

บทที่ 2

แนวคิด ทฤษฎี เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ปัจจุบันขยะที่เป็นพลาสติกเป็นปัญหาหนึ่งที่มีความสำคัญเนื่องจากการกำจัดด้วยวิธีการต่างๆ เช่น การเผา หรือการปล่อยทิ้งตามพื้นดินต่างๆ ล้วนก่อให้เกิดปัญหาทางสิ่งแวดล้อม เช่น การเกิดภาวะโลกร้อน เป็นต้น โดยพลาสติกเหล่านี้ไม่สามารถย่อยสลายได้ภายในเวลาอันรวดเร็ว ดังนั้นจึงได้มีการคิดค้นพลาสติกชนิดใหม่ขึ้นซึ่งเป็นพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพรวมทั้งผลิตจากกระบวนการทางชีวภาพ เช่น poly-L-lactide (PLA), poly- β -hydroxybutyrate (PHB) และ polycaprolactone (PCL) เป็นต้น โดยปัจจุบันได้เริ่มมีการนำมาใช้กันมากขึ้น และมีการศึกษาเพื่อที่จะลดต้นทุนในการผลิตให้ถูกลง

ดังนั้นเมื่อมีความสนใจในการนำพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพเหล่านี้มาใช้ในปริมาณมากขึ้น จึงต้องคำนึงถึงวิธีการในการกำจัดด้วยวิธีต่างๆ วิธีการทางชีวภาพ จึงเป็นวิธีการหนึ่งที่น่าสนใจ เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม เช่น การนำเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพมาทำการย่อยสลาย โดยในปัจจุบันได้มีนักวิจัยชาวต่างชาติสนใจที่จะนำเอนไซม์ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพโดยเฉพาะอย่างยิ่ง PLA ผสมลงในฟิล์มพลาสติกในการเกษตรเพื่อให้เกิดการย่อยสลายได้เองหลังการใช้ รวมทั้งมีความสนใจในการนำเอนไซม์ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพมาทำการ recycle พลาสติกเหล่านี้ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าเอนไซม์ย่อยสลาย PLA จึงเป็นเอนไซม์ที่น่าสนใจในการผลิตให้ได้ปริมาณมากขึ้นเพื่อตอบสนองต่อการประยุกต์ใช้งานในอนาคตอันใกล้

Poly (L-lactide) หรือ PLA เป็นพอลิเอสเทอร์สายตรง มีหน่วยย่อยเป็น L-lactic acid ซึ่งสามารถผลิตจากกระบวนการหมักผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร เช่น มันสำปะหลัง ข้าว ข้าวโพด แป้ง (Miura et al., 2004) โดยใช้กระบวนการหมักจากเชื้อจุลินทรีย์

2.1 จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลาย PLA ได้ (PLA biodegrading microorganisms)

จุลินทรีย์ถือเป็นปัจจัยหลักในกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพ โดยจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลาย PLA ได้แสดงดังตาราง 2 การศึกษาเกี่ยวกับจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลาย PLA ได้เริ่มในปี ค.ศ. 1981 โดย Williams เป็นนักวิทยาศาสตร์คนแรกที่รายงานการย่อยสลาย PLA โดยใช้เอนไซม์

โปรตีนเนสเค (proteinase K) ซึ่งเป็นเอนไซม์เซอรินโปรติเอส (serine protease) ที่แยกได้จากราสกุล *Tritirachium album* (Williams., 1981) ต่อมาในปี ค.ศ. 1997 Pranamuda et al. รายงานว่า *Amycolatopsis* sp. สายพันธุ์ HT-32 เป็นแอคติโนมัยสีทชนิดแรกที่สามารถย่อยสลาย PLA ได้โดยสามารถสร้างบริเวณใสบนจานเลี้ยงเชื้อที่มี PLA ได้ และพบว่าเอนไซม์ที่ได้มีลักษณะคล้ายกับเอนไซม์โปรตีนเนส โดยแอคติโนมัยสีทนี้สามารถย่อยสลายฟิล์ม PLA ได้ 60 มิลลิกรัมหลังการบ่มในอาหารเหลวเป็นเวลา 14 วัน (Pranamuda et al., 1997) นอกจากนี้แอคติโนมัยสีทสายพันธุ์นี้ยังพบว่า *Amycolatopsis* sp. สายพันธุ์ 15 สามารถสร้างบริเวณใสบนอาหารที่ประกอบด้วย PLA ได้เช่นกัน แสดงให้เห็นว่าแอคติโนมัยสีทที่สามารถย่อยสลาย PLA กระจายตัวอยู่ในสกุลดังกล่าวในการศึกษา ต่อมาได้รายงานว่ แอคติโนมัยสีทที่สามารถย่อยสลาย PLA ได้นั้นจะเป็นแอคติโนมัยสีทในสกุล *Amycolatopsis* (Ikura; & Kudo., 1999; Nakamura; et al., 2001; Tokiwa & Jarerat., 2003) ในปี ค.ศ. 1999 Ikura และ Kudo ได้แยก *Amycolatopsis* สายพันธุ์ 3118 จากดิน น้ำจากบ่อและแม่น้ำโดยพบว่า มีการย่อยสลายฟิล์ม PLA อย่างสมบูรณ์ด้วยจุลินทรีย์สายพันธุ์นี้ภายใน 2 สัปดาห์ (Ikura & Kudo, 1999) ในปี ค.ศ. 1999 Tokiwa et al. ได้แยก *Amycolatopsis* sp. สายพันธุ์ KT-s-9 ซึ่งสามารถย่อยเส้นใยไหม และ PLA ได้ในปีเดียวกัน Tomita et al. ได้รายงานถึงแบคทีเรียทนร้อนชนิด *Brevibacillus* sp. ซึ่งสามารถย่อยฟิล์ม L-PLA ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยแยกได้จากดิน (Tomita et al., 1999) ต่อมา ในปี ค.ศ. 2001 Nakamura et al. ได้แยก *Amycolatopsis* sp. สายพันธุ์ K10H-1 และ K104-2 ได้จากตัวอย่างดิน ซึ่งเอนไซม์นี้มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกับเอนไซม์เซอรินโปรติเอส (Nakamura et al., 2001) ในปีเดียวกัน Sakai et al. คัดแยกแบคทีเรียทนร้อนซึ่งสามารถย่อยสลาย L-PLA ได้จากกองปุ๋ยหมัก ซึ่งระบุว่าเป็น *Bacillus smithii* แบคทีเรียสายพันธุ์นี้เจริญได้ดีในอาหารที่มี L-PLA ร้อยละ 1 และน้ำหนักโมเลกุลของ L-PLA ลดลงร้อยละ 35.6 หลังจากบ่มไว้เป็นเวลา 3 วัน ในสภาวะที่มีการเขย่าที่อุณหภูมิ 60 °C (Sakai et al., 2001) หลังจากนั้น ในปี ค.ศ. 2002 Jarerat et al. ได้ศึกษาการกระจายของจุลินทรีย์ที่ย่อยสลาย PLA ในกลุ่มแอคติโนมัยสีทเป็นจำนวน 105 สายพันธุ์ โดยศึกษาลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA พบว่าสายพันธุ์ที่ย่อยสลาย PLA จัดอยู่ในวงศ์ของ Pseudonocardiaaceae และสกุลที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ *Amycolatopsis*, *Kibdelosporangium*, *Saccharothrix*, *Lentzea* และ *Streptoalloteichus* (Jarerat et al., 2002) มีการศึกษาต่อ ในปี ค.ศ. 2003 Tokiwa และ Jarerat ยืนยันว่าเชื้อแอคติโนมัยสีทในวงศ์ Pseudonocardiaaceae และสกุลที่เกี่ยวข้องมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลาย

PLA (Tokiwa & Jarerat., 2003) ในปี ค.ศ. 2004 Tomita et al. ได้คัดแยกแบคทีเรียที่เรียกชื่อชนิด *Geobacillus* sp. สายพันธุ์ 41 ที่สามารถย่อยสลาย L-PLA ได้ โดยใช้เวลา 20 วัน ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และในปีเดียวกันมีรายงานการคัดแยกจุลินทรีย์หลายกลุ่มที่สามารถย่อยสลาย PLA ได้ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จุลินทรีย์ส่วนใหญ่ จัดอยู่ในกลุ่มของวงศ์ Pseudonocardiaceae และ สกุล อื่น ๆ ได้แก่ *Amyolatopsis*, *Lentzae*, *Kibdelosporangium*, *Streptoalloteichus* และ *Saccharothrix* (Tokiwa & Jarerat., 2004) ในปีเดียวกัน Tomita et al. รายงานว่าเมื่อใช้ crude enzyme ที่ผลิตได้จาก *Geobacillus thermocatenulatus* ในการย่อยสลาย PLA ขนาดโมเลกุล 47,000 หน่วย ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 วัน (Tomita et al., 2004) ในปี ค.ศ. 2007 Kim et al. ค้นพบแบคทีเรียที่เรียกชื่อชนิดใหม่ถูกแยกได้จากปุ๋ยหมัก และระบุว่าเป็น *Bacillus licheniformis* ซึ่งไม่เพียงแต่ย่อยสลาย L-PLA ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำเท่านั้น แต่ยังสามารถย่อยสลาย L-PLA ชนิดอื่นที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงได้ที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส การย่อยสลายดังกล่าวสามารถยืนยันได้จากน้ำหนักโมเลกุล และค่าความหนืดของพอลิเมอร์ที่เปลี่ยนไป (Kim et al., 2007) ในปี ค.ศ. 2009 ได้มีรายงานว่า พลาสติกชนิดนี้สามารถถูกย่อยสลายได้ด้วยจุลินทรีย์ในสกุลอื่นได้ด้วย เช่น *Bacillus brevis*, *B. stearothermophilus*, *B. Licheniformis*, *N. fastidiosa*, *Geobacillus thermocatenulatus*, *Laceyella sacchari*, *Micromonospora echinospor*, *M. Viridifaciens*, *Nonomureae terrinata* และ *Thermoactinomyces vulgaris* (Tomita et al., 1999; 2003; 2004) ในปีเดียวกัน Sukkhum et al. ได้ค้นพบ แอคติโนมัยซีทชอบร้อนในสกุล *Actinomadura keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1 ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLA ได้สูง โดยในระดับฟอสฟอรัส สามารถผลิตเอนไซม์ได้ 44.6 U/ml ในขณะที่ในระดับถังหมักแบบอากาศลอยตัว ผลิตเอนไซม์ได้ถึง 150 U/ml (Sukkhum et al., 2009a; Sukkhum; et al., 2009b) ในปี ค.ศ. 2012 Maytiya et al. ศึกษาการย่อยสลาย PLA โดยใช้ *Pseudonocardia alni* สายพันธุ์ AS4.1531T โดยบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสพบว่า สามารถย่อยสลายฟิล์ม PLA ได้ และทำให้น้ำหนักลดลงมากกว่าร้อยละ 70 ภายในเวลา 20 วันโดยแอคติโนมัยซีทสายพันธุ์นี้สามารถย่อย PLA ได้ 35.8 มิลลิกรัมจากปริมาณ PLA ทั้งหมด 50 มิลลิกรัม (Maytiya et al., 2012) ต่อมาในปี ค.ศ. 2014 Hanparkphoom et al. ทำการศึกษาลักษณะของเอนไซม์ที่ย่อยสลาย PLA ที่สร้างจาก *Laceyella sacchari* สายพันธุ์ LP175 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่เรียกชื่อใหม่ พบว่าเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์ชนิดนี้เป็นเอนไซม์เซอร์อินโปรติเอส ซึ่งสามารถย่อยสลาย PLA ได้มีสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายคือ สภาวะความเป็นกรด-เบสที่

เหมาะสมอยู่ที่ pH 9 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และ มีความเสถียรของเอนไซม์ที่อุณหภูมิสูงถึง 50 องศาเซลเซียส (Hanparkhoom et al., 2014) Liang et al. (2016) พบแบคทีเรีย *Pseudomonas tamsuii* สายพันธุ์ TKU015 ที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLA ซึ่งชนิดของเอนไซม์ไม่เป็นทั้งเอนไซม์ protease และ lipase ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 2.1 ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ ชนิดของเอนไซม์ และวิธีการวัดการย่อยสลาย PLLA

Sources	Type of enzymes	Detection method for PLA degradation	References
Fungi			
<i>Tritirachium album</i> (<i>T. album</i>)	Serine protease	PLA	William (1981)
<i>Fusarium inonoliforme</i>	-	Film-weight loss; ceramic poly(lactic acid) oligomer production	Torres et al (1996)
<i>T. album</i> ATCC 22563	Protease	Film-weight loss; ceramic poly(lactic acid) oligomer production	Jarerat & Tokiwa (2001)
<i>Kibdelosporangium aridum</i>	Protease	Film-weight loss; monomer production (lactic acid)	Jarerat et al. (2003)
Actinomycete			
<i>Amycolatopsis</i> sp. HT 32	Protease	Film-weight loss; monomer production (lactic acid)	Pranamuda et al. (1997)
<i>Amycolatopsis</i> sp. strain No. 3118	Protease	Film-weight loss; monomer production (lactic acid)	Ikura & Kudo (1999)
<i>Amycolatopsis</i> sp. strain 41	Protease	Film-weight loss; monomer production (lactic acid)	Pranamuda et al. (2001)
<i>Amycolatopsis</i> sp. strain K104-1	Protease	Turbidity method	Nakamura et al. (2001)
<i>Saccharothrix waywayandensis</i>	Protease	Film-weight loss; monomer production (lactic acid)	Jarerat & Tokiwa (2003)
<i>Actinomadura keratinilytica</i> strain T16-1	Serine protease	Clear zone method	Sukkhum et al. (2009)
Bacteria			
<i>Bacillus brevis</i> strain 93 (<i>thermophilic microorganism</i>)	Alkaline protease	Film-weight loss; monomer production (lactic acid) and viscosity	Tomita et al. (1999)

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

Sources	Type of enzymes	Detection method for PLA degradation	References
<i>Bacillus smithii</i> strain PL 21 (<i>thermophilic microorganisms</i>)	Lipase (Esterase)	Change in molecular weight	Sakai et al. (2001)
<i>Panibacillus amylolyticus</i> strain TB-13	Lipase	Turbidity method	Akutsu-Shigeno et al. (2003)
<i>Geobacillus thermocatenulatus</i>	Esterase	Change in molecular weight and viscosity	Tomita et al. (2004)
<i>Bacillus clausii</i> pLA-M4	Lipase	Molecular technique	Mayumi et al., (2008)
<i>Bacillus cereus</i> pLA-M7	Lipase	Molecular technique	Mayumi et al., (2008)
<i>Treponema denticola</i> pLA-M9	Hydrolase	Molecular technique	Mayumi et al., (2008)
<i>Paecilomyces</i> sp.	-	Molecular technique	Sangwan & Wu, (2008)
<i>Thermomonospora</i> sp.	-	Molecular technique	Sangwan & Wu, (2008)
<i>Pseudonocardia alni</i> AS4.1531T	-	Turbidity method	Maytiya et al., (2012)
<i>Laceyella sacchari</i> LP175	Protease	Turbidity method	Hanparkphoom et al., (2014)
<i>B. licheniformis</i>	Esterase	Turbidity method	Prema & Palempalli (2015)
<i>Pseudomonas</i> TKU015	No protease and lipase	Turbidity method	Liang et al., (2016)
Yeast			
<i>Cryptococcus</i> sp. strain S-2	Lipase (Cutinase)	Turbidity method	Masaki et al. (2005)
<i>Commercial enzymes</i>			
<i>Bacillus lentus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , and <i>Bacillus licheniformis</i>	Alkaline protease	Film-weight loss; monomer production (lactic acid)	Oda et al. (2000)

2.2 เอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการย่อยสลาย PLA (PLA degrading enzyme)

การย่อยสลาย PLA เกิดจากกระบวนการไฮโดรไลซิสโดยใช้เอนไซม์ทำปฏิกิริยาซึ่งประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ ขั้นแรกเอนไซม์จะถูกดูดซึมเข้าไปในผิวของพลาสติกตรงบริเวณ surface-binding domain ขั้นตอนที่ต่อมา คือ การเกิดไฮโดรไลซิสที่ตำแหน่งของพันธะเอสเทอร์ (Tokiwa & Calabia, 2006) ทั้งนี้กลุ่มของเอนไซม์ที่มีบทบาทในกระบวนการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพที่มีรายงานนั้นมี 3 ชนิด ได้แก่

2.2.1 เอนไซม์โปรติเอส

เอนไซม์โปรติเอส เป็นเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของโปรตีนเป็นกรดอะมิโน โดยตัดที่ตำแหน่งพันธะเปปไทด์ ในปี ค.ศ.1981 มีการรายงานโดย Williams ถึงการย่อยสลาย L-PLA ด้วยเอนไซม์โปรติเนสเคซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ได้จากราสกุล *Tritirachium album* (Williams, 1981) ต่อมาในปี ค.ศ. 1994 Reeve et al. รายงานว่ากรดอะมิโน ที่ตามธรรมชาติซึ่งเป็นส่วนประกอบของโปรตีนจะมีโครงสร้างเป็นแอล-ไอโซเมอร์ ซึ่งส่งผลให้เอนไซม์โปรติเอสมีความจำเพาะกับ แอล-ไอโซเมอร์ โดยจะจับบริเวณ repeated L-lactic acid ทำให้ไม่สามารถตัดพันธะของ D-PLA ได้ เหตุผลนี้จึงทำให้สรุปได้ว่า เอนไซม์โปรติเอสสามารถย่อยสลาย PLA ที่มีลักษณะเป็น แอล-ไอโซเมอร์ได้ (Reeve et al. 1994) ในปี ค.ศ.1996 McDonald et al. ใช้เอนไซม์ชนิดนี้ในการศึกษาการย่อยสลาย L-PLA ประเภทแอลไอโซเมอร์ พบว่าเอนไซม์โปรติเอสสามารถย่อยสลายได้เพียงแอล-ไอโซเมอร์เท่านั้นทำให้เกิดกรดแลคติก (McDonald et al., 1996) ในปี ค.ศ. 2000 Oda และ คนอื่นๆ มีการศึกษาการย่อยสลาย PLA ด้วยเอนไซม์โปรติเอสที่มีขายตามท้องตลาด โดยวัดปริมาณของกรดแลคติกที่ถูกสร้างขึ้นหลังจากสิ้นสุดปฏิกิริยาด้วยการต้ม 5 นาที ซึ่งพบว่า เอนไซม์ย่อยสลาย PLA ส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่ม alkaline protease (Oda et al., 2000) ต่อมาในปี ค.ศ. 2001 Tsuji และ Ishizaka พบว่า เอนไซม์โปรติเนสเคสามารถย่อยสลาย PLA ทำให้มีขนาดเล็กลงได้ (Tsuji & Ishizaka, 2001) และ ในปี ค.ศ. 2003 Moon et al. รายงานว่าสามารถใช้เอนไซม์โปรติเนสเคย่อยสลายโคพอลิเมอร์ของฟิล์ม PLA (Moon et al., 2003) ในปี ค.ศ. 2005 Lim et al. ศึกษาเปรียบเทียบการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพระหว่างเอนไซม์ทางการค้าคือ α -chymotrypsin กับเอนไซม์ในกลุ่มเซอรินโปรติเอส ชนิดอื่นๆ คือ ทริปซิน (trypsin) อีลาสเทส (elastase) โปรติเนสเค และซับทิลิซิน (subtilisin) โดยใช้พลาสติกย่อยสลายทางชีวภาพคือ PLA

PBS PBSA PHB PCL PBS/C และ PES พบว่า เอนไซม์ทั้งหมดสามารถย่อยสลาย PLA ได้ ส่วนเอนไซม์ α -chymotrypsin สามารถย่อยสลายได้เฉพาะ PLA และ PBSA ได้ โดยเอนไซม์ α -chymotrypsin มีความจำเพาะต่อพันธะ α -ester ของ PLA ทำให้สามารถย่อยพลาสติกชีวภาพนี้ได้ (Lim et al., 2005) นอกจากนี้การย่อยสลาย PLA ในรายงานต่อมา พบว่าเป็นเอนไซม์ในกลุ่มเซอร์อินโปรติเอส (Sukkhum et al., 2009b, Hanparkhoom et al., 2014)

2.2.2 เอนไซม์ไลเปส

เอนไซม์ไลเปส เป็นเอนไซม์ที่สามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่บริเวณพันธะเอสเทอร์ในโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ที่มีสายคาร์บอนยาวมากกว่า 10 อะตอมได้เป็นโมโนกลีเซอไรด์ ไตรกลีเซอไรด์ และกรดไขมันอิสระ อย่างไรก็ตามไลเปสไม่สามารถตัดพันธะของ PLA ขนาดใหญ่ ที่เป็นแอล- และดี-พอลิแลกไทด์ในรูปผสมได้ ไลเปสไม่สามารถย่อยอะลิฟาติกพอลิเอสเทอร์ มีค่าคุณสมบัติต่างๆ เหล่านี้คือ ไม่มีคาร์บอนอะตอมที่มีหมู่เมทิลระหว่างพันธะเอสเทอร์จำนวนมาก พอลิเมอร์ที่มีรูปร่างไม่แน่นอน เช่น PHB หรือ PLA ซึ่งต่อมาพบว่าการย่อยสลาย PLA อย่างสมบูรณ์นั้นจะต้องใช้เอนไซม์เอสเทอเรสและไลเปสร่วมกัน (Sakai et al., 2001)

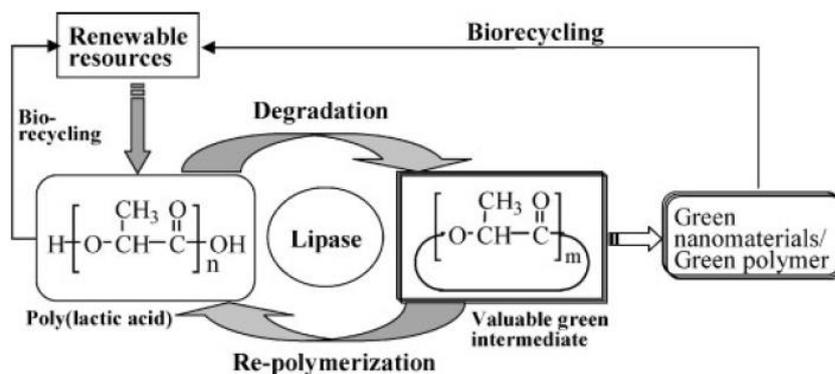
2.2.3 เอนไซม์เอสเทอเรส

เอสเทอเรส เป็นเอนไซม์ที่สามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของกรดไขมันที่มี สายคาร์บอนสั้นกว่า 10 อะตอม โดยการตัดพันธะเอสเทอร์ ในปี ค.ศ. 2004 Tezuka et al. พบว่า เอนไซม์เอสเทอเรสที่ย่อยอะลิฟาติกพอลิเอสเทอร์ สามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายสายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ *Bacillus pumilus* สายพันธุ์ KT1012 (Tezuka et al., 2004) ต่อมาในปี ค.ศ. 2008 Mayumi et al. พบว่า เอนไซม์ที่ย่อยสลาย poly (DL-lactic acid) ถูกจัดอยู่ในกลุ่มของเอนไซม์คาร์บอกซีเอสเทอเรส (carboxylesterase) (EC 3.1.1.1) ซึ่งสามารถย่อยสลายอะลิฟาติกพอลิเอสเทอร์ เช่น tributyrin *p*-nitrophenyl ester (C₂-C₁₈) PBS PBSA PCL PHB และ PLA (Mayumi et al., 2008)

2.3 การย่อยสลายและการสังเคราะห์ PLA ด้วยกระบวนการทางชีวภาพ

ในส่วนของงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายพลาสติก PLA พบว่ามีการศึกษาน้อย โดยพบว่า ในปี ค.ศ. 2006 Jarerat et al. ได้ทำการศึกษาการนำพลาสติก PLA กลับมาใช้ใหม่ด้วย

กระบวนการทางชีวภาพ โดยย่อยสลาย PLA เริ่มต้น 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้กรดแลคติก 600 มิลลิกรัมต่อลิตร (Jarerat et al., 2006) และในปี 2013 Piemonte and Gironi ได้รายงานเกี่ยวกับการสังเคราะห์พลาสติก PLA โดยกระบวนการทางเคมี โดยใช้กรดแลคติกที่ได้จากการย่อยสลาย PLA แล้วสูงถึงร้อยละ 95% (Piemonte & Gironi, 2013) พลาสติกชีวภาพชนิด PLA เมื่อผ่านกระบวนการย่อยสลายตามธรรมชาติโดย จุลินทรีย์แล้วจะได้ผลิตภัณฑ์เป็น กรดแลคติก ซึ่งกรดแลคติกสามารถนำกลับมาใช้เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการสังเคราะห์พลาสติก PLA ได้ ซึ่งการย่อยสลาย PLA อย่างไรก็ตามการศึกษาส่วนใหญ่มักใช้กระบวนการทางเคมีในการสังเคราะห์ PLA แต่การสังเคราะห์ PLA ใหม่ด้วยวิธีการทางชีวภาพนั้น ยังมีการศึกษาไม่มากนัก ในปี ค.ศ.2004 Takahashi et al. ได้ศึกษาการย่อยสลาย PLA ชนิด DL-PLA โดยใช้เอนไซม์ไลเปส ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ซึ่ง PLA จะถูกเปลี่ยนให้เป็นโพลิโกลิเมอร์ที่เป็นวงแหวนแลกไทด์ และสามารถนำกลับมาใช้ผลิต PLA ได้ เช่นเดียวกับการใช้เอนไซม์ไลเปสทางการค้าที่มีชื่อว่า lipase CA (Novozyme 435) ในการย่อยสลาย PLA ซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์โพลิโกลิเมอร์ที่เป็นวงแหวนที่สามารถนำกลับมาใช้ในการผลิต PLA ได้อีกครั้ง โดยทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 2.1) (Takahashi et al., 2004)



ภาพที่ 2.1 การนำ PLA กลับมาใช้ใหม่โดยใช้เอนไซม์ไลเปส ทั้งในกระบวนการย่อยสลาย PLA และการนำกลับมาสังเคราะห์ใหม่

ที่มา: Takahashi et al. (2004)

ในปี ค.ศ. 2008 Lassalle และ Ferreira ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการนำกรดแลคติกที่ผ่านกระบวนการย่อยสลายมาแล้วมาทำการสังเคราะห์ขึ้นใหม่เป็น PLA โดยใช้คะตะลิสต์ คือ เอนไซม์ไลเปส ในตัวทำละลายเฮกเซน จากการศึกษาพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ PLA

คือที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง โดยได้ PLA สูงถึงร้อยละ 55 (Lassalle & Ferreira, 2008) ต่อมาในปี ค.ศ. 2009 Roeb et al. ได้ศึกษาการสังเคราะห์ PLA ใหม่โดยใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นคะตะลิสต์ผ่านกระบวนการเปิดวงแหวนแลกไทด์พบสภาวะที่เหมาะสมคือ ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน โดยใช้กรดแลคติก ร้อยละ 20 โดยมีมวลต่อปริมาตร ในสภาวะที่มี ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เหลว ทั้งนี้ PLA ที่เกิดขึ้น มีมอโนเมอร์ต่อกันมากถึง 12,900 หน่วย (Roeb et al., 2009) ในปีค.ศ. 2012 Chuensangjun et al. ได้ทำการศึกษาการนำเอากรดแลคติกมาสังเคราะห์ขึ้นใหม่โดยใช้เอนไซม์ไลเปสทางการค้าเป็นคะตะลิสต์ และศึกษาคุณสมบัติของพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ได้ พบว่าปัจจัยสำคัญในการรวมตัวของกรดแลคติก คือ อุณหภูมิ ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดคือ 50 องศา-เซลเซียส โดยใช้เวลา 5 ชั่วโมง นอกจากนี้ความเข้มข้นของเอนไซม์ไลเปสก็ส่งผลต่อน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ โดยพบว่า น้ำหนักโมเลกุลเพิ่มขึ้นได้ถึงร้อยละ 70 หากเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ไลเปสจากร้อยละ 1.25 เป็นร้อยละ 5 (Chuensangjun et al., 2012)

ในปัจจุบัน กระบวนการย่อยสลายและการสังเคราะห์ PLA ขึ้นใหม่ด้วยกระบวนการทางชีวภาพถือเป็นวิธีที่ได้รับการพิจารณาว่าเป็นวิธีที่ยั่งยืนและไม่ก่อผลเสียต่อธรรมชาติ การใช้เอนไซม์ย่อยสลาย PLA เป็นกรรมวิธีทางชีวภาพที่มีประโยชน์ในการนำกลับมาใช้ใหม่สำหรับขยะพลาสติกที่มีส่วนประกอบของ PLA กระบวนการดังกล่าว จะดำเนินภายใต้สภาวะที่ไม่รุนแรงเป็นกระบวนการที่สะอาด และไม่ก่อให้เกิดผลิตภัณฑ์ข้างเคียงที่ไม่ต้องการภายหลังกระบวนการย่อยสลายเช่น สารราซิเมค (racemic) ของ PLA จากรายงานการศึกษาข้างต้นทำให้เกิดแนวคิดในการศึกษาถึงการใช่วิธีการทางชีวภาพ ซึ่งการศึกษานี้จะใช้เป็นพื้นฐานในการย่อยสลาย PLA และนำมอโนเมอร์กลับมาสังเคราะห์ใหม่โดยใช้เอนไซม์ไลเปส ซึ่งการศึกษานี้จะใช้เป็นพื้นฐานในการนำ PLA ไปใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อไป

2.4 การหมักแบบแห้ง (solid state fermentation, SSF)

หมักแบบแห้ง คือ กระบวนการหมักที่ใช้วัสดุที่เป็นของแข็งเป็นอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ เช่น การหมักมันสำปะหลังหรือเมล็ดข้าวเพื่อให้ราสร้างสารสี การหมักถั่วเหลืองเพื่อทำเต้าเจี้ยวหรือซีอิ๊ว และการผลิตเอนไซม์จากราเส้นสาย โดยการหมักแบบนี้จุลินทรีย์จะค่อยๆ ใช้วัสดุไปอย่างช้าๆ จึงใช้

เวลาในการหมักนาน นอกจากนี้การหมักแบบนี้ยังมีการใช้ในกระบวนการเทคโนโลยีชีวภาพกันอย่างกว้างขวางเพราะวัสดุหมักมีราคาถูกกว่ากระบวนการผลิตอื่นๆ ดังนั้นกระบวนการหมักแบบนี้จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยลดค่าใช้จ่ายในอุตสาหกรรมการผลิต เนื่องจากวัสดุที่ใช้ในการหมักจะเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมทางการเกษตร เช่น กากเหลือทิ้งจากการหีบน้ำมัน (Balaji & Ebenezer, 2008) นอกจากนี้การหมักแบบแห้งจะมีข้อดีมากกว่าการหมักในอาหารเหลว (submerged fermentation, SmF) คือ ลดค่าใช้จ่ายและประหยัดพลังงานเนื่องจากไม่ต้องใช้ระบบหล่อเย็น การเปรียบเทียบข้อดี-ข้อเสียของการหมักแบบแห้งกับการหมักในอาหารเหลว (Ali & Zukali, 2011) ดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 เปรียบเทียบข้อดี-ข้อเสียของการหมักแบบแห้งกับการหมักในอาหารเหลว

	การหมักแบบแห้ง	การหมักแบบเปียก
ค่าใช้จ่าย	น้อย	มาก
ผลผลิต (product yield)	สูง	ต่ำ
การปนเปื้อน (contaminate)		
เทคโนโลยี (technology)	ง่าย	ซับซ้อน
การใช้พลังงาน (energy)	ต่ำ	มาก
การผลิตของเสีย (waste production)	น้อย	มาก
การควบคุมตัวแปรให้คงที่	ยาก	ง่าย
ระยะเวลาในการผลิต (production phase)	นาน	เร็ว

ที่มา: Ali & Zukali (2011)

2.4.1 การผลิตผลิตภัณฑ์จากแอกติโนมัยซีทในกระบวนการหมักแบบแห้ง

ส่วนใหญ่จุลินทรีย์ที่เหมาะสมมากที่สุดในการหมักแบบแห้งคือรา ได้แก่ *Aspergillus niger*, *Trichoderma* spp. และ *Rhizopus* sp. ซึ่งผลผลิตที่นิยมผลิตจากกระบวนการหมักแบบแห้งได้แก่ การผลิตเอนไซม์และการผลิตยาปฏิชีวนะ (Pandey et al., 1999; Subramaniyam & Vimala, 2012) สำหรับแบคทีเรียกลุ่มแอกติโนมัยซีท *Streptomyces* sp. สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากรำข้าวสาลี (Pandey et al., 1999) การผลิตสารของแอกติโนมัยซีทแบบที่เรียกที่ใช้กระบวนการหมักแบบแห้งและแบบเปียกในการผลิตสารดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 เปรียบเทียบแอกติโนมัยซีทแบคทีเรียที่ใช้กระบวนการหมักแบบแห้งและการหมักในอาหารเหลวเพื่อผลิตสาร

Product	Actinomycetes	Substrate		Productivity		Reference
		SSF	SmF	SSF	SmF	
Enzyme						
Protease	<i>Streptomyces rimosus</i> TM-55	Sweet potato residue : Peanut meal residue (5:1)	Soluble starch	26.7 U/g	17.4 U/mL	Yang & Wang (1999)
α -Amylase	<i>S. rimosus</i> TM-55	Sweet potato residue : Peanut meal residue (100:20g)	Soluble starch	2,642. 7 U/g	691.3 U/ml	Yang & Wang (1999)
Thermophilic protease	<i>Streptomyces</i> sp. 594	Feather meal	Mineral medium and 1% (w/v) feather meal	15.5 U/g	7.2 U/g	De Azeredo et al. (2006)
Alkaline protease	<i>Thermoactinomyces</i> <i>thalpophilis</i> PE14	Wheat bran	ND	2,576 PU/g	ND	Divakar et al. (2006)
L-Asparaginase	<i>Streptomyces</i> spp.	Soybean meal	Yeast extract medium	49.23 U/ml	24.61 U/ml	Basha et al. (2009)
Thermophilic alkaline protease	<i>Streptomyces</i> sp. CN902	Wheat bran : Chopped date stones (5 :5g)	ND	220.50 U/g	ND	Lazim et al. (2009)
Keratinase	<i>S. sclerotialis</i>	Feathers waste and 3.5% starch	ND	10.3 U/มล	ND	Yadav et al. (2011)
Tetracycline	<i>Streptococcus</i> <i>viridifaciens</i>	Sweet potato residue	Cellulosic substrates	2129 μ g/g	ND	Yang & Ling (1998)

2.4.2 การตรวจสอบการสลายตัวของผลิตภัณฑ์พลาสติกที่ย่อยได้ทางชีวภาพ

การย่อยตัวได้ทางของพลาสติกที่สลายตัวได้ทางชีวภาพจะได้ CO₂ น้ำ สารประกอบอินทรีย์และสารประกอบอื่นๆที่ไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมปกติการย่อยพลาสติกในสิ่งแวดล้อมจะเกิดจากการย่อยทางกลการย่อยด้วยความร้อน เช่น แสง UV และการย่อยด้วยสารเคมีในการย่อย

พลาสติกที่เป็นภาชนะจะใช้เวลาในการย่อยนานกว่าพลาสติกที่เป็นชิ้นเล็กและมีการบดมาแล้ว (Kale et al., 2006)

ผลิตภัณฑ์ที่ทำจากพลาสติกมีมากมายหลายรูปแบบ ดังนั้นหากต้องการทราบว่าผลิตภัณฑ์นั้นทำมาจากพลาสติกที่ย่อยได้ทางชีวภาพหรือไม่นั้น จำเป็นจะต้องทดสอบคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์นั้นตามมาตรฐานการทดสอบผลิตภัณฑ์ย่อยตัวได้ทางชีวภาพ ในการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ย่อยสลายตัวได้ทางชีวภาพสามารถจัดจำแนกได้โดยการทดสอบการย่อยในสิ่งแวดล้อม เช่น ทดสอบในสารละลายทดสอบในการทำปุ๋ยหมัก และทดสอบการย่อยในดิน เป็นต้นซึ่งจะมีจุลินทรีย์ที่อยู่ในสิ่งแวดล้อมจะเป็นตัวย่อยพลาสติกชีวภาพ สำหรับ ISO 14855-1 เป็นการทดสอบการย่อยได้ทางชีวภาพในปุ๋ยหมักในระดับ pilot-scale

2.5 วัสดุหมักแบบแห้ง

2.5.1 แหน (นพพล เกตุประสาท, มปท.)

ชื่ออื่นๆ: แหนเปิด แหนเล็ก

ชื่อสามัญ: Duckweed

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Lemna minor* L.

วงศ์: LEMNACEAE

ลักษณะทั่วไป: เป็นพืชขนาดเล็กลอยน้ำ เจริญเติบโตได้ดีในน้ำนิ่ง เช่น

ห้วย หนอง คลอง บึง

การป้องกันและกำจัด: แหนเป็นวัชพืชที่มีประโยชน์มากกว่าโทษ ส่วนใหญ่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ หรือการปล่อยปลากินพืชในจำนวนที่เหมาะสมกับขนาดพื้นที่หรืออัตราการขยายพันธุ์ของแหนในพื้นที่นั้น

การแพร่ระบาด: ระบาดมากในพื้นที่น้ำนิ่งหรือไหลอย่างช้าๆ และไม่มีสัตว์กินพืช เช่น เป็ด ปลา กินพืช

ข้อมูลอื่นๆ: แหนเล็ก หรือเรียกโดยทั่วไปว่าแหนเปิดเล็ก มีโปรตีนประมาณ 20-40% โยประมาณ 4-6% และยังเป็นพืชที่นิยมนำไปตากแห้งทำเป็นปุ๋ย เป็นอาหารเลี้ยงสัตว์หรือผสมในอาหารของสัตว์ เช่น อาหารของเป็ด ห่าน ปลา ไก่ นกกระทา และสุกร เป็นต้น มีผู้

ศึกษาประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียจากฟาร์มเป็ด พบว่า ในระยะเวลา 100 วัน สามารถดูดปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (TKN) ได้สูงสุดถึง 49.10% ดังนั้น จึงนิยมนำแหนเป็ดเล็กมาใช้เป็นอาหารโปรตีนราคาถูกสำหรับเลี้ยงเป็ดเทศ

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของแหน:

ต้น: มี thallus เล็กๆ สีเขียว อยู่เดี่ยวๆ หรืออยู่ติดกันเป็นกลุ่มตั้งแต่ 1 ถึงหลาย thallus ซึ่งส่วนนี้จะทำหน้าที่เป็นใบและลำต้นพร้อมๆ กัน

ใบ: มีลักษณะเป็นรูปรี เป็นเกล็ดเล็กประมาณ 0.2 ซม. สีเขียวเป็นมัน เชื่อมติดกันเป็นกระจุก 2-3 ใบ ใต้ใบมีรากฝอยเล็กๆ

ดอก: ออกเป็นช่อเกิดอยู่ในช่องตรงขอบ thallus มีเยื่อบางล้อมรอบช่อดอกไว้ ดอกตัวผู้ 1-2 อัน แต่ละอันมีอับริณู 1-2 ช่อ ดอกตัวเมียมีเพียงรังไข่ที่ภายใน 1 ช่องและมีไข่อ่อนเพียง 1 ใบ

ผล: เป็นแบบ utricle (มีเมล็ดเดี่ยวแก่แล้วไม่แตกและมีลักษณะคล้ายถุงเล็กๆ หรือกระเปาะเล็กๆ)

เมล็ด: เป็นแบบ pericarp (ผนังเปลือกของผล ประกอบด้วยผนังผลชั้นนอก ผนังชั้นกลาง และผนังผลชั้นใน)

แหน (duckweed) อยู่ในวงศ์ Lemnaceae มีดอกขนาดเล็ก มีทั้งหมด 5 จินัส ได้แก่ Lemna, Landoltia, Spirodela, Wolffia และ Wolffiella ทั้งหมด 38 สปีชีส์ แหนมีความสำคัญในการใช้ผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ (biofuels) มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วและสามารถเก็บแปรงและโปรตีนในเซลล์ได้ ดังนั้นจึงถูกนำมาใช้ผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพโดยใช้เป็น 2 ขั้นตอนได้แก่ ขั้นตอนการสร้างมวลและขั้นตอนการสะสมแป้ง ในแหนจะพบปริมาณแป้ง 3-75% มีโปรตีน 15-45% ของน้ำหนักแห้ง ปริมาณโปรตีนของแหนจะเทียบเท่ากับระหว่าง alfalfa (20%) และ soybean (41.7%) (Bech et al. 2015) ดังตารางที่ 2.4

แหน เป็นมีปริมาณ $39.1-105.9 \text{ t ha}^{-1} \text{ year}^{-1}$ ในการใช้บำบัดสารอาหารในน้ำเสีย ซึ่งมีปริมาณสูงกว่าพืชอื่นที่ใช้บำบัดน้ำเสีย ในแหนจะมีปริมาณแป้ง 31.0-45.8% ของน้ำหนักแห้ง (Xu et al. 2012)

ตารางที่ 2.4 สารอาหารในแทน *Lemna minor* L.

องค์ประกอบของสารในแทน	ปริมาณ (g/DW)
Crude protein	18.38
Lipid	2.32
Ash	23.71
Amino acid	
Aspartic acid	1.096
Threonine	0.494
Serine	0.471
Glutamic acid	1.216
Glycine	0.438
Alanine	0.747
Valine	0.646
Methionine	0.179
Isoleucine	0.518
Leucine	0.696
Tyrosine	0.287
Phenylalanine	0.623
Histidine	0.224
Lysine	10.900

ที่มา: Yilmaz et al. (2004)

2.5.2 vermiculite

vermiculite เป็นไมกา ที่พบมากในประเทศอินเดีย ผลิตได้ 2,000 ตันต่อปี ซึ่ง vermiculite จะใช้ขัดผิวได้ 8-20 ครั้ง ถูกใช้ในสารกำจัดศัตรูพืช น้ำมันหล่อลื่น สารฆ่าเชื้อ อีฐฉนวน (insulating bricks) และ airconditioning เนื่องจากมีรูพรุนสูง มีคุณสมบัติในการแลกเปลี่ยนประจุ vermiculite ประสบความสำเร็จในการเป็นตัวค้ำจุณเพื่อใช้ตรึงเซลล์ในการผลิตเอนไซม์ acid phosphatase, alkaline phosphatase และ urease ด้วยการดูดซับ

2.5.3 กากมันสำปะหลัง (Cassava chip)

การผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลังปัจจุบันใช้มันเส้น แต่ในกระบวนการผลิตมีปัญหา การใช้พลังงานและน้ำสูง การพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตเอทานอลจากหัวมันสำปะหลังสดเป็นแนวทางใหม่ที่น่าสนใจ เนื่องจากหัวมันมีปริมาณมากและราคาถูก ในฤดูแล้งก็ยังสามารถใช้เป็นวัตถุดิบได้โดยตรงเช่นเดียวกับโรงงานแป้งมันสำปะหลัง โดยไม่ต้องมีค่าใช้จ่ายในการทำแห้งและเก็บ

สต็อก ข้อจำกัดสำคัญของ การใช้หัวมันสดเป็นวัตถุดิบ คือ องค์ประกอบทางเคมีไม่สม่ำเสมอ ยากต่อการควบคุมปริมาณของแข็ง เริ่มต้น และมีขีดจำกัดในการเพิ่มความเข้มข้นของของแข็งเริ่มต้น เพิ่มประสิทธิภาพกระบวนการผลิตเอทานอลในภาคอุตสาหกรรม โดยเฉพาะอย่างยิ่งกระบวนการผลิตเอทานอลจากหัวมันสำปะหลัง เช่น ศึกษากระบวนการปรับสภาพหัวมันสำปะหลังโดยเอนไซม์ผสม (Cocktail enzymes) เพื่อเพิ่มปริมาณของแข็งสำหรับเตรียมน้ำเชื่อมที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูงขึ้น (น้ำตาลสูงขึ้นจากร้อยละ 25 เป็นร้อยละ 32-35 หมักแล้วปริมาณเอทานอลเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 8-10 เป็น ร้อยละ 16-18) ทั้งนี้กระบวนการปรับสภาพหัวมันสำปะหลังโดยเอนไซม์ผสม เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพ กระบวนการผลิตเอทานอล อีกทั้งยังเป็นการพัฒนากระบวนการผลิตแบบ SSF (Simultaneous Saccharification and Fermentation) จากหัวมันสำปะหลังที่ระดับปริมาณของแข็งทั้งหมดในระบบ การหมักสูง (Very High Gravity Fermentation: VHGF) ซึ่งมีข้อได้เปรียบเนื่องจาก มีความเหมาะสมกับ วัตถุดิบที่ใช้ในประเทศ เพิ่มปริมาณเอทานอลในการหมัก ลดการใช้น้ำ และพลังงาน จึงเป็นแนวทางพัฒนา อุตสาหกรรมผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลัง งานวิจัยนี้อยู่ระหว่างการพัฒนาต่อในระดับต้นแบบ (ฝ่ายบริหารคลัสเตอร์และโปรแกรมวิจัย สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ, 2554) องค์ประกอบของสารต่างๆในกากมันสำปะหลัง ดังตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 องค์ประกอบของสารต่างๆ ในกากมันสำปะหลัง

องค์ประกอบของสารอาหาร	ปริมาณ (%)
Moisture	12.33
Protein	1.86
Ash	2.08
Fat	1.06
Crude fiber	3.47
Carbohydrate	79.20
pH	5.82

ที่มา: Sule et al. (2017)

ประพัฒน์ ตั้งภูมิระพีวงศ์ และคณะ (2558) ได้ทำการศึกษากากมันสำปะหลังหลังจากโรงงานผลิตเอทานอลเพื่อเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการ โดยนำกากมันสำปะหลังจากโรงงานผลิตเอทานอลมาหมักด้วยเชื้อเห็ดขอนดำเป็นเวลา 4 วัน (LP4) และเป็นเวลา 8 วัน (LP8) หมักด้วยเชื้อรา

Rhizopus oryzae เป็นเวลา 4 วัน (RO4) และเป็นเวลา 8 วัน (RO8) หมักด้วยเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* เป็นเวลา 4 วัน (BS4) และเป็นเวลา 8 วัน (BS8) เชื้อ *S. cerevisiae* เป็นเวลา 4 วัน (SC4) และเวลา 8 วัน (SC8) ทำการหมักด้วยเชื้อเห็ด เชื้อราและยีสต์ที่อุณหภูมิห้อง แต่เชื้อแบคทีเรีย ทำการหมักที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 4 และ 8 วัน พบว่า กากมันสำปะหลังจากโรงงานผลิตเอทานอลที่หมักด้วยจุลินทรีย์มีปริมาณโปรตีนในช่วง 12.26 - 18.40 % เพิ่มขึ้นจากกลุ่มควบคุมที่มีโปรตีน 9.43 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$) โดยการ หมักเชื้อรา *R. oryzae* เป็นเวลา 8 วันช่วยปรับปรุงให้ค่าโภชนะโปรตีน การย่อยได้วัตถุแห้ง อินทรีย์วัตถุ โปรตีน NDF และ ADF สูงที่สุด การปรับปรุงคุณค่าทางโภชนะของกากมันสำปะหลังจากโรงงานผลิตเอทานอลโดยใช้จุลินทรีย์สามารถเพิ่มคุณค่าทางโภชนะ และการย่อยได้ในกระเพาะรูเมน จึงเหมาะที่จะนำไปใช้หรือเป็นส่วนผสมของอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องได้

2.5.4 การถั่วเหลือง (soybean meal)

โดยทั่วไปเมล็ดถั่วเหลืองจะมีน้ำ 5.6-11.5% มี crude protein 2 ถึง 43.6% ไขมัน 15.5 ถึง 24.7% มีเถ้า 4.5 ถึง 6.4% มี neutral detergent fiber (NDF) ในช่วง 10 ถึง 14.9% มี acid detergent fiber (ADF) ในช่วง 9 ถึง 11.1% มีปริมาณ carbohydrates 31.7 to 31.85% ของถั่วเหลืองแห้ง (Banaszkiewicz, 2011) ดังตารางที่ 2.6

ตารางที่ 2.6 สารอาหารที่พบในกากถั่วเหลือง

สารอาหาร	กากถั่วเหลือง (% dry mass)
โปรตีน	44.40
เถ้า	6.65
ไขมัน	2.18
เยื่อใย	6.75
เยื่อใยที่สกัดด้วยสารละลายที่เป็นกลาง (Neutral detergent fiber, NDF)	15.51
เยื่อใยที่สกัดด้วยสารละลายที่เป็นกลาง (Acid detergent fiber, ADF)	9.5
สารประกอบที่ไม่มีไนโตรเจน (Nitrogen free extract)	31.82
แป้ง	6.3

ที่มา: Banaszkiwicz (2011)

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Hongzhang et al. (2006) ได้ศึกษาการผลิตแบบแห้งโดยใช้ PUF (polyurethane foam) เป็นตัวค้ำจุนในการผลิตเอนไซม์ alkaline protease การผลิตเอนไซม์ผลิตได้สูงสุดเท่ากับ 2185 U ml⁻¹ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงที่ พีเอช 9.0 อุณหภูมิ 32 °C หัวเชื้อ 1.0% PUF 3.75 ml g⁻¹ เพาะเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง และเติม CaCl₂ 15.0 mmol L⁻¹ ภายใต้สภาวะนี้จะผลิตเอนไซม์ในการเพาะเลี้ยงแบบแห้งโดยใช้ PUF (polyurethane foam) เป็นตัวค้ำจุนมากกว่าการหมักแบบอาหารเหลว

Kristensen et al. (2007) พบว่าปริมาณเอนไซม์ hydrolysis ที่ผลิตได้จะลดลงเมื่อเพิ่มแทนที่หัวเชื้อแสดงว่าสับสเตรทจะยับยั้งเอนไซม์ cellulases

Saurabh et al. (2007) พบว่า *Bacillus* sp. (SBP-29) แยกได้จากอุตสาหกรรมการผลิตสัตว์ปีกสามารถผลิตเอนไซม์ได้ จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงด้วยกากถั่วเหลือง พบว่า สามารถผลิตเอนไซม์ protease ได้ 3028 U/mL โดยใช้กากถั่วเหลือง 1.5% (w/v) เนื่องจากกากถั่วเหลืองมีราคาถูกจึงทำให้การผลิตเอนไซม์ protease มีราคาถูกลงด้วย เอนไซม์จะทนต่อแอมโมเนียม เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบกวนขนาด 10 L จะสามารถผลิตเอนไซม์ได้ 3208 U/mL ภายใน 18 h อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมของเอนไซม์ คือ 60°C และ 9.5 ตามลำดับ มีความคงตัวของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 20-90 °C และ คงตัวที่พีเอช 6.0–12.0 ตัวยับยั้งเอนไซม์ protease ได้แก่ phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) และ diiodopropyl fluorophosphate (DFP) และกิจกรรมของเอนไซม์จะเพิ่มขึ้น 10-15% เมื่อเติม Ca⁺⁺ และ Mg⁺⁺

Varnai et al. (2010) พบว่า เอนไซม์ย่อยสลายจะถูกจำกัดด้วยลักษณะโครงสร้างและความยากในการย่อยสลายของผนังเซลล์พืช

Mukhtar & Haq (2013) ศึกษาการคัดเลือกวัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตร (agroindustrial byproducts) เพื่อผลิตเอนไซม์ alkaline protease ด้วยสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายจาก EMS ของ *Bacillus subtilis* IH-72EMS8 วัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตรที่นำมาเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตเอนไซม์ alkaline protease ได้แก่ กากเมล็ดต้นเรพ กากเมล็ดถั่ว กากเมล็ดทานตะวัน กากกลูเตน กากเมล็ดฝ้าย และ กากถั่วเหลือง นอกจากนี้ยังมี รำข้าว รำข้าวสาลี และแป้งข้าวสาลี จากเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวพบว่า กากถั่วเหลือง 20 g/L จะผลิตเอนไซม์จากสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายจาก EMS ของ *Bacillus subtilis* IH-72EMS8 ได้ 5.74 ± 0.26 U/mL และ 11.28 ± 0.45 U/mL ตามลำดับ โดยขนาดของกากถั่วเหลืองที่ละเอียดสามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุด เมื่อทำการผลิตเอนไซม์ด้วยการหมักแบบแห้งพบว่า รำข้าวสาลีกับกากถั่วจะผลิตเอนไซม์ได้มากที่สุด

Santhi (2014) ได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์ protease จาก *Bacillus cereus* จะให้เอนไซม์มากที่สุดเมื่อทำการเพาะเลี้ยงที่ 48 ชั่วโมง พีเอช 7 โดยมี glucose และ peptone เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนตามลำดับ นอกจากนี้ยังใช้น้ำเสียจากมันสำปะหลัง 6 % ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด

Bech et al. (2015) ได้ศึกษาการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช (plant cell wall-degrading enzymes) โดย *Trichoderma asperellum* เปรียบเทียบการวิเคราะห์ความแตกต่างของโปรตีนคัดหลัง (secretome analysis) ของ *T. asperellum* ที่เจริญบนอาหาร potato dextrose agar (PDA), รำข้าวสาลี และแห่น (duckweed) จากรูปแบบการผลิตเอนไซม์จาก *T. asperellum* พบว่า สามารถผลิตได้หลายชนิด ได้แก่ depolymerization enzyme และ debranching enzymes ส่วนใหญ่คือ เอนไซม์ hemi-cellulases จากผลการวิเคราะห์โปรตีนคัดหลังพบว่าจะมีความจำเพาะกับการกระตุ้นการสร้าง glycoside hydrolase เมื่อเพาะเลี้ยงในแหล่งที่อาหารรำข้าวสาลี และ PDA รวมทั้งกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ GH62 α -L-arabinofuranosidase ซึ่งเป็นเอนไซม์ย่อยแห่น จากการทดลองชี้ให้เห็นว่า เอนไซม์รวม (cocktail enzyme) จาก *T. asperellum* สามารถย่อยแห่นเพื่อผลิตกลูโคสได้มากกว่า 60%

Prema & Palempalli (2015) พบว่า *Bacillus licheniformis* ที่แยกได้จากกองปุ๋ยหมักพลาสติกเพื่อผลิตและทำให้เอนไซม์ PLA depolymerase บริสุทธิ์ ซึ่งเอนไซม์ PLA depolymerase จะเป็นเอนไซม์ esterase เนื่องจากมีการ p-nitrophenyl acetate (PNPA) เป็นสับสเตรตในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ เอนไซม์ PLA depolymerase จะถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอนด้วย ammonium sulphate และ ion exchange chromatography พบว่าเอนไซม์มีคุณสมบัติดังนี้ มีโมเลกุล 44 KDa อุณหภูมิที่เหมาะสม 50°C-60°C และมี pH ที่เหมาะสม 6 ถึง 7 ตัวยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์คือ ethyl acetate ตัวยับยั้งรองลงมา คือ hexane, isopropanol, DMSO, ethanol, methanol, acetonitrile และ acetone

Liang et al. (2016) ได้ศึกษาการจัดการของเหลือทิ้งจากการประมงและพลาสติกยังคงน่าเป็นห่วงถึงคุณภาพสิ่งแวดล้อม พลาสติก PLA เป็นพลาสติกทางการค้าที่สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ (renewable) และเป็นพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (biodegradable plastic) ในการศึกษานี้ได้ทำการผลิตเอนไซม์ PLA depolymerase จากอาหารที่มีผงแกนปลาหมึก (squid pen powder, SPP) และผงพลาสติก PLA จากภาชนะบรรจุโดย *Pseudomonas tamsuii* TKU015 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากดิน Taiwanese คุณสมบัติของเอนไซม์ PLA depolymerase บริสุทธิ์ คือ มีขนาดโมเลกุล 58 kDa มีค่า pH ที่เหมาะสมเท่ากับ 10 อุณหภูมิ 60°C มีคุณสมบัติในการย่อย fibrinogen และ tributyrin แต่ไม่สามารถย่อย casein, triolein, และ poly(β -hydroxybutyrate)

ได้ การผลิตเอนไซม์ PLA depolymerase จาก *P. tamsuii* TKU015 สามารถใช้ผงแกนปลาหมึก และผงพลาสติก PLA จากภาชนะบรรจุเป็นแหล่งของคาร์บอนและไนโตรเจนได้

Lomthong et al. (2016) ได้ศึกษาปัจจัยทางกายภาพต่อการเพิ่มการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งดิบ (raw starch degrading enzyme) โดยแบคทีเรียชอบอุณหภูมิ *Laceyella sacchari* LP175 ในถังหมักแบบลอยตัว (airlift fermenter) ขนาด 3 ลิตร พบว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงที่สภาวะพีเอช 6.5 อุณหภูมิ 45°C และให้อัตราการให้อากาศ 0.5 vvm โดยออกแบบการทดลองแบบ central composite design จะให้เอนไซม์ย่อยแป้งดิบ 278 U/mL เพาะเลี้ยงนาน 36 ชั่วโมง ซึ่งการผลิตเอนไซม์และอัตราการผลิตจะ 1.53 และ 2.04 เท่า ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับระดับ flask เอนไซม์ย่อยแป้งดิบที่ผลิตโดย *L. sacchari* LP175 กับเอนไซม์ทางการค้า glucoamylase จะช่วยเพิ่มการย่อยกากมันสำปะหลังได้ 300 g/L (71% starch content) ต่อน้ำตาล 157 g/L คิดเป็นการย่อยสลายเท่ากับ 66.3% ที่พีเอช 6.5 อุณหภูมิ 50°C นาน 12 ชั่วโมง จากนั้นทำการศึกษากการผลิตเอทานอลแบบไม่ปราศจากเชื้อจากกากมันสำปะหลัง พบว่าจะได้เอทานอล 90.9 g/L (88% theoretical yield) เมื่อทำการเตรียมมันสำปะหลังโดย modified simultaneous saccharification และหมักที่ 50°C นาน 6 ชั่วโมง และนำไปหมักโดย thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* DMKU-KS07 ที่อุณหภูมิ 42°C นาน 18 ชั่วโมง ซึ่งอัตราการผลิตสูงสุดเท่ากับ 3.79 g/L/h.

Panyachanakul et al. (2017) ได้ศึกษา Poly(DL-lactic acid) (PDLLA) เป็นพลาสติกย่อยสลายทางชีวภาพที่สามารถย่อยสลายได้ด้วยเอนไซม์หลายชนิด งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาวัสดุตั้งเซลล์ที่เหมาะสม (suitable immobilization material) ในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PDLLA และศึกษาสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมโดยใช้การตรึงเซลล์ *Actinomodura keratinolytica* สายพันธุ์ T16-1 ภายใต้สภาวะการหมักที่แตกต่างกันในถังหมักแบบพัดกววน (stirrer fermenter) จากผลการวิจัยพบว่าเส้นใยขัดเป็นวัสดุตั้งที่ดีที่สุดซึ่งสายพันธุ์ T16-1 สามารถผลิตเอนไซม์ได้ 30.03 U/ml ในระดับ shake flask เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อในถังหมักแบบใบพัดกววนขนาด 5 ลิตร จะให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด 766.33 U/ml คิดเป็นอัตราการผลิตเท่ากับ 15.97 U/ml.h โดยให้อากาศ 0.25 vvm อัตราการกวน 170 rpm อุณหภูมิ 45 °C และใช้เวลาในการเพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมง และเมื่อทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์แบบ repeated batch และ continuous ที่ค่าอัตราการเจือจางเท่ากับ 0.013/h พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ได้เท่ากับ 942.67 U/ml คิดเป็นอัตราการผลิตเท่ากับ 19.64 U/ml.h และ 796.43 U/ml คิดเป็นอัตราการผลิตเท่ากับ 16.58 U/ml.h ตามลำดับ จากนั้นทำการขยายขนาดการผลิตโดยใช้ถังหมักแบบใบพัดกววนขนาด 10 ลิตรพบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดเท่ากับ 578.67 U/ml คิดเป็นอัตราการผลิตเท่ากับ 12.06 U/ml.h

Peñamaría et al. (2017) จากการคัดเลือก *Aspergillus niger* จำนวน 35 สายพันธุ์ เพื่อผลิตเอนไซม์ lipase สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้คือ *Aspergillus niger* strain Van Tieghem. H/6-24-6 จากการศึกษาวัสดุค้ำจุนในการหมักแบบแห้งจาก vermiculite กากโกโก้ และแกลบข้าวสาลี พบว่า แกลบข้าวสาลี ให้การผลิตเอนไซม์ lipase ได้สูงและราคาถูก

Lomthong et al. (2017) ได้หาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต poly (L-lactide) (PLLA)-degrading enzyme จาก *Laceyella sacchari* LP175 ในระดับพลาสม่าโดยใช้วัสดุทางการเกษตรเป็นวัสดุหมักแบบอาหารเหลว จากการศึกษาแบบ one-factor-at-a-time พบว่า กากมันสำปะหลัง (cassava chips) และกากถั่วเหลือง (soybean meal) เป็นแหล่งของคาร์บอนและไนโตรเจนที่ดี การผลิตเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นด้วยการเติมฟอสเฟตและจะถูกยับยั้งด้วยเกลือ เอนไซม์สามารถผลิตได้สูงสุด (65.5 U/mL) ในอาหารเหลว basal ที่เติมกากมันสำปะหลัง 4.64 g/L กากถั่วเหลือง 1.53 g/L และผง PLLA 0.31 g/L PLLA เมื่อทำการขยายขนาดการผลิตเอนไซม์ในถังหมัก airlift fermenter ขนาด 3 ลิตร ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงที่ 50 °C, พีเอช 7.0 และอัตราการให้อากาศ 0.5 vvm เพาะเลี้ยงนาน 18 ชั่วโมงให้กิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 94.4 U/mL จากนั้นนำ crude enzyme ไปย่อยผง PLLA พบว่าสามารถย่อยผง PLLA ได้ 91% เมื่อทำการย่อยที่ 50 °C ใช้เวลานาน 72 ชั่วโมง

Peñamaría et al. (2017) ได้ผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันพืชโดยใช้กระบวนการที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม กระบวนการนี้จะผลิตเอนไซม์ lipase เอนไซม์ lipase จะพบทั่วไปในสิ่งแวดล้อมและผลิตจากเอนไซม์ อย่างไรก็ตามเอนไซม์ lipase ที่สร้างจากราจะดีกว่าแบคทีเรียเนื่องจากราคาการผลิตต่ำ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกเอนไซม์ lipase และสามารถเจริญได้ดีในการเพาะเลี้ยงแบบแห้ง คัดเลือกจาก 35 สายพันธุ์ของยีสต์และราโดยเพาะเลี้ยง มีวัสดุค้ำจุน ได้แก่ vermiculite เปลือกข้าวสาลีบด (crushed wheat husk) เปลือกเมล็ดโกโก้ (cacao seed-husk) และ แหล่งของคาร์บอน ได้แก่ น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันดอกทานตะวัน และน้ำมันมะกอก จากทั้งหมด 35 สายพันธุ์ จะถูกคัดเลือกหาสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์ lipase สายพันธุ์ที่เลือกได้ คือ *Aspergillus niger* strain Van Tieghem. H/6-24-6 โดยในการผลิตจะมีเปลือกข้าวสาลีบดเป็นตัวค้ำจุนที่มีน้ำมันดอกทานตะวันเป็นแหล่งพลังงาน

2.7 กรอบแนวคิดในการวิจัย

เนื่องจากการใช้พลาสติกย่อยได้ เริ่มมีบทบาทสำคัญต่อการดำเนินชีวิต ดังนั้น PLLA พลาสติก เป็นพลาสติกที่ย่อยได้ชนิดหนึ่งที่กำลังได้รับการยอมรับให้มีการผลิตในประเทศไทย ศักยภาพในการนำมาใช้ผลิตวัสดุต่างๆ มากมาย เช่น ภาชนะบรรจุของปัจจุบันภาชนะที่ผลิตจากพลาสติกที่ย่อยสลายได้ที่สามารถหมุนเวียนกลับมาใช้ใหม่ได้ ดังนั้นการกำจัดพลาสติกชีวภาพจึงทำได้

โดยการฝังกลบแต่ต้องใช้เวลาานาน ซึ่งแนวทางที่จะช่วยลดระยะเวลาการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพได้ โดยการใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ร่วมด้วย กรอบแนวความคิดของแผนงานวิจัยดังแสดงในแผนภูมิ

