*บทความวิจัย*

# สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์พอลิ (3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) ดีพอลิเมอเรส จาก *Actinomadura* sp. สายพันธุ์ TF1

**วิชุดา พรหมคงบุญ[1] ทายาท ศรียาภัย[2] และ พิชาภัค ศรียาภัย[1*]**

## บทคัดย่อ

PHBV ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากเนื่องจากเป็นพอลิเมอร์ที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมและถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางทางการแพทย์ การเกษตร และบรรจุภัณฑ์ การเร่งการย่อยสลาย PHBV มีความสำคัญในการจัดการขยะพลาสติกชีวภาพ ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ PHBV depolymerase จาก *Actinomadura* sp. สายพันธุ์ TF1 และตรวจสอบการย่อยสลายแผ่นฟิล์ม PHBV ภายหลังการฝังดิน 2 สัปดาห์ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส *Actinomadura* sp. สายพันธุ์ TF1 แยกได้จากดิน คอมโพสต์ในประเทศไทย การย่อยสลาย PHBV ทดสอบโดยการสังเกตวงใสที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายพอลิเมอร์ที่ประกอบในอาหารแข็ง basal medium การทำงานสูงสุดของเอนไซม์ PHBV depolymerase เท่ากับ 5.81 ± 0.22 ยูนิตต่อมิลลิลิตร สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์เมื่อเลี้ยงในอาหาร basal medium คือ พีเอช 8 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ที่มีความเข้มข้นของสับสเตรท PHBV 0.4 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร แผ่นฟิล์ม PHBV ถูกย่อยสลายโดยการทำงานของสายพันธุ์ TF1 ผลการทดลองพบว่าแผ่นฟิล์มที่ฝังดินกับสายพันธุ์ TF1 น้ำหนักลดลงไปมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแสดงผลของการย่อยสลายของแผ่นฟิล์ม PHBV เช่น พื้นผิวที่ขรุขระ มีช่อง โพรง และรูพรุนเกิดขึ้น ดังนั้นสรุปได้ว่าสายพันธุ์ TF1 มีศักยภาพในการใช้สำหรับการย่อยสลายขยะพลาสติกชีวภาพ PHBV

**คำสำคัญ:** *Actinomadura* sp. พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) สภาวะที่เหมาะสม

---

[1] ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

[2] คณะวัฒนธรรมสิ่งแวดล้อมและการท่องเที่ยวเชิงนิเวศ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

[*] ผู้นิพนธ์ประสานงาน, e-mail: peechapack@g.swu.ac.th

# Optimization for Production of Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) Depolymerase from *Actinomadura* sp. strain TF1

**Wichuda Promkongboon[1], Thayat Sriyapai[2] and Pichapak Sriyapai[3*]**

## ABSTRACT

PHBV have gained much attention as environment-friendly polymers that can widely be used in medicine, agriculture and packaging. It is important to accelerate PHBV degradation for the management of bioplastic wastes. Therefore, the purposes of this study were to investigate the optimization for production of PHBV depolymerase from *Actinomadura* sp. strain TF1 and to examine the biodegradation of PHBV film, after soil burial for 2 weeks at 45°C. *Actinomadura* sp. strain TF1 was isolated from compost soil in Thailand. Degradation of the PHBV was examined by the formation of clear zone of hydrolysis on the polymer containing basal medium agar plates. The highest activity of PHBV depolymerase was 5.81 ± 0.22 U/ml. The optimal conditions for enzyme production when cultured in basal medium were pH 8, 45°C and 0.4% (w/v) substrate concentration of PHBV. The PHBV film was degraded by the action of strain TF1. The results showed that PHBV film buried in soil with strain TF1 lost weight more than 80%, the scanning electron microscope showed evidence of PHBV film degradation such as surface roughening, cavities, grooves and pit formation. Therefore, it can be concluded that strain TF1 can potentially be used for biodegradation of PHBV bioplastic wastes.

**Keywords:** *Actinomadura* sp., Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate), Optimization

---

[1] Department of Biology, Faculty of Science, Srinakharinwirot University.

[2] Faculty of Environmental Culture and Ecotourism, Srinakharinwirot University.

[*] Corresponding author, email: peechapack@g.swu.ac.th

## บทนำ

ปัจจุบันปัญหาขยะพลาสติกกำลังเป็นปัญหาระดับโลก เนื่องจากปริมาณขยะพลาสติกที่เพิ่มมากขึ้น แต่การกำจัดและการจัดการยังเป็นไปอย่างล่าช้า โดยพลาสติกเหล่านี้ส่วนใหญ่ผลิตมาจากสารพวกปิโตรเคมีซึ่งย่อยสลายได้ยาก ทนต่อการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ในธรรมชาติ [1] และถ้ากำจัดขยะพลาสติกเหล่านี้โดยการเผาจะก่อให้เกิดมลพิษทางอากาศเนื่องจากการสันดาปของพลาสติกจะปลดปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ออกมาเป็นจำนวนมากส่งผลให้เกิดสภาวะเรือนกระจก [2] จากสาเหตุเหล่านี้จึงทำให้เกิดการสะสมขยะพลาสติกบนพื้นผิวโลกเป็นจำนวนมาก ดังนั้นพลาสติกชีวภาพจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจในการนำมาใช้ทดแทนพลาสติกที่ย่อยสลายได้ยาก เนื่องจากพลาสติกชีวภาพเป็นพลาสติกที่สามารถสลายได้ทางชีวภาพโดยอาศัยเอนไซม์จากจุลินทรีย์ที่อยู่ในสิ่งแวดล้อมบริเวณนั้นๆ ให้กลายเป็นแร่ธาตุกลับคืนสู่ดิน [3]

พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (polyhydroxyalkanoates, PHAs) เป็นพลาสติกชีวภาพที่ได้รับความสนใจในทศวรรษที่ผ่านมา เนื่องจากเป็นตัวแทนของพลาสติกที่สังเคราะห์ได้จากธรรมชาติโดยตรง เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม สามารถเข้ากับเนื้อเยื่อสิ่งมีชีวิตได้ดีและไม่เป็นพิษกับสิ่งมีชีวิต [4] โดย PHAs เกิดจากการสังเคราะห์และสะสมแกรนูล (granules) อยู่ในไซโตพลาสซึมของจุลินทรีย์ในระหว่างการเจริญที่ถูกจำกัดปริมาณสารอาหาร เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และออกซิเจน แต่ต้องมีแหล่งคาร์บอนที่มากเกินพอ เช่น กลูโคส PHAs มีอนุพันธ์หลายชนิดขึ้นอยู่กับความแตกต่างของหน่วยย่อยมอนอเมอร์ในสายพอลิเมอร์ [5] ซึ่งตัวที่มีความน่าสนใจมากที่สุด คือ พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทีเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) (poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate), PHBV) โดย PHBV เป็นโคพอลิเมอร์ที่เกิดจากการรวมตัวกันแบบสุ่มของ 3-ไฮดรอกซีบิวทีเรต (3-hydroxybutyrate, HB) และ 3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต (3-hydroxyvalerate, HV) ซึ่งเป็นพลาสติกที่ทนต่อแรงอัดได้ดีมีความเหนียวและยืดหยุ่นได้ดี ขึ้นรูปได้ง่ายจึงสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ มากมาย [6] ทำให้ในอนาคตอาจมีขยะพลาสติกเกิดขึ้นเป็นจำนวนมากจึงส่งผลให้มีนักวิจัยสนใจศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ที่มีศักยภาพในการย่อยสลาย PHBV Akbar และคณะ [3] ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ PHBV depolymerase จาก *Streptomyces* sp. AF-111 พบว่าเชื้อผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหาร mineral salt medium ที่ประกอบไปด้วย PHBV 0.2 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ที่ค่าพีเอช 7 Shah และคณะ [1] พบว่า *Bacillus* sp. AF3 สามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีเมื่อเลี้ยงในอาหาร minimal medium ที่ประกอบไปด้วย PHBV 0.4 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร และ yeast extract 1 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตรที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ค่าพีเอช 7 เป็นเวลา 20 วัน นอกจากนี้ Shah และคณะ [7] ศึกษา การผลิตเอนไซม์ PHBV depolymerase จาก *Streptoverticillium kashmirense* AF1 ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีเมื่อเลี้ยงในอาหาร arginine glycerol salt medium ที่ประกอบไปด้วย PHBV 1 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร และมีน้ำตาลแล็กโทสเป็นแหล่งคาร์บอนเพิ่มเติมที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ที่ค่าพีเอช 7 และ 8 Nadhman และคณะ [8] ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ PHBV depolymerase จาก *Aspergillus* sp. NA-25 พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหาร minimum salt medium ที่ประกอบไปด้วย PHBV 0.2 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตรที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ที่ค่าพีเอช 7 และมีน้ำตาลแล็กโทส 0.2 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตรเป็นแหล่งคาร์บอนเพิ่มเติม

จากรายงานวิจัยเหล่านี้เห็นได้ว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ PHBV depolymerase ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ และสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อเพื่อให้เชื้อผลิตเอนไซม์ออกมาในปริมาณมากที่สุด จากการศึกษาค้นคว้าพบว่ายังมีรายงานเกี่ยวกับการศึกษาเอนไซม์ PHBV depolymerase ใน *Actinomadura* sp. น้อยมาก ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ PHBV depolymerase จาก *Actinomadura* sp. สายพันธุ์ TF1 ซึ่งเป็นเชื้อที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพพอลิบิวทิลีนซักซิเนต (polybutylene succinate, PBS) ที่ได้รายงานก่อนหน้านี้ [9]

## อุปกรณ์และวิธีทดลอง

### 1. การทดสอบความสามารถในการย่อยสลาย PHBV จากเชื้อ *Actinomadura* sp. สายพันธุ์ TF1

เตรียมเชื้อจุลินทรีย์โดยนำเชื้อ *Actinomadura* sp. สายพันธุ์ TF1 (accession no. KC529344) ที่แยกได้จากดินปุ๋ยหมักซึ่งได้มีรายงานมาก่อนหน้านี้ว่าเชื้อมีศักยภาพในการย่อยสลาย PBS [9] นำมาเตรียมเป็นเชื้อเริ่มต้น (starter) โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง yeast-malt extract agar (International Streptomyces Project, ISP-2) ซึ่งประกอบด้วย yeast extract 4 กรัม/ลิตร, malt extract 10 กรัม/ลิตร, dextrose 4 กรัม/ลิตร และ agar 20 กรัม/ลิตร หลังจากนั้นบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน

การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพด้วยวิธีการเกิดบริเวณใส (clear zone) บนอาหารแข็งได้ประยุกต์ใช้วิธีการของ Nishida และ Tokiwa [10] พลาสติกชีวภาพที่ใช้ในงานวิจัยนี้ได้แก่ พอลิบิวทิลีนซัคซิเนต-โค-อะดิเพท (poly(butylene succinate-co-adipate), PBSA), พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (polyhydroxybutyrate, PHB) และ PHBV สำหรับเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญของสายพันธุ์ TF1 การเตรียมอาหารแข็งเริ่มจากชั่งพลาสติกชีวภาพ 1 กรัม ละลายใน dichloromethane 20 มิลลิลิตร นำมาผสมรวมกันกับ 1 ลิตร basal medium โดยอาศัยเครื่อง อัลตราโซนิคเคเตอร์ (ultrasonicator) อาหาร basal medium ประกอบไปด้วย yeast extract 0.2 กรัม/ลิตร, $(NH_4)_2SO_4$ 1 กรัม/ลิตร, NaCl 0.1 กรัม/ลิตร, $MgSO_4.7H_2O$ 0.2 กรัม/ลิตร, $CaCl_2.2H_2O$ 0.02 กรัม/ลิตร, $FeSO_4.7H_2O$ 0.01 กรัม/ลิตร, $Na2MoO_4.2H_2O$ 0.0005 กรัม/ลิตร, $Na_2WO_4.2H_2O$ 0.005 กรัม/ลิตร, $MnSO_4$ 0.005 กรัม/ลิตร, $K_2HPO_4$ 1.6 กรัม/ลิตร และ $KH_2PO_4$ 0.2 กรัม/ลิตร นำอาหารที่เตรียมบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้ dichloromethane ระเหย เติมวุ้น 20 กรัม/ลิตร และนำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เทใส่จานเพาะเชื้อ ทำการทดสอบการย่อยสลายของพลาสติกชีวภาพโดยการวนเชื้อสายพันธุ์ TF1 ปริมาตร 1 ลูปเต็ม (loop full) บนผิวหน้าอาหารแข็ง จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน สังเกตและวัดเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดบริเวณใสที่เกิดขึ้นบนอาหารแข็ง

### 2. การผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลาย PHBV จากเชื้อ *Actinomadura* sp. สายพันธุ์ TF1 ในอาหารเหลว

นำเชื้อ *Actinomadura* sp. สายพันธุ์ TF1 เลี้ยงในอาหารเหลว LB low salt ที่ประกอบด้วย peptone 10 กรัม/ลิตร yeast extract 5 กรัม/ลิตร และ NaCl 5 กรัม/ลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มในเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 45 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง เพื่อเตรียมเป็นเชื้อเริ่มต้น จากนั้นนำเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 8 มิลลิลิตร ถ่ายลงในอาหาร basal medium ที่ประกอบไปด้วยแหล่งคาร์บอนของ PHBV ที่มีความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร ปริมาณ 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใส (supernatant) มาวัดการทำงานของเอนไซม์ที่ย่อยสลาย PHBV

### 3. การวัดการทำงานของเอนไซม์ที่ย่อยสลาย PHBV

การวัดการทำงานของเอนไซม์ที่ย่อยสลาย PHBV โดยดูจากความขุ่น (turbidity) ที่ลดลงของสารละลาย PHBV ประยุกต์วิธีการของ Shah และคณะ [1] โดยทำการเตรียมสารละลายสับสเตรท PHBV ที่ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตรในสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่ค่าพีเอช 8 ด้วยเครื่องอัลตราโซนิคเคเตอร์ จากนั้นเตรียม reaction mixture โดยการผสมกันระหว่างสารละลายสับสเตรท PHBV ปริมาตร 0.9 มิลลิลิตร และส่วนใสปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวัด optical density ที่ 650 นาโนเมตร ($OD_{650}$) กำหนดให้ 1 ยูนิตของเอนไซม์ที่ย่อยสลาย PHBV เท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลง 1 หน่วยที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตรภายใต้สภาวะทดสอบ การวัดการทำงานของเอนไซม์ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

### 4. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PHBV จากเชื้อ *Actinomadura* sp. สายพันธุ์ TF1

#### 4.1 การหาค่าพีเอชที่เหมาะสม

นำเชื้อ *Actinomadura* sp. สายพันธุ์ TF1 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB low salt เป็นเวลา 96 ชั่วโมง เพื่อเตรียมเป็นเชื้อเริ่มต้น จากนั้นนำเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 8 มิลลิลิตร เลี้ยงในอาหาร basal medium ที่มี PHBV ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร ปรับค่าพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีค่า 6, 7, 8 และ 9 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุกๆ 48 ชั่วโมงเป็นเวลา 10 วัน โดยเก็บส่วนใสมาวัดการทำงานของเอนไซม์ตามวิธีการข้อ 3

#### 4.2 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสม

นำเชื้อ *Actinomadura* sp. สายพันธุ์ TF1 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB low salt เป็นเวลา 96 ชั่วโมง เพื่อเตรียมเป็นเชื้อเริ่มต้น จากนั้นนำเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 8 มิลลิลิตร เลี้ยงต่อในอาหาร basal medium ที่มี PHBV ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์

ขนาด 250 มิลลิลิตร ปรับค่าพีเอชที่เหมาะสม จากนั้นนำไปเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30, 35, 40, 45 และ 55 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุกๆ 48 ชั่วโมงเป็นเวลา 10 วัน โดยเก็บส่วนใสมาวัดการทำงานของเอนไซม์ตามวิธีการข้อ 3

### 4.3 การหาความเข้มข้นของ PHBV ที่เหมาะสม

นำเชื้อ *Actinomadura* sp. สายพันธุ์ TF1 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB low salt เป็นเวลา 96 ชั่วโมง เพื่อเตรียมเป็นเชื้อเริ่มต้น จากนั้นนำเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 8 มิลลิลิตร เลี้ยงต่อในอาหาร basal medium ที่มี PHBV ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันดังนี้ 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร ปรับค่าพีเอชที่เหมาะสม ปริมาณ 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาเลี้ยงที่อุณหภูมิที่เหมาะสม เขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุกๆ 48 ชั่วโมงเป็นเวลา 10 วัน โดยเก็บส่วนใสมาวัดการทำงานของเอนไซม์ตามวิธีการข้อ 3

## 5. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการวัดการทำงานของเอนไซม์ที่ย่อยสลาย PHBV

นำเชื้อ *Actinomadura* sp. สายพันธุ์ TF1 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB low salt เป็นเวลา 96 ชั่วโมง เพื่อเตรียมเป็นเชื้อเริ่มต้น จากนั้นนำเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 8 มิลลิลิตร เลี้ยงต่อในอาหาร basal medium ที่มี PHBV ที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม ปรับค่าพีเอชที่เหมาะสม ปริมาณ 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาเลี้ยงที่อุณหภูมิที่เหมาะสม เขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่ระยะเวลาที่เหมาะสม จากนั้นเก็บส่วนใสโดยการนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสมาทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์หยาบ (crude enzyme) โดยทำการเตรียมสารละลายสับสเตรท PHBV ที่ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตรในสารละลายบัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl ที่มีค่าพีเอช 7, 8 และ 9 โดยอาศัยเครื่องอัลตราโซนิคเคเตอร์ จากนั้นเตรียม reaction mixture ตามวิธีการข้อ 3 นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 35, 45 และ 55 องศาเซลเซียส ระยะเวลาที่ใช้ในการบ่มได้แก่ 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 และ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำแต่ละตัวอย่างมาวัดการทำงานของเอนไซม์

## 6. การศึกษาการย่อยสลายแผ่นฟิล์มพลาสติก PHBV โดยการฝังดิน

### 6.1 การเตรียมแผ่นฟิล์มพลาสติก PHBV

นำเม็ดพลาสติก PHBV 1 กรัม ละลายในคลอโรฟอร์มปริมาตร 20 มิลลิลิตร เมื่อเม็ดพลาสติกละลายหมดให้เทสารละลายทั้งหมดลงในจานแก้ว ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมงโดยไม่ให้โดนแสงเพื่อให้แผ่นฟิล์มพลาสติก PHBV แข็งตัว ทุกขั้นตอนทำภายในตู้ดูดควัน จากนั้นนำแผ่นฟิล์มพลาสติก PHBV ที่ได้ตัดออกเป็น 4 ส่วนเท่าๆ กัน และนำไปชั่งน้ำหนัก

### 6.2 การเตรียมดิน

ดินที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้เป็นดินมูลไส้เดือน เตรียมโดยนำดินที่ได้มาฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ให้เย็น

### 6.3 การเตรียมเชื้อ *Actinomadura* sp. สายพันธุ์ TF1

นำเชื้อ *Actinomadura* sp. สายพันธุ์ TF1 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB low salt ปริมาตร 100 มิลลิลิตรในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร พีเอช 8 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง จากนั้นทำการเก็บเซลล์โดยนำอาหารเลี้ยงเชื้อปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เติม basal medium ปริมาตร 40 มิลลิลิตรลงไปในหลอดทดลองและ resuspend ให้เข้ากันเพื่อเตรียมเป็นเชื้อที่ใช้ในการทดลองต่อไป

### 6.4 การเตรียมหน่วยทดลอง

ประกอบด้วยกระบะขนาด 35 × 25 เซนติเมตร โดยแบ่งออกเป็นกระบะควบคุมและกระบะทดลอง เริ่มจากนำดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาณ 1 กิโลกรัม เทลงในกระบะเกลี่ยให้ทั่วทั้งกระบะ จากนั้นนำแผ่นฟิล์มพลาสติก PHBV มาวางบนดิน (แผ่นฟิล์มพลาสติกผ่านการฆ่าเชื้อโดยการล้างด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 70% และ น้ำกลั่น 2 ครั้ง) เททับด้วยดินอีก 1 กิโลกรัม สำหรับกระบะควบคุมจะเท basal medium ที่ไม่มีสายพันธุ์ TF1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 40 มิลลิลิตรลงไปในกระบะ สำหรับกระบะทดลองจะเทอาหาร basal medium ปริมาตร 40 มิลลิลิตรที่มีสายพันธุ์ TF1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งเตรียมได้จากข้อ 6.3 จากนั้นคลุมกระบะด้วยแผ่นพลาสติก นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ เก็บแผ่นพลาสติก PHBV ทุกสัปดาห์เพื่อนำมาชั่งน้ำหนักที่ลดลง

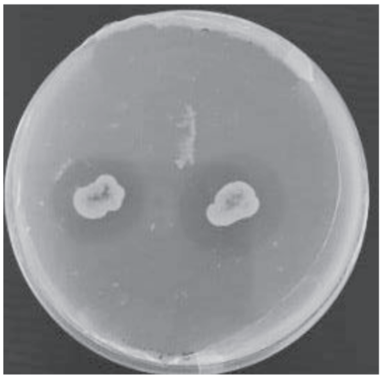
### 6.5 การวิเคราะห์ผล

นำแผ่นฟิล์มพลาสติก PHBV ออกจากกระบะไปล้างด้วยน้ำกลั่นจนสะอาด เช็ดให้แห้งและทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำแผ่นพลาสติกที่ได้ไปชั่งน้ำหนักเพื่อหาน้ำหนักที่หายไป และศึกษาลักษณะบนพื้นผิวของพลาสติกด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope; SEM) โดยส่งวิเคราะห์แผ่นพลาสติกที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

### 1. ผลการทดสอบความสามารถในการย่อยสลาย PHBV

จากการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพชนิดต่างๆ บนอาหารแข็งพบว่าสายพันธุ์ TF1 สามารถย่อยสลายพลาสติกชีวภาพได้หลายชนิด ได้แก่ PHB, PBSA และ PHBV ซึ่งให้ขนาดวงใสประมาณ 1.5, 1.8, และ 2.5 เซนติเมตร ตามลำดับเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน สายพันธุ์ TF1 สามารถย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ PHBV ได้ดีที่สุดดังแสดงในรูปที่ 1 ดังนั้นจึงเลือก PHBV มาทำการศึกษา การเกิดวงใสรอบๆ โคโลนีบนอาหารแข็งซึ่งเป็นการยืนยันให้เห็นว่าเชื้อมีการปลดปล่อยเอนไซม์ออกมาภายนอกเซลล์ (extracellular enzyme) เพื่อย่อยสลายพอลิเมอร์ให้อยู่ในรูปที่สามารถละลายน้ำได้ [11] เอนไซม์ที่ย่อยสลายพอลิเมอร์ของ PHBV จากเชื้อสายพันธุ์ TF1 คือ PHBV depolymerase เป็นเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติเหมือนกับที่พบรายงานซึ่งในรายงานที่อ้างอิงก็ใช้ชื่อเอนไซม์เดียวกัน *Actinomadura* sp. เป็นแบคทีเรียแกรมบวกและต้องการอากาศในการเจริญ เชื้อที่มีศักยภาพในการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ เช่น *Actinomadura miaoliensis* strain BC 44T-5$^T$ ย่อยสลาย PHB [12] *Actinomadura keratinilytica* strain T16-1 ย่อยสลายพอลิแอลแลคไทด์ (poly-L-lactide, PLLA) [13], *Actinomadura* sp. S14 ย่อยสลายพอลิคาร์โปรแลคโตน (polycaprolactone, PCL) [14] และ *Actinomadura* sp. AF-555 ย่อยสลาย PHBV [11]

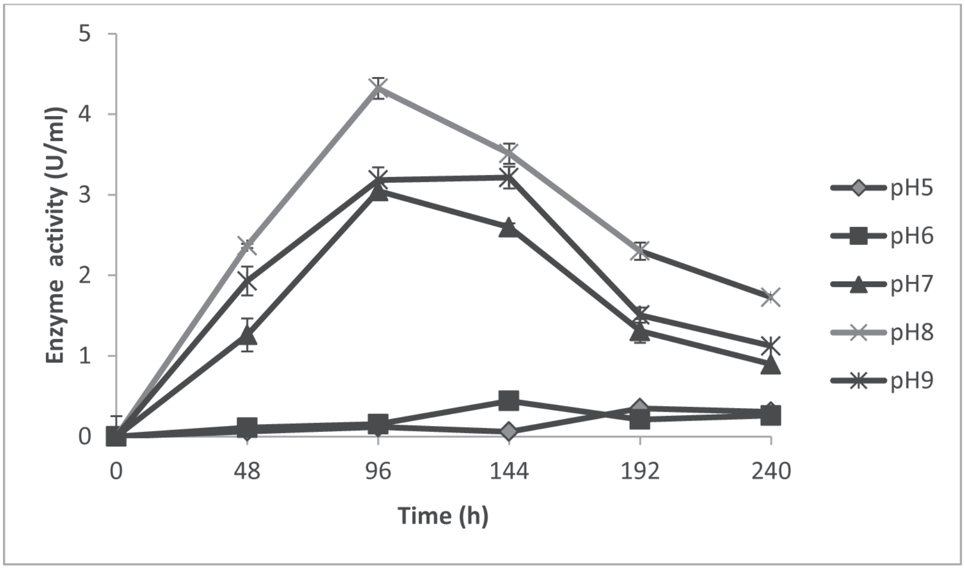


**รูปที่ 1** การเกิดวงใสบนอาหารแข็ง basal medium ที่ประกอบด้วย PHBV 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตรเป็นสับสเตรทจากสายพันธุ์ TF1 บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

## 2. ผลของสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลาย PHBV

### 2.1 ผลของค่าพีเอชที่เหมาะสม

จากการศึกษาผลของพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ PHBV depolymerase จากสายพันธุ์ TF1 พบว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าพีเอช 8 สามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดที่เวลา 96 ชั่วโมง วัดการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 4.32 ± 0.02 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ ที่พีเอช 9 และ 7 ซึ่งวัดการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 3.2 ± 0.18 และ 3.04 ± 0.2 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สำหรับที่ค่าพีเอช 5 และ 6 พบว่าความสามารถในการผลิตเอนไซม์ลดลงมีค่าการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 0.11 ± 0.11 และ 0.15 ± 0.02 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 2) แสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์ TF1 สามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีที่ค่าพีเอชเป็นเบสอ่อน แต่ประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์จะต่ำลงเมื่อเลี้ยงเชื้ออยู่ในสภาวะที่เป็นกรด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Shah และคณะ [7] พบว่า *Streptoverticillium kashmirense* AF1 สามารถผลิตเอนไซม์ PHBV depolymerase ได้ดีที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าพีเอช 8 Akbar และคณะ [3] ศึกษา *Streptomyces* sp. AF-111 ที่สามารถผลิตเอนไซม์ PHBV depolymerase ได้ดีที่สุดที่ค่าพีเอช 7 เช่นเดียวกับที่มีรายงานใน *Bacillus* sp. AF3 [1]



**รูปที่ 2** ผลของพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ PHBV depolymerase จากสายพันธุ์ TF1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว basal medium ที่มี PHBV ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตรปรับค่าพีเอชในอาหารแตกต่างกัน เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 240 ชั่วโมง

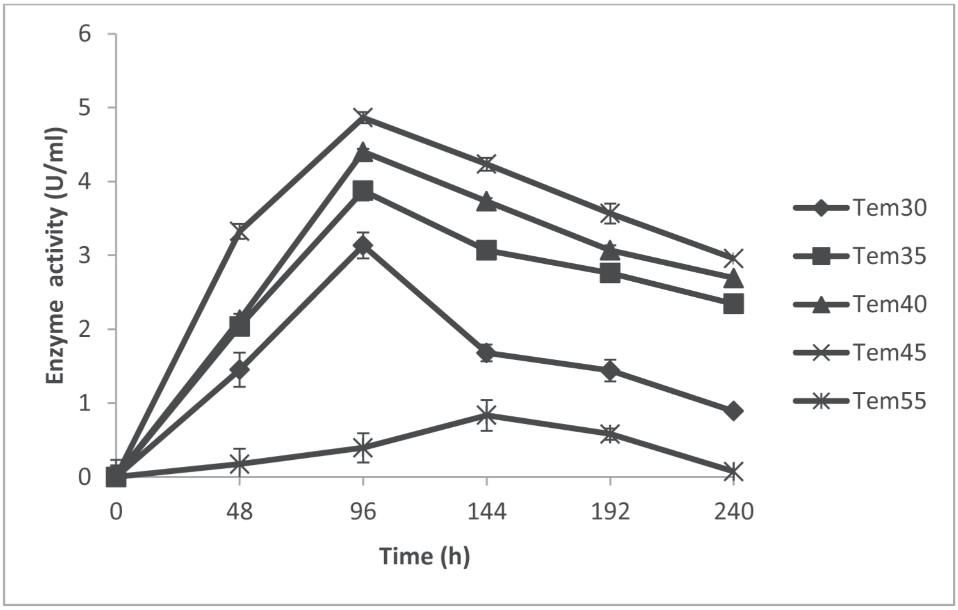
### 2.2 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสม

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ PHBV depolymerase จากสายพันธุ์ TF1 พบว่า สายพันธุ์ TF1 สามารถผลิตเอนไซม์ PHBV depolymerase ได้ดีที่สุดเมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมงซึ่งมีการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 4.86 ± 0.1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ 40 และ 35 องศาเซลเซียส มีการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 4.4 ± 0.08 และ 3.87 ± 0.04 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 3) โดยพบว่าเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นเป็น 55 องศาเซลเซียสความสามารถในการผลิตเอนไซม์ PHBV depolymerase ลดลง (รูปที่ 3) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Shah และคณะ [7] ศึกษา *S. kashmirense* AF1 Nadhman และคณะ [8] ศึกษา *Aspergillus* sp. NA-25 และ Akbar และคณะ [3] ศึกษา *Streptomyces* sp. AF-111 ซึ่งพบว่าที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ PHBV depolymerase ได้ดีที่สุด

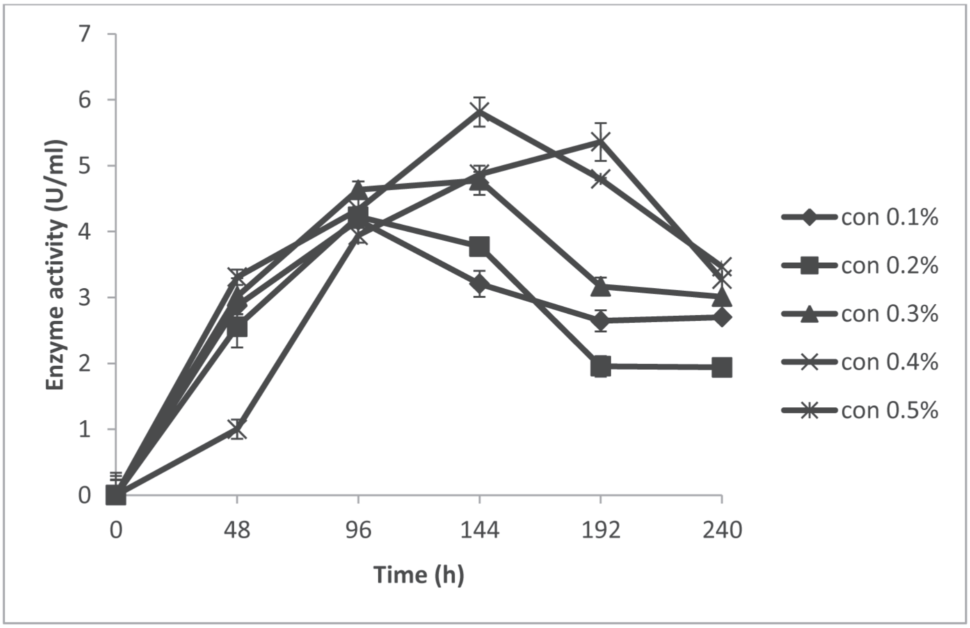
### 2.3 ผลของความเข้มข้นของ PHBV ที่เหมาะสม

จากการศึกษาผลของความเข้มข้น PHBV ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ PHBV depolymerase จากสายพันธุ์ TF1 พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ PHBV depolymerase ได้ดีที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยความเข้มข้น PHBV ที่ 0.4 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร เป็นเวลา 144 ชั่วโมง การทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 5.81 ± 0.22 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ 0.5 และ 0.3 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร การทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 3.94 ± 0.14 และ 4.77 ± 0.12 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 4) เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสับสเตรทมากเกินระดับที่เหมาะสมต่อความต้องการของเอนไซม์จะมีผล

ทำให้ไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ *Bacillus* sp. AF3 สามารถผลิตเอนไซม์ PHBV depolymerase ได้ดีที่สุดที่ความเข้นข้น PHBV 0.4% เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร Nadhman และคณะ [8] ศึกษา *Aspergillus* sp. NA-25 และ Sanyal และคณะ [15] ศึกษา *Aspergillus* spp. พบว่าเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ PHBV depolymerase ได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้น PHBV เท่ากับ 0.2 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร Shah และคณะ [7] พบว่า *S. kashmirense* AF1 สามารถผลิตเอนไซม์ PHBV depolymerase ได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้น PHBV เท่ากับ 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร ศักยภาพของการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพโดยจุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างกันความต้องการสารอาหารในการผลิตเอนไซม์แตกต่างกัน



**รูปที่ 3** ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ PHBV depolymerase จากสายพันธุ์ TF1 ในระยะเวลา 240 ชั่วโมง เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว basal medium ที่มี PHBV ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร ที่ค่าพีเอช 8 เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิแตกต่างกันเป็นเวลา 240 ชั่วโมง



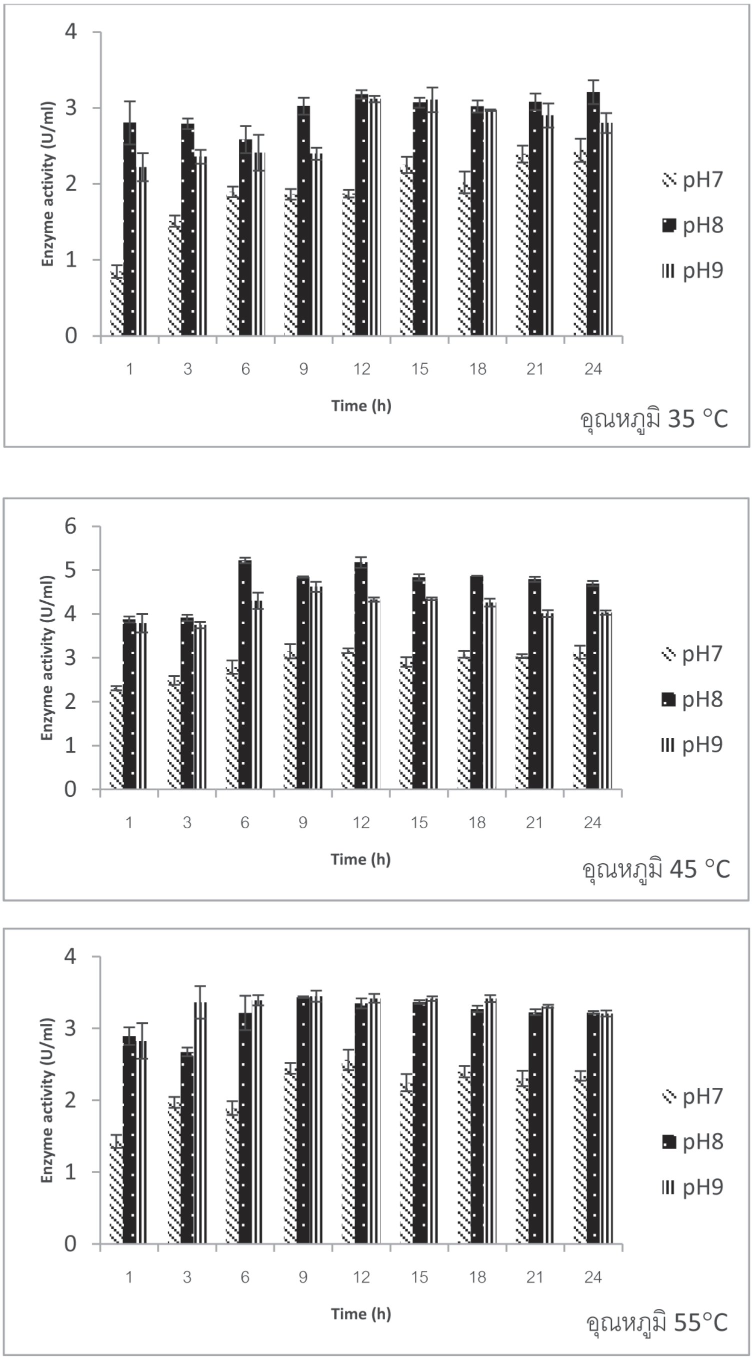
**รูปที่ 4** ผลของความเข้มข้น PHBV ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ PHBV depolymerase เมื่อเลี้ยงสายพันธุ์ TF1 ในอาหารเหลว basal medium ที่มี PHBV ความเข้มข้นแตกต่างกัน ที่ค่าพีเอช 8 เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 240 ชั่วโมง

### 3. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการวัดการทำงานของเอนไซม์ที่ย่อยสลาย PHBV

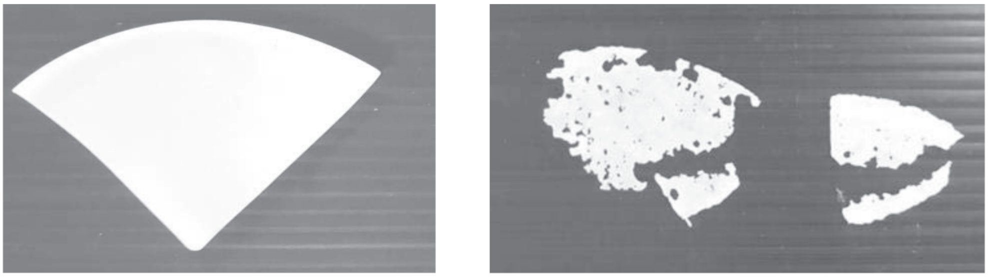
ในการวัดการทำงานของเอนไซม์ PHBV depolymerase จากสายพันธุ์ TF1 พบว่าเอนไซม์ทำงานได้ดีในสับสเตรท PHBV ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร ในสารละลายบัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl ที่มีค่าพีเอช 8 บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง วัดการทำงานของเอนไซม์ได้เท่ากับ 5.22 ± 0.06 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 5) จึงเป็นค่าที่เหมาะสมในการนำมาใช้หาค่าการทำงานของเอนไซม์ซึ่งใช้เวลาการบ่มน้อยกว่าวิธีที่เคยมีรายงานมาก่อนหน้านี้ Shah และคณะ [1] ผลิตเอนไซม์ PHBV depolymerase จากเชื้อ *Bacillus* sp. AF3 นำมาบ่มกับสับสเตรท PHBV 0.3 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตรละลายใน 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl ที่ค่าพีเอช 7.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดการทำงานของเอนไซม์ได้เท่ากับ 0.24 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และในปี 2010 Shah และคณะ [11] ศึกษาการย่อยสลาย PHBV จากเชื้อ *Actinomadura* sp. AF-555 ที่แยกได้จากดิน วัดการทำงานของเอนไซม์ได้ 1.102 ยูนิตต่อมิลลิลิตรซึ่งบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบเชื้อในจีนัสเดียวกันพบว่าสายพันธุ์ TF1 มีศักยภาพที่ดีในการผลิตเอนไซม์ PHBV depolymerase และเอนไซม์ยังทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูงถึง 45 องศาเซลเซียส จึงสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ดีในการย่อยสลายในคอมโพสต์

## 4. การศึกษาการย่อยสลายแผ่นฟิล์มพลาสติก PHBV โดยการฝังดิน

การศึกษาการย่อยสลายแผ่นฟิล์มพลาสติก PHBV จากสายพันธุ์ TF1 เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ โดยการเปรียบเทียบน้ำหนักของแผ่นฟิล์มพลาสติก PHBV ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง ก่อนการฝังดินชั่งน้ำหนักแผ่นฟิล์มได้เท่ากับ 0.25 กรัม เมื่อนำไปฝังดินและเก็บในสัปดาห์ที่ 1 และ 2 พบว่าแผ่นฟิล์มจากกลุ่มทดลองชั่งน้ำหนักได้เท่ากับ 0.11 กรัม และ 0.03 กรัมตามลำดับ ดังนั้นแผ่นฟิล์มในกลุ่มทดลองน้ำหนักลดลง 56 เปอร์เซ็นต์ และ 88 เปอร์เซ็นต์ภายหลังจากฝังดิน 1 และ 2 สัปดาห์ตามลำดับ (รูปที่ 6) นอกจากนี้เมื่อสังเกตลักษณะของแผ่นฟิล์มพลาสติกพบว่าแผ่นฟิล์มในกลุ่มทดลองถูกย่อยสลายให้มีขนาดเล็กลง บางลง เป็นชิ้นเล็กๆ มีรูพรุนเกิดขึ้น และมีบางส่วนที่ถูกย่อยสลายไปแสดงว่าสายพันธุ์ TF1 ปลดปล่อยเอนไซม์เพื่อมาย่อยสลายแผ่นพลาสติกจึงทำให้น้ำหนักแผ่นฟิล์มลดลง การย่อยสลายบนแผ่นฟิล์มขึ้นอยู่กับประชากรและการกระจายตัวของจุลินทรีย์ที่เจริญบนผิวหน้า (surface) แผ่นฟิล์ม ในงานวิจัยของ Wang และคณะ [16] ศึกษาการย่อยสลายแผ่นฟิล์มพลาสติก PHBV จาก *Acidovorax* sp. HB01 พบว่าน้ำหนักของแผ่นฟิล์มหายไปเกือบ 100 เปอร์เซ็นต์ภายใน 32 ชั่วโมง Kuntanoo และคณะ [17] ศึกษาการย่อยสลายแผ่นฟิล์มพลาสติก PHBV โดยการฝังดินพบว่าใช้ระยะเวลาการย่อยสลาย 45 วันน้ำหนักของแผ่นฟิล์มหายไป 20 เปอร์เซ็นต์ เมื่อสังเกตการเปลี่ยนแปลงลักษณะภายนอกบนแผ่นฟิล์มพลาสติก PHBV โดยการสังเกตบริเวณผิวหน้าแผ่นฟิล์มพลาสติกด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดพบว่าแผ่นฟิล์มพลาสติก PHBV ในกลุ่มควบคุมมีลักษณะค่อนข้างเรียบ และไม่มีรูพรุน สำหรับแผ่นฟิล์มพลาสติกในกลุ่มทดลองพบว่ามีลักษณะผิวหน้าที่ขรุขระมีรูพรุนเกิดขึ้นเป็นจำนวนมากมีทั้งขนาดเล็กและขนาดใหญ่ มีรอยเว้าหรือลักษณะเป็นโพรงเกิดขึ้นบนพื้นผิวของแผ่นฟิล์ม (รูปที่ 7) แสดงว่ามีกระบวนการย่อยสลายเกิดขึ้นซึ่งเป็นผลมาจากสายพันธุ์ TF1 ที่เกาะบริเวณพื้นผิวหน้าของแผ่นฟิล์มทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติและส่วนประกอบพื้นฐานของพอลิเมอร์ ผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Mabrouk และคณะ [18] ศึกษาการย่อยแผ่นฟิล์มพลาสติก PHBV โดย *Streptomyces* sp. SNG9 Sang และคณะ [19] ศึกษาการย่อยแผ่นฟิล์มพลาสติก PHBV โดย *Paecilomyces lilacinus* F4-5 Goncalves และคณะ [20] ศึกษาการย่อยสลายแผ่นฟิล์มพลาสติก PHBV ด้วยจุลินทรีย์ที่อยู่ในดิน Shah และคณะ [11] ศึกษาการย่อยสลายแผ่นฟิล์มพลาสติก PHBV โดย *Actinomadura* sp. AF-555 Wang และคณะ [16] ศึกษาการย่อยแผ่นฟิล์มพลาสติก PHBV ด้วย *Acidovorax* sp. HB01 และ Kuntanoo และคณะ [17] ศึกษาการย่อยแผ่นฟิล์มพลาสติก PHBV ด้วยจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในดิน

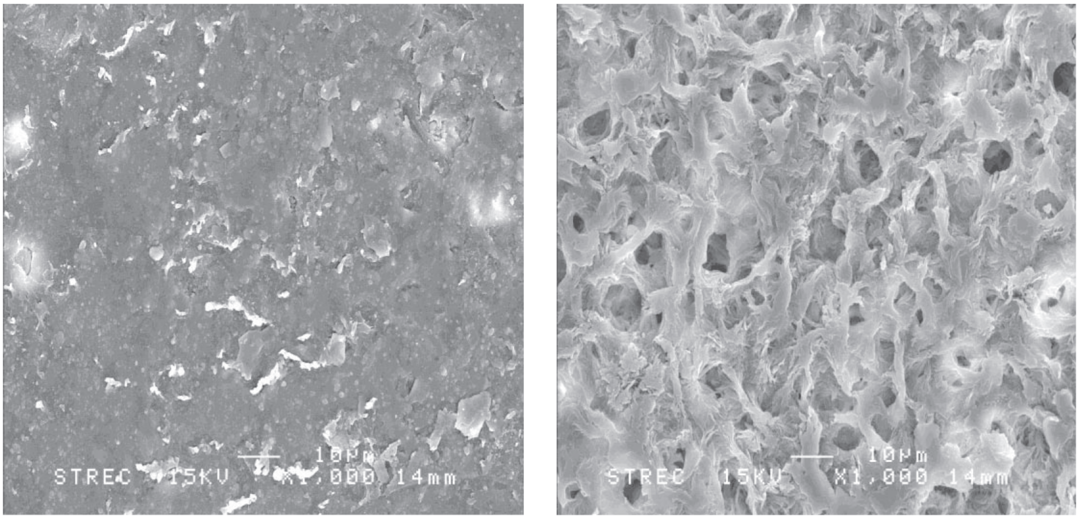


**รูปที่ 5** การหาสภาวะที่เหมาะสมในการวัดการทำงานของเอนไซม์ PHBV depolymerase โดยเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ TF1 ในสภาวะที่เหมาะสม นำส่วนใสมาวัดการทำงานของเอนไซม์โดยเตรียมสับสเตรท PHBV ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร ในสารละลายบัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl ที่มีค่าพีเอช 7, 8 และ 9 จากนั้นเตรียม reaction mixture นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 35, 45 และ 55 องศาเซลเซียส ระยะเวลาที่ใช้ในการบ่มได้แก่ 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 และ 24 ชั่วโมง



(ก) (ข) (ค)

**รูปที่ 6** การย่อยสลายแผ่นฟิล์มพลาสติก PHBV โดยสายพันธุ์ TF1 ด้วยการฝังดินเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ (ก) แผ่นฟิล์มพลาสติก PHBV ในกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการใส่เชื้อสายพันธุ์ TF1 ลงไปในดิน (ข) แผ่นฟิล์มพลาสติก PHBV ที่ฝังดินระยะเวลา 1 สัปดาห์ และ (ค) แผ่นฟิล์มพลาสติก PHBV ที่ฝังดินระยะเวลา 2 สัปดาห์



(ก) (ข)

**รูปที่ 7** ลักษณะแผ่นฟิล์มพลาสติก PHBV ที่ผ่านการย่อยสลายโดยสายพันธุ์ TF1 ด้วยการฝังดินเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (ก) แผ่นฟิล์มพลาสติก PHBV ในกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการใส่เชื้อสายพันธุ์ TF1 (ข) แผ่นฟิล์มพลาสติก PHBV ในกลุ่มทดลองที่มีการใส่เชื้อสายพันธุ์ TF1 ลงไปในดิน

## สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้พบว่า *Actinomadura* sp. สายพันธุ์ TF1 สามารถย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ PHBV จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ PHBV depolymerase พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ basal medium ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ประกอบด้วย 0.4 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร PHBV ปรับพีเอช 8 อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 144 ชั่วโมง สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดเท่ากับ 5.81 ± 0.22 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการวัดการทำงานของเอนไซม์

พบว่า เอนไซม์สามารถทำงานได้ดีที่พีเอช 8 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาในการบ่ม 6 ชั่วโมง เมื่อศึกษาการย่อยสลายบนแผ่นฟิล์มพลาสติก PHBV ด้วยสายพันธุ์ TF1 โดยการฝังดินเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์พบว่าแผ่นฟิล์มมีน้ำหนักลดลง 88 เปอร์เซ็นต์ มีลักษณะการกัดกร่อนและรูพรุนเกิดขึ้นชัดเจนเมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน จากผลการทดลองนี้สามารถต่อยอดงานวิจัยในการศึกษาการทำบริสุทธิ์เอนไซม์และคุณสมบัติของเอนไซม์ต่อไป

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2559 มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ (สัญญาวิจัยเลขที่ 006/2559) และขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒที่ให้การสนับสนุนทำวิจัยให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

## เอกสารอ้างอิง

1. Shah, A. A., Hasan, F., Hameed, A., and Ahmed, S. 2007. Isolation and Characterization of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) Degrading Bacteria and Purification of PHBV Depolymerase from Newly Isolated *Bacillus* sp. AF3. *International Biodeterioration & Biodegradation.* 60: 109-115.
2. Sathya, R., Ushadev, T., and Panneerselvam, A. 2012. Plastic Degrading Actinomycetes Isolated from Mangrove Sediments. *International Journal of Current Research.* 4: 1-3.
3. Akbar, S., Hasan, F., Nadhman, A., Khan, S., and Shah, A. A. 2013. Production and Purification of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) Degrading Enzyme from *Streptomyces* sp. AF-111. *Journal of Polymers and the Environment.* 21: 1109-1116.
4. Yan, W., Fan, L., Zhan-yong, W., Dong-bo, L., Hong-mei, X., Ling-fei, L., and Shan, C. 2012. Purification and Properties of an Extracellular Polyhydroxybutyrate Depolymerase from *Pseudomonas mendocina* DSWY0601. *Chemical Research in Chinese Universities.* 28: 459-464.
5. Reddy, C. S. K., Ghai, R., Rashmi, and Kalia, V. C. 2003. Polyhydroxyalkanoates: an Overview. *Bioresource Technology.* 87: 137-146.
6. Wang, Y., Chen, R., Cai, J., Liu, Z., Zheng, Y., Wang, H., Li, Q., and He, N. 2013. Biosynthesis and Thermal Properties of PHBV Produced from Levulinic Acid by *Ralstonia eutropha.* PLoS ONE. 8: 1-8.
7. Shah, A. A., Hasan, F., Hameed, A., and Ahmed, S. 2007. Isolation and Characterization of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) Degrading Actinomycetes and Purification of PHBV Depolymerase from Newly Isolated *Streptoverticillium kashmirense* AF1. *Annals of Microbiology.* 57: 583-588.

8. Nadhman, A., Hasan, F., Shah, Z., Hameed, A., and Shah, A. A. 2012. Production of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) Depolymerase from *Aspergillus* sp. NA25. *Applied Biochemistry and Microbiology.* 48: 531-536.

9. Sriyapai, T., Siripoke, S., Chansiri, K., Petchwattana, N., and Somyoonsap, P. 2014. Optimization for Production of Aliphatic Polyester-Degrading Enzyme from *Actinomadura* sp. Strain TF1. *Srinakharinwirot Science Journal.* 30: 103-118.

10. Nishida, H., and Tokiwa, Y. 1993. Distribution of Poly(β-hydroxybutyrate) and Poly (ε-caprolactone) Aerobic Degrading Microorganisms in Different Environments. *Journal of Environmental Polymer Degradation.* 1: 227-233.

11. Shah, A. A., Hasan, F., and Hameed, A. 2010. Degradation of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by a Newly Isolation *Actinomadura* ap. AF-555, from Soil. *International Biodeterioration & Biodegradation.* 64: 281-285.

12. Tseng, M., Yang, S.-F., Hoang, K.-C., Liao, H.-C., Yuan, G.-F., and Liao, C.-C. 2009. *Actinomadura miaoliensis* sp. nov., a Thermotolerant Polyester-Degrading Actinomycete. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 59: 517-520.

13. Sukkhum, S., Tokuyama, S., Tamura, T., and Kitpreechavanich, V. 2009. A Novel Poly (L-lactide) Degrading Actinomycetes Isolated from Thai Forest Soil, Phylogenic Relationship and the Enzyme Characterization. *Journal of General and Applied Microbiology.* 55: 459-467.

14. Somyoonsap, P., Sriyapai, T., Siripoke, S., Chansiri, K. 2011. Isolation and Selection of a Thermophilic Polycaprolactone Degrading Actinomycete, *Actinomadura* sp. Strain S14. *Srinakharinwirot Science Journal.* 27: 229-243.

15. Sanyal, P., Samaddar, P., and Paul, A. K. 2006. Degradation of Poly(3-hydroxybutyrate) and Poly (3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalerate) by Some Soil *Aspergillus* spp. *Journal of Polymers and the Environment.* 14: 257-263.

16. Wang, Z., Gao, J., Li, L., and Jiang, H. 2012. Purification and Characterization of an Extracellular Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) Depolymerase from *Acidovorax* sp. HB01. *World Journal Microbiology Biotechnology.* 28: 2395-2402.

17. Kuntanoo, K., Promkotra, S., and Kaewkannetra, P. 2013. Biodegradation of Polyhydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate (PHBV) Blended with Natural Rubber in Soil Environment. *International Scholarly and Scientific Research & Innovation.* 7: 1057-1061.

18. Mabrouk, M., M., and Sabry, S., A. 2001. Degradation of Poly (3-hydroxybutyrate) and Its Copolymer Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by a Marine *Streptomyces* sp. SNG9. *Microbiological Research.* 156: 323-335.

19. Sang, B-I., Lee, W-K., Hori, K., and Unno, H. 2006. Purification and Characterization of Fungal Poly(3-hydroxybutyrate) Depolymerase from *Paecilomyces lilacinus* F4-5 and Enzymatic Degradation of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) Film. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 22: 51-57.
20. Goncalves, S. P. C., Martins-Franchetti, S. M. and Chinaglia, D. L. 2009. Biodegradation of the Films of PP, PHBV and Its Blend in Soil. *Journal of Polymers and the Environment.* 17: 280-285.

*ได้รับบทความวันที่ 25 สิงหาคม 2559*
*ยอมรับตีพิมพ์วันที่ 19 ตุลาคม 2559*