

การทำให้บริสุทธิ์และคุณสมบัติของเอนไซม์พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต)
ดีพอลิเมอร์จาก *Actinomadura* sp. สายพันธุ์ TF1



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

ธันวาคม 2559

การทำให้บริสุทธิ์และคุณสมบัติของเอนไซม์พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต)
ดีพอลิเมอร์จาก *Actinomadura* sp. สายพันธุ์ TF1



ปริญญานิพนธ์
ของ
วิชุดา พรหมคงบุญ

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

ธันวาคม 2559

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การทำให้บริสุทธิ์และคุณสมบัติของเอนไซม์พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต)
ดีพอลิเมอร์จาก *Actinomadura* sp. สายพันธุ์ TF1



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา
ธันวาคม 2559

วิชุดา พรหมคงบุญ. (2559). การทำให้บริสุทธิ์และคุณสมบัติของเอนไซม์พอลิ (3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต)ดีพอลิเมอร์จาก *Actinomadura* sp. สายพันธุ์ TF1. ปริญญา
นิพนธ์ กศ.ม. (ชีววิทยา). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
คณะกรรมการควบคุม: ผศ ดร.พิชามัก ศรียาภัย, ผศ ดร.ทนายาท ศรียาภัย,

Actinomadura sp. สายพันธุ์ TF1 สามารถย่อยสลาย PHBV ได้ดีที่สุด โดยสังเกตจากวงใส
ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายพอลิเมอร์ที่ประกอบในอาหารแข็ง basal medium การทำงานสูงสุดของ
เอนไซม์ PHBV depolymerase เท่ากับ 5.81 ± 0.22 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการ
ผลิตเอนไซม์เมื่อเลี้ยงในอาหาร basal medium คือ พีเอช 8 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ที่มีความ
เข้มข้นของสับสเตรท PHBV 0.4 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร ในการศึกษาการย่อยสลายแผ่นฟิล์ม
PHBV โดยฝังดินเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสพบว่าแผ่นฟิล์มที่ฝังดินร่วมกับ
สายพันธุ์ TF1 น้ำหนักลดลงไป 86.67 ± 2.31 เปอร์เซ็นต์ เอนไซม์ PHBV depolymerase ถูกผลิต
ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมและนำเอนไซม์มาทำให้บริสุทธิ์โดยตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต
ไดอะไลซิส และโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออนโดยใช้คอลัมน์ DEAE พบว่าเอนไซม์มีค่า
กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 463.7 ± 4.4 ยูนิต์ต่อมิลลิกรัมโปรตีน ให้ผลผลิตร้อยละ 49.9 และม
ีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 2.8 เท่า การทำ SDS-PAGE พบว่า PHBV depolymerase มีน้ำหนักโมเลกุล
ประมาณ 35 กิโลดาลตัน ผลของอุณหภูมิ พีเอช ความจำเพาะต่อสับสเตรท โลหะหนัก สารเคมี และ
สารที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์จะถูกทดสอบการศึกษาสมบัติของ PHBV depolymerase พบว่า
อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ คือ 45 องศาเซลเซียส และเอนไซม์มีความเสถียรที่
อุณหภูมิ 35-45 องศาเซลเซียส พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ คือ 8 และเอนไซม์มีความ
เสถียรที่ค่าพีเอช 8-9 การศึกษาสับสเตรทที่จำเพาะพบว่า PHBV depolymerase มีความจำเพาะต่อ
PHBV, PLA, PLLA, casein และ gelatin การเติม Na^+ และ K^+ ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ มีผลใน
การส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ แต่ Fe^{2+} และ Hg^{2+} ที่ความเข้มข้น 1 และ 5 มิลลิโมลาร์ และ Cu^{2+}
ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ β -mercaptoethanol และ Triton X-
100 มีผลเพียงเล็กน้อยต่อการทำงานของเอนไซม์ แต่ Tween 80 และ CTAB มีผลเป็นตัวยับยั้งการ
ทำงานของเอนไซม์ และการศึกษาผลของตัวยับยั้งพบว่าเอนไซม์ PHBV depolymerase สามารถถูก
ยับยั้งโดย EDTA, PMSF และ DTT ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ดังนั้นเอนไซม์ PHBV
depolymerase จากสายพันธุ์ TF1 เป็นโปรตีนเอนไซม์

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF POLY(3-HYDROXYBUTYRATE-CO-3-HYDROXYVALERATE) DEPOLYMERASE FROM *Actinomadura* sp. STRAIN TF1



Presented in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Master of Education Degree in Biology
at Srinakharinwirot University
December

Wichuda Promkongboon. (2016). *Purification and Characterization of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) depolymerase from Actinomadura sp. Strain TF1*. Master thesis, M.Ed. (Biology). Bangkok: Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee: Assistant Professor Pichapak Sriyapai, Ph.D.; Assistant Professor Thayat Sriyapai, Ph.D.

Actinomadura sp. strain TF1 demonstrated a high level of activity to degrade PHBV, based on clear zone formation on an emulsified PHBV basal medium agar plate at 45 °C. Strain TF1 showed the highest amount of activity of PHBV depolymerase which was 5.81 ± 0.22 U/ml. Maximum production of PHBV depolymerase in basal medium was observed at pH 8, 45 °C and 0.4% (w/v) substrate concentration of PHBV. The PHBV film was degraded by the action of strain TF1, after soil burial for two weeks at 45 °C. The results showed that PHBV film buried in soil with strain TF1 lost weight $86.67 \pm 2.31\%$. The PHBV depolymerase was produced under optimized conditions and purified through ammonium sulphate, dialysis and ion exchange (DEAE) column chromatography. The purified enzyme exhibited a specific activity of 463.7 ± 4.4 units/mg proteins, while the yield and purification fold were 49.9 and 2.8, respectively. The molecular weight of the purified PHBV depolymerase, as determined by SDS-PAGE, was approximately 35 kDa. The effects of temperature, pH, substrate specificity, metal ions, reagents and inhibitors on PHBV depolymerase activity were determined. The optimum enzyme activity was exhibited at temperature of 45 °C with thermal stability in a range of 35-45 °C and a pH of 8.0 with stability in the range of 8-9. The PHBV depolymerase was strongly active against specific substrates such as PHBV, PLA, PLLA, casein and gelatin. The addition of 1 mM Na^+ and K^+ increased the PHBV depolymerase activity, whereas the PHBV depolymerase activity was inhibited by 1 and 5 mM Fe^{2+} and 5 mM Cu^{2+} . β -mercaptoethanol and Triton X-100 had a negligible influence on enzyme activity, but Tween 80 and CTAB caused inhibition. The inhibitors EDTA, PMSF and DTT strongly inhibited enzyme activity by 10 mM. Therefore, The PHBV depolymerase from strain TF1 is protease.

ปริญญาานิพนธ์

เรื่อง

การทำให้บริสุทธิ์และคุณสมบัติของเอนไซม์พอลิ(3-ไฮดรอกซีบีวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต)

ดีพอลิเมอร์จาก *Actinomadura* sp. สายพันธุ์ TF1

ของ

วิชุดา พรหมคงบุญ

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)

วันที่.....เดือน พ.ศ. 2559

อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญาานิพนธ์

คณะกรรมการสอบปากเปล่า

.....ที่ปรึกษาหลัก

.....ประธาน

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิชาภัค ศรียาภัย)

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สมเกียรติ พรพิสุทธิมาศ)

.....ที่ปรึกษาร่วม

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทนายท ศรียาภัย)

(อาจารย์ ดร.มนตรี ยะสาวงษ์)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิชาภัค ศรียาภัย)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทนายท ศรียาภัย)

ประกาศคุณูปการ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิชาภัค ศรียาภักย์ อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทนายาท ศรียาภักย์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ทุ่มเทและสละเวลาเพื่อให้คำปรึกษาอย่างเต็มที่ ช่วยชี้แนะแนวทางในการดำเนินการวิจัย จนบริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สมเกียรติ พรพิสุทธิมาศ ดร.มนตรี ยะสาวงษ์ ดร.สุชมาภรณ์ กระจำงสังข์ ดร.ณัฐฐิกา สุวรรณาศรัย และดร.อนิษฐาน ศรีนวล ที่กรุณาแนะนำให้ข้อเสนอแนะต่างๆ ที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัยชิ้นนี้

ขอกราบขอบพระคุณสถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สสวท.) ที่กรุณาให้ทุนสนับสนุนในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณนางสาวฐิติมา เชื้อรุ่ง และนางสาวอรจิรา เตชะวรวัักษ์ สำหรับมิตรภาพ คำปรึกษาแนะนำต่างๆ ความช่วยเหลือ และน้ำใจอันมีค่ายิ่ง

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณบิดา และมารดาที่คอยสนับสนุน ให้ความช่วยเหลือ สร้างกำลังใจให้สามารถผ่านอุปสรรคต่างๆ จนบริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

วิชุดา พรหมคงบุญ

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง.....	1
ความมุ่งหมายของการวิจัย.....	3
ขอบเขตของการวิจัย.....	4
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
พลาสติกชีวภาพ.....	5
พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต.....	9
พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทีเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาลเอร์เรต).....	12
เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PHBV.....	14
Actinomadura.....	17
จุลินทรีย์ที่ย่อยสลาย PHBV.....	18
การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์.....	20
งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการทำเอนไซม์ PHBV depolymerase ให้บริสุทธิ์.....	26
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	29
อุปกรณ์และสารเคมี.....	29
วิธีการดำเนินการวิจัย.....	32
การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพชนิดต่างๆ จากเชื้อ	
Actinomadura sp. สายพันธุ์ TF1.....	33
การศึกษาการย่อยสลายแผ่นฟิล์มพลาสติก PHBV โดยการฝังดิน.....	33
การผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพจากเชื้อ Actinomadura sp. สายพันธุ์	
TF1 ในอาหารเหลว.....	34
การวัดการทำงานของเอนไซม์ที่ย่อยสลาย PHBV และการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน..	35

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
3 (ต่อ)	
การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PHBV จาก	
<i>Actinomadura</i> sp. สายพันธุ์ TF1.....	35
การหาค่าพีเอชที่เหมาะสม.....	36
การหาอุณหภูมิที่เหมาะสม.....	36
การหาความเข้มข้นของ PHBV ที่เหมาะสม.....	36
การหาสภาวะที่เหมาะสมในการวัดการทำงานของเอนไซม์ที่ย่อยสลาย PHBV.....	36
การทำเอนไซม์ย่อยสลาย PHBV ให้บริสุทธิ์ และการหาขนาดโมเลกุลโปรตีน.....	37
การเลี้ยงเชื้อ <i>Actinomadura</i> sp. สายพันธุ์ TF1 เพื่อผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลาย PHBV.....	37
การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต.....	37
การกำจัดเกลือโดยการไดอะไลซิส.....	38
การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน.....	38
การตรวจสอบหาความบริสุทธิ์และน้ำหนักมวลโมเลกุลของเอนไซม์ด้วยวิธี sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).....	38
การศึกษากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ด้วยวิธีไซโมแกรม (zymogram).....	39
การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ที่ย่อยสลาย PHBV.....	39
ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์.....	39
ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์.....	39
การศึกษาคความเสถียรของเอนไซม์ที่ค่าพีเอชต่างๆ.....	40
การศึกษาคความเสถียรของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆ.....	40
การศึกษาลับสเตรทที่จำเพาะต่อเอนไซม์.....	40
การศึกษาคผลของตัวยับยั้งที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์.....	41
การศึกษาคผลของสารเคมีที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์.....	42
การศึกษาคผลของไอออนโลหะที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์.....	42

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
4 ผลการทดลอง.....	43
การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพชนิดต่างๆ จาก	
<i>Actinomadura</i> sp. สายพันธุ์ TF1.....	43
การศึกษาการย่อยสลายแผ่นฟิล์มพลาสติก PHBV โดยการฝังดิน.....	44
การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PHBV จาก <i>Actinomadura</i> sp.	
สายพันธุ์ TF1.....	47
การหาค่าพีเอชที่เหมาะสม.....	47
การหาอุณหภูมิที่เหมาะสม.....	48
การหาความเข้มข้นของ PHBV ที่เหมาะสม.....	49
การหาสภาวะที่เหมาะสมในการวัดการทำงานของเอนไซม์ที่ย่อยสลาย PHBV.....	50
การทำเอนไซม์ย่อยสลาย PHBV ให้บริสุทธิ์ และการหาขนาดโมเลกุลของโปรตีน.....	52
การตรวจสอบหาความบริสุทธิ์และน้ำหนักมวลโมเลกุลของเอนไซม์ด้วยวิธี sodium	
dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).....	54
การศึกษาการทำงานของเอนไซม์ด้วยวิธีไซโมแกรม (zymogram).....	55
การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ที่ย่อยสลาย PHBV.....	56
ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์.....	56
ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์.....	57
การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ที่ค่าพีเอชต่างๆ.....	58
การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆ.....	59
การศึกษาสับสเตรทที่จำเพาะต่อเอนไซม์.....	60
การศึกษาผลของตัวยับยั้งที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์.....	61
การศึกษาผลของสารเคมีที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์.....	62
การศึกษาผลของไอออนโลหะที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์.....	63

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
5 สรุป อภิปราย และข้อเสนอแนะ.....	65
บรรณานุกรม.....	74
ภาคผนวก.....	83
ภาคผนวก ก.....	84
ภาคผนวก ข.....	87
ภาคผนวก ค.....	89
ภาคผนวก ง.....	93
ภาคผนวก จ.....	95
ประวัติย่อผู้วิจัย.....	98

บัญชีตาราง

ตาราง	หน้า
1 ตัวอย่างเม็ดยาที่ใช้ในโครมาโทกราฟีแบบเจลฟิลเตรชัน.....	23
2 ตัวอย่างเรซินของ stationary phase ในโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน.....	24
3 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง.....	29
4 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง.....	30
สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง (ต่อ).....	31
5 ขนาดบริเวณสีที่เกิดจากการเลี้ยงสายพันธุ์ TF1 บนอาหารแข็งพลาสติกชีวภาพ โดย บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน.....	43
6 ผลการวิเคราะห์หรือลดการย่อยสลายของแผ่นฟิล์ม PHBV (โดยน้ำหนัก).....	45
7 การทำบริสุทธิ์เอนไซม์ที่ย่อยสลาย PHBV จากสายพันธุ์ TF1.....	53
8 สับสเตรทที่จำเพาะต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ PHBV จากสายพันธุ์ TF1.....	60
9 ผลของตัวยับยั้งที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ PHBV จากสายพันธุ์ TF1.....	61
10 ผลของสารเคมีที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ PHBV จากสายพันธุ์ TF1.....	62
11 ผลของไอออนโลหะที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ PHBV จากสายพันธุ์ TF1.....	63
12 ปริมาณสารที่ใช้ในการเตรียมสารละลายมาตรฐาน (BSA).....	90
13 น้ำหนักของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต (กรัม) ที่ใช้เติมในสารละลาย 1 ลิตรที่เปอร์เซ็นต์ จุดอิ่มตัวแตกต่างกัน.....	94

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 การสังเคราะห์ PCL โดยการเปิดวงแหวนพอลิเมอร์ของ ϵ -Caprolactone.....	5
2 การสังเคราะห์ PBS จากกรดซัคซินิกและ 1,4-บิวเทนไดออล.....	6
3 การสังเคราะห์ PBSA จาก 1,4-บิวเทนไดออล กรดซัคซินิกและกรดอะดิพิค.....	7
4 การสังเคราะห์ PLA จาก L-Lactic acid และ D-Lactic acid.....	8
5 การสะสมแกรนูล PHA ภายในเซลล์ของแบคทีเรีย.....	9
6 สูตรโครงสร้างของ PHAs.....	10
7 โครงสร้างทางเคมีของ PHBV ที่เกิดจากการรวมกันของ HB และ HV.....	13
8 วิธีการสังเคราะห์ PHBV.....	14
9 กลไกการย่อยพลาสติกชีวภาพโดยจุลินทรีย์.....	15
10 แผนผังแบบจำลองการย่อยสลาย PHBV โดยเอนไซม์ในพื้นธะเอสเทอร์.....	16
11 การเกิดบริเวณใสของสายพันธุ์ TF1 บนอาหารแข็งพลาสติกชีวภาพชนิดต่างๆ ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน.....	44
12 รูปการย่อยสลายแผ่นฟิล์มพลาสติก PHBV โดยสายพันธุ์ TF1 ด้วยการฝังดินเป็น ระยะเวลา 2 สัปดาห์.....	46
13 ลักษณะของแผ่นพลาสติก PHBV ที่ผ่านการย่อยสลายโดยสายพันธุ์ TF1 ด้วยการ ฝังดินเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด...	46
14 ผลของพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ PHBV depolymerase จากสายพันธุ์ TF1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว basal medium ที่มี PHBV ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ โดยมวลต่อปริมาตรปรับค่าพีเอชในอาหารแตกต่างกัน เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 240 ชั่วโมง.....	47
15 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ PHBV depolymerase จากสายพันธุ์ TF1 ในระยะเวลา 240 ชั่วโมง เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว basal medium ที่มี PHBV ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร ที่ค่าพีเอช 8 เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ แตกต่างกัน เป็นเวลา 240 ชั่วโมง.....	48
16 ผลของความเข้มข้น PHBV ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ PHBV depolymerase เมื่อเลี้ยงสายพันธุ์ TF1 ในอาหารเหลว basal medium ที่มี PHBV ความเข้มข้น แตกต่างกันที่ค่าพีเอช 8 เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 240 ชั่วโมง	49

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ

หน้า

17	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 ระยะเวลาที่ใช้ในการบ่ม ได้แก่ 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 และ 24 ชั่วโมง.....	51
18	การทำบริสุทธิ์ของเอนไซม์ที่ย่อยสลาย PHBV จากสายพันธุ์ TF1 โดยทำโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออนโดยใช้คอลัมน์ DEAE เซคอลัมน์ด้วยโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 0-0.5 โมลาร์ ใน 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl พีเอช 8 อัตราการไหล 1 มิลลิลิตร ต่อนาที เก็บตัวอย่างละ 5 มิลลิลิตร.....	52
19	SDS-PAGE ของเอนไซม์ที่ย่อยสลาย PHBV จากสายพันธุ์ TF1.....	54
20	Zymogram ของเอนไซม์ที่ย่อยสลาย PHBV จากสายพันธุ์ TF1.....	55
21	ผลของพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ PHBV	56
22	ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ PHBV.....	57
23	ผลของความเสถียรของเอนไซม์ที่ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ PHBV ที่ค่าพีเอชต่างๆ....	58
24	ผลของความเสถียรของเอนไซม์ที่ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ PHBV ที่ค่าอุณหภูมิต่างๆ	59

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

ปัจจุบันประชากรโลกเพิ่มจำนวนมากยิ่งขึ้นส่งผลให้การใช้พลาสติกมีปริมาณสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องในแต่ละปี จึงทำให้เกิดการสะสมของเหลือทิ้งจากผลิตภัณฑ์พลาสติกในปริมาณมากยิ่งขึ้นทุกวัน จากรายงานล่าสุดของ World Economic Forum คาดการณ์ว่าอนาคตไม่เกินปี ค.ศ. 2050 ขยะพลาสติกในมหาสมุทรและแหล่งน้ำจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นเป็น 13 เมตริกล้านตันต่อปี (สำนักงานนโยบายและแผนทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. 2559) ซึ่งพลาสติกเหล่านี้ส่วนใหญ่ผลิตมาจากสารพวกปิโตรเคมี วิธีการกำจัดขยะพลาสติกเหล่านี้จะใช้วิธีการเผา การฝังกลบ และการนำกลับมาใช้ใหม่ แต่การเผาของขยะพลาสติกจะก่อให้เกิดมลพิษทางอากาศเนื่องจากการสันดาปของพลาสติกนั้นจะปลดปล่อยสารอินทรีย์ที่เป็นพิษสูงในอากาศ (Sathya; Ushadevi; & Panneerselvam. 2012) ส่งผลให้เกิดสภาวะเรือนกระจกที่เกิดจากการปลดปล่อยแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์จำนวนมากในชั้นบรรยากาศ ในขณะเดียวกันการกำจัดขยะพลาสติกโดยวิธีการฝังกลบใช้ระยะเวลานานในการกำจัดเนื่องจากขยะพลาสติกเหล่านี้ย่อยสลายยาก ทนต่อการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ในธรรมชาติ เพราะมีมวลโมเลกุลสูง และเป็นวงแหวนอะโรมาติกเป็นส่วนใหญ่ (Shah; et al. 2007a) ส่วนการกำจัดขยะพลาสติกโดยการนำกลับมาใช้ซ้ำ (reuse) การหมุนเวียนกลับมาใช้ใหม่ (recycle) หรือลดปริมาณการใช้ (reduce) ก็สามารถลดปัญหาได้ในระดับหนึ่ง แต่การนำพลาสติกมาใช้ซ้ำหรือหมุนเวียนนำกลับมาใช้ใหม่นั้น อาจพบปัญหาการปนเปื้อนของพลาสติกที่นำมาใช้ซ้ำหรือหมุนเวียนนำกลับมาใช้ใหม่ โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์ที่เป็นบรรจุภัณฑ์ เมื่อนำมาใช้ซ้ำควรคัดแยกและทำความสะอาดให้ถูกต้องด้วยวิธีการที่เหมาะสมตามวัตถุประสงค์ของการใช้งาน ซึ่งค่อนข้างยุ่งยากและมีค่าใช้จ่ายสูงในการดำเนินการ นอกจากนี้พลาสติกที่นำเข้าสู่กระบวนการหมุนเวียนกลับมาใช้ใหม่ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีคุณภาพด้อยลง อันเนื่องมาจากการเสื่อมสภาพของพอลิเมอร์ที่ผ่านกระบวนการผลิตซ้ำหลายๆ ครั้ง และการแปรสภาพพลาสติกกลับไปเป็นสารตั้งต้น เพื่อนำไปผลิตสารพอลิเมอร์สำหรับผลิตพลาสติกและผลิตภัณฑ์พลาสติกขึ้นมาใหม่ ทำให้ต้นทุนของสารตั้งต้นเพิ่มมากขึ้น จึงส่งผลให้ต้นทุนของผลิตภัณฑ์เพิ่มมากขึ้น และระหว่างการแปรสภาพก็อาจก่อให้เกิดมลพิษทางอากาศหรือทางน้ำได้ (รมณีย์ หวังดีธรรม. 2549) ด้วยสาเหตุเหล่านี้จึงทำให้เกิดการสะสมของขยะพลาสติกเป็นจำนวนมากบนโลก ซึ่งเป็นสาเหตุหลักของมลพิษทางระบบนิเวศและสิ่งแวดล้อม ดังนั้นพลาสติกชีวภาพจึงเป็น

ทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ เพื่อนำมาใช้แทนพลาสติกที่ผลิตมา จากปิโตรเคมี (Akbar; et al. 2013) เนื่องจากพลาสติกชีวภาพเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม

พลาสติกชีวภาพ คือ พลาสติกที่มีคุณสมบัติพิเศษสามารถสลายตัวได้ทางชีวภาพ (compostable) ให้กลายเป็นปุ๋ยหมัก (compost) กลับคืนสู่ดิน พลาสติกชีวภาพแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มหลักตามแหล่งที่มา ได้แก่ 1) พลาสติกที่สังเคราะห์มาจากปิโตรเคมีแต่สามารถย่อยสลายได้โดยจุลินทรีย์ เช่น polycaprolactone (PCL), poly(butylene succinate) (PBS) และ 2) พลาสติกที่สังเคราะห์ได้จากทรัพยากรที่นำกลับมาใช้ใหม่ได้ โดยผ่านกระบวนการเทคโนโลยีชีวภาพการหมักด้วยจุลินทรีย์ เช่น poly(lactide) (PLA), polyhydroxyalkanoates (PHAs) (Tokiwa; et al. 2009) การย่อยสลายทางชีวภาพของพลาสติกเกิดจากการเปลี่ยนพอลิเมอร์ให้กลายเป็นมอนอเมอร์โดยจุลินทรีย์ ซึ่งเกี่ยวข้องกับเอนไซม์อย่างน้อย 2 ชนิด คือ extracellular depolymerase และ intracellular depolymerase ซึ่งถ้าเกิดในสภาวะที่มีออกซิเจนผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้ คือ มวลชีวภาพคาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำ แต่ถ้าเกิดในสภาวะไม่มีออกซิเจนจะได้แก๊สมีเทนเป็นผลิตภัณฑ์เพิ่มอีกตัว (Thakur. 2012) พลาสติกชีวภาพมีประโยชน์เป็นอย่างมาก ได้แก่ การเพิ่มปุ๋ยในดิน การลดการสะสมของขยะพลาสติกจำนวนมากในสิ่งแวดล้อมส่งผลให้ลดปัญหามลพิษทางสิ่งแวดล้อม และการลดต้นทุนในการจัดการขยะพลาสติก

ในทศวรรษที่ผ่านมา การผลิตพลาสติกชีวภาพ polyhydroxyalkanoates (PHAs) มีความน่าสนใจเป็นอย่างมากเนื่องจากเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ (biodegradability) สามารถเข้ากับเนื้อเยื่อของมนุษย์ได้ดี (biocompatibility) สังเคราะห์ได้จากจุลินทรีย์ที่ใช้พืชผลทางการเกษตรเป็นแหล่งคาร์บอน และมีคุณสมบัติการผลิตที่เหมือนกับพลาสติกที่ได้จากปิโตรเคมี (Wang; et al. 2012) จึงได้มีการประยุกต์ใช้ PHAs ในหลายๆ ด้าน เช่น การแพทย์ การเกษตร ทางทะเล บรรจุภัณฑ์ต่างๆ (Shah; et al. 2007b)

PHAs เป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติที่เกิดจากการสังเคราะห์และการสะสมภายในเซลล์ของจุลินทรีย์บางชนิดในระหว่างการเจริญเติบโตที่ไม่สมดุล โดยปริมาณของไนโตรเจน ฟอสเฟต หรือออกซิเจนมีอย่างจำกัด แต่มีแหล่งคาร์บอนมากเกินพอ (Keshavarz; & Roy. 2010) โดย PHAs มีหลายชนิดขึ้นอยู่กับความแตกต่างของหน่วยย่อยมอนอเมอร์ในสายพอลิเมอร์ (Reddy; et al. 2003) ประกอบด้วย homopolymer เช่น poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) ซึ่งเป็นสมาชิกชนิดแรกของ PHAs ที่สังเคราะห์ได้และพบได้มากที่สุด และ copolymer เช่น poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) ซึ่งเกิดจากการรวมกันของหน่วยย่อย 3-hydroxybutyrate (HB) และ 3-hydroxyvalerate (HV) เมื่อเปรียบเทียบสมบัติของ PHB กับ PHBV พบว่า PHBV มีสมบัติทางกายภาพที่ดีกว่า คือ ทนต่อการอัดได้ดีกว่า เหนียว หยัดหยุ่นได้ดี และมีคุณสมบัติอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับ

กระบวนการผลิตที่ดีกว่า (Yuanpeng; et al. 2013) ดังนั้น PHBV จึงได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก ในทางการค้าสำหรับการผลิตในขนาดใหญ่ของพลาสติกทึบร้อนที่ย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ (Shah; et al. 2007b) นอกจากนี้การย่อยสลาย PHBV ก็เป็นสิ่งสำคัญเช่นกันสำหรับการจัดการขยะพลาสติก ชีวภาพให้มีความเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม อัตราการย่อยสลายของ PHBV ขึ้นอยู่กับประชากรของ จุลินทรีย์และการแพร่กระจาย (Akbar; et al. 2013) มีงานวิจัยหลายชิ้นที่รายงานเกี่ยวกับการคัดแยก เชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลาย PHBV ได้ ประกอบไปด้วยแบคทีเรีย เช่น *Bacillus* strains, *Acidovorax faceilis*, *Variovorax paradoxus*, *Pseudomonas mendocina*, *Streptomyces* sp., *Actinomadura* sp., *Micrococcus* sp., *Lysinibacillus sphaericus*, *Geobacillus toebii*, *Ralstonia pickettii* และเชื้อรา เช่น *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium* sp. จะเห็นได้ว่ามีแบคทีเรียบางชนิด เท่านั้นที่สามารถย่อยสลาย PHBV และมีรายงานวิจัยไม่มากนักที่รายงานเกี่ยวกับการทำเอนไซม์ให้ บริสุทธิ์และศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ที่ย่อยสลาย PHBV ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีความสนใจใน การศึกษาแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลาย PHBV โดยศึกษาการทำบริสุทธิ์และ คุณสมบัติของเอนไซม์ที่เชื้อผลิต ซึ่งคาดว่าจะได้เอนไซม์ที่มีประโยชน์เพื่อรองรับการใช้พลาสติก ชีวภาพที่มากขึ้นในอนาคต

ความมุ่งหมายของการวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้ได้ตั้งความมุ่งหมายไว้ดังนี้

1. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ PHBV จาก *Actinomadura* sp. สายพันธุ์ TF1
2. เพื่อศึกษาการทำบริสุทธิ์ของเอนไซม์ที่ย่อยสลาย PHBV จาก *Actinomadura* sp. สายพันธุ์ TF1
3. เพื่อศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ที่ย่อยสลาย PHBV จาก *Actinomadura* sp. สายพันธุ์ TF1

ขอบเขตของการวิจัย

ทดสอบความสามารถของ *Actinomadura* sp. สายพันธุ์ TF1 ที่แยกได้จากดินปุ๋ยหมักจากการศึกษาของทายาท ศรียาภัย และคณะ (2557) ในการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ PHBV โดยการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ PHBV depolymerase ได้แก่ พีเอช อุณหภูมิ และความเข้มข้นของสับเสตรท ด้วยการวัดการทำงานของเอนไซม์ที่ดัดแปลงจากวิธีของ Shah; et al. (2007a) และหาปริมาณโปรตีนโดยใช้วิธีของ Bradford (1976) โดยการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ Bovine serum albumin (BSA) จากนั้นเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่เหมาะสมเพื่อนำเอนไซม์ที่ผลิตได้มาทำให้บริสุทธิ์ โดยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่จุดอิ่มตัว 80% ทำไดอะไลซิส (dialysis) ทำโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออนชนิด DEAE Sepharose นำหลอดที่มีการทำงานของเอนไซม์สูงที่สุดมาตรวจสอบหาความบริสุทธิ์และน้ำหนักโมเลกุลโดยใช้ SDS-PAGE และนำเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มาศึกษาคุณสมบัติต่างๆ ได้แก่ ค่าพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสม ความเสถียรของเอนไซม์ที่ค่าพีเอชและอุณหภูมิต่างๆ ความจำเพาะต่อสับเสตรท และผลของตัวยับยั้งสารเคมี และไอออนโลหะต่อการทำงานของเอนไซม์

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

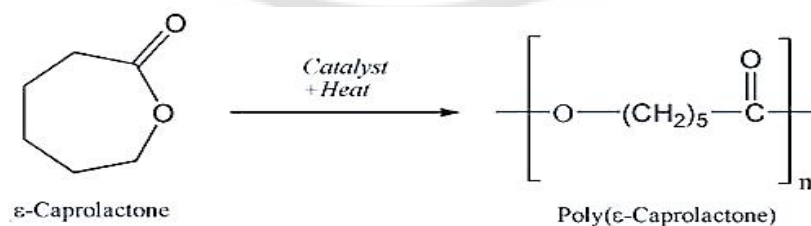
พลาสติกชีวภาพ (bioplastics)

พลาสติกชีวภาพ หมายถึง พลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพโดยอาศัยเอนไซม์จากจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในสิ่งแวดล้อมนั้นๆ ให้กลายเป็นแร่ธาตุกลับคืนสู่ดิน สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มหลักตามแหล่งที่มาดังนี้

1. พลาสติกที่ได้จากการทับถมกันของสารอินทรีย์จากพืชและสัตว์มาเป็นเวลานาน (fossil resources) เช่น ปิโตรเลียม ได้แก่

1.1 พอลิคาร์โพรแลคโตน poly(ϵ -caprolactone) (PCL)

PCL เป็นพอลิเอสเทอร์ที่มีลักษณะเป็นผลึก เกิดจากการสังเคราะห์โดยการเปิดวงแหวนพอลิเมอร์ของ ϵ -caprolactone ดังภาพประกอบ 1 มีจุดหลอมเหลวต่ำประมาณ 59-64 องศาเซลเซียส PCL นำมาใช้ประโยชน์ในทางชีวการแพทย์เนื่องจากมีความปลอดภัยต่อร่างกายมนุษย์ เช่น วัสดุนำส่งยา (drug delivery) PCL สามารถย่อยสลายได้โดยจุลินทรีย์แบบใช้และไม่ใช้ออกซิเจนที่แพร่กระจายในระบบนิเวศ เอนไซม์ที่ย่อยสลาย PCL ได้แก่ ไลเปส (lipase) และเอสเทอร์เรส (esterase) อัตราการย่อยสลายของ PCL ขึ้นอยู่กับน้ำหนัก โมลโมเลกุล และการเป็นผลึก สำหรับชื่อทางการค้าของ PCL เช่น CAPA® (จากบริษัทซิลเวีย ประเทศเบลเยียม) Tone® (จากบริษัทยูเนี่ยนคาร์ไบด์ ประเทศอเมริกา) หรือ Celgreen (จากบริษัทไดเซล ประเทศญี่ปุ่น) (Tokiwa; et al. 2009; Vroman; & Tighzert. 2009; Woodruff; & Hutmacher. 2010)

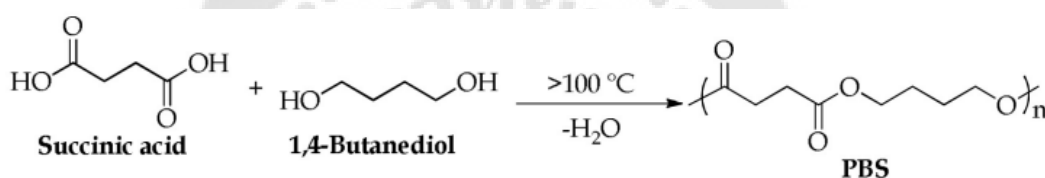


ภาพประกอบ 1 การสังเคราะห์ PCL โดยการเปิดวงแหวนพอลิเมอร์ของ ϵ -caprolactone

ที่มา: Piskin, Erhan; et al. (2009). In vivo performance of simvastatin-loaded electrospun spiral-wound polycaprolactone scaffolds in reconstruction of cranial bone defects in the rat model. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 90(4): p. 1142.

1.2 พอลิบิวทิลีนซัคซิเนต poly(butylene succinate) (PBS)

PBS เป็นอะลิฟาติกพอลิเอสเตอร์ที่สังเคราะห์มาจากปฏิกิริยาการควบแน่นของ ไกลคอล (glycols) เช่น เอทิลีนไกลคอล และ 1,4-บิวเทนไดออล และกรดไดคาร์บอกซีลิก (dicarboxylic acids) เช่น กรดซัคซินิก และกรดอะดิพิก ดังในภาพประกอบ 2 โดย PBS ถูกนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น ฟิล์ม ฟิล์มบรรจุภัณฑ์ กระจกพลาสติก ผลิตภัณฑ์อนามัย โดยสังเคราะห์ขึ้นมาครั้งแรกในปี ค.ศ. 1990 และพัฒนาโดยบริษัท Shower High Polymer ประเทศญี่ปุ่น ภายใต้ชื่อทางการค้า Bionolle และ EnPol® เป็นชื่อทางการค้าของบริษัท Ire Chemical ประเทศเกาหลี PBS สามารถย่อยสลายได้โดยจุลินทรีย์ที่แพร่กระจายในสิ่งแวดล้อม (Shah; et al. 2008; Vroman; & Tighzert. 2009)

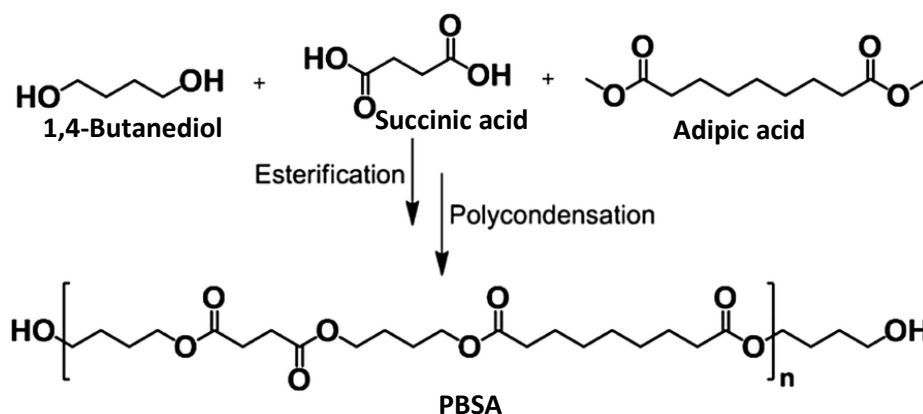


ภาพประกอบ 2 การสังเคราะห์ PBS จากกรดซัคซินิก และ 1,4-บิวเทนไดออล

ที่มา: พีระศักดิ์ เภาประเสริฐ. (2013). พอลิเมอร์จากแหล่งชีวภาพ: การทบทวนวรรณกรรม. วารสารวิจัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น (ฉบับบัณฑิตศึกษา). 18(3): หน้า 541.

1.3 พอลิบิวทิลีนซัคซิเนต-โค-อะดิเพต poly(butylene succinate-co-adipate) (PBSA)

PBSA เป็นพอลิเอสเตอร์ที่เป็นโคพอลิเมอร์ของ PBS เกิดจากการรวมตัวแบบสุ่มของ บิวทิลีน(butylene) ซัคซิเนต (succinate) และอะดิเพต (adipate) สามารถสังเคราะห์ทางเคมีโดยการควบแน่นของ 1,4-บิวเทนไดออล กับกรดซัคซินิกและกรดอะดิพิก ดังในภาพประกอบ 3 ถ้าพอลิเมอร์ประกอบด้วยหน่วยย่อยอะดิเพตมากกว่าหน่วยย่อยของ 1,4-บิวทานไดออลและซัคซิเนต จะทำให้เกิดกระบวนการย่อยได้รวดเร็วกว่า ดังนั้นจึงเป็นเหตุผลที่ทำให้ PBSA สามารถย่อยสลายได้เร็วกว่า PBS การนำไปใช้ประโยชน์ เช่น ฟิล์ม ฟิล์มบรรจุภัณฑ์ กระจกพลาสติก ผลิตภัณฑ์อนามัย (Averous; & Pollet. 2012)



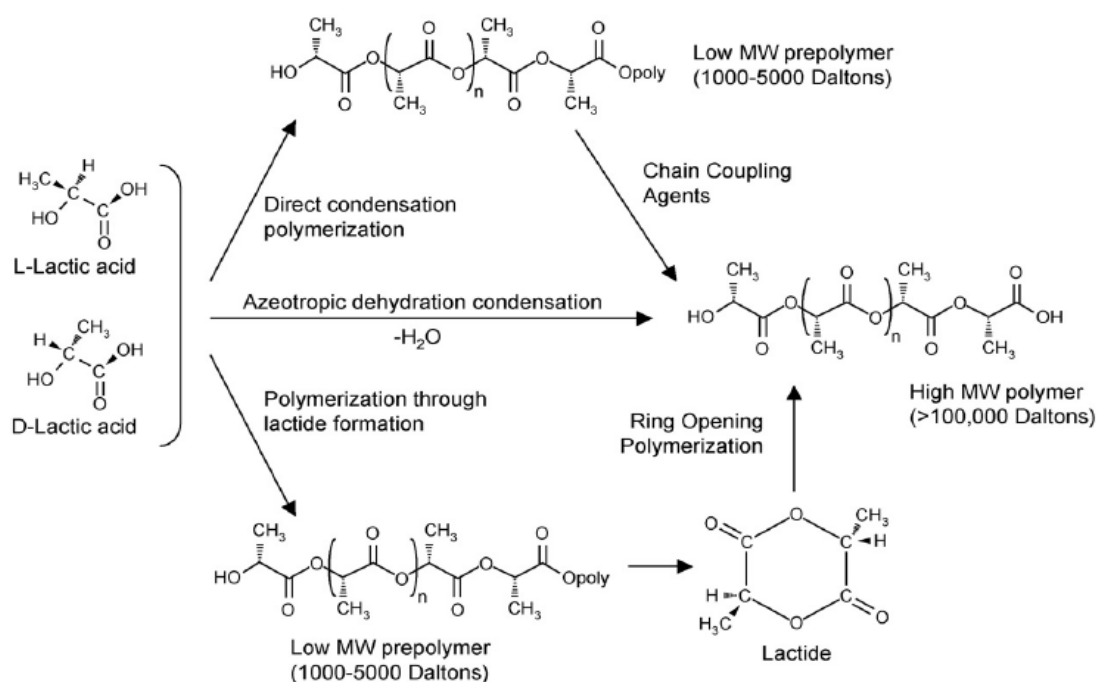
ภาพประกอบ 3 การสังเคราะห์ PBSA จาก 1,4-บิวเทนไดออล กรดซักซินิก และกรดอะดิพิก

ที่มา: Vilela, Carla; et al. (2014). The Quest for Sustainable Polyesters-Insights into the Future. *Polymer Chemistry*. 9: p. 3129.

2. พลาสติกที่ได้จากทรัพยากรที่นำกลับมาใช้ใหม่ได้ (renewable resources)

2.1 พอลิแลคติกแอซิด poly(lactic acid) (PLA)

PLA เป็นอะลิฟาติกพอลิเอสเทอร์สังเคราะห์มาจากกรดแลคติก ซึ่งกรดแลคติกอาจได้มาจากการสังเคราะห์ทางเคมีหรือได้มาจากพืชผลทางการเกษตร เช่น กัญชง มอลโทส เด็กโทส จากข้าวโพดหรือมันฝรั่ง เชื้อโครสจากอ้อยหรือบีท โดยบดหรือไม่พืชผลทางการเกษตรเหล่านี้ให้กลายเป็นแป้ง และย่อยแป้งให้กลายเป็นน้ำตาล แล้วใช้จุลินทรีย์ในกลุ่ม *Lactobacilli* หมักน้ำตาลที่ได้ให้กลายเป็นกรดแลคติก โดย PLA มีไอโซเมอร์ 2 รูปแบบ คือ *L*-lactic acid และ *D*-lactic acid จากนั้นจึงใช้กรดแลคติกเหล่านี้ไปเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ PLA ดังในภาพประกอบ 4 การนำ PLA มาใช้ประโยชน์ส่วนใหญ่ทางด้านการแพทย์ เช่น อุปกรณ์ฝังในร่างกาย (implant devices) โครงร่างเนื้อเยื่อ (tissue scaffolds) ไหมเย็บแผลภายในร่างกาย (internal sutures) นอกจากนี้ยังนำมาใช้ในด้านบรรจุภัณฑ์อาหาร รวมทั้งผลิตภัณฑ์อื่นๆ (Garlotta. 2002; Lim; Auras; & Rubino. 2008)



ภาพประกอบ 4 การสังเคราะห์ PLA จาก L-lactic acid และ D-lactic acid

ที่มา: Lim, L.-T.; Auras, R.; & Rubino, M. (2008). Processing Technologies for Poly(lactic acid). *Progress in Polymer Science*. 33: p. 822.

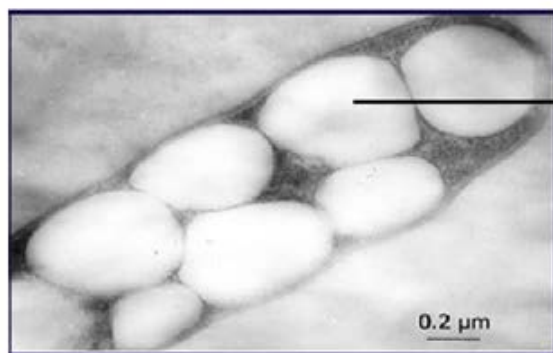
2.2 พอลิไฮดรอกซีอัลคานอยด์ polyhydroxyalkanoates (PHAs)

PHAs เป็นตัวแทนของพอลิเอสเทอร์ที่ได้จากธรรมชาติ โดยเกิดจากแบคทีเรียสะสม PHAs ไว้ภายในเซลล์ในสภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนมากเกินไปแต่แหล่งไนโตรเจนมีจำกัด ในจุลินทรีย์บางกลุ่มสามารถสะสม PHAs ไว้ภายในเซลล์ได้มากถึง 90 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง PHAs เป็นพลาสติกชีวภาพกลุ่มใหญ่ที่มีอนุพันธ์พอลิเมอร์เป็นจำนวนมาก โดยขึ้นอยู่กับความยาวสายโซ่ของหมู่ที่มาแทนที่ (R) ทำให้ PHAs มีคุณสมบัติแตกต่างกันไปตั้งแต่เป็นพลาสติกที่มีความแข็งแรงแต่เปราะง่ายไปจนถึงพลาสติกที่มีความยืดหยุ่นหรือทนต่อแรงดึงได้ดี โดยชนิดของพอลิเมอร์ที่ได้ขึ้นอยู่กับปัจจัยในการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ เช่น พีเอช อุณหภูมิ ความเข้มข้น แหล่งคาร์บอน และชนิดของจุลินทรีย์ (Vroman; & Tighzert. 2009) PHAs สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น ด้านทางการแพทย์ ด้านบรรจุภัณฑ์ ด้านการเกษตร (Reddy; et al. 2003)

พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต (Polyhydroxyalkanoates หรือ PHAs)

PHAs เป็นกลุ่มพอลิเมอร์ประเภทพอลิเอสเทอร์ธรรมชาติที่สังเคราะห์ และสะสมภายในเซลล์ของจุลินทรีย์หลายกลุ่มภายใต้สภาวะตึงเครียด เช่น การจำกัดปริมาณไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ออกซิเจน แต่มีแหล่งคาร์บอนมากเกินไป ส่งผลให้เซลล์จุลินทรีย์เกิดการสะสมคาร์บอนและพลังงานเก็บไว้ใช้ภายในเซลล์ (Keshavarz; & Roy. 2010) ดังในภาพประกอบ 5 โดยทั่วไปแหล่งคาร์บอนที่ใช้เป็นวัตถุดิบ ได้แก่ พืชผลทางการเกษตรจำพวกแป้ง เช่น ข้าวโพด มันสำปะหลัง มันฝรั่ง ข้าว ข้าวสาลี นอกจากนี้ยังได้มีการดัดแปลงพันธุกรรมของจุลินทรีย์และพืชเพื่อให้สามารถผลิต PHAs ได้ในปริมาณสูง (Akbar; et al. 2013)

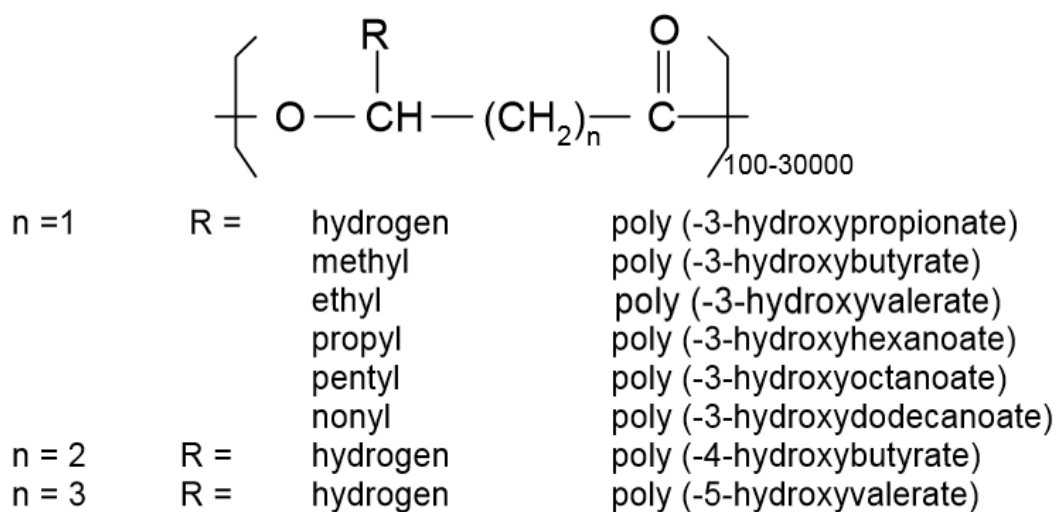
โครงสร้างของ PHAs มีแกนหลักเป็น R-hydroxyalkanoic acid (HA) แต่มีความแตกต่างกันของหมู่ฟังก์ชันที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 (C-3) หรือตำแหน่งบีต้า ทำให้ได้เป็น PHAs ชนิดต่างๆ ดังในภาพประกอบ 6 โดย PHAs มีองค์ประกอบของมอนอเมอร์ที่แตกต่างกันมากถึง 150 แบบ อยู่ในช่วง 50,000-1,000,000 ดาลตัน (Da) โครงสร้างที่พบมากที่สุดคือ พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (polyhydroxybutyrate, PHB) (Keshavarz; & Roy. 2010)



PHA Granules

ภาพประกอบ 5 การสะสมแกรนูล PHA ภายในเซลล์ของแบคทีเรีย

ที่มา: Guo-Giang, Chen.; Juanyu, Zhang.; & Ying, Wang. (2015). Hydroxyalkanoates and Polyhydroxyalkanoates: Production and Applications. In *Industrial Biorefineries and White Biotechnology*. p. 556.



ภาพประกอบ 6 สูตรโครงสร้างของ PHAs

ที่มา : Ojumu, T.V.; Yu, J.; & Solomon, B.O. (2004). Production of Polyhydroxyalkanoates, a Bacterial Biodegradable Polymer. *African Journal of Biotechnology*. 3(1): p. 19.

การจำแนกพอลิเมอร์ของ PHAs

1. แบ่งตามจำนวนอะตอมคาร์บอน แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม (Tan; et al. 2014) ได้แก่

1.1 PHA สายสั้น (short-chain length PHA, scl-PHA) ประกอบด้วยอะตอมคาร์บอน 3-5 อะตอม เช่น poly(3-hydroxybutyrate) P(3HB), poly(4-hydroxybutyrate) P(4HB), poly(3-hydroxyvalerate) P(3HV)

1.2 PHA สายปานกลาง (medium-chain length PHA, mcl-PHA) ประกอบด้วยอะตอมคาร์บอน 6-14 อะตอม เช่น poly(3-hydroxyhexanoate) P(3HHx), poly(3-hydroxyoctanoate) P(3HO), 3-hydroxyheptanoate (PHHp), 3-hydroxynonanoate (PHN), 3-hydroxydecanoate (PHD)

1.3 PHA สายยาว (long-chain length PHA, lcl-PHA) ประกอบด้วยอะตอมคาร์บอน 15 อะตอมขึ้นไป

2. แบ่งตามชนิดของหน่วยย่อย แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม (Keshavarz; & Roy. 2010) ได้แก่

2.1 โฮโมพอลิเมอร์ (homopolymers) ประกอบด้วยหน่วยย่อยชนิดเดียวกันมาเชื่อมต่อกัน เช่น polyhydroxybutyrate (PHB), polyhydroxyoctanoate (PHO)

2.2 เฮเทอโรพอลิเมอร์ (heteropolymers) หรือโคพอลิเมอร์ (copolymer) ประกอบด้วยหน่วยย่อยต่างชนิดกันมาเชื่อมต่อกัน เช่น poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) (PHBV), poly-(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) [P(3HB-co-4HB)]

การนำ PHAs ไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ

PHAs มีลักษณะเด่นหลายด้าน เช่น สามารถเข้าได้กับเนื้อเยื่อของมนุษย์ ไม่เป็นพิษ สังเคราะห์มาจากวัสดุดิบที่หาได้ง่าย สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพให้กลับกลายเป็นแร่ธาตุในดิน ดังนั้น PHAs จึงสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในหลายๆ ด้านเพื่อทดแทนพลาสติกที่ไม่สามารถย่อยสลายทางชีวภาพได้ (Keshavarz; & Roy. 2010; Reddy; et al. 2003; Vroman; & Tighzert. 2009) ดังนี้

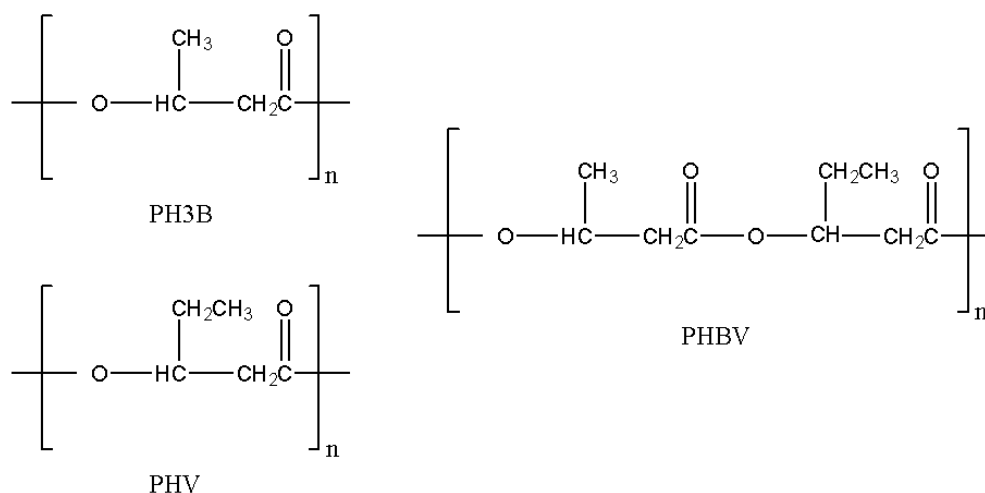
1. ด้านการแพทย์และเภสัช PHAs ได้นำมาประยุกต์ให้กับวัสดุปลดปล่อยตัวยาในระยะยาว เพื่อควบคุมอัตราและระยะเวลาในการปลดปล่อยยารักษาโรค วัสดุสร้างกระดูกใช้ในการกระตุ้นการเจริญของกระดูก วัสดุในการสร้างทางเดินปัสสาวะ ไหมเย็บแผลในการผ่าตัด (surgical sutures) ผ้าปิดแผล สารห้ามเลือด (haemostatic agents) แคปซูลยา เป็นแนวทางการงอกของเนื้อเยื่อและกระดูกในการรักษาฟันและขากรรไกร ผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวข้องกับระบบหัวใจและหลอดเลือด เช่น ช่อมแซมเยื่อหุ้มหัวใจและผนังหัวใจห้องบน โครงสร้างสำหรับการงอกของเนื้อเยื่อหลอดเลือดแดง หลอดเลือดเทียม ชี้นปิดโรคหัวใจและหลอดเลือดและลิ้นหัวใจ
2. ด้านบรรจุภัณฑ์ ส่วนใหญ่ประยุกต์ใช้เป็นถุงพลาสติก สารเคลือบกระดาษและกระดาษแข็ง กล่องนม ปากกา บรรจุภัณฑ์ที่ใช้แล้วทิ้ง มีดโกน เครื่องใช้ในครัว ภาชนะบรรจุอาหาร ขวดน้ำ ภาชนะบรรจุเครื่องดื่ม ขวดบรรจุสารเคมี ขวดแชมพู และถ้วย เป็นต้น
3. ด้านการเกษตร วัสดุห่อหุ้มและปลดปล่อยฮอร์โมน สารอาหาร ยาฆ่าแมลง ฟีโรโมน ยาฆ่าวัชพืช และปุ๋ยตามระยะเวลาที่กำหนด ทำเป็นฟิล์มที่ปกคลุมเรือนกระจกสำหรับเพาะปลูกพืชสวน หรือทำเป็นพลาสติกคลุมดินสำหรับปกป้องพืชที่ยังอ่อนเพื่อช่วยรักษาความชื้น เพิ่มอุณหภูมิในดิน และช่วยลดวัชพืช แถบสำหรับการกระจายเมล็ดพืช และสารอาหาร กระถางต้นไม้แบบใช้แล้วทิ้ง
4. ด้านเส้นใย เช่น ผ้าอ้อมสำเร็จรูปเด็ก ผลิตภัณฑ์อนามัยสำหรับผู้หญิง สิ่งทอต่างๆ
5. ด้านทางทะเล เช่น เชือก ข่ายจับปลา
6. ด้านอื่นๆ เช่น วัสดุสำหรับผลิตสี คลิป ลวดเย็บกระดาษ ที่ตั้งลูกกอล์ฟเมื่อเริ่มเล่นกอล์ฟ กาวที่ไวต่อแรงกดดันและละลายด้วยความร้อน

พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทีเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต)

(Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) หรือ PHBV)

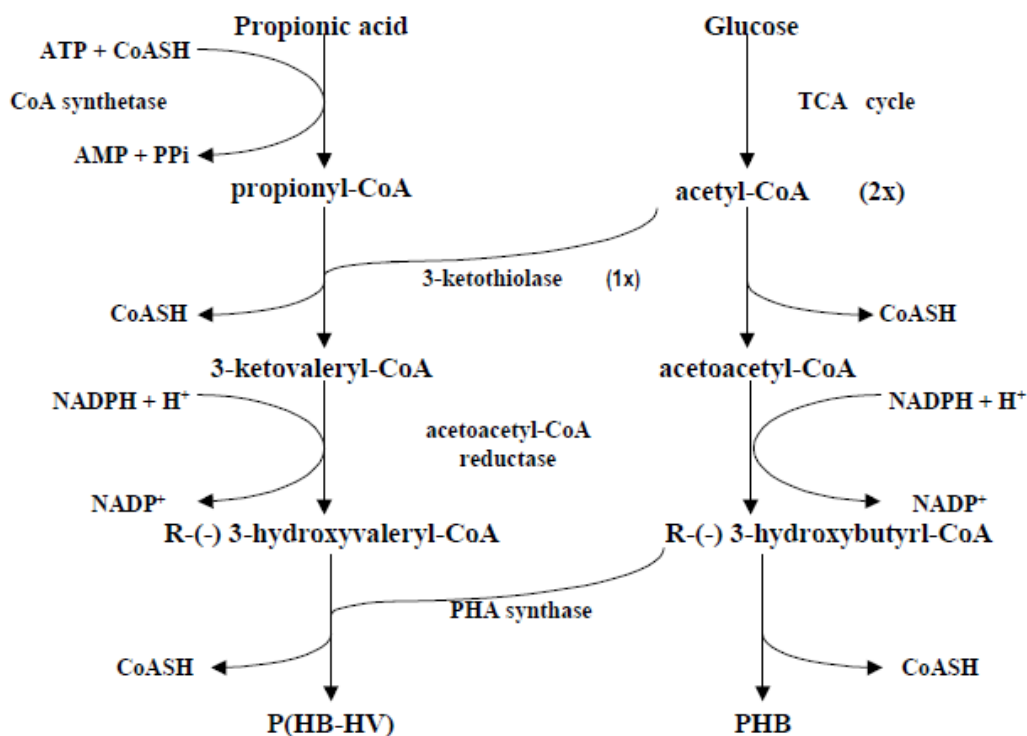
PHBV เป็นโคพอลิเมอร์ที่จัดอยู่ในกลุ่มของ PHAs ซึ่งมีชื่อเรียกอื่นๆ เช่น Biopol P(3HB-3HV, Poly β -hydroxybutyrate- β -hydroxyvalerate), Poly(hydroxybutyric acid-co-hydroxyvaleric acid) เป็นพลาสติกทึบร้อนที่สามารถย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติ ซึ่งเกิดจากการรวมตัวกันของมอนอเมอร์ 3-hydroxybutyrate (HB) และ 3-hydroxyvalerate (HV) แบบสุม์ เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเอสเทอร์ แกนหลักประกอบไปด้วยอะตอมของคาร์บอนและออกซิเจน ดังในภาพประกอบ 7 โดย 3-hydroxybutyrate (HB) ช่วยทำให้แข็งแต่เปราะง่าย ส่วน 3-hydroxyvalerate (HV) จะช่วยในเรื่องของความยืดหยุ่น เมื่อเพิ่มอัตราส่วนของ HV ส่งผลให้จุดหลอมเหลว อุณหภูมิที่เปลี่ยนเป็นแก๊ส และสภาพการเป็นผลึกของพลาสติกลดลงแต่เพิ่มความทนทานและลดแรงตึงได้ดีขึ้น PHBV สังเคราะห์ขึ้นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1983 โดย Imperial Chemical Industries (ICI) ภายใต้ชื่อทางการค้าคือ Biopol ในการสังเคราะห์ PHBV จากจุลินทรีย์เกิดจากการควบคุมปัจจัยในกระบวนการหมักของจุลินทรีย์และการเติมแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการสังเคราะห์ โดยใช้แหล่งคาร์บอน 2 ชนิดเป็นแหล่งอาหาร นอกจากนี้ยังต้องอาศัยตัวกลางที่สำคัญคือกรดไพรูวิก โดยจุลินทรีย์จะเปลี่ยนกลูโคสให้เป็น อะซิติลโคเอ (acetyl-CoA) และเปลี่ยนกรดไพรูวิกให้เป็นไพรูโวนิลโคเอ (propionyl-CoA) หากจุลินทรีย์อยู่ในสภาวะที่สารอาหารต่างๆ สมดุลกัน สารทั้ง 2 ชนิดนี้จะถูกเปลี่ยนเป็นพลังงานและชีวมวล แต่ถ้าอยู่ในสภาวะที่แหล่งอาหารไม่สมดุลแต่มีปริมาณคาร์บอนมากเกินไป อะซิติลโคเอ (acetyl-CoA) และไพรูโวนิลโคเอ (propionyl-CoA) จะถูกเปลี่ยนเป็น PHBV ซึ่งในการสังเคราะห์ PHBV นั้น ต้องอาศัยเอนไซม์ 3 ชนิด คือ เอนไซม์เบต้า-คีโตไทโอเลส (β -ketothiolase) ทำหน้าที่เปลี่ยนอะซิติลโคเอ (acetyl-CoA) ให้กลายเป็นอะซิโตะอะซิติลโคเอ (acetoacetyl-CoA) และทำให้เกิดการควบแน่นของอะซิติลโคเอ (acetyl-CoA) กับไพรูโวนิลโคเอ (propionyl-CoA) ให้กลายเป็นเบต้าคีโตวาเลอริลโคเอ (β -ketovaleryl-CoA) จากนั้นเอนไซม์อะซิโตะอะซิติลโคเอรีดักเทส (acetoacetyl-CoA reductase) จะเปลี่ยนอะซิโตะอะซิติลโคเอ (acetoacetyl-CoA) ให้เป็นเบต้าไฮดรอกซีบิวทีริลโคเอ (β -hydroxybutyryl-CoA) และเปลี่ยนเบต้าคีโตวาเลอริลโคเอ (β -ketovaleryl-CoA) ให้กลายเป็นเบต้าไฮดรอกซีวาเลอริลโคเอ (β -hydroxyvaleryl-CoA) และขั้นตอนสุดท้ายเอนไซม์ซินเทส (synthase) ทำให้เกิดการรวมตัวกันของเบต้าไฮดรอกซีบิวทีริลโคเอ (β -hydroxybutyryl-CoA) และเบต้าไฮดรอกซีวาเลอริลโคเอ (β -hydroxyvaleryl-CoA) ให้กลายเป็น PHBV ดังในภาพประกอบ 8 นอกจากนี้ PHBV ยังสามารถสังเคราะห์ได้จากพืชที่มีการดัดแปลงพันธุกรรมได้อีกด้วย ประโยชน์ของ PHBV ส่วนใหญ่จะนำมาใช้ในทางการแพทย์ เช่น ทำเป็นแคปซูลยา วัสดุเทียมทางการแพทย์ และพวกบรรจุภัณฑ์ต่างๆ

นอกจากนี้ยังนำมาผลิตเป็นขวดสำหรับผู้บริโภค เพื่อเป็นทางเลือกในการใช้พลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติแทนการใช้พลาสติกที่ย่อยสลายเองตามธรรมชาติไม่ได้ (ศิริวรรณ ระเด่นอาหมัด. 2552; Eschenlauer; et al. 1996; Acagastya. 2015)



ภาพประกอบ 7 โครงสร้างทางเคมีของ PHBV ที่เกิดจากการรวมกันของ HB และ HV

ที่มา: Lucy; O Connell. (2013). *PHBV (Biopol)*. Online



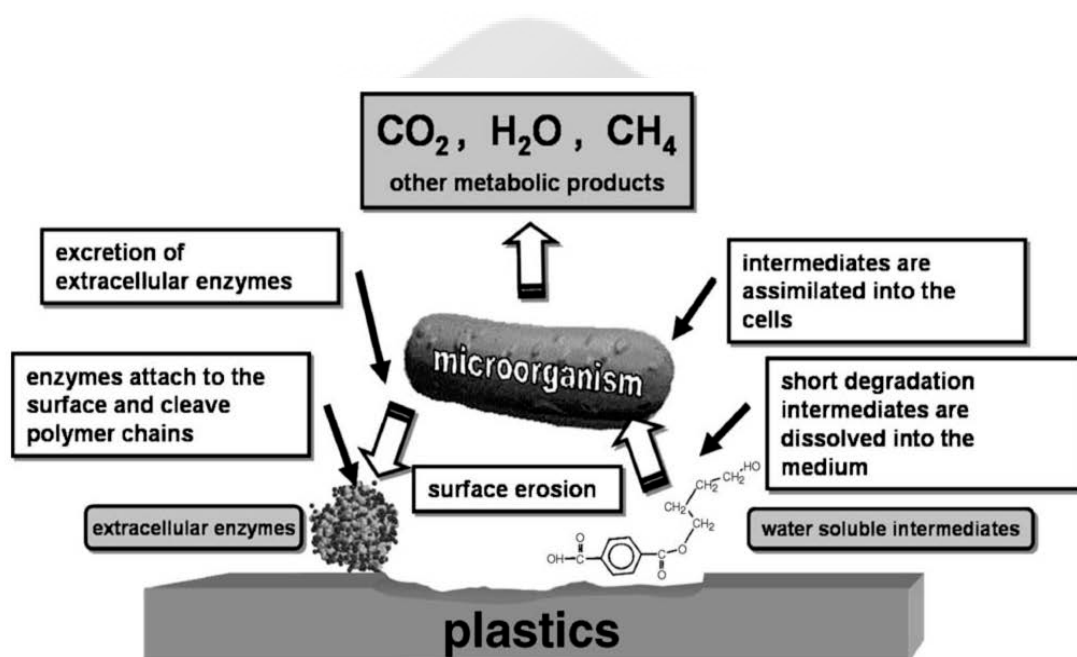
ภาพประกอบ 8 วิธีการสังเคราะห์ PHBV

ที่มา: Ojumu, T. V. & Solomon, B. O. (2004). Production of Polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer. *African Journal of Biotechnology*. 3(1): pp. 18-24.

เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PHBV

การย่อยสลาย PHBV สามารถย่อยสลายได้โดยเอนไซม์จากจุลินทรีย์ ซึ่งมีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องอย่างน้อย 2 ประเภท คือ extracellular depolymerase และ intracellular depolymerase เนื่องจากพอลิเมอร์ของ PHBV มีโมเลกุลขนาดใหญ่และไม่สามารถละลายน้ำได้ จุลินทรีย์จึงไม่สามารถนำ PHBV ผ่านผนังเซลล์ชั้นนอกเข้าสู่เซลล์ได้ ดังนั้นขั้นตอนแรกจุลินทรีย์จะหลั่ง extracellular enzyme ออกมา ทำให้เกิดกระบวนการ depolymerization ของพอลิเมอร์ภายนอกเซลล์จุลินทรีย์ ซึ่งเป็นพวก endo-enzyme เป็นเอนไซม์ที่ทำให้เกิดการแตกตัวของพันธะภายในสายพอลิเมอร์อย่างไม่เป็นระเบียบ และ exo-enzymes หรือเอนไซม์ที่ทำให้เกิดการแตกหักของพันธะที่ละหน่วยจากปลายด้านนอกของสายพอลิเมอร์ โดยเอนไซม์จะยึดเกาะกับพื้นผิวของพอลิเมอร์ ทำให้เกิดการสลายตัวของพอลิเมอร์ที่ซับซ้อนให้เป็นโมเลกุลที่มีขนาดเล็กเปลี่ยนเป็นสายสั้นๆ เช่น โอลิโกเมอร์ ไดเมอร์ และเปลี่ยนเป็น

มอนอเมอร์ในที่สุด คือ 3-hydroxybutyrate และ 3-hydroxyvalerate ซึ่งมีขนาดเล็กเพียงพอที่สามารถดูดซึมเข้าสู่เซลล์จุลินทรีย์โดยใช้น้ำเป็นตัวกลาง จุลินทรีย์จึงสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้นำไปเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน โดย intracellular enzyme ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ทำให้เกิดเมแทบอลิซึมของ β -oxidation และ tricarboxylic acid cycle (TCA) ผลผลิตสุดท้ายที่ได้คือน้ำและแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ในสภาวะที่มีออกซิเจน ในกรณีที่ไม่มีออกซิเจนจะได้แก๊สมีเทนเป็นผลผลิตเพิ่มอีกตัว (พิชาภักดิ์ สมยูทธทรัพย์. 2553; Thakur. 2011; Shah; et al. 2008; Rydz; et al. 2015) ดังในภาพประกอบ 9

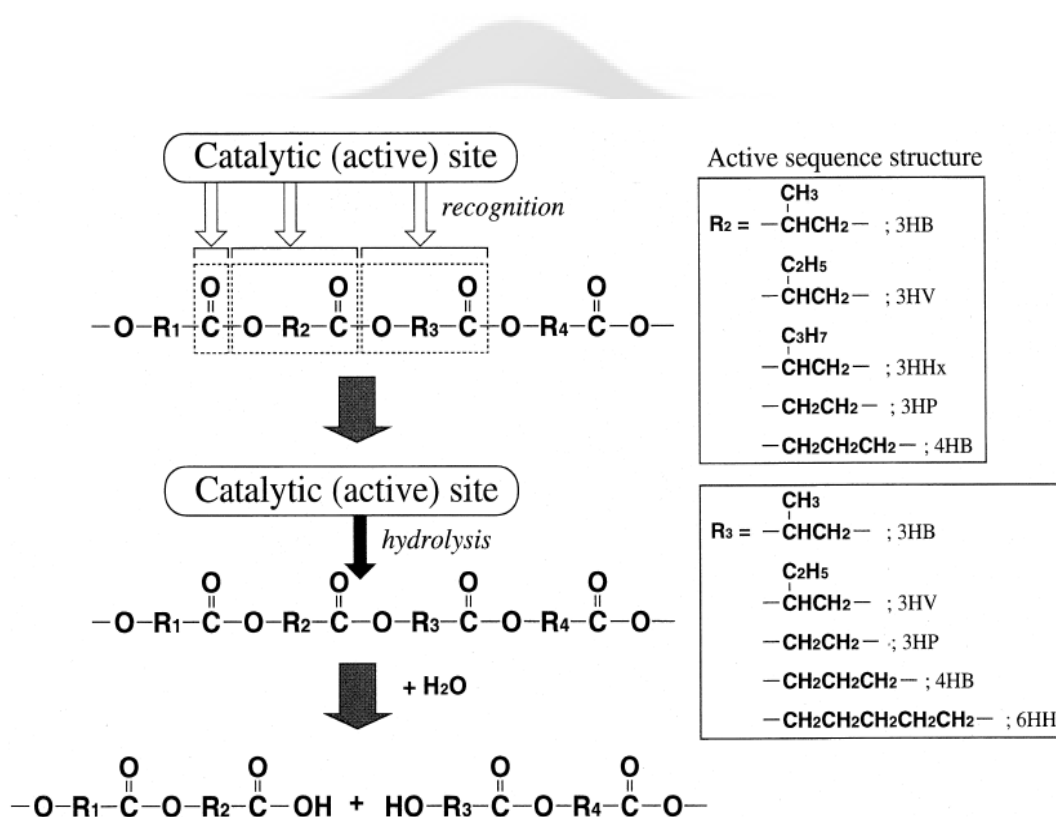


ภาพประกอบ 9 กลไกการย่อยพลาสติกชีวภาพโดยจุลินทรีย์

ที่มา: Muller, Rolf-Joachim. (2003). Biodegradability of polymer: regulations and methods for testing. In *Biopolymer online*. online.

PHBV จัดว่าเป็นพอลิเอสเทอร์ตัวหนึ่ง ดังนั้นการย่อยสลายของ PHBV เกิดจากการสลายของพันธะเอสเทอร์ โดยเกิดจากบริเวณ active site ของ catalytic domain ของเอนไซม์สามารถจดจำหน่วยย่อยของสับสเตรตได้อย่างน้อย 3 หน่วยย่อย อัตราการย่อยสลายด้วย hydrolysis ของเอนไซม์ในพันธะเอสเทอร์ขึ้นอยู่กับโครงสร้างทางเคมีของหน่วยย่อยลำดับที่ 2 (R_2) และหน่วยย่อยลำดับที่ 3

(R₃) ในสายพอลิเอสเทอร์ โดย catalytic site ของเอนไซม์จับกับสับสเตรทโดยมีปฏิสัมพันธ์กับ carbonyl group ของหน่วยย่อย hydroxyl-terminated R₁ เพื่อช่วยให้เกิดปฏิกิริยาย่อยสลายด้วยน้ำ ของพันธะเอสเทอร์ลำดับที่ 2 (R₂) กับ active site ของ catalytic domain ผลผลิตที่ได้จากการย่อยสลายด้วยน้ำของเอนไซม์ จะมีโครงสร้างทางเคมีบางอย่างที่เหมือนกัน คือ หน่วยย่อยปลายด้าน carboxyl-termini มีสายยาวประมาณ 3 หรือ 4 อะตอมคาร์บอน ในขณะที่หน่วยย่อยปลายด้าน hydroxyl-termini มีแขนงข้างยาว 0-2 อะตอมคาร์บอน (Sudesh; Abe; & Doi. 2010) ดังใน ภาพประกอบ 10



ภาพประกอบ 10 แผนผังแบบจำลองการย่อยสลาย PHBV โดยเอนไซม์ในพันธะเอสเทอร์

ที่มา: Sudesh, H.; Abe, Y.; & Doi, Y. (2000). Synthesis, Structure and Properties of Polyhydroxyalkanoates: Biological Polyesters. *Progress in Polymer Science*. 25: p. 1536.

Actinomadura (Goodfellow; et al. 2012)

Domain: Bacteria

Phylum: Actinobacteria

Class: Actinobacteria

Order : Streptosporangiales

Family: Thermomonosporaceae

Genus: Actinomadura

เป็นเชื้อในกลุ่มแอคติโนมัยซีที่มีลักษณะเด่นคือ เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีปริมาณของกัวนีนและไซโตซีน (G+C) ที่สูงกว่าแบคทีเรียแกรมบวกทั่วไป โดยภายในดีเอ็นเอประกอบด้วย G+C ประมาณ 66-73 โมลเปอร์เซ็นต์ ดำรงชีวิตแบบใช้ออกซิเจน วงจรชีวิตของ *Actinomadura* เกิดจากการพัฒนาเซลล์ที่เป็นเส้นใยที่เรียกว่า เส้นใย (hyphae) และสปอร์ เมื่อเจริญเติบโตบนดินหรืออาหารร่วน *Actinomadura* จะมีการแตกแขนงของเส้นใย โดยเส้นใยจะสามารถเจริญเติบโตได้ทั้งบนพื้นผิวและแทรกลงในดินหรืออาหารร่วนเพื่อพัฒนาเส้นใยให้หนาแน่นขึ้นเรียกว่า เส้นใยใต้ผิวอาหาร (substrate mycelium) มีการสร้างผนังกัน (septum) เพื่อแบ่งเส้นใยให้เซลล์มีความยาวมากขึ้น เส้นใยมีการแตกแขนงเป็นจำนวนมากแต่ไม่มีการแตกหักของเส้นใย เนื้อเส้นใยเหล่านี้สามารถเจริญเป็นเส้นใยเหนือผิวอาหาร (aerial mycelium) ซึ่งจะอยู่เหนือบริเวณฐานของดินหรืออาหารร่วน แต่อาจมีการลดรูปหรือไม่แสดงให้เห็น แต่ถ้าแสดงให้เห็นเส้นใยเหนือผิวอาหารจะสามารถสร้างสปอร์ได้สายละประมาณ 50 ท่อน โดยเชื้อที่โตเต็มที่จะมีสายเส้นใยเหนือผิวอาหารสั้นหรือบางครั้งจะเป็นสายยาวของ arthrospores สายของสปอร์ที่สร้างอาจจะเป็นสายตรงยาว มีลักษณะคล้ายตะขอ หรืออาจเป็นเกลียว พื้นผิวของสปอร์อาจมีลักษณะเป็นรอยพับ ขรุขระ หยักเป็นลอน มีหนาม หรือเรียบ สีของสปอร์อาจเป็นสีฟ้า น้ำตาล ครีม เทา เขียว ชมพู แดง ขาว หรือเหลือง ผนังเซลล์ของเชื้อในกลุ่ม *Actinomadura* เป็นแบบที่มี meso-diaminopimelic acid เมื่อเซลล์ถูกไฮโดรไลไลซ์ให้เล็กลงผลิตภัณฑ์ที่ได้ คือ กลูโคส มาดูโรส แมนโนส ไวโบส และกาแลกโตส ส่วนใหญ่เชื้อกลุ่มนี้จะกระจายตัวเป็นจำนวนมากในดิน โดยสามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิประมาณ 10-60 องศาเซลเซียส บางสายพันธุ์เป็นเชื้อก่อโรคในสัตว์และมนุษย์

จุลินทรีย์ที่ย่อยสลาย PHBV

Mergaert; et al. (1994) ทำการทดสอบการย่อยสลาย PHB และ PHBV ในกองปุ๋ยหมักในครัวเรือนขนาดเล็กโดยการวัดน้ำหนักที่สูญเสียไป และความแข็งแรงเชิงกล โดยใช้แบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Bacillus megaterium* และ *Streptomyces* strains แบคทีเรียแกรมลบ คือ *Acidovorax facilis*

Kasuya; et al. (1997) ได้แยก *Comamonas acidovorans* YM1609 จากน้ำจืดซึ่งสามารถย่อยสลาย PHB และ PHBV ได้

Leathers; Govind; & Greene (2000) ได้แยกเชื้อจากน้ำทะเลบริเวณใกล้ชายฝั่งทางทิศตะวันตกเฉียงใต้ของรัฐเปอร์โตริโก ประเทศสเปน พบว่า *Pseudoalteromonas* sp. NRRL B-30083 สามารถย่อยสลาย PHBV ได้ นอกจากนี้ Iyer; et al. (2000) ได้ศึกษาเอนไซม์ PHB depolymerase จาก *Aspergillus fumigatus* (Pdf1) พบว่า นอกจากจะสามารถย่อยสลาย PHB ได้แล้วยังสามารถย่อยสลาย PHBV ได้เช่นกัน

Mabrouk; & Sabry (2001) ใช้ *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ SNG9 ที่แยกจากตะกอนนอกชายฝั่งทะเลในเมืองอเล็กซานเดอร์ ย่อยสลายแผ่นฟิล์มของ PHB และ PHBV ในปีเดียวกัน Asano; & Watanabe (2001) ได้แยก *Arthrobacter* sp. strain W6 จากดิน พบว่านอกจากจะสามารถย่อยสลาย PHB ได้แล้วยังสามารถย่อยสลาย PHBV ที่ปริมาณ HV 5, 14 และ 22 เปอร์เซ็นต์

Khan; et al. (2002) ได้แยกเชื้อจากกากตะกอนน้ำเสีย พบว่า เชื้อในแฟมิลี *Comamonadaceae* เป็นเชื้อกลุ่มหลักที่สามารถย่อยสลาย PHBV ได้ และ Sang; et al. (2002) ได้ทดสอบการย่อยสลายแผ่นฟิล์ม PHBV ด้วยวิธีการฝังดินโดยใช้เชื้อรา คือ *Paecilomyces liliacinus* F4-5 เชื้อแอคติโนมัยซิต คือ *Streptomyces acidiscabies* A2-21 และแบคทีเรีย คือ *Acidovorax delafieldii* B7-21 พบว่าเชื้อราสามารถย่อยสลายแผ่นฟิล์ม PHBV ได้ดีที่สุด นอกจากนี้ Kim; et al. (2002) ได้คัดแยกเชื้อจากตัวอย่างน้ำเสีย โดยใช้ PHB และ PHBV เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า เชื้อรา *Emericellopsis minima* W2 แสดงให้เห็นการย่อยสลายได้ดีที่สุด

Feng; et al. (2004) ใช้ PHA depolymerase จากเชื้อจุลินทรีย์ *Ralstonia picketti* สายพันธุ์ T1 และ *Acidovorax* sp. สายพันธุ์ TP4 ศึกษาลักษณะการย่อยของ PHBV ที่มีหน่วยย่อยของ 3HV อยู่ในช่วง 8-98 เปอร์เซ็นต์โมล โดยพบว่าถ้าหน่วยย่อย 3HV เพิ่มขึ้นอัตราการย่อยจะเพิ่มขึ้นเช่นกัน แต่จะสูงเพียง 40 เปอร์เซ็นต์โมลเท่านั้น หลังจากนั้นอัตราการย่อยก็ลดลง ซึ่ง *R. picketti* สายพันธุ์ T1 สามารถย่อยสลายหน่วยย่อย 3HV ได้ในช่วงกว้าง แต่ *Acidovorax* sp. สายพันธุ์ TP4 สามารถย่อยสลาย 3HV ได้น้อยกว่า 80 เปอร์เซ็นต์โมลเท่านั้น

Ghanem; et al. (2005) ได้แยก *Nocardiopsis aegyptia* sp. จากตะกอนชายฝั่งทะเลในอเล็กซานเดรีย ซึ่งสามารถย่อยสลาย PHB และ PHBV ที่ปริมาณ HV 10 และ 20 เปอร์เซ็นต์

Rhee; Kim; & Shin. (2006) แยก *Pseudomonas luteola* M13-4 จากทะเลที่สามารถย่อยสลาย PHB ได้ และเมื่อศึกษา poly(3-hydroxyoctanoate) depolymerase พบว่า สามารถย่อยสลาย PHBV ที่ปริมาณ HV 30 และ 60 เปอร์เซ็นต์

Shah; et al. (2007a) ได้แยกเชื้อจุลินทรีย์ *Micrococcus* sp. สายพันธุ์ AF2, *Bacillus* sp. สายพันธุ์ AF3 และ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ AF10 จากกากตะกอนน้ำเสียที่สามารถย่อยสลาย PHBV โดยสังเกตจากบริเวณสีที่เกิดขึ้นบนอาหารแข็ง และในปีเดียวกัน Shah; et al. (2007b) แยกเชื้อจุลินทรีย์ *Streptovorticillium kashmirensis* สายพันธุ์ AF1 จากกากตะกอนบำบัดน้ำเสียที่สามารถย่อยสลาย PHBV ได้

Hermida; Yashchuk; & Miyazaki (2009) ใช้เชื้อจุลินทรีย์ *Streptomyces omiyaensis* สายพันธุ์ SSM5670 ศึกษาคุณสมบัติการย่อยของแผ่นฟิล์ม PHBV พบว่าเมื่อผ่านไป 45 วัน แผ่นฟิล์ม PHBV สูญเสียน้ำหนักไป 45 เปอร์เซ็นต์

Shah; Hasan; & Hameed (2010) คัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ *Actinomadura* sp. สายพันธุ์ AF-555 จากพื้นผิวของแผ่นฟิล์ม PHBV ที่ฝังดินจากกองขยะเป็นระยะเวลา 120 วัน และ Volova; et al. (2010) ได้ศึกษาความสามารถในการย่อยสลาย PHB และ PHBV ในสิ่งแวดล้อมน้ำทะเลในทะเลทางตอนใต้ของจีน จากนั้นแยกเชื้อที่อยู่บนพื้นผิวของแผ่นฟิล์มมาศึกษาด้วย 16S rRNA พบว่าเชื้อที่สามารถย่อยสลาย PHB และ PHBV ได้ ประกอบไปด้วย *Enterobacter* sp. IBP-VN1, *Enterobacter* sp. IBP-VN4, *Enterobacter* sp. IBP-VN5, *Enterobacter* sp. IBP-VN6, *Bacillus* sp. IBP-VN2 และ *Gracilibacillus* sp. IBP-VN3

Shivakumar; et al. (2011) ได้ศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ poly(β)-Hydroxybutyrate (PHB) depolymerase (PhaZ_{Pen}) จาก *Penicillium citrinum* S2 ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำเสีย พบว่าสามารถย่อยสลาย PHBV ได้

Arcos-Hernandez; et al. (2012) ผลิตและย่อยสลาย PHBV โดยเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการกำจัดน้ำเสีย นอกจากนี้ Zhanyong; et al. (2012) ได้คัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ *Acidovorax* sp. สายพันธุ์ HB01 จากตัวอย่างจุลินทรีย์ที่ใช้ในการกำจัดน้ำเสีย โดย PHBV depolymerase สามารถย่อยสลาย PHBV ได้ดีในช่วงพีเอช 7 และที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังสามารถย่อยสลาย PHB, PCL และ P(3HB-co-4HB) ได้เช่นกัน และ Wang; et al. (2012) แยกเชื้อจุลินทรีย์ *Pseudomonas mendocina* สายพันธุ์ DSWY0601 จากน้ำเสียโรงงานต้มเหล้า ที่สามารถย่อยสลาย PHB เมื่อทำให้บริสุทธิ์พบว่า extracellular PHB depolymerase สามารถย่อยสลาย P(3HB-co-4HB) และ PHBV แต่ไม่สามารถย่อยสลาย PLA, PBS และ PCL ได้

Akbar; et al. (2013) ได้แยกเชื้อจุลินทรีย์ AF-11 จากตัวอย่างตะกอนน้ำเสีย เมื่อวิเคราะห์ด้วยยีน 16 rRNA พบว่าเหมือนกับ *Streptomyces althioticus* สายพันธุ์ NRRL B-3981 ถึง 99 เปอร์เซ็นต์ และ Hailong; et al. (2013) ใช้ *Pseudomonas mendocina* DS04-T ย่อยสลายฟิล์ม PHAs ประกอบด้วย PHB, PHBV และ P(3HB-co-4HB)

Yashchuk; Miyazaki; & Hermida. (2014) แยกเชื้อ *Streptomyces* sp. SSM5670 เพื่อย่อยสลาย PHBV นอกจากนี้ในปีเดียวกัน วราภรณ์ จันทาสี (2557) ได้คัดแยกจุลินทรีย์จากดินบ่อฝังกลบขยะ ที่สามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งที่ผสมผงพลาสติก PHBV แบ่งการทดสอบเป็น 3 ขั้นตอน คือ 1) แบบตะกอนแบคทีเรียลงบนผิวหน้าอาหาร 2) แบบขีดเชื้อลงบนผิวหน้าอาหาร และ 3) แบบแช่ในอาหารเหลว พบว่ามี 13 ไอโซเลทที่สามารถเจริญเติบโตได้ดี เมื่อจำแนกชนิดแบคทีเรียและทดสอบความไวต่อสารปฏิชีวนะ ประกอบด้วยแบคทีเรีย 2 ชนิด คือ *Lysinibacillus sphaericus* และ *Geobacillus toebii*

Vaishnavi & Shivakumar (2015) ได้ศึกษาเอนไซม์ PHB depolymerase (PHAZ_{pen}) จาก *Penicillium expansum* พบว่าสามารถย่อยสลาย PHB และ PHBV ได้

การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ (enzyme purification)

ในสภาวะปกติตามธรรมชาติ ภายในเซลล์จุลินทรีย์ประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิดอยู่ร่วมกัน ดังนั้น ถ้าต้องการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ชนิดใดชนิดหนึ่งต้องมีการแยกเอนไซม์ออกมาให้บริสุทธิ์เสียก่อน เพื่อลดการรบกวนจากเอนไซม์ชนิดอื่น ซึ่งเมื่อเอนไซม์มีความบริสุทธิ์สูงขึ้น ทำให้มีแอกทิวิตี (activity) สูงขึ้นด้วย โดยทั่วไปเทคนิคการแยกเอนไซม์หรือโปรตีนออกจากกันจะเน้นที่เรื่องของขนาด ประจุ และความแตกต่างของช่วงระหว่างโมเลกุล และมีหลายเทคนิคที่มีประสิทธิภาพในการทำให้เอนไซม์หรือโปรตีนตัวอย่างมีความบริสุทธิ์เพิ่มมากขึ้น ขั้นตอนการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ (จิตติมา เจริญพานิช. 2553; ปราณี พัฒนพิพิทไพศาล. 2556; ยุวดี วัฒนโกศลสิน. ม.ป.ป.) มีดังนี้

1. การตกตะกอนโปรตีน (protein precipitation)

ขั้นตอนนี้เป็นการทำให้สารละลายโปรตีนที่ได้จากจุลินทรีย์มีความเข้มข้นมากขึ้น โดยการตกตะกอนโปรตีนที่ละลายในของเหลว แล้วนำตะกอนมาละลายในบัฟเฟอร์ในปริมาณที่จำกัด สารละลายโปรตีนที่ได้จึงมีความเข้มข้นขึ้น

การตกตะกอนด้วยสารละลายเกลือ (salting out) โดยปกติโปรตีนที่ละลายอยู่ในน้ำโมเลกุลของโปรตีนจะจับกับโมเลกุลของน้ำได้ดีกว่าการจับกับโมเลกุลของโปรตีนด้วยตัวเอง ดังนั้นโปรตีนจึงไม่เกิดการตกตะกอน การจะทำให้โปรตีนตกตะกอนได้นั้นสามารถทำได้โดยการเติมเกลือ เช่น เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) ซึ่งเป็นที่นิยมมากเพราะเอนไซม์จะ

ไม่มีการเสียสภาพอย่างถาวรโดยปกติโปรตีนส่วนใหญ่ละลายได้ดีในสารละลายเกลือที่ความเข้มข้นต่ำ เมื่อความเข้มข้นของเกลือเพิ่มมากขึ้นการละลายของโปรตีนจะลดลง ทำให้เกิดการตกตะกอนเนื่องจากเกลือ เรียกว่า salting out effect เกิดจากไอออนของเกลือดึงโมเลกุลของน้ำออกจากโมเลกุลโปรตีน ทำให้โมเลกุลของโปรตีนมีโอกาสจับกันได้มากยิ่งขึ้น โปรตีนจึงตกตะกอนลงมา การตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ทำโดยการเติมเกลือลงในสารละลายเอนไซม์ที่ละน้อยอย่างช้าๆ และคนอย่างต่อเนื่องจนมีความเข้มข้น 80-100 เปอร์เซ็นต์ของจุดอิ่มตัว เพื่อให้ได้ตะกอนโปรตีนเกือบทั้งหมดโดยปริมาณเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้เพิ่มขึ้นอยู่กับเปอร์เซ็นต์จุดอิ่มตัวของสารละลายเกลือที่ต้องการ

2. การกำจัดเกลือ (desalting)

การกำจัดเกลือเป็นขั้นตอนหลังจากการตกตะกอนด้วยสารละลายเกลือ เพื่อแยกไอออนของเกลือออกจากสารละลายโปรตีน วิธีการที่นิยมใช้ คือ การไดอะไลซิส (dialysis) เป็นวิธีใช้แยกโปรตีนซึ่งเป็นสารโมเลกุลใหญ่ออกจากสารอื่นๆ ซึ่งมีโมเลกุลเล็กกว่า คือ แยกไอออนของเกลือออกจากสารละลายโปรตีน โดยนำสารละลายบรรจุลงในถุงที่ทำจากเซลโลเฟน (cellophane) หรือคอลลาเจน (collagen) ที่มีคุณสมบัติยอมให้เกลืออนินทรีย์ (inorganic salts) และสารที่มีมวลโมเลกุลต่ำผ่านเข้าออกได้อย่างอิสระ แต่ไม่ยอมให้โปรตีนหรือสารโมเลกุลใหญ่ผ่านได้ โดยจะต้องแช่ถุงที่บรรจุสารละลายโปรตีนลงในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมประมาณ 12-24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยมีการกวนตลอดเวลา และต้องเปลี่ยนบัฟเฟอร์บ่อยๆ เพื่อให้ไอออนของเกลือแพร่ผ่านได้เร็วขึ้น

3. คอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography)

ในคอลัมน์ประกอบด้วย stationary phase และ mobile phase โดย mobile phase จะไหลผ่าน stationary phase พร้อมกับตัวอย่างโปรตีนทำให้ตัวอย่างโปรตีนเกิดการแยกออกจากกัน ซึ่งถ้าตัวอย่างโปรตีนที่มีปฏิสัมพันธ์กับ stationary phase อย่างแข็งแรง และมากกว่า mobile phase จะทำให้ตัวอย่างโปรตีนนั้นไหลออกมาช้า ส่วนตัวอย่างโปรตีนที่มีปฏิสัมพันธ์กับ mobile phase อย่างแข็งแรงและมากกว่า stationary phase จะทำให้ตัวอย่างโปรตีนนั้นไหลออกมาเร็ว

หลักการทำงานเริ่มจากการใส่ stationary phase ลงในคอลัมน์ จากนั้นค่อยๆ ใส่สารละลายโปรตีนตัวอย่างลงไปตามด้วย mobile phase ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวชะผ่านคอลัมน์ลงไปยังตัวอย่างโปรตีนที่ถูกเจือจางตัวชะก็就会被แยกออกจากกัน เมื่อสารละลายโปรตีนตัวอย่างไหลออกจากคอลัมน์จะถูกเก็บไว้เป็นส่วนๆ จากนั้นนำแต่ละส่วนไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและกิจกรรมของเอนไซม์ต่อไป (Campbell; & Farrell. 2012) คอลัมน์โครมาโทกราฟีที่นิยมใช้แบ่งออกเป็น 2 วิธี คือ

3.1 โครมาโทกราฟีแบบเจลฟิลเตรชัน (gel filtration chromatography)

เป็นเทคนิคการแยก และทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์โดยอาศัยความแตกต่างของขนาดโมเลกุลของเอนไซม์ โดยสารตัวกลางที่ใช้เป็นเจลที่มีรูพรุน อาศัยคุณสมบัติของเม็ดเจลที่มีลักษณะเป็นช่องว่างภายในที่เกิดจาก การเชื่อมไขว้ของพอลิเมอร์ที่ใช้ในการสร้างเจล โดยทั่วไปพอลิเมอร์ที่ใช้ในการสร้างเจลมี 2 ชนิด คือ 1) พอลิเมอร์ที่เป็นคาร์โบไฮเดรต เช่น dextran และ agarose หรือชื่อทางการค้าคือ Sephadex และ Sepharose 2) พอลิอะคริลาไมด์ หรือชื่อทางการค้าคือ Bio-Gel โดยภายในเม็ดเจลแต่ละเม็ดมีขนาดช่องว่างที่จำเพาะยอมให้สารที่มีขนาดโมเลกุลค่าหนึ่งผ่านเข้าไปในเม็ดเจลได้ ทำให้สารที่มีขนาดใหญ่กว่าไม่สามารถผ่านเข้าไปได้จึงถูกชะออกมาก่อนกับสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ชะ ส่วนสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กผ่านเข้าไปวนเวียนอยู่ภายในช่องว่างของเม็ดเจล ทำให้ใช้เวลานานกว่าจะหลุดออกมาผ่านออกเจลได้ ทำให้สารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กหลุดออกมาจากคอลัมน์ในภายหลัง ตัวอย่างของเรซินที่ใช้โครมาโทกราฟีแบบเจลฟิลเตรชัน ดังในตาราง 1

3.2 โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน (ion exchange chromatography)

เป็นเทคนิคการแยกและทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์โดยอาศัยความแตกต่าง และการแลกเปลี่ยนไอออนระหว่างโปรตีนและสารตัวกลางที่มีไอออนอยู่ที่ผิวเรซินแลกเปลี่ยนไอออนเป็นลิแกนด์ที่อาจจะเป็นขั้วบวกหรือขั้วลบ เรซินที่เป็นขั้วลบจะเรียกว่า cation exchanger จะมีหน้าที่จับกับสารที่มีประจุบวก และเรซินที่เป็นขั้วบวกจะเรียกว่า anion exchanger จะมีหน้าที่จับกับสารที่มีประจุลบ หลักการทำงาน คือ โปรตีนจะถูกทำให้จับกับตัวแลกเปลี่ยนประจุ (ion exchange resin) ในคอลัมน์ โดยโปรตีนที่มีประจุเหมือนกับเรซินแลกเปลี่ยนประจุหรือโปรตีนที่ไม่มีประจุจะถูกผลักให้ผ่านคอลัมน์ลงมาก่อน ส่วนโปรตีนที่มีประจุตรงข้ามกับเรซินก็จะติดอยู่กับคอลัมน์ การแยกโปรตีนที่จับกับตัวแลกเปลี่ยนประจุออกมาทีหลัง ทำได้โดยการชะด้วยสารละลายที่มีเกลือที่มีความเข้มข้นสูง ซึ่งจะไปรบกวนแรงดึงดูดระหว่างประจุของโปรตีนและตัวแลกเปลี่ยนประจุ ด้วยการเพิ่มความเข้มข้นสารละลายเกลือทีละเล็กละน้อย (salt gradient) โปรตีนที่จับกับเรซินได้อ่อนกว่าก็จะหลุดออกมาก่อน ส่วนโปรตีนที่จับแบบแน่นก็จะหลุดออกมาทีหลัง ตัวอย่างเรซินที่ใช้ในโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออนดังในตาราง 2

ตาราง 1 ตัวอย่างเม็ดเจลที่ใช้ในโครมาโทกราฟีแบบเจลฟิลเตรชัน

Gel type	Fractionation range (kDa; globular proteins)	Bead diameter (μm)
Sephadex G-10	0-0.7	40-120
Sephadex G-25	1-5	50-150
Sephadex G-100	4-150	40-120
Sephadex G-200	5-600	40-120
Sephacryl S-100	1-100	25-75
Sephacryl S-300	10-1500	25-75
Sepharose 6-B	10-4000	45-165
Sepharose 2-B	70-40000	60-200
Bio-Gel P-2	0.1-1.8	45-90
Bio-Gel P-6	1-6	90-180
Bio-Gel P-30	2.5-40	90-180
Bio-Gel P 100	5-100	90-180
Bio-Gel A 0.5m	10-500	75-150
Bio-Gel A 5m	10-5000	75-150
Bio-Gel A 15m	40-15000	75-150

ที่มา: Walsg, G. (2002). *Proteins Biochemistry and Biotechnology*. p. 122.

4. การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์

Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) เป็นวิธีการเพื่อใช้ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนในแต่ละขั้นตอน และใช้ในการหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน กล่าวคือ SDS-PAGE เกิดจาก cross-linked ของ polyacrylamide gel ที่มี sodium dodecyl sulphate (SDS) และ reducing agent เช่น บีต้าเมอร์แคปโตเอทานอล (β -mercaptoethanol) เป็นส่วนประกอบ โดยเมื่อโปรตีนรวมตัวกับ SDS ประจุลบจาก SDS จะจับกับโปรตีนอย่างแน่นหนาทำให้โปรตีนทั้งหมดเป็นประจุลบและทำลายแรงดึงดูดระหว่างโปรตีนทำให้โปรตีนเกิดการคลายตัวจากโครงสร้างตติยภูมิกลายเป็นรูปแท่ง ดังนั้นการเคลื่อนที่ของโปรตีนจะ

เคลื่อนที่ไปหาประจุบวกในสนามไฟฟ้า และการเคลื่อนที่ของโปรตีนขึ้นอยู่กับน้ำหนักโมเลกุลเพียงอย่างเดียว โดยโปรตีนที่มีมวลโมเลกุลน้อยจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าโปรตีนที่มีมวลโมเลกุลมาก ดังนั้นจะทำให้เห็นจำนวนของโปรตีนที่มีอยู่ในสารตัวอย่าง โดยถ้าโปรตีนบริสุทธิ์จะปรากฏเพียง 1 แถบหลังจากการนำเจลไปทำการย้อมสี และสามารถกำหนดน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนโดยเปรียบเทียบกับตัวอย่างโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล

ตาราง 2 ตัวอย่างเรซินของ stationary phase ในโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน

Ion exchanger	Chemical structure of the functional group	Abbreviation
Cation, weak	Carboxymethyl-	CM
Cation, strong	Sulfopropyl-	SP
Cation, strong	Sulfoethyl-	SE
Cation, intermediate	Phospho-	P
Anion, weak	Diethylaminoethyl-	DEAE
Anion, weak	Dimethylaminoethyl-	DMAE
Anion, weak	Polyethylencimine	PI
Anion, strong	Trimethylaminoethyl-	TMAE
Anion, strong	Trimethylaminomethyl-	Q
Anion, strong	Trimethylaminohydroxypropyl-	QA
Anion, strong	Diethyl-(2-hydroxypropyl)-aminoethyl	QAE
Anion, strong	Quaternized polyethyleneimine	QPI

ที่มา: Luqman, I. M. (2012). *Ion Exchange Technology II: Application*. p. 7.

5. การตรวจสอบหาปริมาณโปรตีน

นอกจากการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนแล้ว ยังต้องวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ที่เตรียมได้ในแต่ละขั้นตอน ในส่วนของการวิเคราะห์โปรตีนทำได้โดยอาศัยคุณสมบัติต่างๆ ของโปรตีนซึ่งทำได้หลายวิธี โดยแต่ละวิธีจะมีความไวต่อการวิเคราะห์ต่างกัน วิธีที่ใช้กันมาก คือ

วิธีของแบรดฟอร์ด Bradford (1976)

เป็นการวัดปริมาณโปรตีนโดยใช้ Coomassie Brilliant Blue G-250 ซึ่งสามารถดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร การย้อมติดสี Coomassie ของโปรตีนจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วและเสร็จสมบูรณ์ได้ภายใน 2 นาที และสีจะคงทนอยู่ได้ถึง 1 ชั่วโมง โดยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นภายใต้สภาวะที่เป็นกรด สารละลายที่ใช้จะมีสีแดง (red form) เมื่อจับกับโปรตีนจะกลายเป็นสีน้ำเงิน (blue form) โดยรูปแบบสีแดงของสีย้อม Coomassie จะให้อิเล็กตรอนอิสระแก่หมู่ไฮดรอกซิลของโปรตีน ซึ่งจะทำให้โปรตีนแตกตัว มีสถานะเป็นลบและเกิดส่วนที่ไม่ชอบน้ำของโปรตีน ส่วนนี้ในโครงสร้างตติยภูมิของโปรตีนจับกับสีย้อมบริเวณไม่มีขั้วแบบนอนโควาลเลนต์ (non-covalent) ด้วยแรงแวนเดอร์วาลส์ พันธะที่จับกันมีความแข็งแรงโดยปฏิกิริยา ไฮดรอนิกของทั้งโปรตีนและสีย้อม โปรตีนจะติดสีย้อม Coomassie ด้วยความคงทนด้วยรูปแบบสีน้ำเงิน ดังนั้นจึงสามารถวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมดในสารละลายได้โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง

6. การตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์

การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ เป็นการตรวจสอบความสามารถของเอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยาหนึ่งๆ ซึ่งสามารถวัดได้จากอัตราการเปลี่ยนสับสเตรทไปเป็นผลิตภัณฑ์ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม โดยอาจแสดงในเทอมของปริมาณของสับสเตรทที่ถูกสลายไปต่อหน่วยเวลา หรืออาจแสดงเป็นยูนิตของเอนไซม์ (enzyme units)

ยูนิตของเอนไซม์ หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่แคทาไลสต์หรือเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงของสับสเตรท 1 โมลต่อวินาทีภายใต้สภาวะที่กำหนด สามารถเขียนเป็นสมการได้ดังนี้

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิตต่อวินาที)} = \frac{\text{ปริมาณสับสเตรทที่ถูกแคทาไลสต์}}{\text{เวลา}}$$

ภายใต้สภาวะที่กำหนด หมายถึง สภาวะที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ ได้แก่ พีเอช อุณหภูมิ ความเข้มข้นของสับสเตรท ความแรงไอออน และการมีโคแฟกเตอร์

ในแต่ละขั้นตอนของการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ ต้องมีการตรวจสอบว่าแต่ละขั้นตอนเอนไซม์มีความบริสุทธิ์มากขึ้นเพียงไร โดยการวิเคราะห์กิจกรรมจำเพาะ (specific activity) ของเอนไซม์ โดยคำนวณจากปริมาณของสับสเตรทที่ถูกแคทาไลสต์โดยเอนไซม์ต่อปริมาณโปรตีนทั้งหมดในปฏิกิริยาต่อหน่วยเวลา หรือค่ากิจกรรมเอนไซม์ต่อปริมาณโปรตีนทั้งหมด สามารถคำนวณได้จาก

$$\text{กิจกรรมจำเพาะ (ยูนิตต่อมิลลิกรัม)} = \frac{\text{กิจกรรมของเอนไซม์ทั้งหมด}}{\text{ปริมาณโปรตีนทั้งหมด}}$$

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการทำเอนไซม์ PHBV depolymerase ให้บริสุทธิ์

Sang; et al. (2006) ได้แยก *Paecilomyces lilacinus* F4-5 จากดินซึ่งสามารถย่อยสลายฟิล์ม PHBV ได้ ศึกษาเอนไซม์โดยการนำเอนไซม์มาทำให้บริสุทธิ์ โดยนำสารละลายส่วนใสมาตกตะกอนด้วยเกลียวแอมโมเนียมซัลเฟต จากนั้นนำมาผ่านคอลัมน์ butyl-Sepharose ที่ชะด้วย 0-1 โมลาร์ของเกลียวแอมโมเนียมซัลเฟต แล้วเลือก fraction ที่มีแอกติวิตีของเอนไซม์ที่ดีที่สุดมาไดอะไลซิสด้วยบัฟเฟอร์ Tris-HCl ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ จากนั้นผ่านคอลัมน์ Resource Q ชะด้วย 0-12.5 มิลลิโมลาร์ของโซเดียมคลอไรด์ นำเอนไซม์ที่ได้มาไดอะไลซิสด้วยบัฟเฟอร์ Tris-HCl ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ จากนั้นตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนและหาน้ำหนักโมเลกุลด้วย SDS-PAGE พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุล 45 กิโลดาลตัน เมื่อศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์พบว่า เอนไซม์สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พีเอช 7 และมีความเสถียรเป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิต่ำกว่า 40 องศาเซลเซียส ในขณะที่การทำงานของเอนไซม์จะลดลงที่อุณหภูมิสูงกว่า 55 องศาเซลเซียส

Shah; et al. (2007a) ได้แยก *Bacillus* sp. AF3 สามารถย่อยสลาย PHBV ได้จากกากตะกอนน้ำเสีย อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ คือ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 7 ทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 20 วันในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี PHBV เป็นแหล่งคาร์บอน จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บสารละลายส่วนใส แล้วทำให้บริสุทธิ์โดยตกตะกอนด้วยเกลียวแอมโมเนียมซัลเฟต และนำโปรตีนมาผ่านโครมาโทกราฟีแบบ เจลฟิลเตรชันด้วย Sephadex G-75 วิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธีเลาเวรี และตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนและหาขนาดน้ำหนักโมเลกุลด้วย SDS-PAGE พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 37 กิโลดาลตัน นอกจากนี้ Shah; et al. (2007b) ยังได้แยก *Streptovorticillium kashmirensis* AF1 จากกากตะกอนในกระบวนการบำบัดน้ำเสีย อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 45 องศาเซลเซียส พีเอช 8 จากนั้นนำสารละลายส่วนใสที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์โดยตกตะกอนด้วยเกลียวแอมโมเนียมซัลเฟตที่ 80% จากนั้นทำโครมาโทกราฟีแบบเจลฟิลเตรชันด้วย Sephadex G-75 พบว่ามี 2 พีกที่มีแอกติวิตีของเอนไซม์ที่ดีที่สุด วิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธีเลาเวรี และตรวจสอบความบริสุทธิ์และหาขนาดน้ำหนักโมเลกุลด้วย SDS-PAGE พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 35 และ 45 กิโลดาลตัน

Zhanyong; et al. (2012) คัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ *Acidovorax* sp. สายพันธุ์ HB01 จากตัวอย่างจุลินทรีย์ที่ใช้ในการกำจัดน้ำเสีย โดยการเลี้ยงเชื้อ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงเพื่อให้ได้

สารละลายส่วนใสและทำให้เข้มข้นขึ้น โดยการกรองด้วยกระดาษกรอง Pall Omega ซึ่งจะตัดสารละลายที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 10 กิโลดาลตันออกไป จากนั้นนำสารละลายที่ได้มาไดอะไลซิสและลงคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน Q Sepharose fast flow ซะด้วยโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0-1 โมลาร์ จากนั้นเก็บ fraction เพื่อทดสอบการย่อยสลาย PHBV แล้วนำ fraction ที่มีแอกติวิตีของเอนไซม์ที่ดีที่สุดมาไดอะไลซิสต่อและลงคอลัมน์ Sephadex G-75 และขนาดน้ำหนักโมเลกุลด้วย SDS-PAGE พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 43.3 กิโลดาลตัน การตรวจสอบโปรตีนจะใช้ BCA Protein Assay Kits พิเศษและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ คือ 7.0 และ 50 องศาเซลเซียสตามลำดับ นอกจากนี้การศึกษาลักษณะของไอออนโลหะ พบว่า Na^+ , K^+ และ Ca^{2+} สามารถเพิ่มอัตราการย่อยได้ดียิ่งขึ้น ในขณะที่ Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} และ Fe^{2+} จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ รวมทั้ง EDTA ก็มีผลยับยั้งที่สำคัญต่อการทำงานของเอนไซม์ และในปีเดียวกันนี้ Wang; et al. (2012) ได้แยกเชื้อจุลินทรีย์ *Pseudomonas mendocina* สายพันธุ์ DSWY0601 จากน้ำเสียโรงงานต้มเหล้า ที่สามารถย่อยสลาย PHB และ PHBV โดยการเลี้ยงเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงเพื่อให้ได้สารละลายส่วนใส และกรองด้วย Pall Filtration ทำการไดอะไลซิสและลงคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน DEAE-Sepharose fast flow ซะด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0-1 โมลต่อลิตร จากนั้นนำ fraction ที่มีแอกติวิตีของเอนไซม์สูงที่สุดมาทำไดอะไลซิสและต่อด้วยลงคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน Phenyl Sepharose 6 fast flow ซะด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 0-0.8 โมลาร์ ตรวจสอบความบริสุทธิ์ตรวจและหาขนาดน้ำหนักโมเลกุลด้วย SDS-PAGE พบว่า มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 59.8 กิโลดาลตัน พิเศษและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ คือ 8.5 และ 50 องศาเซลเซียสตามลำดับ เสถียรต่ออุณหภูมิที่ 20-50 องศาเซลเซียส เสถียรที่พีเอช 8-9.5 และนอกจากนี้ยังพบว่า PMSF และ SDS มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

Akbar; et al. (2013) ได้แยกเชื้อจุลินทรีย์ *Sreptomycetes* AF-11 จากตัวอย่างตะกอนน้ำเสียเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงเพื่อให้ได้สารละลายส่วนใส นำมาตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่จุดอิ่มตัว 60% นำไปปั่นเหวี่ยง และนำส่วนใสที่ได้มาตกตะกอนต่อด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่จุดอิ่มตัว 80% จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง โปรตีนทั้งหมดทำการไดอะไลซิสโดย protein dialysis kit เพื่อกำจัดเกลือ จากนั้นโปรตีนตัวอย่าง 2 มิลลิลิตร ถูกไหลลงคอลัมน์ Sephadex G-75 นำ fraction ที่มีแอกติวิตีของเอนไซม์ที่ดีที่สุดไปตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนและหาขนาดน้ำหนักโมเลกุลด้วย SDS-PAGE พบว่า มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 51 กิโลดาลตัน เมื่อศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ พบว่า เอนไซม์เสถียรที่อุณหภูมิ 35-55 องศาเซลเซียส พีเอช 6-8 ไอออนโลหะที่มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ คือ Zn^{2+} และพบว่า

EDTA และ PMSF สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้นั้นแสดงว่าเอนไซม์ที่ได้เป็นกลุ่มของ serine hydrolase และในปีเดียวกัน Hailong; et al. (2013) เลี้ยง *Pseudomonas mendocina* ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บสารละลายส่วนใส แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเพื่อกำจัดสารละลายที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 10 กิโลดาลตันออกไป ต่อด้วยไดอะไลซิสและลงคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน Q Sepharose Fast Flow ขนาด 10 มิลลิลิตร โดยเปลี่ยนบัฟเฟอร์จาก 0-1 โมลาร์ จากนั้นเก็บแต่ละ fraction ไปทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเลือก fraction ที่มีแอกติวิตีของเอนไซม์ที่ดีที่สุดไปผสมกับเกลียวแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 1.3 โมลาร์ ก่อนที่จะโหลดลงคอลัมน์ phenyl Sepharose 6 Fast Flow แล้วชะโดยเกลียวแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 1.3-0 โมลาร์ แล้วนำมาไดอะไลซิสอีกครั้ง จากนั้นนำไปโปรตีนโหลดลงคอลัมน์ Sephadex G-75 วัดปริมาณโปรตีนโดยใช้ BCA protein assay kit และสุดท้ายตรวจสอบความบริสุทธิ์และหาขนาดน้ำหนักโมเลกุลโดย SDS-PAGE พบว่า มีน้ำหนักโมเลกุล 59.4 และ 33.8 กิโลดาลตัน เมื่อศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์พบว่า ค่าพีเอชที่เหมาะสมคือ 8 ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 50 องศาเซลเซียส ผลของไอออนโลหะพบว่า Na^+ และ K^+ ช่วยเพิ่มอัตราการย่อยสลายได้ดีขึ้น

Yashchuk; Miyazaki; & Hermida. (2014) เลี้ยง *Streptomyces* sp. SSM 5670 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 110 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บสารละลายส่วนใส จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง YM 10 regenerated cellulose นำโปรตีนลงคอลัมน์ โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน DEAE-Sephadex A-50 ขนาด 10 มิลลิลิตร โดยเปลี่ยนบัฟเฟอร์จาก 0-0.7 โมลาร์ เลือก fraction ที่มีแอกติวิตีของเอนไซม์ดีที่สุดไปทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยกระบวนการอัลตราฟิลเตรชัน จากนั้นนำเอนไซม์มาโหลดลงคอลัมน์ Sephadex G-100 และทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยกระบวนการอัลตราฟิลเตรชัน วัดปริมาณโปรตีนโดยใช้วิธีการของเบรดฟอร์ด และตรวจสอบความบริสุทธิ์และหาขนาดน้ำหนักโมเลกุลโดย SDS-PAGE พบว่า มีน้ำหนักโมเลกุล 24 กิโลดาลตัน เมื่อศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์พบว่าสามารถทำงานได้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 7.5 และการทำงานของเอนไซม์จะลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 45 องศาเซลเซียส

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

1. เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

ตาราง 3 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	บริษัท
1. ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow clean bench)	Lab leader
2. ตู้บ่มเชื้อ (incubator)	Delta Laboratory
3. ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า (incubator shaker)	New Brunswick Scientific
4. ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air sterilizing)	Astell
5. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave)	Meditop.Co.,Ltd
6. เครื่องวัดพีเอช (pH meter)	Fisher Scientific
7. เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)	Hsiangtat
8. เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge)	Meditop
9. เครื่องอัลตราโซนิเคเตอร์ (ultrasonicator)	Labquip
10. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer)	Bangkok High Lab
11. เครื่อง hotplate stirrer	Laboratory & Medical Supplies
12. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (analytical balance)	Ohaus Corporation
13. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)	TN-Science

2. สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

ตาราง 4 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

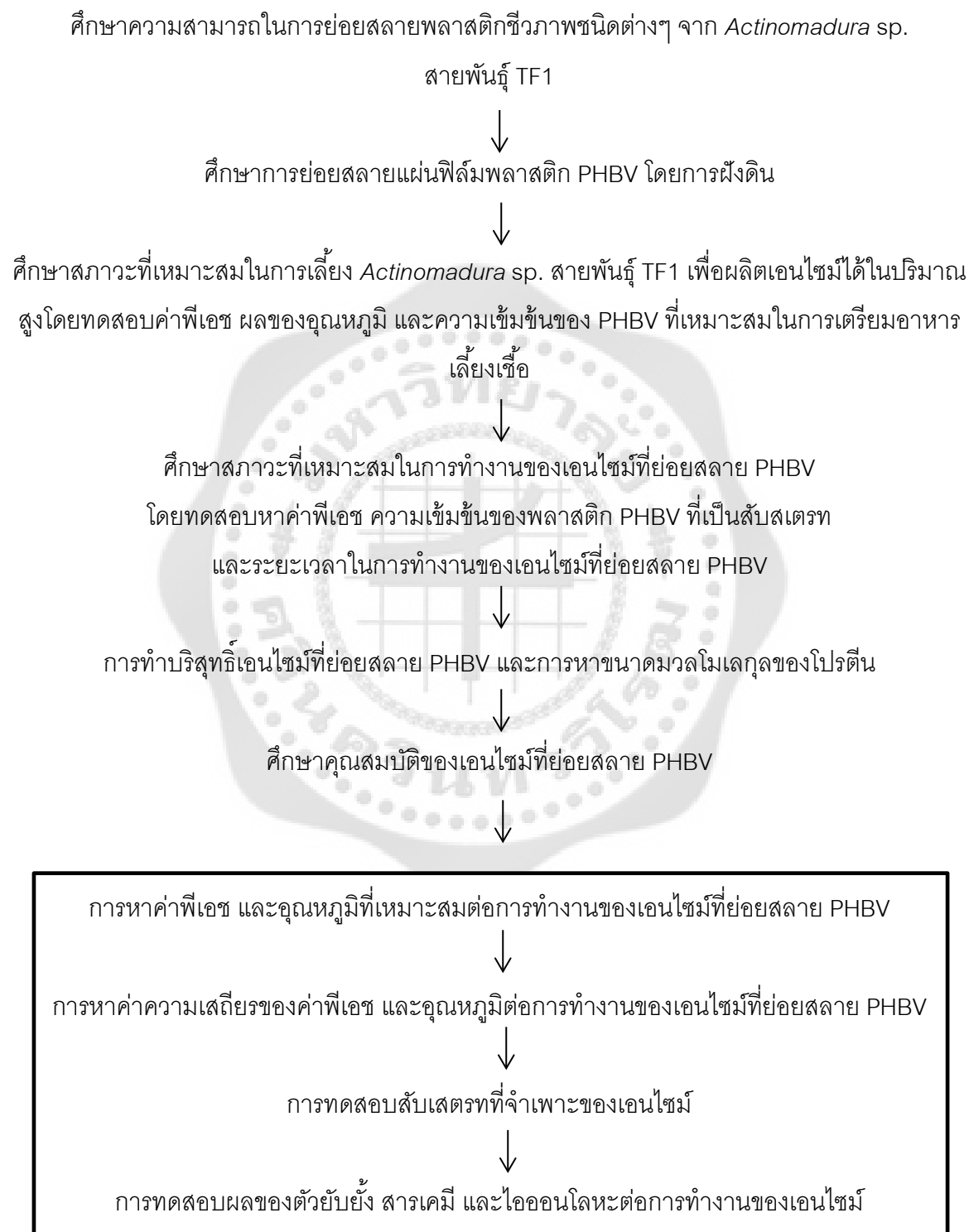
สารเคมี	บริษัท
1. Poly(3-hydroxybutyric acid –co-3-hydroxyvaleric acid) (PHBV)	Sigma-Aldrich
2. Poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] (PHB)	Sigma-Aldrich
3. Polybutylene succinate (PBS)	Sigma-Aldrich
4. Polybutylene succinic adipate (PBSA)	Sigma-Aldrich
5. Poly(L-lactide) (PLA)	Sigma-Aldrich
6. Polycaprolactone (PCL)	Sigma-Aldrich
7. Tris	Pacific Science
8. Glycine	Pacific Science
9. Resolving Gel Buffer	Bio-Rad Laboratories
10. 10x Tris/Glycine/SDS Buffer	Bio-Rad Laboratories
11. Stacking Gel Buffer	Bio-Rad Laboratories
12. 2-Mercaptoethanol	Bio-Rad Laboratories
13. Ammonium Persulfate	Bio-Rad Laboratories
14. TEMED	Bio-Rad Laboratories
15. 2x Laemmli Sample	Bio-Rad Laboratories
16. 30% Acrylamide/Bis Solution 29:1	Bio-Rad Laboratories
17. Prestained Protein Ladder, Broad Range	BioLab
18. Coomassie Brilliant Blue R-250	Pacific Science
19. Dichloromethane	Merck
20. 2-Propanol	Merck Merck
21. Acetic acid	Bio Basic Canada Inc.
22. Yeast Extract	Becton, Dickinson and Company
23. Peptone	Company
24. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Bio Basic Inc.

ตาราง 4 (ต่อ)

สารเคมี	บริษัท
25. Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Bio Basic Canada Inc.Sigma
26. Phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF)	Sigma-Aldrich
27. 1,4-dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich
28. Trichloroacetic Acid (TCA)	Loba Chemie
29. Casein	EMD Chemicals
30. Gelatin	Sigma-Aldrich
31. Cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB)	Sigma-Aldrich
32. Sodium carbonate (Na_2CO_3)	Sigma-Aldrich
33. Tween 80	Sigma-Aldrich
34. Triton X-100	Sigma-Aldrich
35. Calcium chloride (CaCl_2)	Ajax Finechem Pty Ltd
36. Sodium chloride (NaCl)	Ajax Finechem Pty Ltd
37. Potassium chloride (KCl)	Ajax Finechem Pty Ltd
38. Iron(II)sulfate(FeSO_4)	Ajax Finechem Pty Ltd
39. Magnesium sulfate (MgSO_4)	Ajax Finechem Pty Ltd
40. Manganese(II)sulfate (MnSO_4)	Carlo Erba
41. Zinc sulfate (ZnSO_4)	Ajax Finechem Pty Ltd
42. Copper(II)sulfate (CuSO_4)	Ajax Finechem Pty Ltd

วิธีดำเนินการวิจัย

ขั้นตอนการดำเนินการ สรุปได้ดังนี้



1. การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพชนิดต่างๆ จากเชื้อ *Actinomadura* sp. สายพันธุ์ TF1

การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์โดยนำ *Actinomadura* sp. สายพันธุ์ TF1 ที่แยกได้จากดินปุ๋ยหมักซึ่งได้รายงานมาก่อนหน้านี้ (ทายาท ศรียาภัย; และคณะ. 2557) มาเตรียมเป็นเชื้อเริ่มต้น (starter) โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง yeast-malt extract agar International Streptomyces Project (ISP-2) (ภาคผนวก ก ข้อ 1) บนจานเพาะเชื้อแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน

การทดสอบการย่อยสลายของพลาสติกชีวภาพด้วยวิธีการเกิดบริเวณใส (clear zone) ได้ประยุกต์ใช้วิธีการของ Nishida; & Tokiwa. (1993) พลาสติกชีวภาพที่ใช้ในงานวิจัยนี้ได้แก่ PHBV, PHB, PBSA, PLA และ PCL ซึ่งใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญของ *Actinomadura* sp. สายพันธุ์ TF1 การเตรียมอาหารแข็งเริ่มจากชั่งพลาสติกชีวภาพ 1 กรัม ละลายใน dichloromethane 20 มิลลิลิตร นำมาผสมรวมกันกับ 1 ลิตร basal medium (ภาคผนวก ก ข้อ 2) โดยอาศัยเครื่องอัลตราโซนิกเคเตอร์ (ultrasonicator) นำอาหารที่เตรียมบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้ dichloromethane ระเหย เดิมวุ้น (agar) 20 กรัม และนำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เทใส่จานเพาะเชื้อ การทดสอบการย่อยสลายของพลาสติกชีวภาพโดยการวน *Actinomadura* sp. สายพันธุ์ TF1 บนผิวหน้าอาหารแข็ง จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน สังเกตและวัดขนาดบริเวณใสที่เกิดขึ้น

2. การศึกษาการย่อยสลายแผ่นฟิล์มพลาสติก PHBV โดยการฝังดิน

2.1 การเตรียมแผ่นฟิล์มพลาสติก PHBV

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

2.2 การเตรียมดิน

ดินที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้เป็นดินมูลไส้เดือน เตรียมโดยนำดินที่ได้มาบ่มฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ให้เย็น

2.3 การเตรียม *Actinomadura* sp. สายพันธุ์ TF1

นำ *Actinomadura* sp. สายพันธุ์ TF1 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB low salt ปริมาตร 100 มิลลิลิตรในฟลาस्कขนาด 250 มิลลิลิตร พีเอช 8 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง จากนั้นทำการเก็บเซลล์โดยนำอาหารเลี้ยงเชื้อปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เติมน้ำ basal medium ปริมาตร 40 มิลลิลิตรลงไปให้หมดหลอด และ resuspend ให้เข้ากันเพื่อเตรียมเป็นเชื้อที่ใช้ในการทดลองต่อไป

2.4 การเตรียมหน่วยทดลอง

ประกอบด้วยกระบอกขนาด 35 x 25 เซนติเมตร โดยแบ่งออกเป็นกระบอกควบคุมและกระบอกทดลอง เริ่มจากนำดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาณ 1 กิโลกรัม เทลงในกระบอกเกลี่ยให้ทั่วทั้งกระบอก จากนั้นนำแผ่นฟิล์มพลาสติก PHBV มาวางบนดิน (แผ่นฟิล์มพลาสติกผ่านการฆ่าเชื้อโดยการล้างด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 70% และ น้ำกลั่น 2 ครั้ง) เททับด้วยดินอีก 1 กิโลกรัม สำหรับกระบอกควบคุมจะเติมน้ำ basal medium ที่ไม่มีสายพันธุ์ TF1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณ 40 มิลลิลิตรลงไปในกระบอก สำหรับกระบอกทดลองจะเติมน้ำ basal medium ปริมาตร 40 มิลลิลิตรที่มีสายพันธุ์ TF1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งเตรียมได้จากข้อ 2.3 จากนั้นคลุมกระบอกด้วยแผ่นพลาสติก นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ เก็บแผ่นพลาสติก PHBV ทุกสัปดาห์เพื่อนำมาชั่งน้ำหนักที่ลดลง

2.5 การวิเคราะห์ผล

นำแผ่นฟิล์มพลาสติก PHBV ออกจากกระบอกไปล้างด้วยน้ำกลั่นจนสะอาด เช็ดให้แห้ง และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำแผ่นพลาสติกที่ได้ไปชั่งน้ำหนักเพื่อนำน้ำหนักที่หายไป และศึกษาลักษณะบนพื้นผิวของพลาสติกด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope; SEM) โดยส่งวิเคราะห์แผ่นพลาสติกที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. การผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพจาก *Actinomadura* sp. สายพันธุ์ TF1 ในอาหารเหลว

นำ *Actinomadura* sp. สายพันธุ์ TF1 มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB low salt (ภาคผนวก ก ข้อ 3) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาस्कขนาด 250 มิลลิลิตร เป็นเวลา 96 ชั่วโมง (4 วัน) เพื่อเตรียมเป็นเชื้อเริ่มต้น จากนั้นนำเชื้อเริ่มต้นมาเลี้ยงต่อในอาหาร basal medium ที่ประกอบไปด้วยแหล่งคาร์บอนของ PHBV ที่ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร ปริมาณ 100 มิลลิลิตร ใน ฟลาस्क

ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นำไปเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใส (supernatant) มาวัดการทำงานของเอนไซม์ที่ย่อยสลาย PHBV

4. การวัดการทำงานของเอนไซม์ที่ย่อยสลาย PHBV และการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

การวัดการทำงานของเอนไซม์ที่ย่อยสลาย PHBV โดยวัดได้จากความขุ่น (turbidity) ที่ลดลงของสารละลาย PHBV โดยประยุกต์วิธีการของ Shah และคณะ (Shah; et al. 2007a) โดยทำการเตรียมสารละลายสับสเตรท PHBV ที่ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตรในสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่มีค่าพีเอช 8 (ภาคผนวก ข) ด้วยเครื่องอัลตราโซนิกเคเตอร์ จากนั้นเตรียม reaction mixture โดยการผสมกันระหว่างสารละลายสับสเตรท PHBV 0.9 มิลลิลิตร และส่วนใสปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวัด optical density ที่ 650 นาโนเมตร (OD_{650}) กำหนดให้ 1 ยูนิตของเอนไซม์ที่ย่อยสลาย PHBV เท่ากับ ปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลง 1 หน่วยที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร ภายใต้สภาวะทดสอบ การวัดการทำงานของเอนไซม์ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยชุดหาโปรตีน (Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit) จากบริษัท Thermo Scientific ที่ดัดแปลงวิธีการของ Bradford (Bradford. 1976) โดยดูสารละลายตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายผสม Coomassie 1 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 10 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร (OD_{595}) ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) การหาค่าความเข้มข้นของโปรตีนโดยการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (standard curve) ซึ่งการเตรียมกราฟมาตรฐานจะใช้สารละลาย Bovine serum albumin (BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐานที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้ 0, 2.5, 5, 10, 15, 20 และ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค ข้อ 1)

5. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PHBV จาก *Actinomadura* sp. สายพันธุ์ TF1

โดยการหาผลของค่าพีเอช อุณหภูมิ และความเข้มข้นของ PHBV ที่เหมาะสมในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

5.1 การหาค่าพีเอชที่เหมาะสม

นำ *Actinomadura* sp. สายพันธุ์ TF1 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB low salt เป็นเวลา 96 ชั่วโมง เพื่อเตรียมเป็นเชื้อเริ่มต้น จากนั้นนำเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 8 มิลลิลิตร เลี้ยงในอาหาร basal medium ที่มี PHBV ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร ปรับค่าพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อ ให้มีค่า 6, 7, 8 และ 9 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุกๆ 48 ชั่วโมง เป็นเวลา 10 วัน โดยเก็บส่วนใสมาวัด การทำงานของเอนไซม์ตามวิธีการข้อ 4

5.2 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสม

นำ *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 ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ปรับค่าพีเอชที่เหมาะสม จากนั้นนำไปเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30, 35, 40, 45 และ 55 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุกๆ 48 ชั่วโมงเป็นเวลา 10 วัน โดยเก็บส่วนใสมาวัดการทำงานของเอนไซม์ตามวิธีการข้อ 4

5.3 การหาความเข้มข้นของ PHBV ที่เหมาะสม

โดยนำ *Actinomadura* sp. สายพันธุ์ TF1 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB low salt เป็นเวลา 96 ชั่วโมง เพื่อเตรียมเป็นเชื้อเริ่มต้น จากนั้นนำเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 8 มิลลิลิตรเลี้ยงต่อในอาหาร basal medium ที่มี PHBV ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันดังนี้ 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่มีค่าพีเอชที่เหมาะสม ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร โดยทำการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ นำไปเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุกๆ 48 ชั่วโมงเป็นเวลา 10 วัน โดยเก็บส่วนใสด้านบนมาวัดการทำงานของเอนไซม์ตามวิธีการข้อ 4

6. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการวัดการทำงานของเอนไซม์ที่ย่อยสลาย PHBV

นำ *Actinomadura* sp. สายพันธุ์ TF1 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB low salt เป็นเวลา 96 ชั่วโมง เพื่อเตรียมเป็นเชื้อเริ่มต้น จากนั้นนำเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 8 มิลลิลิตร เลี้ยงต่อในอาหาร basal medium ที่มี PHBV ที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม ปรับค่าพีเอชที่เหมาะสม ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาเลี้ยงที่อุณหภูมิที่เหมาะสม เขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อ

นาที่ เก็บตัวอย่างที่ระยะเวลาที่เหมาะสม จากนั้นเก็บส่วนใสโดยการนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสมาทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของ เอนไซม์หยาบ (crude enzyme) โดยทำการเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ PHBV ที่ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตรในสารละลายบัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl ที่มีค่าพีเอช 7, 8 และ 9 โดยอาศัยเครื่องอัลตราโซนิกเคเตอร์ จากนั้นเตรียม reaction mixture ตามวิธีการข้อ 4 นำมาบ่มที่ อุณหภูมิ 35, 45 และ 55 องศาเซลเซียส ระยะเวลาที่ใช้ในการบ่มได้แก่ 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 และ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำแต่ละตัวอย่างมาวัดการทำงานของเอนไซม์

7. การทำเอนไซม์ย่อยสลาย PHBV ให้บริสุทธิ์ และการหาขนาดโมเลกุลของ โปรตีน

7.1 การเลี้ยง *Actinomadura* sp. สายพันธุ์ TF1 เพื่อผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลาย PHBV

นำ *Actinomadura* sp. สายพันธุ์ TF1 เลี้ยงในอาหารเหลว LB low salt ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เป็นเวลา 96 ชั่วโมง เพื่อเตรียมเป็นเชื้อเริ่มต้น จากนั้นเก็บ เซลล์โดยนำเชื้อเริ่มต้นมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ล้างเซลล์ ด้วย basal medium นำมาปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บเซลล์ จากนั้นนำเซลล์มาเลี้ยงต่อในอาหาร basal medium ปริมาณ 100 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วย PHBV ที่ความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อ ปริมาตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 144 ชั่วโมง เชย้าที่ ความเร็ว 180 รอบต่อนาที นำอาหารเลี้ยงเชื้อไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว รอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเก็บส่วนใสเพื่อนำมาวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน และคำนวณหาค่าการทำงานของเอนไซม์ที่ย่อยสลาย PHBV

7.2 การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

นำสารละลายส่วนใสที่ได้จากข้อ 7.1 มาทำการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ระดับความอิ่มตัวของเกลือ 80 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร (ภาคผนวก ง) โดยค่อยๆเติม เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ละน้อยอย่างช้า ๆ พร้อมทั้งมีการกวนตลอดเวลาด้วยแท่งแม่เหล็กกวนสาร (magnetic bar) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำสารละลายเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตทั้งหมดไป ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วน ที่เป็นตะกอนโปรตีนไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

7.3 การกำจัดเกลือโดยการไดอะไลซิส

นำตะกอนโปรตีนที่ได้จากข้อ 7.2 มาละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่ค่าพีเอช 8 จากนั้นนำสารละลายที่ได้บรรจุลงในถุงไดอะไลซิส (dialysis bag) ซึ่งขนาดมวลโมเลกุลของสารที่สามารถผ่านเข้าออกได้ประมาณ 12-14 กิโลดาลตัน โดยนำถุงไดอะไลซิสไปแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอช 8.0 มีการวนตลอดเวลาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยนสารละลายบัฟเฟอร์ทุกๆ 1, 2, 4 ชั่วโมง และทิ้งไว้ข้ามคืน จากนั้นดูดสารละลายออกจากถุงไดอะไลซิสเพื่อนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนใสที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนและวัดการทำงานของเอนไซม์

7.4 การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน

เริ่มจากนำสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 7.3 มาผ่านคอลัมน์ที่ภายในบรรจุเรซิน (resin) แลกเปลี่ยนไอออนชนิด diethylaminoethanol (DEAE) Sepharose การเตรียมเรซินโดยการนำเรซินมาบรรจุลงคอลัมน์ (เส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 เซนติเมตร x ความยาวคอลัมน์ 20 เซนติเมตร) ล้างเรซินด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl พีเอช 8 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ จากนั้นนำสารละลายเอนไซม์ผ่านลงคอลัมน์และชะต่อด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl พีเอช 8 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่ผสมกับสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันตั้งแต่ 0, 50, 100, 200, 300, 400 และ 500 มิลลิโมลาร์ เก็บสารละลายที่ถูกชะออกมาหลอดละ 5 มิลลิลิตร เพื่อนำมาวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนและค่าการทำงานของเอนไซม์ต่อไป

7.5 การตรวจสอบหาความบริสุทธิ์และน้ำหนักมวลโมเลกุลของเอนไซม์ด้วยวิธี

sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

การเตรียมเจล 12.5 เปอร์เซ็นต์ของโพลีอะคริลาไมด์โดยประยุกต์วิธีการของ Laemmli (1970) ประกอบด้วยเจลส่วนชั้นล่าง (resolving gel) (ภาคผนวก จ ข้อ 1) และเจลส่วนชั้นบน (stacking gel) (ภาคผนวก จ ข้อ 2) โปรตีนมาตรฐานที่ใช้เปรียบเทียบขนาดของโปรตีนตัวอย่างมีมวลโมเลกุลขนาดตั้งแต่ 245, 180, 135, 100, 75, 63, 48, 35, 25, 20, 17 และ 11 กิโลดาลตัน (kDa) การเตรียมโปรตีนตัวอย่างโดยการเติม 2x loading buffer (ภาคผนวก จ ข้อ 3) และนำมาต้มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (waterbath) เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นโหลดโปรตีนตัวอย่าง และโปรตีนมาตรฐานลงในแผ่นเจล ตั้งค่าเครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบแนวตั้ง (electrophoresis vertical) โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์ 150 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำแผ่นเจลมาย้อมด้วย staining buffer (ภาคผนวก จ

ข้อ 4) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำแผ่นเจลมาล้างด้วย destaining buffer (ภาคผนวก จ ข้อ 5 และ 6) เพื่อสังเกตการเกิดแถบของโปรตีนตัวอย่าง และเปรียบเทียบการเคลื่อนที่ของโปรตีนตัวอย่างกับโปรตีนมาตรฐาน

7.6 การศึกษาการทำงานของเอนไซม์ด้วยวิธีไซโมแกรม (zymogram)

เตรียมเจล 12.5 เปอร์เซ็นต์โพลีอะคริลามิเดตามวิธีการข้อ 7.5 ผสมกับสับสเตรท PHBV ที่มีความเข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในสารละลาย 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl ที่พีเอช 8 จากนั้นเตรียมโปรตีนตัวอย่างโดยการเติม 2x loading buffer โหลดโปรตีนลงแผ่นเจล ตั้งค่าเครื่องอิเล็กโตรโฟเรซิสแบบแนวตั้งโดยใช้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์ 150 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง การล้าง SDS ออกจากแผ่นเจลโดยนำแผ่นเจลมาล้างด้วย 25 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) isopropanol ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และนำมาล้างต่อด้วยน้ำกลั่นอีก 2 ครั้ง เพื่อล้าง isopropanol จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง สังเกตบริเวณใสที่เกิดขึ้นบนแผ่นเจล การถ่ายรูปเจลโดยนำเจลวางบนแผ่นกระดาษสีดำจะปรากฏภาพเป็นแถบสีดำ

8. การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ที่ย่อยสลาย PHBV

8.1 ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

นำสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม จากนั้นตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ในสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอชตั้งแต่ 3-12 โดยเตรียมบัฟเฟอร์ดังนี้ acetate buffer (พีเอช 3-6), phosphate buffer (พีเอช 6-8), Tris-HCl buffer (พีเอช 8-10) และ glycine-NaOH buffer (พีเอช 10-12) โดยบ่มเอนไซม์ร่วมกับสับสเตรทในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมที่ได้ผลจากข้อ 6

8.2 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

นำสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม จากนั้นตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ โดยบ่มเอนไซม์ร่วมกับสับสเตรทในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่แตกต่างกันดังนี้ 35, 45, 55, 65, 75, 85 และ 95 องศาเซลเซียส ที่พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ได้ผลจากข้อ 8.1 และในระยะเวลาที่เหมาะสมที่ได้ผลจากข้อ 6

8.3 การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ที่ค่าพีเอชต่างๆ

นำสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม จากนั้นนำสารละลายเอนไซม์ที่ได้ไปเก็บไว้ในสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอชต่างๆ ดังนี้ acetate buffer (พีเอช 3-6), phosphate buffer (พีเอช 6-8), Tris-HCl buffer (พีเอช 8-10) และ glycine-NaOH buffer (พีเอช 10-12) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดการทำงานของเอนไซม์

8.4 การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆ

นำสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม จากนั้นนำสารละลายเอนไซม์บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิต่างๆ ดังนี้ 35, 45, 55, 65, 75, 85 และ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 นาที และนำไปวัดการทำงานของเอนไซม์

8.5 การศึกษาสับสเตรทที่จำเพาะต่อเอนไซม์

เตรียมสับสเตรทพลาสติกชีวภาพ (PHBV, PHB, PLA, PBS และ PCL) ที่ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร ในสารละลายบัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl พีเอช 8 การวัดการทำงานของเอนไซม์ประยุกต์ใช้วิธีของ Oda; et al. (1997) โดย reaction mixture ประกอบด้วย เอนไซม์ที่บริสุทธิ์ 0.5 มิลลิลิตร รวมกับสารละลายบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วยสับสเตรทพลาสติกชีวภาพ 2.5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที นำไปวัดค่า OD ที่ 650 นาโนเมตร กำหนด 1 ยูนิตของการทำงานของเอนไซม์เท่ากับค่าความขุ่นที่ลดลง 1 หน่วย ที่ OD 650 นาโนเมตรภายใต้สภาวะที่กำหนด

สับสเตรทที่ใช้ในการวัดการทำงานของโปรตีเอส (protease) ได้แก่ เคซีน (casein) และ เจลาติน (gelatin) สำหรับการวัดการทำงานของเอนไซม์ caseinase (caseinolytic activity) โดยเตรียมสารละลายเคซีน 0.6 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตรในสารละลายบัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl พีเอช 8 จากนั้นนำเอนไซม์ที่บริสุทธิ์ 0.5 มิลลิลิตรผสมกับสารละลายเคซีน ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาและตกตะกอนโปรตีนด้วยการเติมกรดไตรคลอโรอะซิติก (trichloroacetic acid: TCA) ความเข้มข้น 0.3 โมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 20 นาที จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 นำของเหลวที่กรองได้ 2 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายไฮเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) 6 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และเติมสารละลายฟอลินฟีนอล (Folin and Ciocalteu's phenol reagent) ความ

เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่า OD ที่ 660 นาโนเมตร การวัดการทำงานของโปรตีเอสโดยการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน ซึ่งการเตรียมกราฟมาตรฐานจะใช้ไทโรซีน (L-tyrosine) ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 0, 50, 100, 150, 200, 250 และ 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค ข้อ 2) กำหนด 1 ยูนิตของการทำงานของเอนไซม์โปรตีเอสเท่ากับความสามารถของเอนไซม์ในการย่อยสลายเคซีนได้ไทโรซีน 1 ไมโครกรัม ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด สำหรับการวัดการทำงานของ gelatinase (gelatinase activity) โดยเตรียมสารละลายเจลาติน 0.6 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตรในสารละลายบัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl พีเอช 8 จากนั้นนำเอนไซม์ที่บริสุทธิ์ 0.5 มิลลิลิตรผสมกับสารละลายเจลาติน ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมเมอร์คิวรีคลอไรด์ (HgCl_2) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 20 นาที นำไปวัดค่า OD ที่ 630 นาโนเมตร กำหนด 1 ยูนิตของการทำงานของเอนไซม์เจลาติเนสเท่ากับความขุ่นที่ลดลง 1 หน่วย ที่ OD 630 นาโนเมตรภายใต้สภาวะที่กำหนด

สับสเตรทที่ใช้ในการวัดการทำงานของเอนไซม์เอสเทอเรส (esterase) ได้แก่ *p*-nitrophenyl-acetate (C2), *p*-nitrophenyl-butyrate (C4), *p*-nitrophenyl-decanoate (C10), *p*-nitrophenyl-palmitate (C16) และ *p*-nitrophenyl-stearate (C18) โดยนำมาบ่มกับเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที วัดการดูดกลืนแสงของ *p*-nitrophenol ที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากสับสเตรทที่ OD 410 นาโนเมตร กำหนด 1 ยูนิตของเอนไซม์เท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่ผลิต 1 ไมโครโมลของ *p*-nitrophenol ต่อ 1 นาทีที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

สับสเตรทที่ใช้ในการวัดการทำงานของเอนไซม์ไลเปส (lipase) ได้แก่ olive oil โดยเตรียมสารละลาย olive oil ที่ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรต่อปริมาตรในสารละลายบัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl พีเอช 8 โดยอาศัยเครื่องอัลตราโซนิกเคเตอร์ การวัดการทำงานของเอนไซม์โดย reaction mixture ประกอบด้วยเอนไซม์ที่บริสุทธิ์ 0.5 มิลลิลิตร รวมกับสารละลาย olive oil 2.5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที นำไปวัดค่า OD ที่ 650 นาโนเมตร กำหนด 1 ยูนิตของการทำงานของเอนไซม์เท่ากับความขุ่นที่ลดลง 1 หน่วย ที่ OD 650 นาโนเมตร ภายใต้สภาวะที่กำหนด

8.6 การศึกษาผลของตัวยับยั้งที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์

นำสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมที่ได้ผลจากข้อ 8.1 จากนั้นเติมตัวยับยั้งเอนไซม์ต่างๆ ได้แก่ phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF), ethylenediaminetetraacetate (EDTA) และ 1,4-dithiothreitol (DTT) ที่ระดับความเข้มข้น 1, 5 และ 10 มิลลิโมลาร์ โดยบ่มเอนไซม์ร่วมกับสับสเตรทใน

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิในอุณหภูมิที่เหมาะสม ในระยะเวลาที่เหมาะสมจากข้อ 6 จากนั้นวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์

8.7 การศึกษาผลของสารเคมีที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์

นำสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 8.1 จากนั้นเติมสารเคมีต่างๆ ได้แก่ cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB), sodium dodecyl sulfate (SDS), Tween 80, และ β -mercaptoethanol (β -ME) ที่ความเข้มข้น 1 และ 5 เปอร์เซ็นต์ โดยบ่มเอนไซม์ร่วมกับสับสเตรทในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิในอุณหภูมิที่เหมาะสม และในระยะเวลาที่เหมาะสมจากข้อ 6 จากนั้นวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์

8.8 การศึกษาผลของไอออนโลหะที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์

นำสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 8.1 จากนั้นเติมสารละลายไอออนโลหะต่างๆ ได้แก่ Na^+ , Ca^{2+} , K^+ , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} และ Hg^{2+} ที่ระดับความเข้มข้นสุดท้าย 1 และ 5 มิลลิโมลาร์ โดยบ่มเอนไซม์ร่วมกับสับสเตรทในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิในอุณหภูมิที่เหมาะสม และในระยะเวลาที่เหมาะสมจากข้อ 6 จากนั้นวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพชนิดต่างๆ จาก *Actinomadura* sp. สายพันธุ์ TF1

เพาะเลี้ยงสายพันธุ์ TF1 บนอาหารแข็ง ISP2 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นนำสายพันธุ์ TF1 วนบนผิวอาหารแข็งพลาสติกชีวภาพชนิดต่างๆ ประกอบไปด้วย PBSA, PHB, PHBV, PLA และ PCL บ่มที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วันสังเกตและวัดบริเวณใสที่เกิดขึ้น ผลการทดลองแสดงในตาราง 5

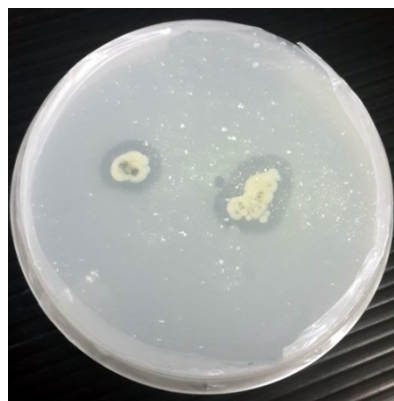
ตาราง 5 ขนาดบริเวณใสที่เกิดจากการเลี้ยงสายพันธุ์ TF1 บนอาหารแข็งพลาสติกชีวภาพ โดยบ่มที่ อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

พลาสติกชีวภาพ	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส (เซนติเมตร) $\pm$ S.E.
PBSA	1.8 ± 0.2
PHB	1.5 ± 0.3
PHBV	2.5 ± 0.2
PLA	2.0 ± 0.3
PCL	-

จากตาราง 5 พบว่า สายพันธุ์ TF1 สามารถย่อยพลาสติกชีวภาพ PBSA, PHBV และ PLA ได้ ดังภาพประกอบ 11 โดยสามารถย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ PHBV ได้ดีที่สุด มีขนาดบริเวณใส 2.5 ± 0.2 เซนติเมตร รองลงมาคือ พลาสติกชีวภาพ PLA และ PBSA โดยมีขนาดบริเวณใส 2.0 ± 0.3 และ 1.8 ± 0.2 เซนติเมตรตามลำดับ ดังนั้นจึงเลือกพลาสติกชีวภาพ PHBV ทำการศึกษาต่อในขั้นตอนต่อไป



PLA



PBSA



PHB



PHBV

ภาพประกอบ 11 การเกิดบริเวณใสของสายพันธุ์ TF1 บนอาหารแข็งพลาสติกชีวภาพชนิดต่างๆ ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

2. การศึกษาการย่อยสลายแผ่นฟิล์มพลาสติก PHBV โดยการฝังดิน

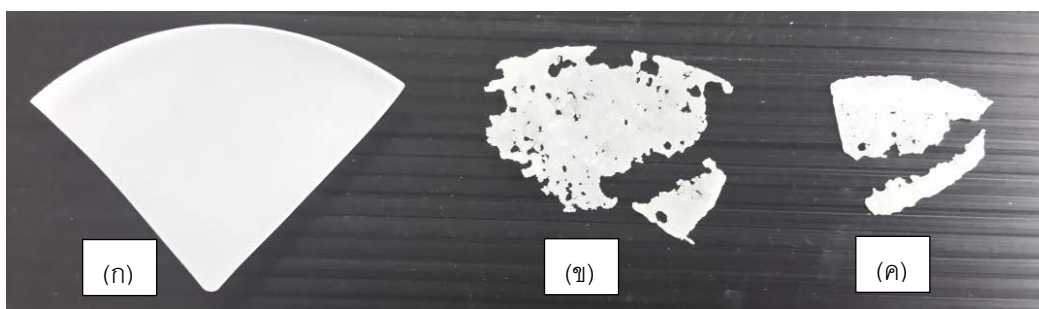
การศึกษการย่อยสลายแผ่นฟิล์มพลาสติก PHBV จากสายพันธุ์ TF1 โดยการฝังดินเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ เก็บผลทุกสัปดาห์เพื่อเปรียบเทียบน้ำหนักของแผ่นฟิล์มพลาสติก PHBV ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง ผลการทดลองแสดงในตาราง 6

ตาราง 6 ผลการวิเคราะห์หรือลดการย่อยสลายของแผ่นฟิล์ม PHBV (โดยน้ำหนัก)

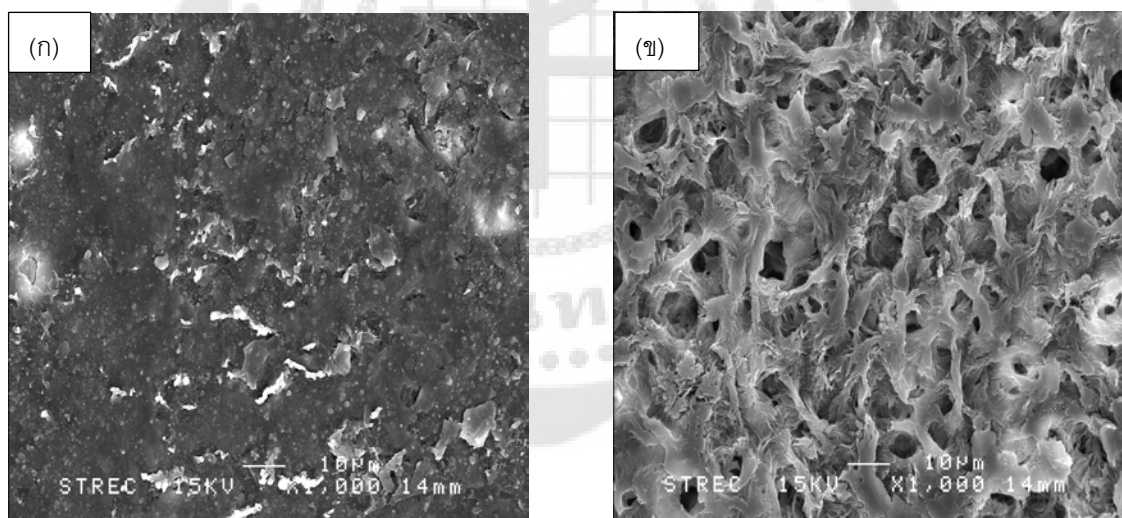
แผ่นฟิล์ม PHBV	น้ำหนักก่อนย่อย (g)	น้ำหนักหลังย่อย (g)	น้ำหนักที่ลดลง (g)	%การย่อยสลาย
สัปดาห์ที่ 1				
Control	0.25	0.25	0.00	0.00
1	0.25	0.11	0.14	56.00
2	0.25	0.12	0.13	52.00
3	0.25	0.12	0.13	52.00
สัปดาห์ที่ 2				
Control	0.25	0.25	0.00	0.00
1	0.25	0.03	0.22	88.00
2	0.25	0.04	0.21	84.00
3	0.25	0.03	0.22	88.00

จากตาราง 6 การศึกษาการย่อยแผ่นฟิล์มพลาสติก PHBV ด้วยสายพันธุ์ TF1 เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ โดยการเปรียบเทียบน้ำหนักของแผ่นฟิล์มพลาสติก PHBV ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองพบว่าแผ่นฟิล์มในกลุ่มควบคุมทั้งในสัปดาห์ที่ 1 และ 2 น้ำหนักของแผ่นฟิล์ม PHBV ยังเหลือเท่าเดิม ส่วนแผ่นฟิล์มในกลุ่มทดลองในสัปดาห์ที่ 1 น้ำหนักของแผ่นฟิล์ม PHBV หายไปประมาณ 53.33 ± 2.31 เปอร์เซ็นต์ และในสัปดาห์ที่ 2 น้ำหนักของแผ่นฟิล์มพลาสติก PHBV หายไปประมาณ 86.67 ± 2.31 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อสังเกตลักษณะพื้นผิวแผ่นฟิล์ม PHBV ด้วยตาเปล่า พบว่า สังเกตเห็นการผุกร่อนเกิดขึ้น ดังในภาพประกอบ 12

เมื่อสังเกตการเปลี่ยนแปลงลักษณะภายนอกของแผ่นฟิล์มพลาสติก PHBV ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองเพิ่มเติม โดยการสังเกตบริเวณพื้นผิวด้านบนของแผ่นฟิล์มพลาสติก PHBV ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) พบว่า เมื่อเปรียบเทียบลักษณะพื้นผิวของแผ่นฟิล์มในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองมีความแตกต่างกันในส่วนโครงสร้าง และลักษณะทางสัณฐานวิทยาอย่างชัดเจน โดยแผ่นฟิล์มพลาสติก PHBV ในกลุ่มควบคุมมีลักษณะค่อนข้างเรียบ และไม่มีรูพรุน ส่วนแผ่นฟิล์มพลาสติก PHBV ในกลุ่มทดลองพบว่า มีลักษณะพื้นผิวที่ขรุขระ มีรูพรุนเกิดขึ้นเป็นจำนวนมาก มีทั้งรูพรุนขนาดเล็กและขนาดใหญ่ มีรอยเว้าหรือลักษณะเป็นโพรงเกิดขึ้นบนพื้นผิวของแผ่นฟิล์ม ดังในภาพประกอบ 13



ภาพประกอบ 12 รูปการย่อยสลายแผ่นฟิล์มพลาสติก PHBV โดยสายพันธุ์ TF1 ด้วยการฝังดินเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ (ก) แผ่นฟิล์มพลาสติก PHBV ในกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการใส่เชื้อสายพันธุ์ TF1 ลงไปในดิน (ข) แผ่นฟิล์มพลาสติก PHBV ที่ฝังดินเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ (ค) แผ่นฟิล์มพลาสติก PHBV ที่ฝังดินเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์

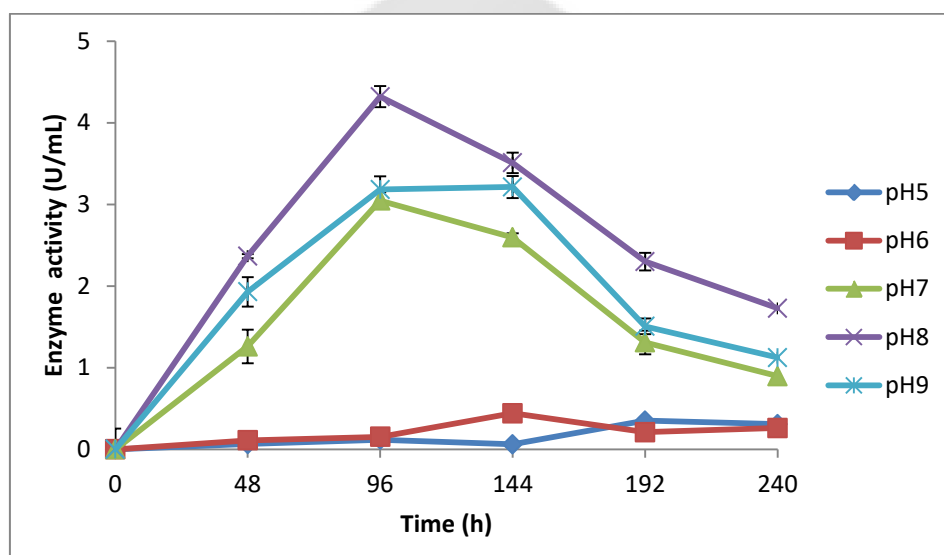


ภาพประกอบ 13 ลักษณะของแผ่นพลาสติก PHBV ที่ผ่านการย่อยสลายโดยสายพันธุ์ TF1 ด้วยการฝังดินเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (ก) แผ่นฟิล์มพลาสติก PHBV ในกลุ่มควบคุม (ข) แผ่นฟิล์มพลาสติก PHBV ในกลุ่มทดลอง

3. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PHBV จาก *Actinomadura* sp. สายพันธุ์ TF1

3.1 การหาค่าพีเอชที่เหมาะสม

นำสายพันธุ์ TF1 มาเลี้ยงในอาหาร basal medium ที่มี PHBV ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร ซึ่งปรับค่าพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีค่า 5, 6, 7, 8 และ 9 แล้วนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน โดยเก็บสารละลายส่วนใสมาวัดการทำงานของเอนไซม์ทุกๆ 48 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงในภาพประกอบ 14

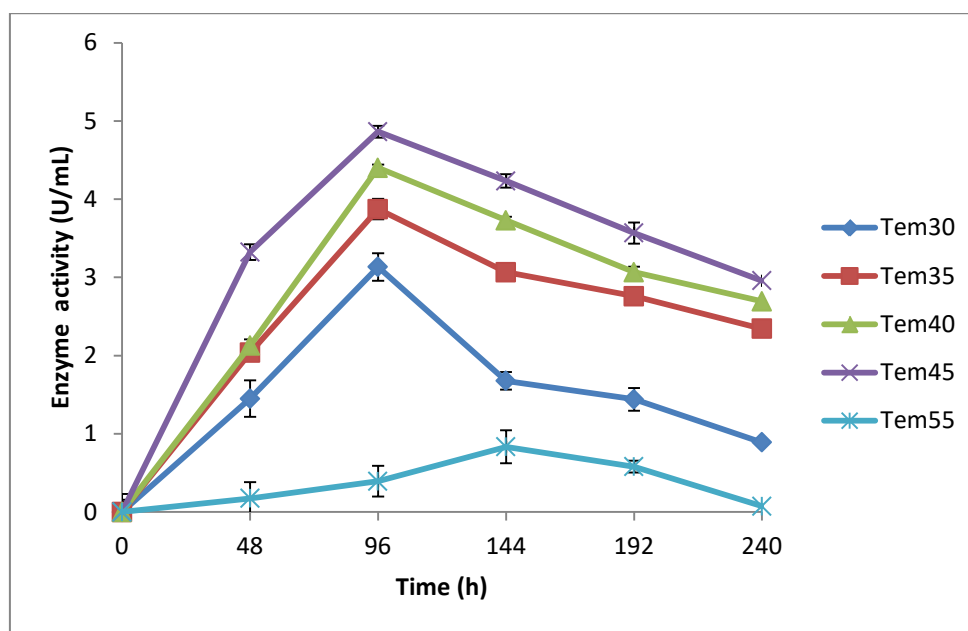


ภาพประกอบ 14 ผลของพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ PHBV depolymerase จากสายพันธุ์ TF1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว basal medium ที่มี PHBV ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตรปรับค่าพีเอชในอาหารแตกต่างกัน เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 240 ชั่วโมง

จากภาพประกอบ 14 พบว่า สายพันธุ์ TF1 สามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอช 8 ที่ 96 ชั่วโมง มีค่าการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 4.32 ± 0.02 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอช 9 และ 7 มีค่าการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 3.21 ± 0.18 และ 3.05 ± 0.21 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่พีเอชเป็นกรด คือ 5 และ 6 พบว่าเอนไซม์ที่ได้มีค่าการทำงานของเอนไซม์ลดลงมากกว่าร้อยละ 90

3.2 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสม

นำสายพันธุ์ TF1 มาเลี้ยงในอาหาร basal medium ที่มี PHBV ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร พีเอช 8 บ่มที่อุณหภูมิ 30, 35, 40, 45 และ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน โดยเก็บสารละลายส่วนใสมาวัดการทำงานของเอนไซม์ทุกๆ 48 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงในภาพประกอบ 15

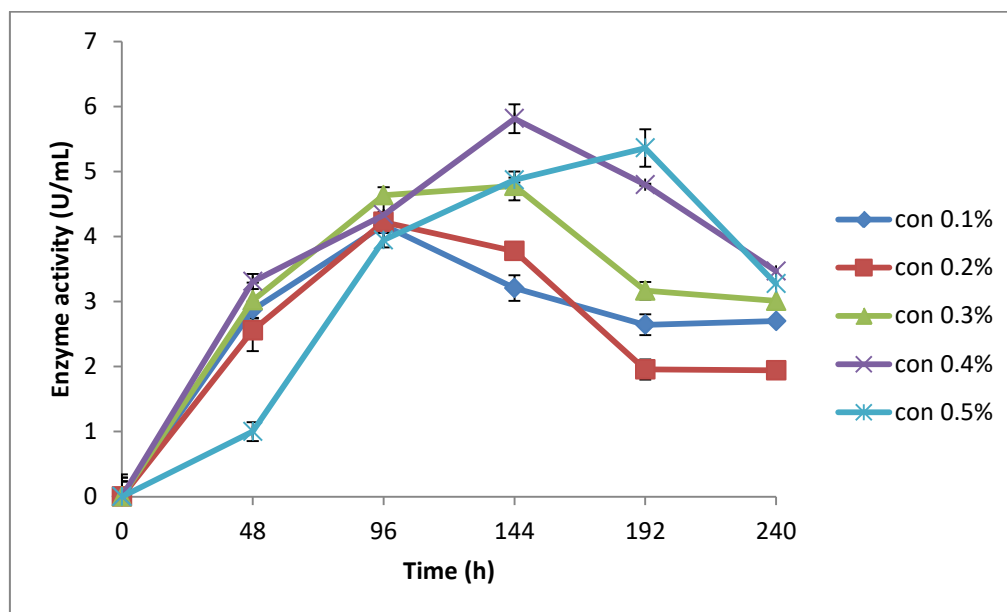


ภาพประกอบ 15 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ PHBV depolymerase จากสายพันธุ์ TF1 ในระยะเวลา 240 ชั่วโมง เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว basal medium ที่มี PHBV ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร ที่ค่าพีเอช 8 เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิแตกต่างกันเป็นเวลา 240 ชั่วโมง

จากภาพประกอบ 15 พบว่า สายพันธุ์ TF1 สามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดเมื่อเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ที่ 96 ชั่วโมง มีค่าการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 4.86 ± 0.1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รองลงมาที่อุณหภูมิ 40 และ 35 องศาเซลเซียส มีค่าการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 4.4 ± 0.08 และ 3.87 ± 0.04 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

3.3 การหาความเข้มข้นของ PHBV ที่เหมาะสม

นำสายพันธุ์ TF1 มาเลี้ยงในอาหาร basal medium ที่มี PHBV ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร พีเอช 8 บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน โดยเก็บสารละลายส่วนใสมาวัดการทำงานของเอนไซม์ทุกๆ 48 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงในภาพประกอบ 16



ภาพประกอบ 16 ผลของความเข้มข้น PHBV ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ PHBV depolymerase เมื่อเลี้ยงสายพันธุ์ TF1 ในอาหารเหลว basal medium ที่มี PHBV ความเข้มข้นแตกต่างกัน ที่ค่าพีเอช 8 เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 240 ชั่วโมง

จากภาพประกอบ 16 พบว่า สายพันธุ์ TF1 สามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของ PHBV 0.4 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร ที่ 144 ชั่วโมง มีค่าการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 5.81 ± 0.22 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รองลงมาที่ความเข้มข้น PHBV 0.5 และ 0.3 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร มีค่าการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 5.36 ± 0.14 และ 4.87 ± 0.12 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

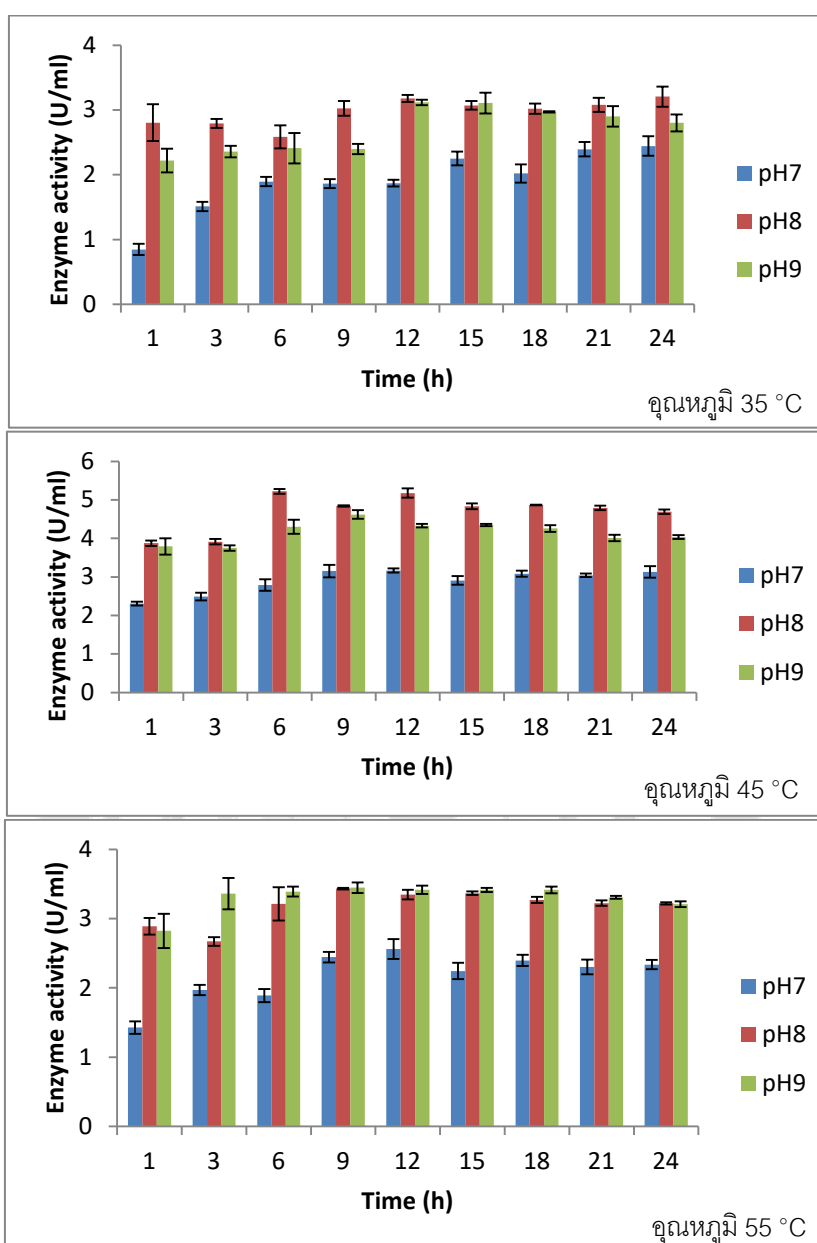
4. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการวัดการทำงานของเอนไซม์ที่ย่อยสลาย PHBV

นำเอนไซม์ที่ผลิตได้ในสภาวะที่เหมาะสม มาวัดการทำงานของเอนไซม์ดิบ โดยทำการเตรียมสารละลายสับสเตรท PHBV ที่ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร ในสารละลายบัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl ที่มีค่าพีเอช 7, 8 และ 9 จากนั้นเตรียม reaction mixture บ่มที่อุณหภูมิ 35, 45 และ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 และ 24 ชั่วโมง ดังในภาพประกอบ 17

จากการหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ จากสายพันธุ์ TF1 ที่ช่วงพีเอชระยะเวลาในการบ่ม และที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่า ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เอนไซม์สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่สารละลายสับสเตรทที่มีค่าพีเอช 8 ระยะเวลาในการบ่ม 12 ชั่วโมง มีค่าการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 3.18 ± 0.06 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รองลงมาสารละลายสับสเตรทที่พีเอช 9 มีค่าการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 3.12 ± 0.04 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ส่วนสารละลายสับสเตรทที่พีเอช 7 เอนไซม์สามารถทำงานได้ดีที่สุดในระยะเวลาการบ่ม 24 ชั่วโมง มีค่าการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 2.44 ± 0.15 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พบว่า เอนไซม์สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่สารละลายสับสเตรทที่มีค่าพีเอช 8 ระยะเวลาในการบ่ม 6 ชั่วโมง มีค่าการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 5.22 ± 0.06 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งให้ผลใกล้เคียงกับที่ระยะเวลาในการบ่ม 12 ชั่วโมง มีค่าการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 5.18 ± 0.12 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ส่วนสับสเตรทที่มีค่าพีเอช 9 เอนไซม์สามารถทำงานได้ดีที่สุดในระยะเวลาการบ่ม 9 ชั่วโมง มีค่าการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 4.62 ± 0.11 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และสารละลายสับสเตรทที่มีค่าพีเอช 7 เอนไซม์สามารถทำงานได้ดีที่สุดในระยะเวลาการบ่ม 12 ชั่วโมง มีค่าการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 3.16 ± 0.06 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

และที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส พบว่า เอนไซม์สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่พีเอช 8 และ 9 ที่ระยะเวลาในการบ่ม 9 ชั่วโมง มีค่าการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 3.44 ± 0.01 และ 3.44 ± 0.07 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ส่วนสารละลายสับสเตรทที่มีค่าพีเอช 7 เอนไซม์สามารถทำงานได้ดีที่สุดในระยะเวลาการบ่ม 12 ชั่วโมง มีค่าการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 2.24 ± 0.14 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และเมื่อเปรียบเทียบสภาวะที่เหมาะสมในการวัดการทำงานของเอนไซม์ ทั้งสามช่วงอุณหภูมิพบว่า ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส สับสเตรทที่มีค่าพีเอช 8 ระยะเวลาในการบ่ม 6 ชั่วโมง เอนไซม์สามารถทำงานได้ดีที่สุด ดังนั้นจึงนำค่าที่ได้มาใช้ในการศึกษาต่อไป

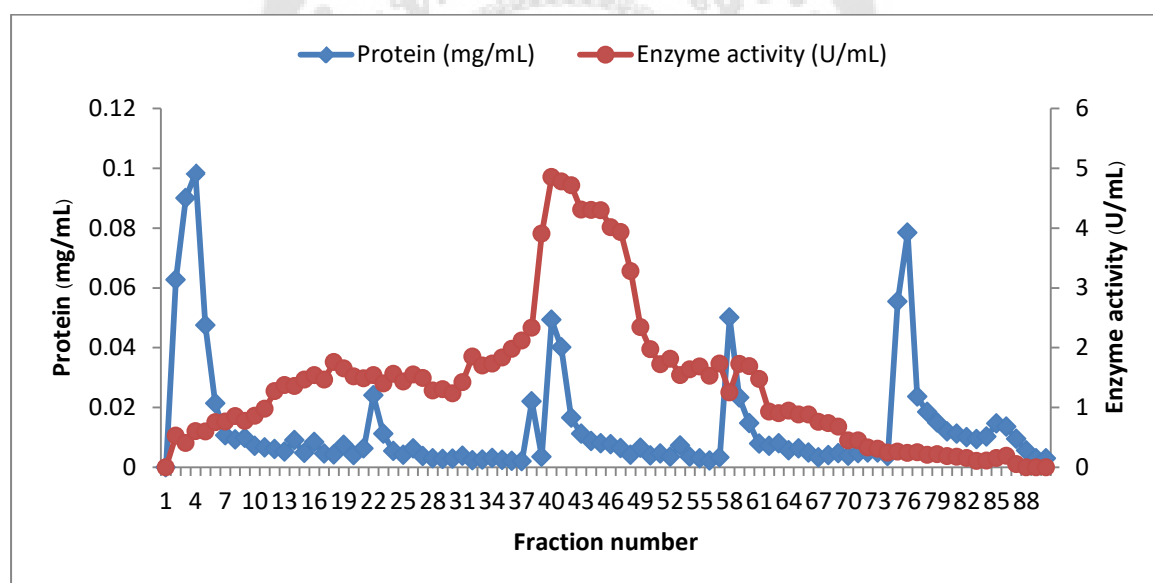


ภาพประกอบ 17 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการวัดการทำงานของเอนไซม์ PHBV depolymerase โดยเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ TF1 ในสภาวะที่เหมาะสม นำส่วนใสมาวัดการทำงานของเอนไซม์ โดยเตรียมสับสเตรท PHBV ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร ในสารละลายบัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl ที่มีค่าพีเอช 7, 8 และ 9 จากนั้นเตรียม reaction mixture นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 35, 45 และ 55 องศาเซลเซียส ระยะเวลาที่ใช้ในการบ่ม ได้แก่ 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 และ 24 ชั่วโมง

5. การทำเอนไซม์ย่อยสลาย PHBV ให้บริสุทธิ์ และการหาขนาดโมเลกุลของโปรตีน

5.1 การทำบริสุทธิ์ของเอนไซม์ที่ย่อยสลาย PHBV

การทำบริสุทธิ์ของเอนไซม์ที่ย่อยสลาย PHBV จากสายพันธุ์ TF1 โดยนำเอนไซม์ดิบที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่เหมาะสมมาผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ โดยเริ่มจากตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ระดับความอิ่มตัวของเกลือ 80 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอนโปรตีน แล้วนำตะกอนโปรตีนที่ได้มาไดอะไลซีสในสารละลายบัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl พีเอช 8 และทำโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออนโดยใช้คอลัมน์ DEAE แล้วชะคอลัมน์ด้วยโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0-0.5 โมลาร์ ใน 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl พีเอช 8 ด้วยอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที เก็บตัวอย่างละ 5 มิลลิลิตร นำมาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและหาค่าการทำงานของเอนไซม์ ผลการทดลองแสดงในภาพประกอบ 18



ภาพประกอบ 18 การทำบริสุทธิ์ของเอนไซม์ที่ย่อยสลาย PHBV จากสายพันธุ์ TF1 โดยทำโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออนโดยใช้คอลัมน์ DEAE ชะคอลัมน์ด้วยโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0-0.5 โมลาร์ ใน 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl พีเอช 8 อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที เก็บตัวอย่างละ 5 มิลลิลิตร

จากภาพประกอบ 18 พบว่า มีโปรตีนออกจากคอลัมน์ 5 ช่วง ได้แก่ 2-7, 20-24, 38-48, 58-61 และ 75-85 จากนั้นหาค่าการทำงานของเอนไซม์พบว่าช่วงที่ 3 สารละลายในหลอดที่ 39-48 เอนไซม์มีทำงานได้ดี โดยหลอดที่ 40 เอนไซม์สามารถทำงานได้ดีที่สุด เท่ากับ 4.86 ± 0.23 หน่วยต่อมิลลิลิตร และมีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 0.049 มิลลิกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร คิดเป็นค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 99.18 ± 4.76 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน จากนั้นรวมหลอดที่ 39-48 แล้วทำไดอะไลซิสด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl พีเอช 8 จากนั้นนำโปรตีนมาทำให้มีความเข้มข้นขึ้น การทำบริสุทธิ์ของเอนไซม์ย่อยสลาย PHBV จากสายพันธุ์ TF1 ผลการทดลองแสดงในตาราง 7

ตาราง 7 การทำบริสุทธิ์เอนไซม์ที่ย่อยสลาย PHBV จากสายพันธุ์ TF1

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)	Purification fold
Culture supernatant	19.7	$3,271 \pm 80.8$	165.7 ± 4.1	100.0	1.0
Dialysis	10.7	$2,334 \pm 45.1$	218.5 ± 2.3	71.4	1.3
DEAE-Sepharose	3.5	$1,630 \pm 15.3$	463.7 ± 4.4	49.9	2.8

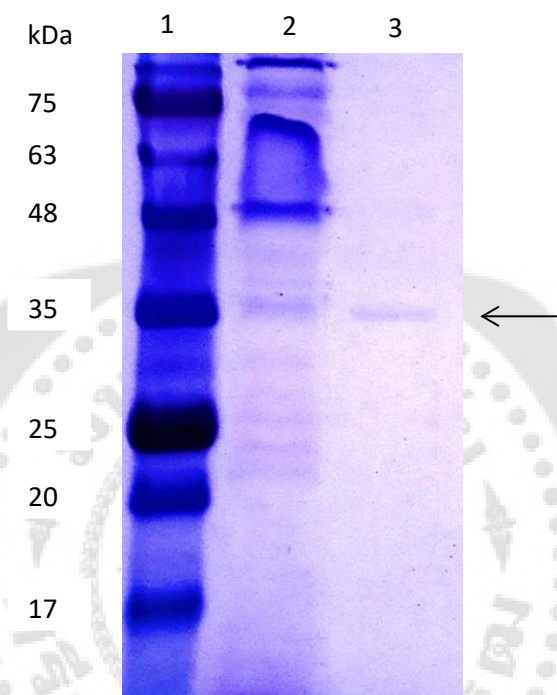
จากตาราง 7 พบว่า การทำบริสุทธิ์ของเอนไซม์ย่อยสลาย PHBV ด้วยคอลัมน์ DEAE-Sepharose ค่าการทำงานของเอนไซม์เพิ่มขึ้นส่วนปริมาณโปรตีนลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับ Culture supernatant โดยค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ Culture supernatant เท่ากับ 165.7 ± 4.1 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ในขั้นตอนการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ระดับความอิ่มตัวของเกลือ 80 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตรแล้วนำมาไดอะไลซิส พบว่ามีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 218.5 ± 2.3 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ให้ผลผลิตร้อยละ 71.4 และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 1.3 เท่า จากนั้นทำโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออนโดยใช้คอลัมน์ DEAE พบว่ามีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 463.7 ± 4.4 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ให้ผลผลิตร้อยละ 49.9 และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 2.8 เท่า

5.2 การตรวจสอบหาความบริสุทธิ์และน้ำหนักมวลโมเลกุลของเอนไซม์ด้วยวิธี

sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

นำเอนไซม์ที่ย่อยสลาย PHBV ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่างๆ มาตรวจสอบความบริสุทธิ์และหาขนาดโมเลกุลของเอนไซม์ด้วย SDS-PAGE ผลการทดลองแสดงในภาพประกอบ

19

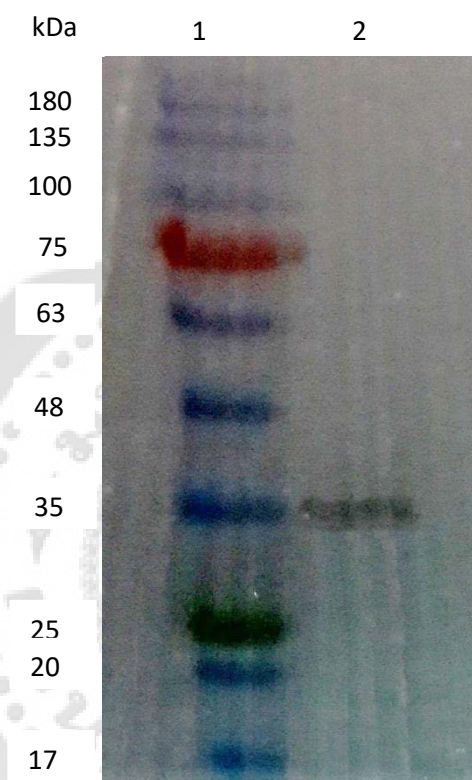


ภาพประกอบ 19 SDS-PAGE ของเอนไซม์ที่ย่อยสลาย PHBV จากสายพันธุ์ TF1 ในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ ได้แก่ แถวที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน แถวที่ 2 โปรตีนหลังจากการทำไดอะไลซิส และ แถวที่ 3 โปรตีนหลังจากที่ผ่านคอลัมน์ DEAE-Sepharose

ภาพประกอบ 19 แสดงลักษณะแถบโปรตีนที่ย่อยสลาย PHBV ที่ทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่างๆ พบว่า เอนไซม์ที่แยกได้ในแต่ละขั้นตอนมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น โดยแถวที่ 1 คือ ขนาดโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน สามารถแยกโปรตีนได้ในช่วง 17-75 กิโลดาลตัน ในแถวที่ 2 คือ เอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตและผ่านกระบวนการไดอะไลซิส พบว่ามีแถบโปรตีนหลายแถบต่อกัน และในแถวที่ 3 คือ เอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์ด้วยโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออนโดยใช้คอลัมน์ DEAE พบว่ามีโปรตีนเพียง 1 แถบ จากนั้นคำนวณหาขนาดโมเลกุลของโปรตีนโดยเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน พบว่ามีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 35 กิโลดาลตัน

5.3 การศึกษาการทำงานของเอนไซม์ด้วยวิธีไซโมแกรม (zymogram)

นำเอนไซม์ที่ย่อยสลาย PHBV ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ มาตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ เพื่อยืนยันขนาดโมเลกุลของเอนไซม์ที่ย่อยสลาย PHBV ด้วยวิธีไซโมแกรม ผลการทดลองแสดงในภาพประกอบ 20



ภาพประกอบ 20 Zymogram ของเอนไซม์ที่ย่อยสลาย PHBV จากสายพันธุ์ TF1 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ ได้แก่ แถวที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน และแถวที่ 2 โปรตีนภายหลังผ่านคอลัมน์ DEAE-Sepharose

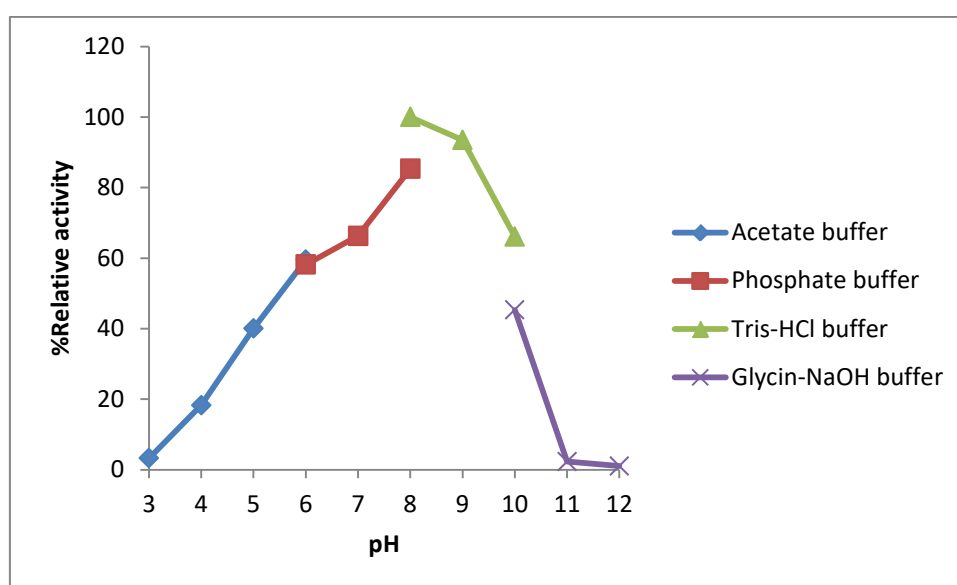
จากภาพประกอบ 20 พบว่า แถบโปรตีนขนาด 35 กิโลดาลตัน เพียงแถบเดียวที่แสดงให้เห็นการทำงานของเอนไซม์ โดยเกิด clear zone ขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการหาขนาดโมเลกุลของเอนไซม์โดยวิธี SDS-PAG แสดงให้เห็นว่า แถบโปรตีนที่ขนาด 35 กิโลดาลตัน เป็นแถบโปรตีนเป้าหมาย

6. การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ที่ย่อยสลาย PHBV

6.1 ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

นำเอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์มาตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ โดยบ่มในสารละลายบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่มีค่าพีเอชในช่วง 3-12 ดังนี้ acetate buffer (พีเอช 3-6), phosphate buffer (พีเอช 6-8), Tris-HCl buffer (พีเอช 8-10) และ glycine-NaOH buffer (พีเอช 10-12) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงในภาพประกอบ

21

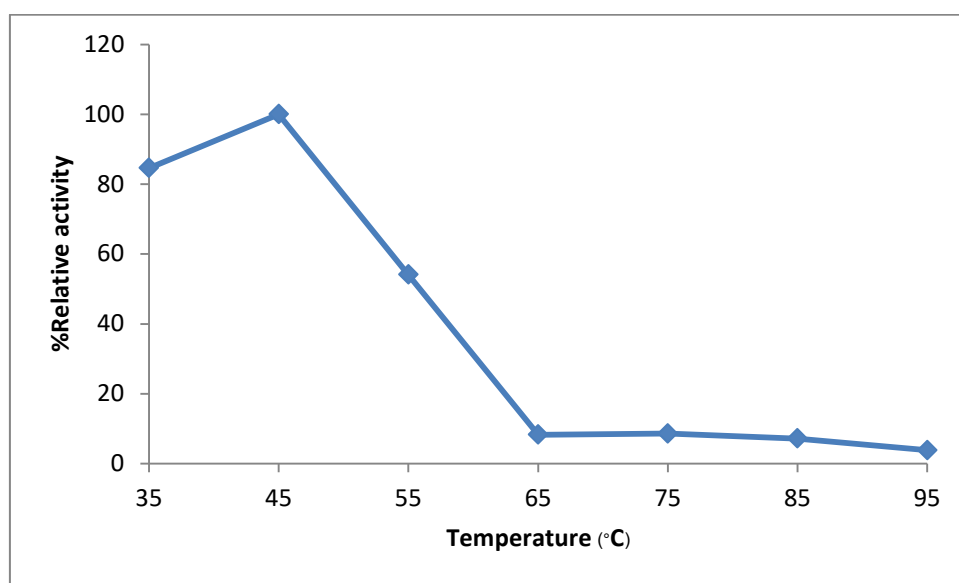


ภาพประกอบ 21 ผลของพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ PHBV

จากภาพประกอบ 21 พบว่า ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์จะอยู่ในช่วง 8-9 ซึ่งเอนไซม์สามารถทำงานได้มากกว่าร้อยละ 80 ในขณะที่เอนไซม์สามารถทำงานได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ที่พีเอช 8 ในสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl ดังนั้น พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์มากที่สุดคือพีเอช 8 นอกจากนี้พบว่าที่พีเอช 4, 5 และ 10 การทำงานของเอนไซม์ลดลงน้อยกว่าร้อยละ 50 และที่พีเอช 3, 11 และ 12 จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

6.2 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

นำเอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์มาตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ โดยปัมที่อุณหภูมิ 35, 45, 55, 65, 75, 85 และ 95 องศาเซลเซียส ในสารละลายบัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl พีเอช 8 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงในภาพประกอบ 22

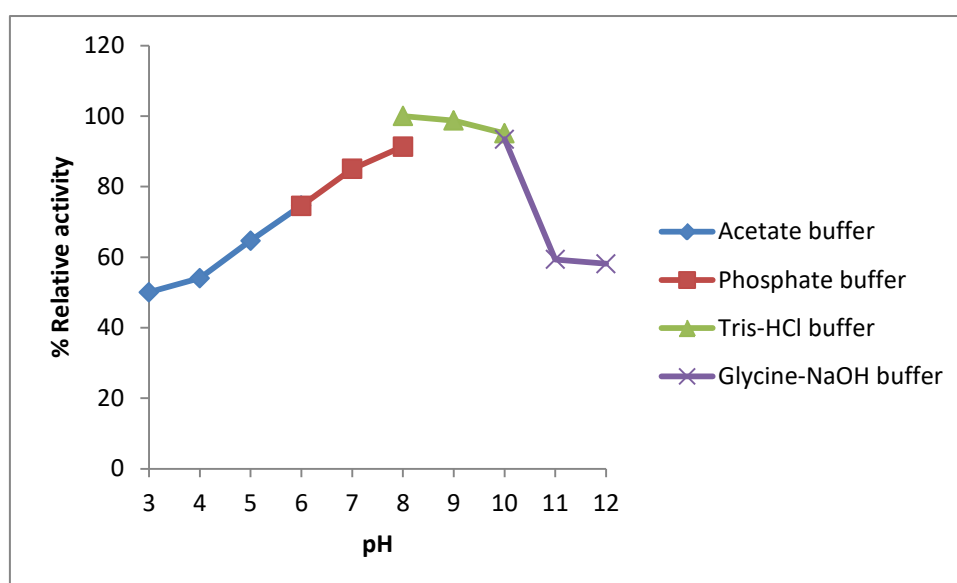


ภาพประกอบ 22 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ PHBV

จากภาพประกอบ 22 พบว่า เอนไซม์สามารถทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิประมาณ 35-45 องศาเซลเซียส โดยอุณหภูมิที่เอนไซม์สามารถทำงานได้ดีที่สุด คือ 45 องศาเซลเซียส และพบว่าเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นหรือลดต่ำลงจาก 45 องศาเซลเซียส การทำงานของเอนไซม์จะลดลง และที่อุณหภูมิสูงกว่า 65 องศาเซลเซียส การทำงานของเอนไซม์ลดลงมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์

6.3 การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ที่ค่าพีเอชต่างๆ

นำเอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้วไปเก็บไว้ในสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ ที่มีค่าพีเอชต่างๆ ดังนี้ acetate buffer (พีเอช 3-6), phosphate buffer (พีเอช 6-8), Tris-HCl buffer (พีเอช 8-10) และ glycine-NaOH buffer (พีเอช 10-12) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดการทำงานของเอนไซม์ ผลการทดลองแสดงในภาพประกอบ 23

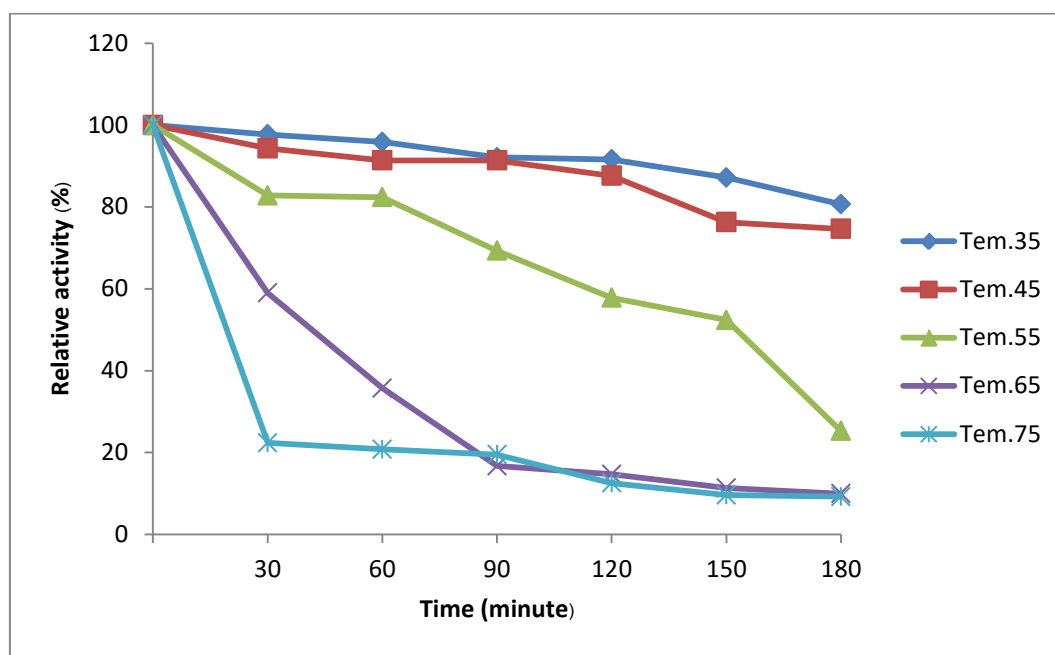


ภาพประกอบ 23 ผลของความเสถียรของเอนไซม์ที่ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ PHBV ที่ค่าพีเอชต่างๆ

จากภาพประกอบ 23 พบว่า ทุกช่วงพีเอชที่ใช้ในการบ่มเอนไซม์ เอนไซม์ยังสามารถทำงานได้ดีมากกว่าร้อยละ 50 โดยเอนไซม์มีความเสถียรดีที่สุดเมื่อบ่มในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีพีเอช 7-10 โดยเอนไซม์ยังสามารถทำงานได้ดีมากกว่าร้อยละ 80

6.4 การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆ

นำเอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้วบ่มในอ่างน้ำควบคุมที่อุณหภูมิต่างๆ ดังนี้ 35, 45, 55, 65, 75, 85 และ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 นาที แล้วนำไปวัดการทำงานของเอนไซม์ ผลการทดลองแสดงในภาพประกอบ 24



ภาพประกอบ 24 ผลของความเสถียรของเอนไซม์ที่ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ PHBV ที่ค่าอุณหภูมิต่างๆ

จากภาพประกอบ 24 พบว่า เอนไซม์มีความเสถียรอยู่ในช่วงอุณหภูมิ 35- 45 องศาเซลเซียส การทำงานของเอนไซม์จะค่อยลดลงอย่างช้าๆ โดยเอนไซม์ยังสามารถทำงานได้มากกว่าร้อยละ 80 ส่วนที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส การทำงานของเอนไซม์เริ่มลดลงอย่างรวดเร็ว โดยเอนไซม์สามารถทำงานได้น้อยกว่าร้อยละ 40 ที่ช่วงการบ่ม 180 นาที แต่สำหรับอุณหภูมิ 65 และ 75 องศาเซลเซียส นั้น การทำงานของเอนไซม์ลดลงอย่างรวดเร็วตั้งแต่ช่วงการบ่มที่ 30 นาทีแรก โดยการทำงานของเอนไซม์ลดลงเหลือน้อยกว่าร้อยละ 60 และ 30 ตามลำดับ

6.5 การศึกษาสับสเตรทที่จำเพาะต่อเอนไซม์

ศึกษาความจำเพาะต่อสับสเตรทของเอนไซม์โดยใช้สับสเตรทในกลุ่มพอลิเอสเทอร์ คือ PHBV, PHB, PBS, PBSA, PLA, PLLA และ PCL กลุ่มโปรตีน คือ casein และ gelatin กลุ่ม *p*-Nitrophenol ester คือ *p*NP-acetate (C2), *p*NP-butyrate (C4), *p*NP-octanoate (C8), *p*NP-decanoate (C10) และ *p*NP-palmitate (C16) และกลุ่มไขมัน คือ Olive oil แล้ววัดการทำงานของเอนไซม์ ผลการทดลองแสดงในตาราง 8

ตาราง 8 สับสเตรทที่จำเพาะต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ PHBV จากสายพันธุ์ TF1

Substrate	Specific activity (U/mg protein)
Polyester	
PHBV	216.54 ± 8.61
PHB	10.83 ± 6.75
PBS	26.67 ± 4.86
PBSA	39.76 ± 6.48
PLA	180.24 ± 3.43
PLLA	191.90 ± 4.36
PCL	0.00
Protein	
Casein	285.56 ± 5.83
Gelatin	137 ± 3.56
<i>p</i> -Nitrophenol ester	
<i>p</i> NP-acetate (C2)	0.00
<i>p</i> NP-butyrate (C4)	0.00
<i>p</i> NP-octanoate (C8)	0.00
<i>p</i> NP-decanoate (C10)	0.00
<i>p</i> NP-palmitate (C16)	0.00
Olive oil	0.00

จากตาราง 8 พบว่า เอนไซม์สามารถย่อยสับสเตรทในกลุ่มพอลอเอสเทอร์ได้ทุกชนิด ยกเว้น PCL โดยสามารถย่อย PHBV ได้ดีที่สุด มีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 216.54 ± 8.61 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน นอกจากนี้พบว่าเอนไซม์ยังสามารถย่อยสับสเตรทในกลุ่มโปรตีนได้ ทั้ง casein และ gelatin โดยสามารถย่อย casein ได้ดีที่สุด มีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 285.56 ± 5.83 แต่เอนไซม์ไม่สามารถย่อยสับสเตรทในกลุ่ม *p*-Nitrophenol ester และไขมันได้ ดังนั้น เอนไซม์ที่ย่อยสลาย PHBV จึงมีคุณสมบัติเหมือนพวก protease

6.6 การศึกษาผลของตัวยับยั้งที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์

นำเอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้ว บ่มในสารละลายบัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl พีเอช 8 ร่วมกับ 1, 5 และ 10 มิลลิโมลาร์ ของ EDTA, PMSF และ DTT แล้ววัดการทำงานของเอนไซม์ ผลการทดลองแสดงในตาราง 9

ตาราง 9 ผลของตัวยับยั้งที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ PHBV จาก สายพันธุ์ TF1

Reagent	Concentration (mM)	%Relative activity
control		100
EDTA	1	63.21 ± 0.22
	5	58.55 ± 0.29
	10	54.66 ± 0.37
PMSF	1	73.70 ± 0.51
	5	71.98 ± 0.32
	10	52.21 ± 1.77
DTT	1	53.47 ± 0.18
	5	13.54 ± 0.36
	10	0.00

จากตาราง 9 พบว่า EDTA, PMSF และ DTT มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ โดย DTT ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้อย่างสมบูรณ์

6.7 การศึกษาผลของสารเคมีที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์

นำเอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้ว บ่มในสารละลายบัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl พีเอช 8 ร่วมกับ 0.1 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ของ cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB), sodium dodecyl sulfate (SDS), Tween 80, Triton X-100 และ β -mercaptoethanol (β -ME) และวัดการทำงานของเอนไซม์ ผลการทดลองแสดงในตาราง 10

ตาราง 10 ผลของสารเคมีที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ PHBV จากสายพันธุ์ TF1

Reagent	Concentration	%Reactive activity
control		100
β -mercaptoethanol	0.10%	94.51 $\pm$ 0.17
	0.50%	91.51 $\pm$ 0.09
Triton X-100	0.10%	93.82 $\pm$ 0.16
	0.50%	93.32 $\pm$ 0.01
Tween 80	0.10%	0.00
	0.50%	0.00
SDS	0.10%	95.75 $\pm$ 0.25
	0.50%	16.92 $\pm$ 0.50
CTAB	0.10%	35.39 $\pm$ 0.15
	0.50%	15.86 $\pm$ 0.12

จากตาราง 10 พบว่า β -mercaptoethanol และ Triton X-100 ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ มีผลเพียงเล็กน้อยต่อการทำงานของเอนไซม์ แต่ Tween 80 และ CTAB ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์มีผลเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ส่วน SDS ที่ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์มีผลเพียงเล็กน้อยต่อการทำงานของเอนไซม์ แต่ที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

6.8 การศึกษาผลของไอออนโลหะที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์

นำเอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้ว บ่มในสารละลายบัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl พีเอช 8 ร่วมกับ 1 และ 5 มิลลิโมลาร์ ของ Na^+ , Ca^{2+} , K^+ , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} และ Hg^{2+} แล้ววัดการทำงานของเอนไซม์ ผลการทดลองแสดงในตาราง 11

ตาราง 11 ผลของไอออนโลหะที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ PHBV จากสายพันธุ์ TF1

Metal ion	Concentration (mM)	%Relative activity
control		100
Ca^{2+}	1	98.94 $\pm$ 0.07
	5	68.29 $\pm$ 0.11
Na^+	1	100.75 $\pm$ 0.07
	5	99.31 $\pm$ 0.03
K^+	1	101.12 $\pm$ 0.12
	5	96.94 $\pm$ 0.13
Fe^{2+}	1	23.72 $\pm$ 0.64
	5	2.75 $\pm$ 0.04
Mg^{2+}	1	97.57 $\pm$ 0.06
	5	79.40 $\pm$ 0.11
Mn^{2+}	1	96.19 $\pm$ 0.07
	5	58.43 $\pm$ 0.30
Zn^{2+}	1	85.64 $\pm$ 0.07
	5	52.25 $\pm$ 0.11
Cu^{2+}	1	90.26 $\pm$ 0.14
	5	14.17 $\pm$ 0.74
Hg^{2+}	1	68.44 $\pm$ 0.16
	5	38.52 $\pm$ 0.23

จากตาราง 11 พบว่า Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} และ Zn^{2+} ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ มีผลเพียงเล็กน้อยต่อการทำงานของเอนไซม์ ส่วน Na^+ และ K^+ ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ มีผลส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ แต่ Fe^{2+} และ Hg^{2+} ที่ความเข้มข้น 1 และ 5 มิลลิโมลาร์ และ Cu^{2+} ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์



บทที่ 5

สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

งานวิจัยในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ PHBV จาก *Actinomadura* sp. สายพันธุ์ TF1 จากนั้นทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต แล้วนำไปทำโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุด้วยคอลัมน์ DEAE และศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ที่ได้ ซึ่งสามารถสรุปและอภิปรายผลได้ดังนี้

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ

การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพชนิดต่างๆ ของ *Actinomadura* sp. สายพันธุ์ TF1 ประกอบไปด้วยอาหารแข็ง PBSA, PHB, PHBV, PLA และ PCL บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน โดยสังเกตบริเวณสีที่เกิดขึ้น พบว่า สายพันธุ์ TF1 สามารถย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ PHBV ได้ดีที่สุด การเกิดบริเวณใสรอบๆ การเจริญของเชื้อบนอาหารแข็งชี้ให้เห็นว่าสายพันธุ์ TF1 สามารถใช้พลาสติกชีวภาพ PHBV เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโต โดยพลาสติกชีวภาพ PHBV ถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์จากสายพันธุ์ TF1 ให้กลายเป็นสารที่สามารถละลายน้ำได้ โดยการย่อยสลายขึ้นอยู่กับการหลั่งของ exoenzyme การแพร่กระจายผ่านอาหารฐานพลาสติก และปฏิสัมพันธ์ระหว่างเอนไซม์และพอลิเมอร์ (Shah; Hasan; & Hameed. 2010) มีการศึกษาพบว่าเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลาย PHBV พบได้ทั้งใน แบคทีเรีย พวงแสดติโนมัยสีท และเชื้อรา เช่น *Bacillus* sp. AF3, *Paecilomyces lilacinus*, *Pseudomonas mendocina*, *Streptomyces* sp. AF-11, *Streptovorticillium kashmirensis* AF1, *Aspergillus* sp. NA-25 (Sang; et al. 2006; Shah; et al. 2007a; Shah; et al. 2007b; Nadhman; et al. 2012; Akbar; et al. 2013; Hailong; et al. 2013)

การศึกษาการย่อยสลายแผ่นฟิล์ม PHBV โดยการฝังดิน

การศึกษาการย่อยสลายแผ่นฟิล์มพลาสติก PHBV จากสายพันธุ์ TF1 เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ โดยการเปรียบเทียบน้ำหนักของแผ่นฟิล์มพลาสติก PHBV ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองก่อนการฝังดินซึ่งน้ำหนักแผ่นฟิล์มได้เท่ากับ 0.25 กรัม เมื่อนำไปฝังดินและเก็บในสัปดาห์ที่ 1 และ 2 พบว่าแผ่นฟิล์มจากกลุ่มทดลองซึ่งน้ำหนักได้เท่ากับ 0.12 ± 0.01 กรัม และ 0.03 ± 0.01 กรัมตามลำดับ ดังนั้นแผ่นฟิล์มในกลุ่มทดลองน้ำหนักลดลง 53.33 ± 2.31 เปอร์เซ็นต์ และ 86.67 ± 2.31 เปอร์เซ็นต์

ภายหลังจากฝังดิน 1 และ 2 สัปดาห์ตามลำดับ นอกจากนี้เมื่อสังเกตลักษณะของแผ่นฟิล์มพลาสติกพบว่าแผ่นฟิล์มในกลุ่มทดลองถูกย่อยสลายให้มีขนาดเล็กลง บางลง เป็นชิ้นเล็กๆ มีรูพรุนเกิดขึ้น และมีบางส่วนที่ถูกย่อยสลายไปแสดงว่าสายพันธุ์ TF1 ปลดปล่อยเอนไซม์เพื่อย่อยสลายแผ่นพลาสติก จึงทำให้น้ำหนักแผ่นฟิล์มลดลง การย่อยสลายบนแผ่นฟิล์มขึ้นอยู่กับประชากรและการกระจายตัวของจุลินทรีย์ที่เจริญบนผิวหน้า (surface) แผ่นฟิล์ม ในงานวิจัยของ Zhanyong; et al. (2012) ศึกษาการย่อยสลายแผ่นฟิล์มพลาสติก PHBV จาก *Acidovorax* sp. HB01 พบว่าน้ำหนักของแผ่นฟิล์มหายไปเกือบ 100 เปอร์เซ็นต์ภายใน 32 ชั่วโมง Kuntanoo; et al. (2013) ศึกษาการย่อยสลายแผ่นฟิล์มพลาสติก PHBV โดยการฝังดินพบว่าใช้ระยะเวลาการย่อยสลาย 45 วัน น้ำหนักของแผ่นฟิล์มหายไป 20 เปอร์เซ็นต์ และงานวิจัยของ Arcos-Hernandez; et al. (2012) ได้ศึกษาการย่อยสลายแผ่นฟิล์ม PHBV ที่ประกอบไปด้วยเปอร์เซ็นต์โมล (%mol) ของ HV ตั้งแต่ช่วง 12-72 เปอร์เซ็นต์โมลจากตะกอนน้ำเสีย พบว่า หลังจากสัปดาห์ที่ 23.4 มีการย่อยสลายเกิดขึ้นมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ เมื่อสังเกตการเปลี่ยนแปลงลักษณะภายนอกบนแผ่นฟิล์มพลาสติก PHBV โดยการสังเกตบริเวณผิวหน้าแผ่นฟิล์มพลาสติกด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดพบว่าแผ่นฟิล์มพลาสติก PHBV ในกลุ่มควบคุมมีลักษณะค่อนข้างเรียบ และไม่มีรูพรุน สำหรับแผ่นฟิล์มพลาสติกในกลุ่มทดลองพบว่ามีลักษณะผิวหน้าที่ขรุขระมีรูพรุนเกิดขึ้นเป็นจำนวนมากมีทั้งขนาดเล็กและขนาดใหญ่ มีรอยเว้าหรือลักษณะเป็นโพรงเกิดขึ้นบนพื้นผิวของแผ่นฟิล์ม แสดงว่ามีกระบวนการย่อยสลายเกิดขึ้นซึ่งเป็นผลมาจากสายพันธุ์ TF1 ที่เกาะบริเวณพื้นผิวหน้าของแผ่นฟิล์มทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติและส่วนประกอบพื้นฐานของพอลิเมอร์ ผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Mabrouk; et al. (2001) ศึกษาการย่อยแผ่นฟิล์มพลาสติก PHBV โดย *Streptomyces* sp. SNG9 Sang; et al. (2006) ศึกษาการย่อยแผ่นฟิล์มพลาสติก PHBV โดย *Paecilomyces lilacinus* F4-5 Goncalves; et al. (2009) ศึกษาการย่อยสลายแผ่นฟิล์มพลาสติก PHBV ด้วยจุลินทรีย์ที่อยู่ในดิน Shah; Hasan; & Hameed. (2010) ศึกษาการย่อยสลายแผ่นฟิล์มพลาสติก PHBV โดย *Actinomadura* sp. AF-555

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PHBV

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PHBV จาก *Actinomadura* sp. สายพันธุ์ TF1 โดยการหาผลของค่าพีเอช อุณหภูมิ และความเข้มข้นของ PHBV ที่เหมาะสมในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากปัจจัยเหล่านี้จะมีอิทธิพลอย่างมากต่อการผลิตเอนไซม์ พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าพีเอช 8 โดยใช้พลาสติกชีวภาพ PHBV ที่ความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร และเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 144 ชั่วโมง เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PHBV โดยมีค่าการทำงานของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 5.81 ± 0.22 หน่วยต่อ

มิลลิลิตร แสดงให้เห็นว่า สายพันธุ์ TF1 เป็นจุลินทรีย์ที่ชอบร้อน จึงส่งผลให้เอนไซม์ที่ได้มีศักยภาพในการย่อยสลายได้ดียิ่งขึ้นเนื่องจากที่อุณหภูมิสูงจะช่วยเพิ่มอัตราเมแทบอลิซึม (metabolism) ได้ (Shah; et al. 2007b) แต่ที่อุณหภูมิสูงกว่า 55 องศาเซลเซียสเอนไซม์ผลิตได้น้อยลงเนื่องจากเชื้อไม่สามารถเจริญเติบโตได้ ส่วนความเข้มข้นของสับสเตรทที่ใช้เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสับสเตรทเป็น 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร พบว่าสายพันธุ์ TF1 ผลิตเอนไซม์ได้ลดลงอาจเนื่องมาจากความอึดตัวของเอนไซม์อย่างรวดเร็วโดยสับสเตรทในบริเวณใกล้เคียงส่งผลให้การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ลดลง ทำให้หลังเอนไซม์ได้ลดลง นอกจากนี้อาจเป็นไปได้ว่าการลดลงของค่าการทำงานของเอนไซม์อาจจะเกิดจากการเปลี่ยนแปลงปัจจัยในการเลี้ยง เช่น ในสภาวะที่เป็นกรดหรือเบสแก่ จาก by-products ของกระบวนการเมแทบอลิซึมของสายพันธุ์ TF1 หรือจากการย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ของพอลิเมอร์จากการศึกษาของ Shah; et al. (2007b) พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PHBV จาก *Streptovorticillium kashmirens* AF1 คืออาหารเลี้ยงเชื้อที่พีเอช 8 ความเข้มข้นของพลาสติก PHBV 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ส่วนการศึกษาของ Nadhman; et al. (2012) พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PHBV จาก *Aspergillus* sp. NA-25 คืออาหารเลี้ยงเชื้อที่พีเอช 7 ความเข้มข้นของพลาสติก PHBV 0.2 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส แต่จากงานวิจัยส่วนใหญ่พบว่าจุลินทรีย์ที่ย่อยสลาย PHBV จะเจริญได้ดีที่อุณหภูมิประมาณ 37 องศาเซลเซียส เช่น การศึกษาของ Sanyal; Samaddar & Paul (2006) พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PHBV จาก *Aspergillus* spp. คืออาหารเลี้ยงเชื้อที่พีเอช 6.8 ความเข้มข้นของพลาสติก PHBV 0.2 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และจากการศึกษาของ Shah; et al. (2007a) พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PHBV จาก *Bacillus* sp. AF3 คืออาหารเลี้ยงเชื้อที่พีเอช 7 ความเข้มข้นของพลาสติก PHBV 0.4 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

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 จึงเป็นค่าที่เหมาะสมในการนำมาใช้หาการทำงานของเอนไซม์ซึ่งใช้เวลาการบ่มน้อยกว่าวิธีที่เคยมีรายงานมาก่อนหน้านี้ Shah; et al. (2007a) ผลิตเอนไซม์ PHBV depolymerase จาก *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 และ Shah; Hasan; & Hameed. (2010) ศึกษาการย่อยสลาย PHBV จาก *Actinomadura* sp. AF-555 ที่แยกได้จากดิน วัดการทำงานของเอนไซม์ได้ 1.102 ยูนิตต่อมิลลิลิตรซึ่งบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบเชื้อในจีนัสเดียวกันพบว่าสายพันธุ์ TF1 มีศักยภาพที่ดีในการผลิตเอนไซม์ PHBV depolymerase และเอนไซม์ยังทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูงถึง 45 องศาเซลเซียส จึงสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ดีในการย่อยสลายในคอมโพสท์

การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์และหาขนาดโมเลกุลของเอนไซม์ที่ย่อยสลายพลาสติก PHBV

เอนไซม์ดิบจากสายพันธุ์ TF1 มีค่าความจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 165.7 ± 4.1 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน จากนั้นนำเอนไซม์ดิบที่ได้มาตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ระดับความอิ่มตัวของเกลือ 80 เปอร์เซ็นต์แล้วนำมาไดอะไลซิส พบว่ามีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 218.5 ± 2.3 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน จากนั้นทำโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออนโดยใช้คอลัมน์ DEAE พบว่ามีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 463.7 ± 4.4 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ให้ผลผลิตร้อยละ 49.9 และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 2.8 เท่า สอดคล้องกับการศึกษาของ Yashchuk; Miyazaki; & Hermida (2014) พบว่าเอนไซม์ย่อยสลาย PHBV จาก *Streptomyces* sp. SSM 5670 มีความบริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์ DEAE Sephadex A-50 เพิ่มขึ้น 2.5 เท่า และให้ผลผลิตร้อยละ 61.9 จากนั้นต่อด้วยคอลัมน์ Sephadex G-100 เอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 10.5 เท่า และให้ผลผลิตร้อยละ 20.5 เช่นเดียวกับการศึกษาของ Wang; et al. (2012) พบว่า PHB depolymerase จาก *Pseudomonas mendocina* DSWY0601 มีความบริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์ DEAE-Sepharose flast flow เพิ่มขึ้น 2.1 เท่า และให้ผลผลิตร้อยละ 7.7 จากนั้นต่อด้วยคอลัมน์ Phenyl Sepharose 6 flast flow เอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 4.2 เท่า และให้ผลผลิตร้อยละ 5.7

ตรวจสอบความบริสุทธิ์และหาขนาดโมเลกุลของเอนไซม์ที่ย่อยสลาย PHBV จากสายพันธุ์ TF1 ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต การไดอะไลซิส และผ่านคอลัมน์ DEAE-Sepharose โดยการทำการพลีอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบเสียสภาพ (SDS-PAGE) พบว่าเอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มมากขึ้น โดยเมื่อทำให้บริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอนเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตและผ่านการไดอะไลซิสพบแถบโปรตีนจำนวนมาก และเมื่อนำเอนไซม์ผ่านคอลัมน์ DEAE-Sepharose พบแถบโปรตีนเพียง 1 แถบ มีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 35 กิโลดาลตัน จากนั้นทำการตรวจสอบยืนยันแถบโปรตีนเป้าหมายด้วยไซโมแกรม พบว่า ปรากฏแถบโปรตีนที่สามารถย่อยสลาย PHBV เพียง 1 แถบ คือที่ขนาดโมเลกุล 35 กิโลดาลตัน แสดงให้เห็นว่า แถบโปรตีนที่ได้จาก SDS-

PAGE คือแถบโปรตีนเป้าหมาย สอดคล้องกับการศึกษาของ Shah; et al. (2007b) พบว่า ขนาดโมเลกุลของ PHBV depolymerase จาก *Streptovorticillium kashmirens* AF1 มีขนาด 35 และ 45 กิโลดาลตัน ส่วนการศึกษาของ Yashchuk; Miyazaki; & Hermida (2014) พบว่า ขนาดโมเลกุลของ PHBV depolymerase จาก *Streptomyces* sp. SSM 5670 มีขนาด 24 กิโลดาลตัน และการศึกษาของ Akbar; et al. (2013) พบว่าขนาดโมเลกุลของ PHBV depolymerase จาก *Streptomyces* sp. AF-111 มีขนาด 51 กิโลดาลตัน

การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ที่ย่อยสลาย PHBV

ผลของพีเอชต่อการทำงานของเอนไซม์

การศึกษาผลของพีเอชต่อการทำงานของเอนไซม์ได้ทำการศึกษาทั้งความเสถียรของเอนไซม์ที่ค่าพีเอชต่างๆ และค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ พบว่าทุกช่วงพีเอชที่ใช้ในการบ่มเอนไซม์ เอนไซม์ยังสามารถทำงานได้ดีมากกว่าร้อยละ 50 โดยเอนไซม์มีความเสถียรมากเมื่อบ่มในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีพีเอช 7-10 โดยเอนไซม์ยังสามารถทำงานได้ดีมากกว่าร้อยละ 80 และเมื่อศึกษาค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ พบว่าค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์มากที่สุด คือ พีเอช 8 และพบว่าที่พีเอชสูงกว่าหรือน้อยกว่า 8 การทำงานของเอนไซม์ลดลง อาจเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงในค่าพีเอชมีผลกระทบต่อโครงสร้างของโปรตีนทำให้ค่าการทำงานของเอนไซม์ลดลง ซึ่งสอดคล้องกับ Hailong; et al. (2013) พบว่าเอนไซม์ย่อยสลาย PHBV จาก *Pseudomonas mendocina* มีค่าความเสถียรของเอนไซม์อยู่ในช่วงพีเอช 5.5-10.5 และพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 8 เช่นเดียวกับ Akbar; et al. (2013) พบว่าเอนไซม์ย่อยสลาย PHBV จาก *Streptomyces* sp. AF-111 มีค่าความเสถียรของเอนไซม์อยู่ในช่วงพีเอช 6-8 และมีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 7 และ 8 ส่วน Yashchuk; Miyazaki; & Hermida (2014) พบว่าเอนไซม์ย่อยสลาย PHBV จาก *Streptomyces* sp. SSM 5670 มีค่าความเสถียรของเอนไซม์อยู่ในช่วงพีเอช 6.5-7.5 และมีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 7.5 ในขณะที่ Sang; et al. (2006) พบว่าเอนไซม์ย่อยสลาย PHBV จาก *Paecilomyces lilacinus* F4-5 มีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 7

ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์

การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์ได้ทำการศึกษาทั้งความเสถียรของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆ และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ พบว่า เอนไซม์มีความเสถียรที่อุณหภูมิ 35-45 องศาเซลเซียส โดยการทำงานของเอนไซม์จะค่อยลดลงอย่างช้าๆ และเอนไซม์ยังสามารถทำงานได้มากกว่าร้อยละ 80 ส่วนที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส การทำงานของเอนไซม์เริ่มลดลงอย่างรวดเร็ว และเมื่อศึกษาค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ พบว่าเอนไซม์สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และพบว่าเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นหรือลดลงจาก 45 องศาเซลเซียส การทำงานของเอนไซม์จะลดลง ทั้งนี้เนื่องจากเอนไซม์เกิดการเสียสภาพจากอุณหภูมิ ในขณะที่ Yashchuk; Miyazaki; & Hermida (2014) พบว่าเอนไซม์ย่อยสลาย PHBV จาก *Streptomyces* sp. SSM 5670 มีค่าความเสถียรของเอนไซม์อยู่ในช่วงอุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส และมีค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 30 องศาเซลเซียส ส่วน Zhanyong; et al. (2012) พบว่าเอนไซม์ย่อยสลาย PHBV จาก *Acidovorax* sp. HB01 มีค่าความเสถียรของเอนไซม์อยู่ในช่วงอุณหภูมิ 30-70 องศาเซลเซียส และมีค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 50 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกับ Hailong; et al. (2013) พบว่าเอนไซม์ย่อยสลาย PHBV จาก *Pseudomonas mendocina* มีค่าความเสถียรของเอนไซม์อยู่ในช่วงอุณหภูมิ 20-50 องศาเซลเซียส และมีค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือ 50 องศาเซลเซียสแสดงว่าเชื้อแต่ละชนิดมีการผลิตเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติการทำงานแตกต่างกัน

สัปสเตอร์ที่จำเพาะต่อการทำงานของเอนไซม์

การศึกษาสัปสเตอร์ที่จำเพาะต่อการทำงานของเอนไซม์ พบว่าเอนไซม์สามารถย่อยสัปสเตอร์ในกลุ่ม Polyester ได้ทุกชนิด ยกเว้น PCL โดยเอนไซม์สามารถย่อย PHBV ได้ดีที่สุด มีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 216.54 ± 8.61 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อเปรียบเทียบกับความจำเพาะต่อเอนไซม์ของพลาสติกชีวภาพในกลุ่ม PHAs คือ PHB และ PHBV พบว่าเอนไซม์สามารถย่อย copolymer (PHBV) ได้ดีกว่า homopolymer (PHB) ซึ่งให้เห็นว่า PHBV ย่อยสลายโดยเอนไซม์ได้ง่ายกว่า PHB อาจเนื่องมาจาก จุดเดือด ความเป็นผลึกที่น้อยกว่า และมวลโมเลกุลของพอลิเมอร์ (Allen; et al. 2011) แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์มีความจำเพาะต่อ PHBV มากกว่า PHB ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ Allen; et al. (2011) พบว่า PHBV depolymerase จาก *Streptomyces* sp. IN1 มีความจำเพาะต่อ PHBV มากกว่า PHB นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์ไม่มีความจำเพาะต่อ PCL อาจเนื่องมาจากโครงสร้างของ PCL เกิดจากมอนอเมอร์ของ ϵ -caprolactone

ที่มีลักษณะคล้ายกรดไขมัน โดย ϵ -caprolactone เป็นไฮโดรคาร์บอนสายยาวและมีหมู่คาร์บอนิลอยู่ปลายโมเลกุลซึ่งเป็นบริเวณที่เอนไซม์ไลเปสย่อยสลายได้ และยังพบว่าเอนไซม์มีความจำเพาะต่อ PBS น้อยมาก เนื่องจากบริเวณปลายพอลิเมอร์ของ PBS มีลักษณะคล้ายโมเลกุลของกลีเซอรอลที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายของเอนไซม์ไลเปส (ลักษมี ศุภระกาญจนะ. 2556) ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเอนไซม์จากสายพันธุ์ TF1 ไม่ใช่เอนไซม์ในกลุ่มไลเปส สอดคล้องกับการศึกษาการย่อยสลาย olive oil ที่พบว่าเอนไซม์ไม่มีความจำเพาะต่อ olive oil แต่พบว่าเอนไซม์ PHBV depolymerase มีความจำเพาะต่อ PLA และ PLLA ซึ่งเอนไซม์โดยส่วนใหญ่ที่สามารถย่อยสลาย PLA และ PLLA ได้เป็นเอนไซม์ในกลุ่มโปรติเอส เนื่องจากเอนไซม์มีความจำเพาะต่อพันธะ α -ester ของ PLA และ PLLA และตำแหน่งทางเคมีของสายคาร์บอนในหน่วยย่อยกรดแลคติกของ PLA และ PLLA มีลักษณะเป็น analogue กับกรดอะมิโน L-alanine (Tokiwa; et al. 2009) ทำให้เอนไซม์โปรติเอสสามารถย่อยสลาย PLA และ PLLA ได้ สอดคล้องกับการศึกษาความจำเพาะต่อสับสเตรทในกลุ่มโปรติเอส พบว่าเอนไซม์สามารถย่อยสับสเตรทในกลุ่มโปรตีนได้ ทั้ง casein และ gelatin โดยสามารถย่อย casein ได้ดีที่สุด มีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 285.56 ± 5.83 แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์จากสายพันธุ์ TF1 เป็นเอนไซม์ในกลุ่มโปรติเอสที่สามารถย่อยได้ทั้งโปรตีน (พันธะเพปไทด์) และ PHBV, PLA และ PLLA (พันธะเอสเทอร์)ได้ สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Sukkhum; et al. (2009) พบว่า เอนไซม์โปรติเอส จาก *Actinomadura keratinolytica* T16-1 สามารถย่อย PLA, casein และ gelatin แต่ไม่สามารถย่อย PCL ได้ ส่วนการศึกษาความจำเพาะต่อสับสเตรท ในกลุ่ม *p*-Nitrophenol ester พบว่าเอนไซม์ไม่สามารถย่อยสลายสับสเตรทในกลุ่มนี้ได้ แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์จากสายพันธุ์ TF1 ไม่ใช่เอนไซม์ในกลุ่มเอสเทอเรส

ผลของตัวยับยั้งต่อการทำงานของเอนไซม์

การศึกษาผลของตัวยับยั้งต่อการทำงานของเอนไซม์โดยใช้ EDTA, PMSF และ DTT ซึ่งมีหน้าที่เป็นตัวยับยั้งโปรติเอส ที่ความเข้มข้น 1, 5 และ 10 มิลลิโมลาร์ โดย EDTA ทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้ง metalloproteinase ส่วน PMSF ทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้ง serine protease และ DTT ทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้ง thiolprotease หรือ cysteineproteinase พบว่า EDTA ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ทำให้ค่าการทำงานของเอนไซม์ลดลงเหลือร้อยละ 54 โดย EDTA ทำปฏิกิริยากับ transition-

metal ions ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเอนไซม์ เกิดเป็นสาร chelate ที่เสถียรทำให้เอนไซม์ไม่สามารถทำหน้าที่ได้อย่างปกติ ส่วน PMSF ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ทำให้ค่าการทำงานของเอนไซม์ลดลงเหลือร้อยละ 52 โดย PMSF จะจับอย่างจำเพาะต่อ active site ของ serine ในโปรตีเอส ทำให้โปรตีนไม่สามารถจับกับสับสเตรทได้ และ DTT ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ทำให้ค่าการทำงานของเอนไซม์ลดลงเหลือร้อยละ 0 แสดงว่า DTT สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้อย่างสมบูรณ์ โดย DTT ทำลายพันธะ disulfide bond (S-S) ระหว่างกรดอะมิโนซิสเทอีน (Cysteine) และเติมหมู่ -SH ทำให้กรดอะมิโนซิสเทอีนไม่สามารถกลับมาสร้างพันธะระหว่างกันได้อีก (สุทธาสินี แจ่มเดชา. 2552) ทำให้โปรตีนไม่สามารถทำหน้าที่ได้ แสดงว่า พันธะ disulfide bond มีความเกี่ยวข้องกับโครงสร้างของเอนไซม์ PHBV depolymerase โดยภาพรวมจะเห็นได้ว่าเอนไซม์ PHBV depolymerase สามารถถูกยับยั้งโดย EDTA, PMSF และ DTT ดังนั้นเอนไซม์ PHBV depolymerase จึงมีคุณสมบัติเป็นพวกโปรตีเอส ซึ่งจากการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Akbar; et al. (2013) พบว่า PHBV depolymerase จาก *Streptomyces* sp. AF1-111 เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม serine protease

ผลของสารเคมีที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์

การศึกษาผลของสารเคมีต่อการทำงานของเอนไซม์พบว่า β -mercaptoethanol และ Triton X-100 ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ มีผลเพียงเล็กน้อยต่อการทำงานของเอนไซม์ แต่ Tween 80 และ CTAB ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ มีผลเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ส่วน SDS ที่ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์มีผลเพียงเล็กน้อยต่อการทำงานของเอนไซม์ แต่ที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ โดยพบว่า Tween 80 มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 100 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าตำแหน่งไม่ชอบน้ำ (hydrophobic region) อาจจะถูกอยู่ใกล้หรืออยู่ในตำแหน่งบริเวณเร่ง (active site) ของเอนไซม์ (Allen; et al. 2011; Yashchuk; Miyazaki & Hermida. 2014) สอดคล้องกับการศึกษาของ Yashchuk; Miyazaki & Hermida (2014) พบว่า Tween 80 มีผลเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ PHBV depolymerase ส่วนศึกษาของ Hailong; et al. (2013) พบว่า Triton X-100 ที่ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ มีผลเพียงเล็กน้อยต่อการทำงานของเอนไซม์ PHBV depolymerase แต่ β -mercaptoethanol ที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ มีผลเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับการศึกษาของ Zhanyong; et al. (2012) พบว่า β -mercaptoethanol ที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ มีผลเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ PHBV depolymerase ในขณะที่การศึกษาของ Allen; et al. (2011) พบว่า Tween 80 มีผลเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ PHBV depolymerase แต่ Triton X-100 มีผลส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์

ผลของไอออนโลหะที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์

การศึกษาผลของไอออนโลหะต่อการทำงานของเอนไซม์พบว่า Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} และ Zn^{2+} ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ มีผลเพียงเล็กน้อยต่อการทำงานของเอนไซม์ ส่วน Na^+ และ K^+ ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ มีผลส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ แต่ Fe^{2+} และ Hg^{2+} ที่ความเข้มข้น 1 และ 5 มิลลิโมลาร์ และ Cu^{2+} ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ โดย monovalent ion และ divalent ion มีผลต่อการทำงานและความเสถียรของเอนไซม์ อาจเนื่องมาจากไอออนโลหะมีผลปรับเปลี่ยนโครงสร้างของโปรตีน โดยไอออนโลหะจับกับบริเวณที่จำเพาะของเอนไซม์ ซึ่งโดยทั่วไปเกิดบริเวณสายด้านข้างของกรดอะมิโนที่มีประจุเป็นลบ โดยถ้าไอออนโลหะจับกับกรดอะมิโนบริเวณที่อยู่ไกลจากบริเวณเร่งปฏิกิริยา (catalytic site) ก็อาจจะไม่มีผลหรือมีผลเพียงเล็กน้อยต่อการทำงานของเอนไซม์ แต่ถ้าไอออนโลหะจับกับบริเวณเร่งปฏิกิริยาก็อาจจะเพิ่มการทำงานของเอนไซม์โดยทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์ (cofactors) หรืออาจจะลดการทำงานของเอนไซม์เนื่องไปขัดขวางการจับของสับสเตรตต่อการเกิดปฏิกิริยากับกรดอะมิโน (Akbar; et al. 2013) จากการศึกษาครั้งนี้จะเป็นไปได้ว่า monovalent ion ทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์เอนไซม์ ส่วน divalent ion มีผลเพียงเล็กน้อยต่อการทำงานของเอนไซม์ ยกเว้น Fe^{2+} และ Cu^{2+} ทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งของเอนไซม์ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าเอนไซม์สามารถทนต่อไอออนโลหะได้หลายชนิด ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้จึงเหมาะที่จะนำไปย่อยพลาสติกชีวภาพ PHBV ในธรรมชาติได้ จากการศึกษาของ Hailong; et al. (2013) พบว่า Na^+ , Zn^{2+} , Mg^{2+} และ K^+ มีผลส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ PHBV depolymerase แต่ Fe^{2+} มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Zhanyong; et al. (2012) พบว่า Ca^{2+} , Na^+ และ K^+ มีผลส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ PHBV depolymerase แต่ Fe^{2+} และ Cu^{2+} มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ และการศึกษาของ Akbar; et al. (2013) พบว่า Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ และ K^+ มีผลเพียงเล็กน้อยต่อการทำงานของเอนไซม์ PHBV depolymerase แต่ Fe^{2+} มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

สำหรับงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาคูณสมบัติบางอย่างของเอนไซม์ PHBV depolymerase ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องทำการศึกษาลำดับเบส หรือ ลำดับกรดอะมิโนที่ปลาย N-terminal เพื่อระบุยืนยันว่าเป็นเอนไซม์ชนิดใด จากนั้นศึกษาลักษณะการแสดงออกของยีน เพื่อผลิตให้ได้จำนวนมากนำไปสู่การประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป



บรรณานุกรม

- จิตติมา เจริญพานิช. (2553). เอนไซม์วิทยา. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: โอ. เอส. พริ้นติ้ง เฮ้าส์.
- ทายาท ศรียาภัย; และคณะ. (2557). สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายอะลิวาติค
พอลิเอสเทอร์จาก เชื้อ *Actinomadura* sp. stain TF1. *วารสารวิทยาศาสตร์ มศว.* 30(2):
103-118.
- ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล. (2556). เอนไซม์เทคโนโลยี. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- พิชากค์ สมบูรณ์ทรัพย์. (2553). พลาสติกชีวภาพ: นวัตกรรมของผลิตภัณฑ์สีเขียว. *วารสารวิทยาศาสตร์
มศว.* 26(2): 177-195.
- พีระศักดิ์ เภาประเสริฐ. (2013). พอลิเมอร์จากแหล่งชีวภาพ: การทบทวนวรรณกรรม. *วารวิจัย
มหาวิทยาลัยขอนแก่น (ฉบับบัณฑิตศึกษา).* 18(3): 536-547.
- ยุวดี วัฒนโกศลสิน. (ม.ป.ป.). *โปรตีนและการสังเคราะห์โปรตีน*. กรุงเทพฯ: ภาควิชาเคมี คณะ
แพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร.
- รมณีย์ หวังดีธรรม. (2549). ไบโอฟลาสติก...เทคโนโลยีที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม. *วิทยาศาสตร์และ
เทคโนโลยี.* 21(1): 5-10.
- ลักษมี สุกระกาญจนะ. (2556). *การคัดแยกและศึกษาคุณสมบัติเชื้อแอคติโนมัยซีท์ที่สามารถผลิต
เอนไซม์ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ*. วิทยานิพนธ์ วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ). กรุงเทพฯ:
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. ถ่ายเอกสาร.
- วรารณ จันทาสี. (2554). *ประสิทธิภาพการย่อยสลายพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพของ
จุลินทรีย์*. วิทยานิพนธ์ วท.ม. (วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม สหสาขาวิชา). กรุงเทพฯ: บัณฑิต
วิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. ถ่ายเอกสาร.
- ศิริวรรณ ระเด่นอาหมัด. (2552). *สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-ไฮดรอกซี
วาเลอเรตจากน้ำเสียโรงงานอาหารทะเล โดยใช้แบคทีเรียที่แยกได้จากระบบแอสปีอาร์*.
วิทยานิพนธ์ วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ). สงขลา: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัย-
สงขลานครินทร์. ถ่ายเอกสาร.
- สุทธาสินี แจ่มเดชา. (2552). *การศึกษาหาโปรตีนที่จำเพาะกับโปรตีน Mtx2 จากแบคทีเรีย Bacillus
sphaericus บนเซลล์เพาะเลี้ยงลูกน้ำยุง Aedes albopictus C6/36*. วิทยานิพนธ์ วท.ม.
(เทคโนโลยีชีวภาพ). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. ถ่ายเอกสาร.

- สำนักงานนโยบายและแผนทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. (2559). เผย อีก 30 ปี ปริมาณขยะจะเยอะกว่าปลาในทะเล. สืบค้นเมื่อ 29 เมษายน 2559, จาก http://www.onep.go.th/index.php?option=com_content&view=article&id=13458:23--2559---30--&catid=72:2010-10-08-06-35-05&Itemid=266
- Acagastya. (2015). *PHBV*. Retrieved December 20, 2015, from <https://en.wikipedia.org/wiki/PHBV>
- Akbar, S.; Hasan, F.; Nadhman, A.; Khan, S; & 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.
- Allen, A. D.; Anderson, W. A.; Ayorinde, F.; & Eribo, B. E. (2011). Isolation and Characterization of an Extracellular Thermoalkalophilic P(3HB-co-3HV) Depolymerase from *Streptomyces* sp. IN1. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 65: 777-785.
- Arcos, H.; et al. (2012). Biodegradation in a Soil Environment of Activated Sludge Derived Polyhydroxyalkanoate (PHBV). *Polymer Degradation and Stability*. 97: 2301-2312.
- Asano, Y.; & Watanabe, S. (2001). Isolation of Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB)-Degrading Microorganisms and Characterization of PHB-Depolymerase from *Arthrobacter* sp. strain W6. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 65(5): 1191-1194.
- Averous, L.; & Pollet, E. (2012). *Environmental Silicate Nano-Biocomposites*. London: Springer-Verlag.
- Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254.
- Campbell, M. K.; & Farrell, S. O. (2012). *Biochemistry*. 7th ed. China: China Translation & Printing Services Limited.
- Eschenlauer; et al. (1996). Production of Heteropolymeric Polyhydroxyalkanoate in *Escherichia coli* from a Single Carbon Source. *International Journal of Biological Macromolecules*. 19(1): 121-130.

- Feng, L.; et al. (2004). Enzymatic Degradation Behavior of Comonomer Compositionally Fractionated Bacterial Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by Poly(3-hydroxyalkanoate) Depolymerases Isolated from *Ralstonia pickettii* T1 and *Acidovorax* sp. TP4. *Polymer Degradation and Stability*. 84: 95-104.
- Garlotta, D. (2002). A Literature Review of Poly(lactic acid). *Journal of Polymer and the Environment*. 9(2): 63-75.
- Ghanem, N. B.; et al. (2005). Degradation of Polyesters by a Novel Marine *Nocardiopsis aegyptia* sp. nov.: Application of Plackett-Burman Experimental Design for the Improvement of PHB Depolymerase Activity. *The Journal of General and Applied Microbiology*. 51: 151-158.
- Goncalves, S. P. C.; Martins-Franchetti, S. M.; & Chinaglia, D. L. (2009). Biodegradation of the Films of PP, PHBV, and Its Blend in Soil. *Polymer Environment*. 17: 280-285.
- Goodfellow, M; et al. (2012). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 5: The Actinobacteria, Part A and B*. 2nd ed. New York: Springer New York
- Guo, G.C.; Juanyu, Z.; & Ying, W. (2015). Hydroxyalkanoates and Polyhydroxyalkanoates: Production and Applications. In *Industrial Biorefineries and White Biotechnology*. pp 555-572. USA: Elsevier.
- Hailong, M.; Husheng, J.; Tingting, S.; & Zhanyong, W. (2013). Purification and Characterization of Two Extracellular Polyhydroxyalkanoate Depolymerases from *Pseudomonas mendocina*. *Biotechnology Letters*. 35: 1919-1924.
- Hermida, E. B.; Yashchuk, O.; & Miyazaki, S. S. (2009). Changes in the Mechanical Properties of Compression Moulded Samples of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) Degraded by *Streptomyces omiyaensis* SSM 5670. *Polymer Degradation and Stability*. 94: 267-271.
- Iyer, S.; et al. (2000). Purification of *Aspergillus fumigatus* (Pdf1) Poly(b-hydroxybutyrate) (PHB) Depolymerase Using a New, Single-Step Substrate Affinity Chromatography Method: Characterization of the PHB Depolymerase Exhibiting Novel Self-Aggregation Behavior. *Journal of Polymers and the Environment*. 8(4): 197-203.

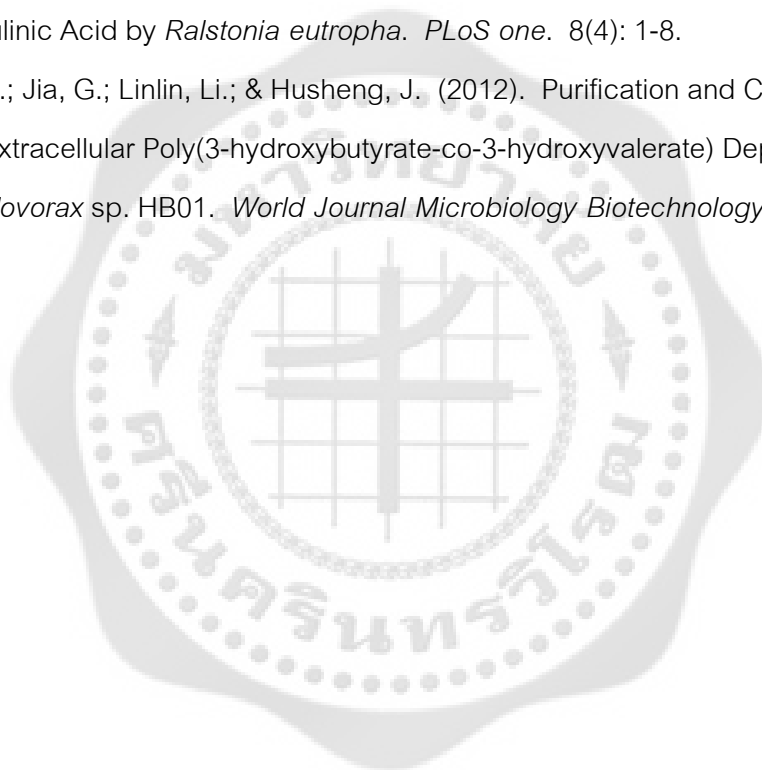
- Kasuya, K. I.; et al. (1997). Biochemical and Molecular Characterization of the Polyhydroxybutyrate Depolymerase of *Comamonas acidovorans* YM1609 Isolated from Freshwater. *Applied and Environmental Microbiology*. 63(12): 4844-4852.
- Keshavarz, T.; & Roy, I. (2010). Polyhydroxyalkanoates: Bioplastics with a Green Agenda. *Current Opinion in Microbiology*. 13: 321-326.
- Khan, S. T.; et al. (2002). Members of the Family *Comamonadaceae* as Primary Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)-Degrading Denitrifiers in Activated Sludge as Revealed by a Polyphasic Approach. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(7): 3206-3214
- Kim, D. Y.; et al. (2002). Purification and Characterization of Poly(3-hydroxybutyrate) Depolymerase from a Fungal Isolate *Emericellopsis minima* W2. *The Journal of Microbiology*. 40(2): 129-133.
- Kuntanoo, K., Promkottra, 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(12): 1749-1753.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.
- Leathers, T. D.; Govind, N. S.; & Greene, R. V. (2000). Biodegradation of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by a Tropical Marine Bacterium, *Pseudoalteromonas* sp. NRRL B-30083. *Journal of Polymers and the Environment*. 8(3): 119-124.
- Lim, L. T.; Auras R.; & Rubino M. (2008). Processing Technologies for Poly(lactic acid). *Progress in Polymer Science*. 33: 820-852.
- Lucy, O. C. (2013). PHBV (Biopol). Retrieved April 19, 2016, from <https://prezi.com/nxqdpaxppmr/phbv-biopol/>
- Luqman, I. M. (2012). *Ion Exchange Technology II: Application*. New York: Springer.
- Mabrouk, M. M.; & 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.

- Maura, A. (2014). *Actinomyces*. Retrieved May 1, 2016, from <https://www.studyblue.com/notes/note/n/final-exam-/deck/6859763>
- Mergaert, J.; et al. (1994). Microbial Degradation of Poly(3-hydroxybutyrate) and Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in Compost. 2(3): 177-183.
- Muller, R. J. (2003). Biodegradability of Polymer: Regulations and Methods for Testing. In *Biopolymer online*. pp. 366-388. Retrieved May 3, 2016, from http://www.wiley-vch.de/books/bioply/pdf_v10/vol10_19.pdf
- Nadham, A.; Hasan, F.; Shah, Z.; Hameed, A.; & Shah, A. A. (2012). Production of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) Depolymerase from *Aspergillus* sp. NA-25. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 48(5): 482-487.
- Nishida, H.; & Tokiwa, Y. (1993). Distribution of Poly(β -hydroxybutyrate) and Poly(ϵ -caprolactone) Aerobic Degrading Microorganisms in Different Environments. *Journal of Environmental Polymer Degradation*. 1(3): 227-233.
- Oda, Y.; et al. (1997). Polycaprolactonedepolymerase Produced by the Bacterium *Alcaligenes faecalis*. *FEMS Microbiology Letters*. 152: 339-343.
- Ojumu, T. V.; Yu J.; & Solomon B. O. (2004). Production of Polyhydroxyalkanoates a Bacterial Biodegradable Polymer. *African Journal of Biotechnology*. 3(1): 18-24.
- Piskin, E.; et al. (2009). In Vivo Performance of Simvastatin-Loaded Electrospun Spiral-Wound Polycaprolactone Scaffolds in Reconstruction of Cranial Bone Defects in the Rat Model. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 90(4): 1137-1151.
- Reddy, C. S. K.; Ghai, R.; Rashmi; & Kalia, V. C. (2003). Polyhydroxyalkanoates: An Overview. *Bioresource Technology*. 87: 137-146.
- Rhee, Y. H.; Kim, Y. H.; & Shin, K. S. (2006). Characterization of an Extracellular Poly(3-hydroxyoctanoate) Depolymerase from the Marine Isolate, *Pseudomonas luteola* M13-4. *Enzyme and Microbial Technology*. 38: 529-535.
- Rydz, J.; et al. (2015). Polyester-Based (bio)Degradable Polymers as Environmentally Friendly Materials for Sustainable Development. *International Journal of Molecular Sciences*. 16: 564-596.

- Sang, B. I.; Hori, K.; Tanji, Y.; & Unno, H. (2002). Fungal Contribution to in Situ Biodegradation of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) Film in Soil. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 58: 241-247.
- Sang, B. I.; Lee, W. K.; Hori, K.; & 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 & Biotechnology*. 22:51-57.
- Sanyal, P.; Samaddar, P.; & Paul, A. K. (2006). Degradation of Poly(3-hydroxybutyrate) and Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by Some Soil *Aspergillus* spp. *Polymer Environment*. 14: 257-263.
- Sathya, R.; Ushadev T.; & Panneerselvam A. (2012). Plastic Degrading Actinomycetes Isolated from Mangrove Sediments. *International Journal of Current Research*. 4(10): 1-3.
- Shah, A. A.; Hasan, F.; Hameed, A.; & Ahmed, S. (2007a). 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.
- (2007b). Isolation and Characterisation of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) Degrading Actinomycetes and Purification of PHBV Depolymerase from Newly Isolated *Streptoverticillium kashmirensis* AF1. *Annals of Microbiology*. 57(4): 583-588.
- (2008). Biological Degradation of Plastics: A Comprehensive Review. *Biotechnology Advances*. 26: 246-265.
- Shah, A. A.; Hasan, F.; & Hameed, A. (2010). Degradation of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by a Newly Isolation *Actinomadura* sp. AF-555, from Soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 64: 281-285.
- Shivakumar, S.; et al. (2011). Purification, Characterization and Kinetic Studies of a Novel Poly(β)-hydroxybutyrate (PHB) Depolymerase PhaZPen from *Penicillium citrinum* S2. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 164: 1225-1236.

- Sudesh, H.; Abe Y.; & Doi Y. (2000). Synthesis Structure and Properties of Polyhydroxyalkanoates: Biological Polyesters. *Progress in Polymer Science*. 25: 1503-1555.
- Sukkhum, S.; Tokuyama, S.; Tamura, T.; & Kipreechavanich, V. (2009). A Novel (L-lactide) Degrading Actinomycetes Isolated from Thai Forest Soil, Phylogenic Relationship and the Enzyme Characterization. *The Journal of General and Applied Microbiology*. 55: 459-467.
- Tan, G. Y. A.; et al. (2014). Enhanced Gas Chromatography-Mass Spectrometry Method for Bacterial Polyhydroxyalkanoates Analysis. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 117(3): 379-382.
- Thakur, P. (2012). *Screening of Plastic Degrading Bacteria from Dumped Soil Area*. M.Sc. (Life Science). Rourkela: Department of Life Science National Institute of Technology.
- Tokiwa, Y.; Calabia, B. P.; Ugwu, C. U.; & Aiba, S. (2009). Biodegradability of Plastics. *International Journal of Molecular Sciences*. 10: 3722-3742.
- Vaishnavi, U. S.; & Shivakumar, S. (2015). Poly(β -hydroxybutyrate) (PHB) Depolymerase PHAZPen from *Penicillium expansum*: Purification, Characterization and Kinetic Studies. *Biotech*. 5: 901-909.
- Vilela, C.; et al. (2014). The Quest for Sustainable Polyesters-insights into the Future. *Polymer Chemistry*. 5(9): 3119-3141.
- Volova, T. G.; et al. (2010). Biodegradation of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) in Tropical Coastal Waters and Identification of PHA-degrading Bacteria. *Polymer Degradation and Stability*. 95: 2350-2359.
- Vroman, I.; & Tighzert, L. (2009). Biodegradable Polymers. *Materials*. 2: 307-344.
- Wang, Y.; et al. (2012). Purification and Properties of an Extracellular Polyhydroxybutyrate Depolymerase from *Pseudomonas mendocina* DSWY0601. *Chemical Research in Chinese Universities*. 28(3): 459-464.
- Walsg, G. (2002). *Proteins Biochemistry and Biotechnology*. Chichester: John Wiley & Sons.

- Woodruff, M. A.; & Hutmacher, D. W. (2010). The Return of a Forgotten Polymer- Polycaprolactone in the 21st Century. *Progress in Polymer Science*. 35(10): 1217-1256.
- Yashchuk, O.; Miyazaki, S. S.; & Hermida, E. B. (2014). Isolation Purification and Some Properties of an Extracellular PHBV Depolymerase from *Streptomyces* sp. SSM5670. *Asian Journal of Microbiology, Biotechnology & Environment Science*. 16(1): 29-33.
- Yuanpeng, W.; et al. (2013). Biosynthesis and Thermal Properties of PHBV Produced from Levulinic Acid by *Ralstonia eutropha*. *PLoS one*. 8(4): 1-8.
- Zhanyong, W.; Jia, G.; Linlin, Li.; & Husheng, J. (2012). Purification and Characterization of an Extracellular Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) Depolymerase from *Acidovorax* sp. HB01. *World Journal Microbiology Biotechnology*. 23: 2395-2402.







ภาคผนวก ก
สูตรอาหารและวิธีการเตรียม

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. yeast-malt extract agar International Streptomyces Project (ISP2)

Yeast extract	4	กรัม
Malt extract	10	กรัม
Dextrose	4	กรัม
Agar	20	กรัม

ปรับ pH ให้ได้ 7.3 และนำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. Basal medium

ละลาย PBS, PBSA, PHB หรือ PHBV 1 กรัม ในสารละลาย dichloromethane 20-30 มิลลิลิตร และนำไปผสมกับ basal medium 1 ลิตร โดยใช้เครื่องอัลตราโซนิกเคเตอร์ (ultrasonicator) อาหาร basal medium ประกอบด้วย

Yeast extract	0.2	กรัม
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1	กรัม
NaCl	0.1	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2	กรัม
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.02	กรัม
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.01	กรัม
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.0005	กรัม
$\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.005	กรัม
MnSO_4	0.005	กรัม
K_2HPO_4	1.6	กรัม
KH_2PO_4	0.2	กรัม

ปรับ pH ให้ได้ประมาณ 7 นำไปต้มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อระเหย dichloromethane จากนั้นเติมวุ้น (agar) 20 กรัม/ลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. Luria Bertani low salt broth (LB low salt)

Peptone	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
NaCl	5	กรัม
น้ำกลั่น	1	กรัม

นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที





ภาคผนวก ข
บัพเฟอร์และวิธีการเตรียมสาร

บัฟเฟอร์และสารเคมีที่ใช้

1. Stock solution

1.1 1 N Acetate buffer pH 3-6

Acetic acid	6	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100	มิลลิลิตร
ปรับ pH ด้วย 1N Sodium acetate		
1N Sodium acetate เตรียมโดย		
Sodium acetate	8.2	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100	มิลลิลิตร

1.2 1 M Phosphate buffer pH 6.0-8.0

KH_2PO_4	13.61	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100	มิลลิลิตร
ปรับ pH ด้วย 1M K_2HPO_4		
1M K_2HPO_4 เตรียมโดย		
K_2HPO_4	17.42	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100	มิลลิลิตร

1.3 1M Tris-HCl buffer pH 5-10

Tris	12.11	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100	มิลลิลิตร
ปรับ pH ด้วย 1 N HCl		

1.4 1M Glycine-NaOH buffer pH 10-12

Glycine	7.51	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100	มิลลิลิตร
ปรับ pH ด้วย 1 M NaOH		

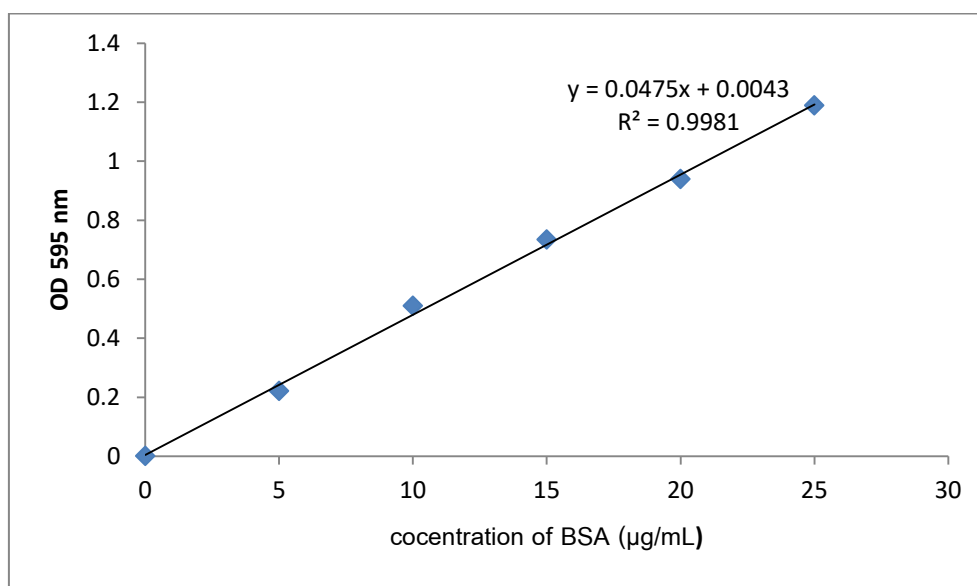
ภาคผนวก ค
วิธีการทำกราฟโปรตีนมาตรฐาน

1. การสร้างกราฟมาตรฐานโปรตีน

ผสมสารละลายโปรตีนมาตรฐานกับน้ำลงในหลอดทดลองให้ได้ความเข้มข้น 0, 2.5, 5, 10, 15, 20, และ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ดังตาราง 5 ความเข้มข้นละ 3 หลอด ยกเว้นหลอดที่ความเข้มข้น 0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Blank) ทำเพียง 1 หลอด จากนั้นเปิดสารละลายโปรตีนมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วเติม Coomassie Reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ที่ค่าความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ สร้างเป็นกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนกับค่าการดูดกลืนแสง โดยให้แกน X เป็นปริมาณความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (BSA) หน่วยเป็น ไมโครกรัม ส่วนแกน Y เป็นค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่วัดได้ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

ตาราง 12 ปริมาณสารที่ใช้ในการเตรียมสารละลายมาตรฐาน(BSA)

Vial	Volume of Diluent	Volume and Source of BSA	Final BSA Concentration
A	2370 μ L	30 μ L of Stock	25 μ g/mL
B	4950 μ L	50 μ L of Stock	20 μ g/mL
C	3970 μ L	30 μ L of Stock	15 μ g/mL
D	2500 μ L	2500 μ L of vial B dilution	10 μ g/mL
E	2000 μ L	2000 μ L of vial D dilution	5 μ g/mL
F	1500 μ L	1500 μ L of vial E dilution	2.5 μ g/mL
G	5000 μ L	0	0 μ g/mL=Blank

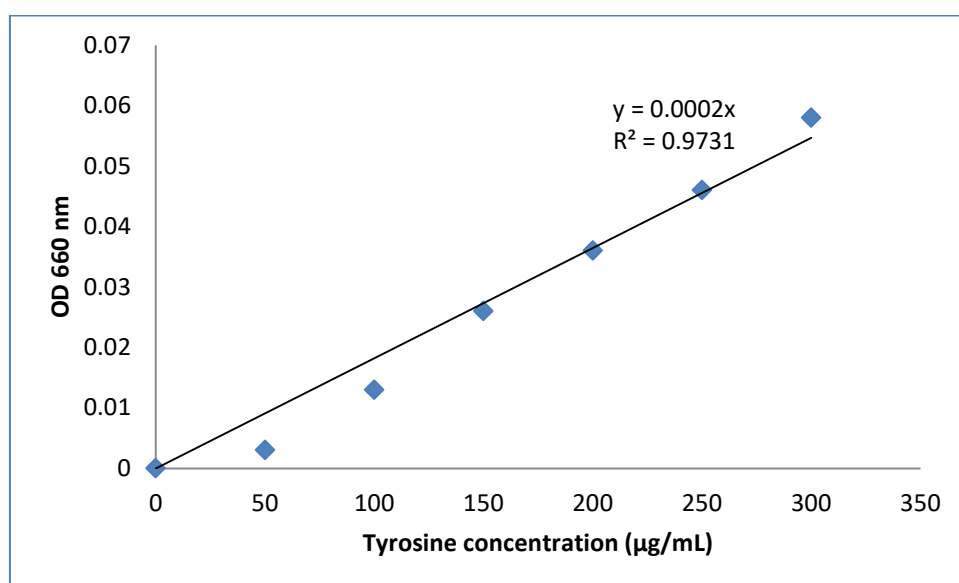


กราฟมาตรฐานโปรตีน

2. การสร้างกราฟมาตรฐานไทโรซีน

1. ชั่งไทโรซีน 10 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร สารละลายที่ได้คือสารละลายไทโรซีน 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเก็บไว้เป็น stock solution
2. เตรียมสารละลายไทโรซีนเข้มข้น 0, 50, 100, 150, 200, 250 และ 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
3. นำไปวัดค่า OD ที่ 660 นาโนเมตร
4. เขียนกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไทโรซีนกับค่า OD ที่ 660 นาโนเมตร เพื่อนำไปคำนวณหาค่าการทำงานของเอนไซม์
5. การคำนวณ

$$\text{การทำงานของเอนไซม์โปรตีเอส} = \frac{\text{ค่า OD} \times \text{ปริมาตรทั้งหมด} \times \text{ความเจือจาง}}{\text{สไลปของกราฟมาตรฐาน} \times \text{เวลา}}$$



กราฟมาตรฐาน ความเข้มข้นของไทโรซีน

ภาคผนวก ง
ปริมาณเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต



ภาคผนวก จ
การเตรียม SDS-PAGE

1. ส่วนผสมของการทำ Lower gel

Total	15%		12.5%		10%		7.5%	
	20ml	10ml	20ml	10ml	20ml	10ml	20ml	10ml
Water	4.9ml	2.45ml	6.6ml	3.3ml	8.2ml	4.1ml	9.9ml	4.95ml
4x LGB	5ml	2.5ml	5ml	2.5ml	5ml	2.5ml	5ml	2.5ml
30% Acrylamide	10ml	5ml	8.3ml	4.15ml	6.7ml	3.35ml	5ml	2.5ml
10% APS	100µl	50µl	100µl	50µl	100µl	50µl	100µl	50µl
TEMED	10µl	5µl	10µl	5µl	10µl	5µl	10µl	5µl

2. ส่วนผสมของการทำ Upper gel (4.5% acrylamide)

4XUGB	3 ml	1 ml
30% Acrylamide	1.8 ml	0.6 ml
Water	7.0 ml	2.4 ml
TEMED	15 µl	5 µl
10% APS	150 µl	50 µl
Total	12 ml	4 ml

3. ส่วนผสมของ 2x SDS Sample buffer (freshly prepare)

2-mercaptoethanol	0.5 ml
0.5% (w/v) Bromphenol blue	0.5 ml
0.5 M TrisHCl	1.5 ml
10% SDS	2 ml
Glycerol	2.5 ml
dH ₂ O	3.0 ml
Total 10 ml	

4. Staining solution I

Methanol : Acetic acid : Water : Coomassie Brilliant Blue-R-250

270 ml : 60 ml : 270 ml : 1.5 g

5. ส่วนผสมของ Destaining solution I

Methanol	25 ml	225 ml
Glacial acetic acid	8 ml	72 ml
Water	65 ml	585 ml
Total	98 ml	882 ml

6. ส่วนผสมของ Destaining solution II

Methanol	50 ml	10 ml
Glacial acetic acid	75 ml	15 ml
Water	875 ml	175 ml
Total	1000 ml	200 ml



ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อสกุล	นางสาววิชุดา พรหมคงบุญ
วันเดือนปีเกิด	8 มิถุนายน 2530
สถานที่เกิด	อำเภอยะหา จังหวัดยะลา
สถานที่อยู่	139/62 ตำบลสะเตงนอก อำเภอเมือง จังหวัดยะลา 95000
ตำแหน่งหน้าที่การงานในปัจจุบัน	ข้าราชการครู คศ.1
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	โรงเรียนกำแพงวิทยา อำเภอละงู จังหวัดสตูล
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2549	ระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย จาก โรงเรียนคณะราษฎรบำรุง จังหวัดยะลา
พ.ศ. 2553	วท.บ. (ชีววิทยา) จาก มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่
พ.ศ. 2554	ป.บัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี จาก มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา
พ.ศ. 2559	กศ.ม. (ชีววิทยา) จาก มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ จังหวัดกรุงเทพฯ
ผลงาน	วิชุดา พรหมคงบุญ, ทายาท ศรียาภัย และพิชามัก ศรียาภัย. (2559) สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์พอลิ (3- ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) ดีพอลิเมอร์ จาก <i>Actinomadura</i> sp. สายพันธุ์ TF1. วารสารวิทยาศาสตร์ มศว.ปีที่ 32 ฉบับที่ 2 Promkongboon W, Sriyapai T, Sriyapai P, 2016. Purification and characterization of poly(3- hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) depolymerase from <i>Actinomadura</i> sp. strain TF1. The 5 th International Conference on Life Science & Biological Engineering (LSBE), 22-24 November 2016, Kyoto, Japan (poster presentation)