการ กวาดจาก 150 เป็น 100

ข้อคิดเห็น/ข้อเสนอแนะของผู้ทรงคุณวุฒิ	ตอบข้อคิดเห็น ของผู้ทรงคุณวุฒิ โดยนักวิจัย
	7.3 เพิ่มเติม ผลการ ทดลองลงใน เนื้อหา
ความเห็นด้านวิชาการ (Technical) แผนงานวิจัย : การใช้หางน้ำยางเพื่อการผลิตเอนไซม์อุตสาหกรรมโดยจุลินทรีย์ด้วยกระบวนการหมักแบบเปิด ผู้ทรงคุณวุฒิท่านที่ 1 1. การเขียนรายงานมีคำผิดมาก สำนวนภาษาอ่านแล้วไม่ชัดเจน ไม่ต่อเนื่อง การเขียนรายงานแยกเป็นโครงการย่อย 2 โครงการ ซึ่งไม่สัมพันธ์กัน ไม่มีการสรุปรวมในตอนท้ายของรายงาน ต้องดูข้อมูลของโครงการย่อย ไม่มีการนำผลของโครงการย่อยมาวิเคราะห์/สังเคราะห์ และสรุปเป็นภาพรวม ควรเพิ่มการนำผลการวิจัยของ 2 โครงการย่อยมาวิเคราะห์เพื่อดูว่าเป็นไปตามวัตถุประสงค์ และเป้าหมายที่วางไว้หรือไม่ โดยเขียนเป็นบทสรุปท้ายรายงาน 2. ไม่มีการสรุปผลว่าหางน้ำยางมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นวัตถุดิบเพื่อใช้ผลิตเอนไซม์ที่จะเป็นประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมหรือไม่ มีความคุ้มค่าที่จะลงทุนหรือไม่ ผู้วิจัยเน้นที่การผลิตเอนไซม์จนเกินไป ควรเพิ่มผลสรุปของโครงการย่อยทั้ง 2 ว่าใช้หางน้ำยางมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอนไซม์ได้หรือไม่ และควรมีการประเมินต้นทุน และมูลค่าเพิ่มที่ได้จากการผลิตเอนไซม์เพื่อดูความคุ้มค่าที่จะพัฒนาต่อเพื่อการผลิตได้จริงต่อไป ผู้ทรงคุณวุฒิท่านที่ 2	1. ได้ ตรวจสอบ และแก้ไข ตาม คำแนะนำ ของ ผู้ทรงคุณวุฒิ

ข้อคิดเห็น/ข้อเสนอแนะของผู้ทรงคุณวุฒิ	ตอบข้อคิดเห็น ของผู้ทรงคุณวุฒิ โดยนักวิจัย
1. เนื้อหาของการรายงานไม่เป็นระบบ ไม่ครบถ้วนสมบูรณ์ มีความผิดพลาดในหลายส่วน ควรแก้ไขให้ครบถ้วนก่อนทำรายงานฉบับจริง ควรเพิ่มข้อมูลของผลการดำเนินงานให้ชัดเจนมากกว่านี้ 2. ชื่อแผนงาน และโครงการย่อยทั้ง 2 ไม่ถูกต้อง ควรแก้ไขให้ตรงตามสัญญา 3. ยังไม่มีข้อมูลรายงานการวิเคราะห์ – สังเคราะห์ข้อมูลในส่วนของการดำเนินงานของโครงการโดยตรง ส่วนใหญ่จะเป็นรายงานของผู้อื่น 4. ไม่มีข้อมูลการทดลองที่เกี่ยวกับการผลิตเอนไซม์โดยใช้หางน้ำยาง มีเพียงข้อมูลคุณสมบัติของน้ำยางและหางน้ำยางเท่านั้น 5. ผู้อำนวยการแผนควรนำผลการดำเนินการวิจัยจาก 2 โครงการย่อยมาสรุป หรือเขียนร้อยเรียงความเชื่อมโยง/สัมพันธ์กันในส่วน ของแผนงานวิจัยด้วย โครงการย่อยที่ 1: การใช้หางน้ำยางเพื่อผลิตเอนไซม์อัลคาไลด์โปรติเอสโดย Bacillus สายพันธุ์ทนร้อนด้วยกระบวนการหมักแบบเปิด ผู้ทรงคุณวุฒิท่านที่ 1 1. ขาดการสรุปผลในเชิงการนำหางน้ำยางมาใช้ประโยชน์เพื่อเพิ่มมูลค่าโดยการใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอนไซม์ และการคิดต้นทุนการผลิต เพื่อเป็นข้อมูลในเชิงเศรษฐศาสตร์ที่จะบอกได้ว่าจะมีแนวโน้มที่จะมีการนำผลการวิจัยนี้ไปใช้งานได้หรือไม่ 2. ยังขาดการสรุปผลทั้งในบทความย่อ และเนื้อหารายงาน ซึ่งควรเพิ่มเติมบทสรุปโดยเพิ่มเนื้อหาที่เกี่ยวข้องกับการใช้ประโยชน์หางน้ำยางให้สอดคล้องกับวัตถุประสงค์ของโครงการ 3. ขาดข้อมูลผลการศึกษารื่องหางน้ำยางว่าปริมาณใดที่เหมาะสม ความเข้มข้นควรเป็นเท่าไร 4. ควรทบทวนการเขียนบทความย่อ ไม่ควรเขียนส่วนคำนำมากเกินไป และไม่ควรรนำข้อมูลจากการค้นเอกสารมาใส่ ควรเพิ่มเติมว่ามีการใช้หางน้ำยางปริมาณมากน้อยเพียงใดในการผลิตเอนไซม์ เนื่องจากวัตถุประสงค์หลักคือการใช้ประโยชน์จากหางน้ำยาง	2. ได้เพิ่ม ตารางคำนวณ ต้นทุนการผลิต เอนไซม์จาก วัตถุดิบทั้งหมดลง ในผลการ ดำเนินงานแล้ว ครับ 1. ได้ ตรวจสอบ และแก้ไข

ข้อคิดเห็น/ข้อเสนอแนะของผู้ทรงคุณวุฒิ	ตอบข้อคิดเห็น ของผู้ทรงคุณวุฒิ โดยนักวิจัย
5. ข้อ 8.6 ควรระบุว่าใช้สารเคมี และ metal ion ใดบ้างในการทดลอง 6. ควรให้ข้อมูลเสนอแนะแนวทางการพัฒนาเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ทั้งในระดับการผลิตระดับอุตสาหกรรม และการผลิตระดับชุมชนที่ อาจจะใช้ประโยชน์ในรูปของหัวเชื้อปุ๋ยหมัก หรือการผลิตเอนไซม์หยาบเพื่อย่อยโปรตีนในน้ำยาง <u>ผู้ทรงคุณวุฒิท่านที่ 2</u> 1. ควรตรวจสอบความครบถ้วนตามข้อเสนอโครงการ เนื่องจากตามที่นำเสนอไว้ output ระบุว่าได้กระบวนการหมักแบบเปิดอย่างต่อเนื่องเพื่อผลิตเอนไซม์ แต่ในการทดลองระบุแค่การหมักแบบเปิดอย่างเดียว ไม่มีการดำเนินการแบบต่อเนื่องว่ามีการไหลเข้าของ ทางน้ำยางเท่าไร และมีการเก็บผลผลิตแบบต่อเนื่องอย่างไร ดังนั้น หากไม่มีการทดลองแบบต่อเนื่องก็ควรตัดคำว่าต่อเนื่องออกให้ เหลือแค่การหมักแบบเปิด และควรให้เหตุผลด้วยว่าทำไมจึงไม่ได้ดำเนินการตามที่ระบุในข้อเสนอโครงการ 2. เนื้อหาของรายงานไม่ครบถ้วน บางตอนมีการคัดลอกมาใส่แต่ไม่สมบูรณ์ และซ้ำซ้อนกัน เช่น ในหัวข้อความสำคัญและที่มาของ ปัญหา paragraph แรกของหน้าที่ 1 และ 2 ควรแก้ไขให้ถูกต้อง 3. ไม่มีข้อมูลรายงานเกี่ยวกับการวางแผนการทดลองในแต่ละหัวข้อการทดลอง ไม่ระบุจำนวนซ้ำของกรรมวิธี จึงทำให้การรายงานผล ไม่ค่อยสมบูรณ์ 4. บทคัดย่อไม่ควรมีเอกสารอ้างอิง และการเขียนหน่วยนับไม่เหมือนกัน (ภาษาไทย หรือภาษาอังกฤษ ตัวย่อ หรือเขียนเต็ม) ทำให้ดู สับสน รูปแบบการเขียนเอกสารอ้างอิงในท้ายเล่ม และการอ้างอิงในเนื้อเรื่องไม่ถูกต้อง ควรตรวจสอบและแก้ไข 5. เนื่องจากหลายการทดลองไม่มีการรายงานการวางแผนทางสถิติ ทำให้ไม่แน่ใจว่าผลการทดลองที่แสดงมีความแม่นยำหรือไม่ เพราะ ผลการทดลองที่แม่นยำควรจะเป็นผลจากการทำการทดลองหลายซ้ำ และมีความน่าเชื่อถือทางสถิติ เช่น การทดลองเกี่ยวกับ อุณหภูมิ และ pH ที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์	ตาม คำแนะนำ ของ ผู้ทรงคุณวุฒิ 2. ชื่อ แผนงาน ถูกต้องครบ แต่ไม่ตรงกับ สัญญา 3.ได้ ตรวจสอบ และแก้ไข ตาม คำแนะนำ ของ ผู้ทรงคุณวุฒิ

ข้อคิดเห็น/ข้อเสนอแนะของผู้ทรงคุณวุฒิ	ตอบข้อคิดเห็น ของผู้ทรงคุณวุฒิ โดยนักวิจัย
6. ควรเพิ่มกราฟในเรื่องการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยเพิ่มกราฟแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ภายใต้สภาวะการให้อากาศ 1.0 vvm และอัตราการกวน 350 รอบต่อนาที 7. ผลการทดลองในข้อ 4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ อธิบายว่าผลการทดลองที่ 23 : $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (X_7) เท่ากับ 0.12 กรัมต่อลิตร ซึ่งค่าของ $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ที่แสดงในตารางที่ 8 อยู่ที่ code level ระดับ 0 แต่ผลที่แสดงในตารางที่ 9 ของการทดลองที่ 23 ค่า $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ก็ควรจะเป็น 0 ไม่ใช่ -2 ควรตรวจสอบและแก้ไขให้ถูกต้อง 8. ควรเพิ่มเติมรายละเอียดในขั้นตอนการดำเนินงานข้อ 8.6 การศึกษาผลของสารเคมี ควรระบุว่าใช้สารเคมีอะไร ปริมาณเท่าใด เป็นสัดส่วนเท่าใดกับปริมาณเอนไซม์ 9. การศึกษาการผลิตเอนไซม์ในถังหมักแบบเปิด ขนาดของถังหมักในขั้นตอนการดำเนินงานและผลการทดลองไม่เท่ากัน ควรตรวจสอบความถูกต้อง 10. ควรแสดงการคำนวณต้นทุนการผลิตเอนไซม์ โดยใช้ทางนํ้ายางเป็นวัตถุดิบในการเลี้ยงจุลินทรีย์ 11. ควรมีการสรุปผลการวิจัยที่สามารถนำไปขยายผล หรือใช้ได้จริง โดยเขียนเป็นแผนผังว่าใช้อะไร ปริมาณเท่าไร (basal medium) ในทางนํ้ายางปริมาณเท่าใด (สัดส่วนที่ชัดเจน) ระยะเวลาการกวน pH ที่เหมาะสม อุณหภูมิ และผลผลิตที่ได้จากสูตรนี้จะได้ประมาณเท่าใด ควรเขียนให้ชัดเจน เพื่อนำไปใช้ได้ในระดับอุตสาหกรรม 12. ควรตรวจสอบการเขียนชื่อวิทยาศาสตร์ของแบคทีเรีย เช่น B. licheniformis KU-K2 ควรเป็น B.licheniformis(KU-K2) (ควรใส่วงเล็บเพื่อแสดงว่าเป็นไอโซเลทที่คัดเลือกมาใช้) 13. ควรตรวจสอบความถูกต้องของค่าที่เขียน ตัวสะกด และลำดับข้อในการดำเนินงาน และผลการทดลองให้สอดคล้องกัน โครงการย่อยที่ 2: การใช้ประโยชน์จากทางนํ้ายาง เพื่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแลกไทด์จากเชื้อแอคติโนมัยซีท โดยใช้	5.ได้ ตรวจสอบ และแก้ไข ตาม คำแนะนำ ของ ผู้ทรงคุณวุฒิ 1 และ 2 ได้ เพิ่มการ สรุปผลการ นำทางนํ้ายาง มาใช้ ประโยชน์

ข้อคิดเห็น/ข้อเสนอแนะของผู้ทรงคุณวุฒิ	ตอบข้อคิดเห็น ของผู้ทรงคุณวุฒิ โดยนักวิจัย
กระบวนการหมักแบบเปิด <u>ผู้ทรงคุณวุฒิท่านที่ 1</u> 1. ควรปรับปรุงบทคัดย่อ โดยลดคำนำให้สั้นกระชับ แสดงถึงเหตุผลที่ทำงานวิจัยชิ้นนี้ และควรระบุที่ใช้หางน้ำย่างกี่เปอร์เซ็นต์ในการศึกษา เนื่องจากเป็นวัตถุประสงค์หลักของการวิจัย 2. คำบรรยายตารางและกราฟควรเขียนให้ชัดเจน โดยเฉพาะ ข้อ 4.3 สูตร medium ยังไม่ชัดเจน ควรระบุที่ใช้หางน้ำย่างกี่เปอร์เซ็นต์ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ 3. ในส่วนของการสรุป ควรมีข้อมูลเสนอแนะว่าการดำเนินการต่อไปควรจะทำอย่างไรในการนำผลงานวิจัยนี้มาใช้ประโยชน์ หรือศึกษาเพิ่มเติมต่อยอดต่อไป 4. ยังขาดข้อมูลความชัดเจนเรื่องสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ยังสร้างความสับสน อาจด้วยการพิมพ์บกพร่อง ทำให้ไม่ตรงกัน 5. ควรมีการศึกษาสัดส่วนของหางน้ำย่างว่าที่ปริมาณใดเหมาะสมกับการใช้ผลิตเอนไซม์ 6. ควรคิดต้นทุนการผลิต และมูลค่าของเอนไซม์ที่ผลิตได้ 7. ควรมีวิธีการนำเอนไซม์มาใช้ประโยชน์ โดยการทำให้บริสุทธิ์ และวิธีการผลิตหัวเชื้อเพื่อผลิตปุ๋ยหมัก โดยอาจผสมเชื้อแบคทีเรียจากโครงการย่อยที่ 1 เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิต <u>ผู้ทรงคุณวุฒิท่านที่ 2</u> 1. ควรตรวจสอบความครบถ้วนตามข้อเสนอโครงการ โดยในส่วนของ output ของข้อเสนอโครงการ ที่ระบุว่าเพื่อใช้ในการนำขยะที่เป็นพลาสติกจำพวกพอลิแลกไทด์มาใช้ใหม่ (recycle) แต่ในผลการทดลองของโครงการไม่ได้กล่าวถึง หรือแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ที่ผลิตได้ว่ามีประสิทธิภาพในการย่อยสลายพอลิแลกไทด์อย่างไร และในข้อ 4.6 ของการดำเนินการวิจัย กล่าวถึงการ	เพื่อเพิ่ม มูลค่าโดย การใช้เป็น วัตถุดิบใน การผลิต เอนไซม์ รวมถึงคิด ต้นทุนการ ผลิตเอนไซม์ ต่อลิตรระดับ ห้องปฏิบัติการ เพื่อเป็น ข้อมูลในเชิง พาณิชย์ สำหรับนำไป ประยุกต์ใช้ โดยได้ใส่ไว้ ทั้งใน บทคัดย่อ และสรุปผล

ข้อคิดเห็น/ข้อเสนอแนะของผู้ทรงคุณวุฒิ	ตอบข้อคิดเห็น ของผู้ทรงคุณวุฒิ โดยนักวิจัย
วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ แต่ไม่มีผลการวิจัยแสดงให้เห็น 2. ควรตรวจสอบความสำคัญและที่มาของปัญหา เนื่องจากไม่ชัดเจน ช้ำซ้อน เอกสารอ้างอิงในเนื้อเรื่องและท้ายเล่มไม่ตรงกัน ผลการทดลองไม่สอดคล้องกับวิธีดำเนินการ 3. ควรเพิ่มเติมข้อมูลเปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่นๆ ที่มีการทำมาแล้วว่าผลใกล้เคียง หรือต่างจากผลการวิจัยนี้อย่างไร 4. ควรตรวจสอบความถูกต้องของการรายงานผล เช่น คำบรรยายได้ภาพที่ 6 เนื้อหาไม่ตรงกับภาพ ผลการทดลองไม่ตรงกับวิธีการดำเนินการวิจัย เนื้อหาที่รายงานไม่ตรงกับกราฟที่แสดงในภาพที่ 4 และกราฟแสดงผลอุณหภูมิเป็นเวลา 7 วัน แต่บรรยายได้ภาพเป็น 4 วัน ควรตรวจสอบและแก้ไขให้ถูกต้อง เพื่อให้เกิดความน่าเชื่อถือ 5. ควรเขียนอธิบายเพิ่มเติมวิธีการคำนวณกิจกรรมเอนไซม์ในข้อ 4.6 (การดำเนินงาน) และเพิ่มตารางผลของเอนไซม์ที่ผลิตได้ในการย่อยสลายพอลิแลกไทด์ 6. ควรสรุปผลการวิจัยให้ชัดเจนว่าต้องใช้สภาวะแบบไหนจึงได้เอนไซม์ปริมาณสูง 7. ควรแสดงการคำนวณต้นทุนการผลิตเปรียบเทียบกับราคาที่นำเข้า หรือที่มีการผลิตจำหน่ายในไทย เนื่องจากมีการใช้ basal medium ผสมในทางน้ำยางที่แยกสกิม 8. ควรแสดงผลการทดลองของอัตราการให้อากาศต่อการผลิตเอนไซม์ให้ตรงกับที่ระบุในขั้นตอนการดำเนินงาน คือ อัตรา 0.2, 0.5, 0.75 และ 1 VVM เพราะในผลการทดลองกล่าวถึงแต่ผลที่อัตราการไหล 0.5 VVM เพียงอัตราเดียว	3. ได้ใส่เพิ่มข้อมูลปริมาณทางน้ำยางที่ใช้ในสูตรอาหารว่าใช้ปริมาณเท่าใดทั้งในผลการ optimized และสรุปผลครับโดยใช้อัตราส่วน 1:1 4. ทั้งในบทคัดย่อและสรุปผลได้เพิ่มผลการ

ข้อคิดเห็น/ข้อเสนอแนะของผู้ทรงคุณวุฒิ	ตอบข้อคิดเห็น ของผู้ทรงคุณวุฒิ โดยนักวิจัย
	ดำเนินงานให้ สอดคล้องกับ วัตถุประสงค์ แล้วครับ ทั้ง การแสดงให้เห็น ถึงการใช้อย่าง ประโยชน์ จากทางน้ำ และการ คัดแยกเชื้อ bacillus ที่มี ความสามารถ ในการผลิต เอนไซม์อคา ไลโนโปรติเอส 5. ได้เพิ่ม สารเคมีลงใน วิธีการทดลอง แล้วคะ 6. ได้เพิ่มลง

ข้อคิดเห็น/ข้อเสนอแนะของผู้ทรงคุณวุฒิ	ตอบข้อคิดเห็น ของผู้ทรงคุณวุฒิ โดยนักวิจัย
	ในรายงาน แล้วคะ เพิ่ม ข้อมูล เสนอแนะ แนวทางการ พัฒนาเพื่อ นำไปใช้ ประโยชน์ทั้ง ในระดับการ ผลิตระดับ อุตสาหกรรม และการผลิต ระดับชุมชนที่ อาจจะใช้ ประโยชน์ใน รูปของหัว เชื้อปุ๋ยหมัก หรือการผลิต เอนไซม์ หยาบเพื่อ

ข้อคิดเห็น/ข้อเสนอแนะของผู้ทรงคุณวุฒิ	ตอบข้อคิดเห็น ของผู้ทรงคุณวุฒิ โดยนักวิจัย
	ย่อยโปรตีน ในน้ำยาง ครับ 1. ไม่มีการ ทดลอง แบบต่อเนื่อง และได้ตัดคำ ว่าต่อเนื่อง ออกให้เหลือ แค่การหมัก แบบเปิด เท่านั้น ทั้งนี้ เนื่องจากน้ำ ทิ้งที่ได้ไม่ได้ เกิดขึ้นใน สภาพจริงไม่ ได้เกิดขึ้น อย่างต่อเนื่อง ต้องมีการพัก เพื่อให้ ส่วนที่

ข้อคิดเห็น/ข้อเสนอแนะของผู้ทรงคุณวุฒิ	ตอบข้อคิดเห็น ของผู้ทรงคุณวุฒิ โดยนักวิจัย
	ยางตะกอน ก่อน 2. แก้ไข เรียบร้อยแล้ว ครับ 3 และ 5. ทำ การทดลอง 3 ซ้ำ โดยข้อมูลที่ ได้เป็นค่าเฉลี่ย จากการทำการ ทดลอง 3 ซ้ำโดย การนำค่าที่ ใกล้เคียงมาเฉลี่ย กัน โดยข้อมูลที่

ข้อคิดเห็น/ข้อเสนอแนะของผู้ทรงคุณวุฒิ	ตอบข้อคิดเห็น ของผู้ทรงคุณวุฒิ โดยนักวิจัย
	ได้สามารถเป็น ตัวแทนการ ทดลองได้ ข้อมูล ทางจุลชีววิทยา จำนวนซ้ำ 3 ซ้ำ ก็ถือว่าเป็น ตัวแทนการ ทดลองได้ ใน ส่วนคุณลักษณะ ของเอนไซม์ถือ ว่าเป็นข้อมูลที่ น่าเชื่อถือได้ เมื่อ พิจารณาจาก การ reviews วารสาร จะมีค่า ใกล้เคียงกันและ ไปในทาง เดียวกัน ข้อ 4 แก้ไขตาม ข้อเสนอของผู้

ข้อคิดเห็น/ข้อเสนอแนะของผู้ทรงคุณวุฒิ	ตอบข้อคิดเห็น ของผู้ทรงคุณวุฒิ โดยนักวิจัย
	ทรงวุฒิ 6. ได้เพิ่มกราฟในเรื่องการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยเพิ่มกราฟแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ภายใต้สภาวะการให้อากาศ 1.0 vvm และอัตราการกวน 350 รอบต่อนาที 7. ได้แก้ไขแล้ว

ข้อคิดเห็น/ข้อเสนอแนะของผู้ทรงคุณวุฒิ	ตอบข้อคิดเห็น ของผู้ทรงคุณวุฒิ โดยนักวิจัย
	ครับ โดยค่าของ $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ที่แสดงในตารางที่ 8 อยู่ที่ code level ระดับ -2 ทำให้ $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (X_7) เท่ากับ 0 กรัมต่อลิตร 8. ได้เพิ่มสารเคมีและขั้นตอนลงในวิธีการทดลองแล้วค่ะ 9.แก้ไขแล้วครับ

ข้อคิดเห็น/ข้อเสนอแนะของผู้ทรงคุณวุฒิ	ตอบข้อคิดเห็น ของผู้ทรงคุณวุฒิ โดยนักวิจัย
	10. ได้เพิ่ม ตารางคำนวณ ต้นทุนการผลิต เอนไซม์จาก วัตถุดิบทั้งหมดลง ในผลการ ดำเนินงานแล้ว ครับ 11. แก้ไขตาม คำแนะนำของ ผู้ทรงคุณวุฒิ 12. ได้ตรวจสอบ และแก้ไขตาม คำแนะนำของ

ข้อคิดเห็น/ข้อเสนอแนะของผู้ทรงคุณวุฒิ	ตอบข้อคิดเห็น ของผู้ทรงคุณวุฒิ โดยนักวิจัย
	ผู้ทรงคุณวุฒิ 1.ได้ทำการ แก้ไข บทความเพื่อให้ สั้นและ กระชับลง 2.สูตร medium

ข้อคิดเห็น/ข้อเสนอแนะของผู้ทรงคุณวุฒิ	ตอบข้อคิดเห็น ของผู้ทรงคุณวุฒิ โดยนักวิจัย
	ครบถ้วนแล้ว และใช้หางน้ำ ยางเป็นหลัก คือ 50 ml แล้วเติม ส่วนประกอบ อื่นๆลงไป 3. ได้เพิ่มเติม ในหัวข้อ สรุปผลการ ทดลอง 4.ตรวจสอบ และ ดำเนินการ แก้ไข 5. เนื่องจาก ใช้หางน้ำยาง

ข้อคิดเห็น/ข้อเสนอแนะของผู้ทรงคุณวุฒิ	ตอบข้อคิดเห็น ของผู้ทรงคุณวุฒิ โดยนักวิจัย
	100% จึง ไม่ได้ ทำการศึกษา สัดส่วนของ ทางน้ำยางที่ ใช้ - - 1.กิจกรรม ของเอนไซม์ แสดงไว้ในทุก การทดลอง ในหน่วย U/ml หรือ หน่วยต่อ มิลลิลิตร

ข้อคิดเห็น/ข้อเสนอแนะของผู้ทรงคุณวุฒิ	ตอบข้อคิดเห็น ของผู้ทรงคุณวุฒิ โดยนักวิจัย
	จากหัวข้อ 4.6 กล่าว วิธีการ วิเคราะห์ กิจกรรมของ เอนไซม์ โดยรวมซึ่ง ขั้นตอนนี้ นำไปใช้ใน การทดลอง อื่นๆก่อน หน้า ซึ่ง แสดงผลเป็น กราฟ 2.ตรวจสอบ ตามข้อเสนอ

ข้อคิดเห็น/ข้อเสนอแนะของผู้ทรงคุณวุฒิ	ตอบข้อคิดเห็น ของผู้ทรงคุณวุฒิ โดยนักวิจัย
	5. เพิ่มวิธีการ คำนวณ กิจกรรมของ เอนไซม์ลงใน หัวข้อ 4.6 6. แก้ไขตาม ข้อเสนอ 7. เนื่องจาก

ข้อคิดเห็น/ข้อเสนอแนะของผู้ทรงคุณวุฒิ	ตอบข้อคิดเห็น ของผู้ทรงคุณวุฒิ โดยนักวิจัย
	เอนไซม์ชนิด นี้ไม่มี จำหน่ายใน ท้องตลาด ดังนั้นจึงไม่ สามารถ เปรียบเทียบ ราคาได้ 8.เพิ่มเติมผล การทดลอง ลงในเนื้อหา