บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

ปัจจุบันขยะที่เป็นพลาสติกซึ่งผลิตจากกระบวนการปิโตรเคมีเป็นปัญหาหนึ่งที่มีความสำคัญ เนื่องจากการกำจัดด้วยวิธีการต่างๆ เช่น การเผา หรือการปล่อยทิ้งตามพื้นดิน ล้วนก่อให้เกิดปัญหาทางสิ่งแวดล้อม เช่น การเกิดภาวะโลกร้อน เป็นต้น โดยพลาสติกเหล่านี้ไม่สามารถย่อยสลายได้ภายในเวลาอันรวดเร็ว ดังนั้น จึงได้มีการคิดค้นพลาสติกชนิดใหม่ขึ้นที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพและผลิตจากกระบวนการทางชีวภาพ เช่น poly-L-lactide (PLLA), poly-β-hydroxybutyrate (PHB) และ polycaprolactone (PCL) เป็นต้น สำหรับปริมาณการใช้และแนวโน้มการเติบโตของพลาสติกชีวภาพในประเทศไทยนับว่ามีทิศทางที่ดี โดยในปี 2557 แนวโน้มของอุตสาหกรรมพลาสติกชีวภาพเพิ่มจาก 1.7 ล้านตัน ไปเป็น 7.8 ล้านตัน ในปี 2562 เพราะแค่อุตสาหกรรมบรรจุภัณฑ์อย่างเดียวใช้พลาสติกชนิดนี้ถึง 70 เปอร์เซ็นต์ หรือ 1.2 ล้านตันในปี 2557 และคาดว่าจะใช้เพิ่มขึ้นเป็น 6.5 ล้านตัน ในปี 2562 (ไทยรัฐ, 2561) โดยปัจจุบันได้เริ่มมีการนำมาใช้กันมากขึ้นและมีการศึกษาเพื่อที่จะลดต้นทุนในการผลิตให้ถูกลง

Poly(L-lactide) หรือ PLLA เป็นพอลิเอสเทอร์สายตรง มีหน่วยย่อยเป็น L-lactic acid ซึ่งสามารถผลิตจากกระบวนการหมักผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร เช่น มันสำปะหลัง ข้าว ข้าวโพด แป้ง (Miura et al., 2004) โดยใช้กระบวนการหมักจากเชื้อจุลินทรีย์ พลาสติกชนิดนี้มีรายงานว่าถูกย่อยสลายได้ด้วยเชื้อจุลินทรีย์หลากหลายชนิด ได้แก่ *Bacillus brevis*, *B. stearothermophilus, B. licheniformis, Geobacillus thermocatenulatus, Micromonospora echinospora, M. viridifaciens, Nonomureae terrinata, N. fastidiosa, Laceyella sacchari, Thermoactinomyces vulgaris* และ *Actinomadura keratinilytica* (Tomita et al., 1999, 2003, 2004; Sukkhum et al., 2009a) สำหรับการศึกษาการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA จากจุลินทรีย์จะพบเฉพาะการผลิตด้วยการหมักแบบอาหารเหลวเท่านั้น ตัวอย่างเช่น การผลิตเอนไซม์ย่อยฟิล์ม PLLA จากแอคติโนมัยซีท *Saccharothix waywayandensis* ที่อุณหภูมิ 43 °C พีเอช 7.0 ในอาหาร mineral salt medium ที่เติม yeast extract ความเข้มข้น 0.002% (Jarerat &

Tokiwa, 2003) จากนั้น Jarerat et al., 2006 ได้รายงานว่าเมื่อใช้ silk fibroin เข้มข้น 0.1 % (W/V) เป็นสับสเตรทในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA ในอาหารเหลวโดยแอคติโนมัยสีท *Amycolatopsis orientalis* พบว่าการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA จะให้ค่าปริมาณสารอินทรีย์คาร์บอนทั้งหมดเท่ากับ 600 mg/L และเมื่อขยายขนาดการผลิตในถังหมักขนาด 5 ลิตรพบว่า เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA จะให้ค่าปริมาณสารอินทรีย์คาร์บอนทั้งหมดเท่ากับ 550 mg/L หลังจากทำการเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน แสดงว่าการเพิ่มขนาดการเพาะเลี้ยงก็ไม่ได้ทำให้การการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA เพิ่มขึ้นมากนัก คณะวิจัยของเราได้คัดแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทชอบร้อน *Actinomadura keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA ได้สูง พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในระดับฟลาสก์จะสามารถผลิตเอนไซม์ได้ 44.6 U/mL โดยใช้เจลาติน (0.24 %, w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน และใช้ PLLA (0.035%) เป็นสับเสตรตแต่เมื่อเพาะเลี้ยงในระดับถังหมักแบบอากาศลอยตัวขนาด 3 ลิตรสามารถผลิตเอนไซม์ได้ 150 U/mL (Sukkhum et al., 2009b) และในปี 2012 คณะวิจัยของเราได้ทำการศึกษาวิจัยแบคทีเรียชนิดนี้ต่อเกี่ยวกับปัจจัยทางกายภาพที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA ในระดับถังหมัก พบว่าแบคทีเรียนี้สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงที่สุด คือ 257 U/mL และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 3 ลิตร ที่อุณหภูมิ 46 °C อัตราการให้อากาศเท่ากับ 0.43 vvm และควบคุมค่าพีเอชที่ 6.8 โดยเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียชนิดนี้ พบว่า สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูง (70 °C) และจากการศึกษาเอนไซม์บริสุทธิ์ พบว่า เอนไซม์ดังกล่าวจัดเป็นเอนไซม์ชนิด serine protease (Sukkhum et al., 2009a) จากกนั้นในปี 2014 คณะวิจัยของเรายังได้คัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทชอบร้อน *Laceyella sacchari* สายพันธุ์ LP175 ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อย PLLA ได้สูงถึง 51.4 U/mL เมื่อเพาะเลี้ยงในระดับฟลาสก์โดยใช้เจลาติน (0.24 %, w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน และใช้ PLLA (0.035%) เป็นสับเสตรท เมื่อทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์และทำการศึกษาคุณลักษณะเฉพาะของเอนไซม์ชนิดนี้ พบว่า เอนไซม์ดังกล่าวจัดเป็น serine protease (Hanphakphoom et al., 2014)

สำหรับการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA ส่วนใหญ่เป็นการหมักในอาหารเหลวซึ่งมีค่าใช้จ่ายที่ค่อนข้างสูงเนื่องจากต้องใช้ระบบหล่อเย็น แต่การหมักแบบแห้งมีข้อดีคือใช้พลังงานต่ำและสามารถใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาใช้เป็นสับสเตรทได้ ทำให้ต้นทุนของการหมักแบบแห้งราคาถูก เนื่องจาสามารถลดค่าใช้จ่ายในเรื่องของสารอาหารที่ใช้ในการหมักแบบอาหารเหลวได้ โดยการเลือกใช้วัสดุ

เหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมทางการเกษตร ซึ่งมีรายงานวิจัยที่ใช้วัสดุเหลือทิ้งมาผลิตเอนไซม์และสารต่างๆ แต่ก็ยังคงมีรายงานน้อยมาก เช่น การผลิต fibrinolytic protease โดยใช้ soybean meal เป็นสับสเตรทด้วยแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* I-2 (Bajaj et al., 2014) การหมักในอาหารเหลวของรา *Aspergillus carbonarius* พบว่า สามารถสร้างเอนไซม์ protease ได้สูงสุด เมื่อใช้ 5% glucose เป็นแหล่งคาร์บอน และ 5% soybean meal เป็นแหล่งไนโตรเจน (Ire et al., 2011) นอกจากนี้ พบว่า การผลิตเอนไซม์ serine alkaline protease ได้สูงสุดจากแบคทีเรีย *Bacillus* sp. (SBP-29) ในอาหารเหลวเมื่อใช้ soybean meal (1.5%) เป็นแหล่งของไนโตรเจน (Saurabh et al., 2007) แต่การผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA แบบแห้งยังไม่มีรายงาน ดังนั้นเนื่องจากเชื้อแอคติโนมัยซีทชอบร้อน *A. keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1 มีลักษณะการเติบโตเป็นเส้นใยและสร้างสปอร์ได้ จึงทำให้เชื้อนี้น่าจะใช้วัสดุหมักได้ดีและสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA ได้ในปริมาณมากและราคาถูกกว่าที่เคยมีการผลิต ปัจจุบันเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA ยังไม่มีการผลิตขายทางการค้า ถึงแม้ว่าเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม protease และ lipase นอกจากนี้เอนไซม์ทางการค้า เช่น proteinase K ที่ผลิตจากเชื้อรา *Tritirachium album* (Williams, 1981) จะสามารถย่อยพลาสติกได้เนื่องจากพลาสติกชนิดนี้มีพันธะ ester จึงทำให้มีโครงสร้างคล้ายโปรตีน ทำให้เอนไซม์ protease สามารถย่อยได้แต่ไม่สูงมาก อย่างไรก็ตามไม่ใช่เอนไซม์ protease ทุกชนิดที่จะสามารถย่อยสลาย PLLA ได้ (Pranamuda et al., 2001, Jarerat et al., 2001, Nakamura et al., 2001) นอกจากนี้การผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA แบบแห้งจะทำให้ได้เอนไซม์ราคาถูกและยังสามารถใช้สภาวะที่ได้จากการหมักนี้มาผลิตเป็นหัวเชื้อเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ย่อยขยะพลาสติกที่มีส่วนผสมของ PLLA ได้ เพื่อช่วยลดระยะเวลาในการย่อยสลายและนำขยะพลาสติกที่ย่อยสลายได้มาใช้ผลิตปุ๋ยหมักเพื่อช่วยเพิ่มธาตุอาหารให้กับต้นพืชได้ จึงเป็นวิธีการหนึ่งที่จะช่วยลดปัญหา และเป็นแนวทางในการนำไปพัฒนาในอุตสาหกรรมการผลิตปุ๋ยหมักได้ต่อไป

ดังนั้นในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ จึงมุ่งเน้นที่เลือกใช้การหมักแบบแห้งโดยใช้วัสดุทางการเกษตรเป็นแหล่งของสารอาหารและเป็นตัวยึดเกาะให้กับ *A. keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1 เพื่อเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะใช้ในการผลิตเอนไซม์ย่อย PLLA ที่มีราคาถูก และศึกษาสภาวะและองค์ประกอบของสารอาหารที่เหมาะสมต่อการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA รวมทั้งขยายขนาดของการหมักแบบแห้งในระดับห้องปฏิบัติการขนาด 600 กรัม

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. คัดเลือกวัสดุหมักที่เหมาะสมในการเติบโตและผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA จาก *Actinomadura keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1 โดยการหมักแบบแห้งในระดับฟลาสก์ตามแผนการทดลองทางสถิติแบบผสม (mixture design)

2. ศึกษาปัจจัยทางกายภาพและปริมาณ PLLA ที่เหมาะสมในการเติบโตและผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA จาก *Actinomadura keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1 โดยการหมักแบบแห้งในระดับฟลาสก์

3. ศึกษาการขยายขนาดการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA จาก *Actinomadura keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1 ด้วยการหมักแบบแห้งในระดับถาด 1 kg

1.3 ขอบเขตการวิจัย

1. คัดเลือกวัสดุหมักที่เหมาะสมในการเติบโตและผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA จากวัสดุทางการเกษตรที่มีต้นทุนต่ำและมีศักยภาพสำหรับการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA ใช้แผนการทดลองทางสถิติแบบผสม (mixture design)

2. ศึกษาปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการเติบโตและผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA ด้วยการหมักแบบแห้งในระดับฟลาสก์โดยใช้การออกแบบการทดลองแบบ one factor at a time

3. ศึกษาการขยายขนาดการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA ด้วยการหมักแบบแห้งในระดับถาด 1 kg

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้สภาวะที่เหมาะสมในการเติบโตและผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA ด้วยการหมักแบบแห้ง

2. ได้ต้นแบบการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA ด้วยการหมักแบบแห้งในระดับอุตสาหกรรม

3. ได้ปริมาณเอนไซม์ย่อยสลาย PLLA ปริมาณมากขึ้น และเป็นการเพิ่มมูลค่าของวัสดุทางการเกษตร