

การคัดแยกและศึกษาคุณสมบัติเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย
พลาสติกชีวภาพ



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
มีนาคม 2556

การคัดแยกและศึกษาคุณสมบัติเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย
พลาสติกชีวภาพ



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

มีนาคม 2556

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การคัดแยกและศึกษาคุณสมบัติเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย
พลาสติกชีวภาพ



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
มีนาคม 2556

ลักษมี ศุภระกาญจนะ. (2556). การคัดแยกและศึกษาคุณสมบัติเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สามารถผลิต
เอนไซม์ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ. ปรินญาณีพนธ์ วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ).
กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. คณะกรรมการควบคุม:
ดร.พิชามัก สมบูรณ์ทรัพย์, ดร.สุชมาภรณ์ สุขุม.

การคัดแยกจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพจากดินที่เกิดจากการทับถมกันของกอง
ขยะหรือปุ๋ยหมัก ด้วยวิธีการเกิดบริเวณใส (clear zone) บนอาหารแข็ง พอลิคาร์โพรแลคโตน
(PCL), พอลิแลคไทด์ (PLA), พอลิบิวทิลีนซัคซิเนต (PBS) และ พอลิบิวทิลีนซัคซิเนตโคอะดิเพท
(PBSA) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ได้ทั้งหมด 40 ไอโซเลท ได้แก่ เชื้อที่ย่อย
สลายบนอาหารแข็ง PLA 9 ไอโซเลท คิดเป็น 22.5 เปอร์เซ็นต์จากเชื้อทั้งหมด เชื้อที่ย่อยสลาย
PCL 18 ไอโซเลท คิดเป็น 45 เปอร์เซ็นต์จากเชื้อทั้งหมด เชื้อที่ย่อยสลาย PBS 15 ไอโซเลทคิด
เป็น 37.5 เปอร์เซ็นต์จากเชื้อทั้งหมดและเชื้อที่ย่อยสลาย PBSA 6 ไอโซเลทคิดเป็น 15 เปอร์เซ็นต์
จากเชื้อทั้งหมด ตามลำดับ จากตัวอย่างดินทั้งหมด 17 ตัวอย่าง แบคทีเรีย 8 ไอโซเลทสามารถสร้าง
เอนไซม์ที่ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพได้มากกว่า 1 ชนิด การจัดจำแนกโดยการวิเคราะห์บริเวณ
16S rDNA ที่มีขนาด 1500 bp การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา พบว่าทั้ง 8 ไอ
โซเลทมีลักษณะคล้ายเชื้อสกุล *Streptomyces* 6 สายพันธุ์ และสกุล *Saccharothrix* 2 สายพันธุ์
โดยเชื้อ *Saccharothrix* sp. สายพันธุ์ APL5 (JN387600.1) เป็นเพียงสายพันธุ์เดียวที่สามารถเกิด
บริเวณใสบนอาหารแข็งพลาสติกชีวภาพทั้ง 4 ชนิดได้ การศึกษาแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน
ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพในอาหารเหลว พบว่าเมื่อใช้ PBS ที่ความ
เข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญ เชื้อสายพันธุ์ APL5 สามารถผลิตเอนไซม์ที่
ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ PBS และ PBSA ได้ดีที่สุด โดยเอนไซม์มีค่าการทำงานของเอนไซม์
จำเพาะเท่ากับ 19.1 และ 13 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4
วัน เมื่อใช้ PBS ที่ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอนและใช้ Yeast extract เป็นแหล่ง
ไนโตรเจน พบว่าเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PBS ที่มีค่าการทำงานของเอนไซม์จำเพาะ
สูงสุดเท่ากับ 20.7 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน การศึกษายีนที่
เกี่ยวข้องกับกระบวนการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ พบลำดับเบสบางส่วนของเอนไซม์ไลเปสขนาด 300
bp ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนจำเพาะ Gly-His-Ser-Met-Gly ที่คล้ายกับ Gly-X₁-Ser-X₂-Gly ในบริเวณ
lipase box ของเอนไซม์กลุ่ม esterase-lipase superfamily (serine hydrolase) เมื่อเปรียบเทียบ
ลำดับกรดอะมิโนในฐานข้อมูลพบว่าคล้ายกับเอนไซม์ triacylglycerol lipase ของเชื้อ *Streptomyces*
flavogriseus สายพันธุ์ ATCC 33331 (YP_004925694.1) 81 เปอร์เซ็นต์คล้ายกับเอนไซม์ไลเปส
ของเชื้อ *Streptomyces pristinaespiralis* สายพันธุ์ ATCC25486 (ZP_06912326.1) 78 เปอร์เซ็นต์
และคล้ายกับเอนไซม์ Triacylglycerol lipase ของเชื้อ *Amycolatopsis* sp. สายพันธุ์ ATCC 39116
(ZP_10048653.1) 77 เปอร์เซ็นต์

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF ACTINOMYCETE THAT PRODUCE
BIOPLASTICS DEGRADING ENZYME



Presented in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Master of Science Degree in Biotechnology
at Srinakharinwirot University
March 2013

Luksamee Sukrakanchana. (2013). *Isolation and characterization of actinomycete that produce bioplastic degrading enzyme*. Master thesis, M.Sc. (Biotechnology). Bangkok: Graduate school, Srinakharinwirot University. Advisor Committee: Dr.Peechapack Somyoonsap, Dr.Sukhumaporn Sukkhum.

Bioplastic -degrading microorganisms were isolated from 17 soil samples ,compost of the rubbish, in Thailand. Among the 40 isolates, 9 (22.5%), 18 (45%), 15 (37.5%) and 6 (15%) isolates could be degraded PLA, PCL, PBS and PBSA respectively. Eight of bioplastic-degrading bacterial strains were screened for their ability of clear zone formulation on bioplastics-emulsified mineral agar plate using polylactic acid (PLA), polycaprolactone (PCL), poly-(butylene succinate) (PBS) and polybutylene succinate-co-adipate (PBSA) as substrates. Eight active strains classified according to phenotypic characteristics and 16S rDNA sequence were belonged to the genus *Streptomyces* (6 strains) and *Saccharothrix* (2 strains). From theirs phenotypic and genetics characterization, strain APL5 (JN387600.1) was closely related to *Saccharothrix* sp. The strain APL5 demonstrated the best bioplastic-degrading activity on agar plate. It could be degraded PCL, PLA, PBA, PBSA and utilized these bioplastics as sole carbon source in culture broth. The effects of carbon and nitrogen sources on the bioplastic-degrading enzyme production by strain APL5 were studied. The best carbon source of the enzyme production was 1.5 % (w/v) PBS. Moreover, The specific activity of investigation PBS and PBSA-degrading enzyme were 19.1 and 13 U/mg protein at 37°C for 4 days, respectively. Besides, strain APL5 demonstrated the highest PBS-degrading activity in culture broth when 1.5 % PBS (w/v) and yeast extract were used as carbon and nitrogen sources, respectively with 20.7 U/mg protein at 37°C for 4 days. Partial nucleotides of bioplastic depolymerase from strain APL5 was studied. The Lpa5 had the highly conserved pentapeptide Gly-His-Ser-Met-Gly, It has been shown that most esterase-lipase superfamily (serine hydrolase) contains a Gly-X₁-Ser-X₂-Gly, called lipase box. The deduced of amino acid homology search revealed that It was related to triacylglycerol lipase from *Streptomyces flavogriseus* ATCC 33331 (YP_004925694.1) with 81 % identity, lipase from *Streptomyces pristinaespiralis* ATCC 25486 (ZP_06912326.1) with 78 % identity and triacylglycerol lipase from *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116 (ZP_ 100 48653.1) with 77 % identity

ปริญญานิพนธ์
เรื่อง
การคัดแยกและศึกษาคุณสมบัติเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพลาสติก
ชีวภาพ
ของ
ลักษมี สุกระกาญจนะ

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.สมชาย สันติวัฒนกุล)
วันที่ เดือน พ.ศ. 2556

คณะกรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์

คณะกรรมการสอบปากเปล่า

.....ประธาน

.....ประธาน

(อาจารย์ ดร.พิชามัก สมบูรณ์ทรัพย์)

(รองศาสตราจารย์ ดร. วิเชียร กิจปรีชาวนิช)

.....กรรมการ

.....กรรมการ

(อาจารย์ ดร.สุขุมภรณ์ สุขขุม)

(รองศาสตราจารย์ ดร.ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร)

.....กรรมการ

(อาจารย์ ดร.พิชามัก สมบูรณ์ทรัพย์)

.....กรรมการ

(อาจารย์ ดร.สุขุมภรณ์ สุขขุม)

งานวิจัยนี้ ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย
จากเงินกองทุนส่งเสริมและพัฒนากการวิจัย บัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ



ประกาศคุณูปการ

ปริญญาานิพนธ์ฉบับนี้จะไม่มีความสำเร็จลงได้ หากขาดความช่วยเหลือและคำแนะนำอย่างดี
ยิ่งจาก ดร.พิชามัก สมบูรณ์ทรัพย์ อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญาานิพนธ์ ดร.สุขุมภรณ์ สุขขุม อาจารย์ที่
ปรึกษาปริญญาานิพนธ์ร่วม ผู้ที่ทุ่มเทให้ความช่วยเหลืออย่างเต็มที่ทั้งในด้านการศึกษา และการทำ
วิจัยมาโดยตลอด ค่อยตักเตือนสั่งสอน แนะนำทั้งในด้านวิชาการ ความรู้ จริยธรรมประกอบการ
ทำปริญญาานิพนธ์ที่สมบูรณ์ ข้าพเจ้ากราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล สิทธิกรกุล ผู้ช่วยศาสตราจารย์ขจีนาฏ โพธิเวช
กุล รองศาสตราจารย์ ดร.ปรีนทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรอนงค์ พริ้งสุลกะ
ดร.ณัฐฎิภา สุวรรณาศรัย ดร.ประวดี อังประภาพรชัย ดร.ทนายท ศรียาภัย ดร.วุฒิพงษ์ ทองใบ และ
คณาจารย์ทุกท่านที่ให้ความรู้แก่ผู้วิจัยตลอดการศึกษา

ขอขอบพระคุณ คุณสมบูรณ์ แดงไทย คุณประกายรัตน์ กสิกรรม ที่ได้ช่วยอบรม สั่งสอน
ให้ความรู้ ความเมตตาและขอคิดเห็นที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการทำงานวิจัยซึ่งมีส่วนทำให้
ปริญญาานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.โกสุม จันทร์ศิริ ที่ให้ความกรุณาผู้วิจัยโดยการเอื้อ
เพื่อสถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์ต่างๆให้ข้าพเจ้าได้ใช้ในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณคุณอุษาวดี ภาควิชาเคมี คุณไพศาล ขาวสัก ดร. สุพัชรา อารีกิจ และ
พี่ๆที่ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่คอยให้ความรู้ คำปรึกษา
แนะนำเรื่องต่างๆ รวมถึงอุปกรณ์ที่จำเป็นต่อการวิจัยเป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. วิเชียร กิจปรีชาวนิชที่กรุณารับเป็นประธานการสอบ
ปริญญาานิพนธ์และช่วยแก้ไขปริญญาานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒที่ได้ให้เงินทุนอุดหนุนการ
ทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้อง ๆ ทุกคนในเอกเทคโนโลยีสื่อภาพ คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สำหรับมิตรภาพ ความช่วยเหลือ และน้ำใจอันมีค่ายิ่ง

ข้าพเจ้าขอโน้มระลึกถึงพระคุณของบิดา มารดาที่สนับสนุน ช่วยเหลือ ให้กำลังใจและชื่น
ชมในความเพียรพยายามของข้าพเจ้า ตั้งแต่เริ่มทำปริญญาานิพนธ์ จนเสร็จสิ้นสมบูรณ์

ลักษมี ศุกระกาญจนะ

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ	1
ภูมิหลัง	1
ความมุ่งหมายของการวิจัย.....	4
ขอบเขตของการวิจัย.....	4
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
พลาสติกชีวภาพ.....	5
เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ	10
จุลินทรีย์ที่ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ	13
การกระจายตัวของแอสโคดีโนไมซีตาในดิน	16
ลักษณะโดยทั่วไปของเชื้อแอสโคดีโนไมซีตา	17
การจัดจำแนกประเภทของเชื้อแอสโคดีโนไมซีตา	19
อนุกรมวิธานของแอสโคดีโนไมซีตา	26
ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ	29
3 วิธีดำเนินงานวิจัย	31
อุปกรณ์และสารเคมี	31
วิธีดำเนินการวิจัย	33
การเก็บตัวอย่างดิน.....	34
การตัดแยกแบคทีเรียที่ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพจากตัวอย่างดิน.....	34
การจัดจำแนกแบคทีเรียโดยศึกษาลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA.....	34
การสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรีย.....	34
การจำแนกเชื้อโดยวิธีวิเคราะห์บริเวณ 16S rDNA และการศึกษา ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis).....	35
การศึกษาทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางชีวเคมีของจุลินทรีย์.....	37
การศึกษาสัณฐานวิทยา (Morphological characterization).....	37
การศึกษาลักษณะการเจริญของแบคทีเรียแอสโคดีโนไมซีตา.....	37

สารบัญ (ต่อ)

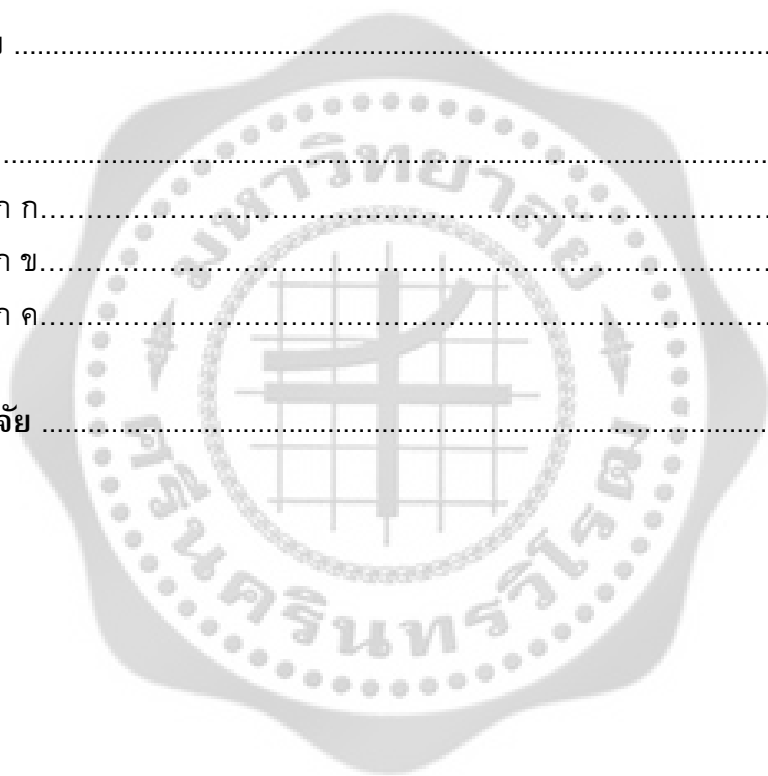
บทที่	หน้า
3 (ต่อ)	
การศึกษาลักษณะของแอกติโนมัยซีทภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (SEM).....	37
การวิเคราะห์ห้องประกอบของเซลล์.....	37
การศึกษาไอโซเมอร์ของ diaminopimelic acid (DAP) ในผนังเซลล์...	37
การวิเคราะห์น้ำตาลในเซลล์.....	38
การศึกษาสรีรวิทยาของเชื้อ (Physiological characterization).....	38
การศึกษาการใช้แหล่งคาร์บอนในการเจริญของเชื้อ.....	38
การศึกษาความสามารถในการทนเค็มและอุณหภูมิที่ใช้ในการเจริญ.....	39
การศึกษาความสามารถในการย่อยสลายของเชื้อ.....	39
การศึกษาการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ.....	39
การศึกษาอุณหภูมิและค่า pH ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ (bioplastic – degrading enzyme).....	39
การศึกษาแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ.....	40
การศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ.....	40
การศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ.....	41
การศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพโดยใช้เทคนิค Degenerated primer.....	41

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
4 ผลการทดลอง	44
การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพจากตัวอย่างดิน.....	44
การจำแนกเชื้อโดยวิธีวิเคราะห์บริเวณ 16S rDNA และการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic analysis).....	47
การศึกษาทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางชีวเคมีของจุลินทรีย์.....	50
การศึกษาสัณฐานวิทยา (Morphological characterization).....	50
การวิเคราะห์องค์ประกอบของเซลล์.....	54
การศึกษาไอโซเมอร์ของ diaminopimelic acid (DAP) ในผนังเซลล์.....	54
การวิเคราะห์น้ำตาลในเซลล์.....	56
การศึกษาลักษณะของเชื้อสายพันธุ์ APL5 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน (SEM).....	57
การศึกษาสรีรวิทยาของเชื้อ (Physiological characterization).....	60
การศึกษาการใช้แหล่งคาร์บอนในการเจริญของเชื้อ.....	60
การศึกษาความสามารถในการทนเค็มและอุณหภูมิที่ใช้ในการเจริญ.....	60
การศึกษาความสามารถในการย่อยสลายของเชื้อแอกติโนมัยสีท.....	60
การศึกษาการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ.....	63
การศึกษาค่า pH และ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ.....	63
การศึกษาแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ.....	65
การศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ.....	67
การศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ.....	69

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
4 (ต่อ)	
การศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ โดยใช้ Degenerated primer.....	71
5 สรุป อภิปราย และข้อเสนอแนะ.....	73
บรรณานุกรม	77
ภาคผนวก	85
ภาคผนวก ก.....	86
ภาคผนวก ข.....	93
ภาคผนวก ค.....	96
ประวัติย่อผู้วิจัย	107



บัญชีตาราง

ตาราง	หน้า
1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	31
2 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง	32
3 ส่วนผสมของการทำ PCR เพื่อสังเคราะห์บริเวณ 16S rDNA	36
4 ส่วนผสมของการทำ PCR เพื่อสังเคราะห์ยีนบางส่วนของ เอนไซม์ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ.....	42
5 ขนาดบริเวณใสที่เกิดขึ้นบนอาหารแข็งพลาสติกชีวภาพ บ่มเชื้อที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน.....	45
6 เปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงของเชื้อแต่ละไอโซเลท เมื่อเปรียบเทียบกับ กับฐานข้อมูล.....	48
7 สรุปผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอกติโนมัยสีท.....	58
8 ผลการศึกษาลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อแอกติโนมัยสีท.....	61
9 การศึกษาความสามารถในการย่อยสลายของเชื้อแอกติโนมัยสีท.....	63
10 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์จำเพาะของเอนไซม์ย่อยสลาย PBSA ของเชื้อสายพันธุ์ APL5.....	64
11 ปริมาณสารที่ใช้ในการทำกราฟมาตรฐานความเข้มข้นของโปรตีน.....	98

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 แผนภาพแสดงประเภทและตัวอย่างพอลิเอสเทอร์ ที่ประกอบด้วย อะลิฟาติกและอะโรมาติก	6
2 วัฏจักรของการย่อยสลายของพลาสติกชีวภาพ	8
3 การสังเคราะห์ 4-hydroxybutyl succinate (4HBS)	9
4 โครงสร้างพลาสติกชีวภาพในกลุ่มของอะลิฟาติกพอลิเอสเทอร์	10
5 กระบวนการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพของจุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์ ปล่อยเอนไซม์ ออกนอกเซลล์ทำให้ได้ผลผลิตเป็นมอนอเมอร์และ ไดเมอร์ (dimers) ซึ่งสามารถส่งผ่านเข้าผนังเซลล์ได้	11
6 โครงสร้างของ tridecanoyl-glyceride, didecanoyl-glyceride และ PBS	12
7 การย่อยสลาย PBS ด้วยเอนไซม์ไลเปส	12
8 วงชีวิตของแอคติโนมัยซีท	18
9 องค์ประกอบของผนังเซลล์และชนิดของน้ำตาลภายในเซลล์ของ เชื้อแอคติโนมัยซีท	19
10 การจัดหมวดหมู่ของชั้น <i>Actinobacteria</i> ตามความสัมพันธ์ ของบริเวณ 16S rDNA	23
11 การจัดกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยซีทตามความสัมพันธ์ของลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ด้วยแผนภูมิทางวิวัฒนาการ วิธีของ neighbor-joining ซึ่ง สามารถจัดกลุ่มแอคติโนมัยซีทได้ทั้งหมด 7 กลุ่ม ดังนี้ 1. <i>Micrococcus</i> <i>Microbacterium</i> และ สกุลที่เกี่ยวข้อง 2. <i>Mycobacterium</i> , <i>Nocardia</i> และ สกุลที่เกี่ยวข้อง 3. Family Pseudonocardiaceae และสกุลที่เกี่ยวข้อง 4. Family Micromonosporaceae 5. Family Streptosporangiaceae, 6. Family Thermonosporaceae 7. Family Streptomycetaceae.....	24
12 การจัดกลุ่มของแอคติโนมัยซีทโดยการใช้ลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ในการศึกษา phylogenetic tree สามารถจัดกลุ่มเชื้อได้ทั้งหมด 5 orders ดังนี้ <i>Actinomycetales</i> , <i>Bifidobacteriales</i> , <i>Acidimicrobiales</i> และ <i>Rubrobavterales</i>	25
13 โครงสร้างและการจัดเรียงตัวของชั้น peptidoglycan ที่ประกอบด้วย DAP บนผนังเซลล์ของเชื้อแอคติโนมัยซีท	28

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
14 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนบริเวณปลาย N terminal ของ เอนไซม์ Poly(L-lactide) depolymerase (<i>pla</i>) จาก <i>Actinomadura keratinilytica</i> สายพันธุ์ T16-1 กับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ serine protease จากเชื้อ <i>Streptomyces griseus</i> subsp. <i>griseus</i> สายพันธุ์ NBRC 13350, <i>Streptomyces pristinaespiralis</i> สายพันธุ์ ATCC 25486 และ <i>Streptomyces avermitilis</i> สายพันธุ์ MA-4680.....	30
15 การตัดแยกแบคทีเรียที่ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพบนอาหารแข็ง PLA ที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน.....	44
16 การเกิดบริเวณใสของเชื้อทั้งหมด 8 ไอโซเลทที่แยกได้จากดินบน อาหารแข็ง PCL ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน.....	46
17 บริเวณ 16S rDNA ขนาด 1500 คู่เบส ของเชื้อ 8 ไอโซเลท จากการทำ PCR.....	47
18 แผนภูมิทางวิวัฒนาการ ของลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA จากเชื้อ 8 สายพันธุ์ และเชื้อที่มีความคล้ายกับเชื้อทั้ง 8 สายพันธุ์จากฐานข้อมูล GenBank ที่ค่า bootstrapping 1,000 ครั้ง.....	49
19 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแอกติโนมัยสีท 4 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ APL1, APL2, APL3 และ APL4 บนอาหารแข็ง ISP2, ISP3 ISP4 และ ISP5.....	52
20 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแอกติโนมัยสีท 4 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ APL5, APL6, APL7 และ APL8 บนอาหารแข็ง ISP2, ISP3 ISP4 และ ISP5.....	53
21 ตำแหน่งไอโซเมอร์ของ DAP จากแอกติโนมัยสีท 8 สายพันธุ์ เปรียบเทียบ กับ DAP มาตรฐานบนแผ่น Thin layer chromatography (TLC).....	55
22 รูปแบบของน้ำตาลในเซลล์ของเชื้อสายพันธุ์ APL5 เปรียบเทียบกับน้ำตาล มาตรฐานบนแผ่น Thin layer chromatography (TLC).....	56

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
23 ลักษณะ aerial mycelium ของเชื้อ <i>Saccharothrix</i> sp. สายพันธุ์ APL5 บนอาหาร Rye medium ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (SEM).....	57
24 การเปรียบเทียบระหว่างชุดควบคุม (control) กับ PBSA -basal medium broth ที่มีการเลี้ยงเชื้อสาย <i>Saccharothrix</i> sp. สายพันธุ์ APL5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 168 ชั่วโมง	64
25 ค่ากิจกรรมเอนไซม์จำเพาะของเอนไซม์ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ (U/mg) เมื่อเลี้ยงในแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆที่ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง.....	66
26 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ (U/ml) เมื่อเลี้ยงในแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆที่ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 96 ชั่วโมง.....	66
27 ค่ากิจกรรมเอนไซม์จำเพาะของเอนไซม์ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ (U/mg) เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่า pH 7 โดยใช้ PBS ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 96 ชั่วโมง.....	67
28 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ของเอนไซม์ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ (U/ml) เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่า pH 7 โดยใช้ PBS ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง	68

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
29 ค่ากิจกรรมเอนไซม์จำเพาะของเอนไซม์ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ (U/mg) เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่า pH 7 โดยใช้ PCL ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 96 ชั่วโมง.....	68
30 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ของเอนไซม์ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ (U/ml) เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่า pH 7 โดยใช้ PCL ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 96 ชั่วโมง.....	69
31 ค่าการทำงานของเอนไซม์จำเพาะของเอนไซม์ (U/mg) ย่อยสลาย PBS เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่า pH 7 ใช้ PBS ที่ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอนและใช้แหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 96 ชั่วโมง	70
32 ค่าการทำงานของเอนไซม์ (U/ml) ย่อยสลาย PBS เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่า pH 7 ใช้ PBS ที่ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนและใช้แหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 96 ชั่วโมง.....	70
33 ขนาดของเอนไซม์ไลเปส (<i>lpa5</i>) ที่มีขนาดเท่ากับ 300 คู่เบส ที่ได้จากการทำ PCR เมื่อเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100bp DNA Ladder marker.....	71
34 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ(<i>lpa5</i>) กับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ <i>Streptomyces</i> sp.และลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ไลเปส <i>Acidovorax delafieldii</i> สายพันธุ์ BS-3 ลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์เอสเทอร์เอสจากเชื้อ <i>Thermobifida alba</i> สายพันธุ์ AHK119	72

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

ความเจริญก้าวหน้าของเทคโนโลยีและการเพิ่มขึ้นของจำนวนประชากรในปัจจุบันทำให้ความต้องการในการใช้พลาสติกมีปริมาณสูงขึ้น ซึ่งก่อให้เกิดการสะสมของพลาสติกใช้แล้วและเหลือใช้เป็นจำนวนมาก (Tokiwa; et al. 2009: 3722-3742) ส่งผลให้เกิดปัญหาในด้านการกำจัดพลาสติก รวมถึงปัญหาทางด้านสิ่งแวดล้อม พลาสติกในชีวิตประจำวันส่วนใหญ่เป็นพลาสติกสังเคราะห์ที่ผลิตจากอุตสาหกรรมปิโตรเคมีซึ่งมีลักษณะโครงสร้างทางเคมีที่ซับซ้อน โดยจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมส่วนใหญ่ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายพลาสติกสังเคราะห์ได้ จึงทำให้เกิดการสะสมของพลาสติกในสิ่งแวดล้อม โดยกระบวนการผลิตและการเผาทำลายพลาสติกสังเคราะห์จะทำให้เกิดการปล่อยก๊าซเรือนกระจก (greenhouse gases) เช่น ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ขึ้นเป็นจำนวนมากซึ่งก๊าซจะลอยขึ้นไปสะสมอยู่ในชั้นบรรยากาศ ก่อให้เกิดการสะสมของพลังงานความร้อนบนชั้นบรรยากาศ และบนผิวโลกมากขึ้น (Thailand and Climate Change. 2550: Online) ส่งผลให้ชั้นบรรยากาศของโลกเกิดการเปลี่ยนแปลงขึ้นอย่างรวดเร็ว และอีกเป็นสาเหตุหนึ่งของการเกิดภาวะโลกร้อน (global warming) ดังนั้นพลาสติกชีวภาพ (bioplastics) จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการพัฒนาเป็นวัสดุสำหรับใช้งานเพื่ออนุรักษ์สิ่งแวดล้อม ทั้งด้านวัตถุดิบ กระบวนการผลิต และกระบวนการทำลาย พลาสติกชีวภาพจึงเป็นที่สนใจของนักวิทยาศาสตร์ตลอดจนนักอุตสาหกรรมชั้นแนวหน้าทั่วโลก

พลาสติกชีวภาพเป็นพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ (biodegradable plastics) ชนิดหนึ่งซึ่งมีกลไกการย่อยสลายด้วยเอนไซม์จากจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติ เมื่อถูกย่อยสลายหมดจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นมวลชีวภาพ (biomass) น้ำ ก๊าซมีเทน และ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ผลิตภัณฑ์เหล่านี้ถูกนำไปใช้ในการเจริญเติบโต และการดำรงชีวิตของพืช โดยไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ดังนั้นพลาสติกชีวภาพจึงมีประโยชน์ และมีคุณสมบัติในการนำมาใช้งานได้เทียบเท่ากับพลาสติกสังเคราะห์ และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม (Tokiwa; et al. 2009: 3722-3742)

ในหลายประเทศได้มีการพัฒนาและผลักดันด้านนโยบาย การวิจัย และพัฒนาอุตสาหกรรม รวมถึงการสร้างผลิตภัณฑ์จากพลาสติกชีวภาพ เพื่อเร่งรัดให้เกิดการทดแทนพลาสติกสังเคราะห์ เช่น ประเทศสหรัฐอเมริกา ได้ก้าวมาเป็นผู้นำการผลิตพลาสติกชีวภาพ โดยประสบความสำเร็จในการผลิตเม็ดพลาสติกชีวภาพในระดับอุตสาหกรรม เช่น บริษัท CargillDow หรือ Natureworks ใช้ข้าวโพดเป็นวัตถุดิบเพื่อผลิตกรดแลคติก และ Poly(lactic acid) (PLA) บริษัท Metabolix Inc. เป็นผู้นำด้านการผลิตพลาสติกชีวภาพย่อยสลายได้ชนิด Poly(hydroxyalkanoates) (PHAs) และในทวีปยุโรปมีการใช้พลาสติกชีวภาพมากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ ของตลาดการผลิตวัสดุย่อยสลายได้ ขณะที่ประเทศญี่ปุ่นซึ่งถือเป็นประเทศแรกที่น่าพลาสติกชีวภาพมาใช้ในการผลิตเป็น

ผลิตภัณฑ์เกี่ยวกับอิเล็กทรอนิกส์ รวมถึงการผลิตชิ้นส่วนรถยนต์ โดยบริษัทโตโยต้าเป็นรายแรกของโลกที่ใช้ PLA ในการผลิตชิ้นส่วน และปลอกครอบยางอะไหล่รถยนต์ สำหรับในประเทศไทยนั้น พลาสติกชีวภาพถือเป็นนวัตกรรมใหม่ที่ช่วยเพิ่มมูลค่าวัตถุดิบทางการเกษตร เช่น ข้าวโพด มันสำปะหลัง และ อ้อย เป็นต้น และมีการนำพลาสติกชีวภาพมาใช้ในการผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ในรูปแบบของภาชนะบรรจุอาหารแบบใช้แล้วทิ้ง เช่น กล่องใส่อาหาร ถ้วยพลาสติก จาน ชาม ช้อน ส้อม และ หลอดพลาสติก เป็นต้น

นอกจากการพัฒนาในด้านการผลิตพลาสติกชีวภาพแล้ว การศึกษาการย่อยสลายของพลาสติกชีวภาพโดยจุลินทรีย์นั้นก็ได้รับความสนใจจากนักวิทยาศาสตร์เช่นกัน ในปี ค.ศ. 1993 นิชิเดะ และโทคิวะ (Nishida & Tokiwa. 1993: 227-233) ได้ทำการศึกษาจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ Polycaprolactone (PCL) และ polyhydroxybutyrate (PHB) ซึ่งแยกได้จากดินบริเวณต่างๆ ในเมืองสึกุบะ ประเทศญี่ปุ่นซึ่งประกอบด้วยดินบริเวณแหล่งน้ำทั้ง ดินนาข้าว ดินป่า ดินจากฟาร์ม กองปุ๋ยหมัก ตะกอนที่ได้จากการบำบัดน้ำเสีย และดินริมถนน เป็นต้น การศึกษาการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพอาศัยวิธีการเกิดบริเวณใส (clear zone) บนจานเพาะเชื้อ และนำมาบ่มเป็นเวลา 10-30 วัน จากการทดลองพบว่ามีเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถย่อยสลาย PCL และ PHB ได้ ในปี ค.ศ. 1996 เมอร์ฟีและคนอื่นๆ (Murphy; et al. 1996: 456-460) ค้นพบเชื้อราชนิดก่อโรคในพืชที่สามารถย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ PCL ได้โดยการผลิตเอนไซม์ cutinase (serine hydrolase) ที่ย่อยคิวติน (cutin) เมื่อทำการเปรียบเทียบสายพันธุ์ wild-type และสายพันธุ์ cutinase-negative gene replacement mutant strain ของ *Fusarium solani* f. sp. *pisi* พบว่าสายพันธุ์ wild-type ของ *Fusarium moniliforme* สร้างเอนไซม์ cutinase ที่มีความสามารถในการย่อยสลาย PCL ได้ (PCL depolymerase) โดยเอนไซม์สามารถย่อยสลายพอลิเอสเตอร์ที่ไม่ละลายน้ำ (insoluble polyester) ให้ได้ผลผลิตที่ละลายน้ำได้ และผลผลิตที่ได้นั้นสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งพลังงานในการเจริญของจุลินทรีย์ต่อไป นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์ (PCL depolymerase) มีลักษณะคล้ายกับเอนไซม์ไลเปส (lipase) เอนไซม์เอสเทอเรส (esterase) และ คิวติเนส (cutinase) ตัวอย่างเช่น เอนไซม์ย่อยสลาย PCL ลักษณะคล้ายกับเอนไซม์ไลเปสในแบคทีเรีย *Alcaligenes faecalis* สายพันธุ์ 273 ต่อมาในปี ค.ศ. 2005 มาเอเดะ ยามาเกตะและอาเบะ (Maeda; Yamagata; & Abe. 2005: 778-788) ศึกษาเอนไซม์ที่ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ Polybutylene succinate (PBS) และ Polybutylene succinate-co-adipate (PBSA) จากเชื้อรา *Aspergillus oryzae* โดยทำการศึกษาความสามารถในการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพจาก culture supernatant โดยลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ที่แยกได้นั้นมีคล้ายกับเอนไซม์คิวติเนส มีขนาดมวลโมเลกุล 21.6 กิโลดาลตัน (kDa) นอกจากนี้ ค्लीเบอร์และคนอื่นๆ (Kleeber; et al. 2005: 262-270) ได้ทำการแยกและศึกษาเอนไซม์ extracellular hydrolase จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีส่วนประกอบของซบสเตอร์ที่มีลักษณะเป็นพันธะเอสเทอร์ (ester bond) เพื่อให้เชื้อเกิดการแสดงออกของยีนและผลิตเอนไซม์ที่ต้องการศึกษา โดยเอนไซม์ที่แยกได้จัดเป็นเอนไซม์ชอบร้อน (thermophilic enzyme) ที่มีขนาดมวลโมเลกุลเท่ากับ 28 กิโลดาลตัน มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกับเอนไซม์ไลเปส จากเชื้อ *Streptomyces albus*

(65 เปอร์เซ็นต์) และพบลำดับกรดอะมิโนบริเวณ active site เป็น -Gly-X₁-Ser-X₂-Gly- คุณสมบัติในการย่อยสลายของเอนไซม์ extracellular hydrolase นั้นต่างจากเอนไซม์ไลเปส (lipase : EC 3.1.1.3) โดยเอนไซม์ไลเปสตัดพันธะเอสเทอร์บริเวณ hydrophobic surface สลายซบสเตรทที่ประกอบด้วยพันธะเอสเทอร์ที่ไม่สามารถละลายน้ำได้ และสลายสารประกอบประเภทไตรกลีเซอไรด์ (triglycerides) ของกรดไขมันสายยาว (≥10 คาร์บอนอะตอม) ส่วนเอนไซม์ extracellular hydrolase สลายพันธะเอสเทอร์คล้ายกับเอนไซม์เอสเทอเรส (esterase: EC 3.1.1.1) สามารถย่อยสลายซบสเตรทที่ละลายน้ำได้ (water-soluble) และยังสามารถสลายสารประกอบประเภท glycerol esterase ที่ประกอบด้วย acyl chain สายสั้นๆ (≤ 10 คาร์บอนอะตอม)

ในประเทศไทยมีงานวิจัยที่ศึกษาเชื้อจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพได้เช่นกัน ในปี ค.ศ. 2009 สุขขุมและคนอื่นๆ (Sukkhum; et al. 2009: 459-467) แยกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ Poly (L-lactide) ทั้งหมด 13 สายพันธุ์ จากดินในป่าของประเทศไทย โดยเชื้อที่แยกได้นั้นจัดอยู่ใน Family Thermomonosporaceae, Micromonosporaceae, Bacillaceae, Streptosporangiaceae, และ Thermoactinomycetaceae โดยเชื้อ *Actinomadura* sp. สายพันธุ์ T16-1 นั้นมีความสามารถในการย่อยสลายสูงสุดเมื่อนำไปเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีแผ่นฟิล์ม PLLA เป็นแหล่งคาร์บอน และพบว่าเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายนั้นเป็นเอนไซม์ serine protease ขนาดมวลโมเลกุลประมาณ 30 กิโลดาลตัน มีอุณหภูมิ และค่า pH ที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์อยู่ที่ 70 องศาเซลเซียส และเอนไซม์มีความเสถียรที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้นั้นเป็นเชื้อชอบร้อนและมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ชอบร้อนได้ในปริมาณมากจึงเหมาะที่จะนำไปใช้ในการผลิตเอนไซม์ระดับอุตสาหกรรม นอกจากนี้คณะผู้วิจัยได้ทำการต่อยอดงานวิจัย โดยทำการศึกษาระบวนการผลิตเอนไซม์จากเชื้อ *Actinomadura* sp. สายพันธุ์ T16-1 โดยใช้วิธีการพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology, RSM) มาใช้ในการศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์ของเชื้อ เช่น แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ที่เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Sukkhum; et al. 2009: 302-306) ในปีเดียวกัน สมยูทรีพี้ และศิริโภค (Somyoonsap; & Siripoke, 2009) แยกเชื้อจุลินทรีย์ชอบร้อนที่ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ PCL จากตัวอย่างดินบริเวณกองขยะในประเทศไทย วิธีการที่ใช้ในการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลาย PCL ได้นั้นใช้วิธีการเกิดบริเวณใสบนอาหารแข็ง เมื่อบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-10 วัน สามารถแยกเชื้อจุลินทรีย์ชอบร้อนได้ทั้งหมด 11 ไอโซเลท การจัดจำแนกสายพันธุ์โดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA พบว่าเชื้อไอโซเลท S11, S12, S41, S42, S61, S81 และ S82 มีความคล้ายกับเชื้อ *Brevibacillus thermoruber* 99 เปอร์เซ็นต์ ไอโซเลท S21 และ S23 คล้ายกับเชื้อ *Brevibacillus brevis* 99 เปอร์เซ็นต์ เชื้อไอโซเลท S43 มีความคล้ายกับเชื้อ *Ureibacillus suwonensis* 99 เปอร์เซ็นต์และไอโซเลท S14 มีความคล้ายกับเชื้อ *Actinomadura keratinolytica* 99 เปอร์เซ็นต์ การศึกษาการย่อยสลาย PCL ของเชื้อนั้นพบว่า ไอโซเลท S21 และ S23 นั้นสามารถเจริญและย่อยสลาย PCL ได้อย่างรวดเร็วกว่าสายพันธุ์อื่นๆ ที่

แยกได้ จากงานวิจัยดังกล่าวเห็นได้ว่า จุลินทรีย์มีความสามารถในการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพได้หลายชนิดซึ่งมีทั้งแบคทีเรีย และเชื้อรา แต่การศึกษาการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพจากแบคทีเรียในกลุ่มแอคติโนมัยซีท (actinomycetes) ยังมีการศึกษาไม่มากนัก ดังนั้นจึงเกิดความสนใจในการคัดแยกเชื้อ และศึกษาการผลิตเอนไซม์ของเชื้อกลุ่มนี้ คาดว่าเอนไซม์ที่ได้ อาจมีประโยชน์ในการนำไปประยุกต์ใช้ได้ในระดับอุตสาหกรรม และมีความสำคัญทางด้านของการรองรับการใช้พลาสติกชีวภาพในอนาคต

ความมุ่งหมายของการศึกษาวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้ได้ตั้งความมุ่งหมายไว้ดังนี้

1. เพื่อคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพจากดินคอมโพสต์ (compost) ในบริเวณต่างๆ ของประเทศไทย
2. ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และสรีรวิทยาของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้
3. ศึกษาความสามารถของเชื้อแบคทีเรียในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ
4. ศึกษาในส่วนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพจากแบคทีเรียที่แยกได้

ขอบเขตของการศึกษาวิจัย

1. คัดแยกและจัดจำแนกแบคทีเรียที่ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพจากดินคอมโพสต์
2. ทดสอบความสามารถของเชื้อในการผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพบนอาหารแข็งและอาหารเหลว
3. ศึกษาในส่วนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพจากแบคทีเรียที่แยกได้

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

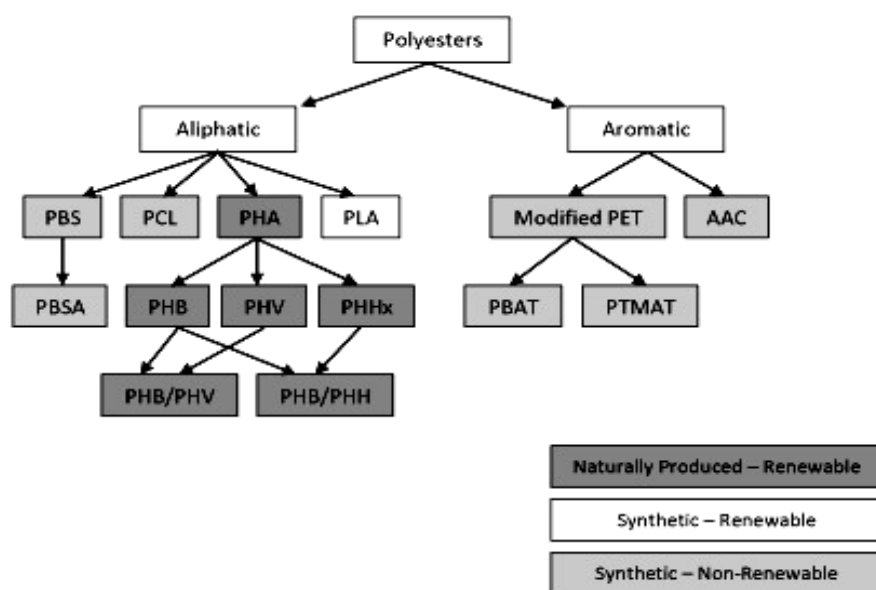
พลาสติกชีวภาพ

ในระยะแรกของการพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ มีการนำวัสดุทางธรรมชาติ เช่น ข้าวโพด อ้อย มันสำปะหลัง แป้ง และโปรตีนจากถั่ว มาเป็นสารตั้งต้นในการผลิตร่วมกับพอลิเมอร์สังเคราะห์ เพื่อลดสัดส่วนของสารที่ย่อยสลายยาก และช่วยเพิ่มความสามารถในการย่อยสลายให้มากขึ้น โดยพอลิเมอร์ที่มีการศึกษาวิจัยและนำมาผลิตเพื่อใช้ประโยชน์สามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ

พอลิเมอร์ที่มีส่วนประกอบของแป้งนั้นเป็นการผสมพอลิเมอร์บางชนิด เช่น พอลิเอสเทอร์ (polyester) และ พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (polyvinyl alcohol) เข้ากับสายพอลิเมอร์ของแป้งที่เป็นการเรียงตัวกันของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น น้ำตาลกลูโคส เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ glycosidic linkage โดยใช้อัตราส่วนผสมตั้งแต่ 10 -90 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ในการใช้งาน ถ้าส่วนผสมของแป้งมากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้สามารถพลาสติกย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติ หากใช้แป้งเป็นส่วนผสม 100 เปอร์เซ็นต์จะทำให้พลาสติกมีคุณสมบัติในการดูดความชื้นได้ดีเหมาะสำหรับการทำแคปซูลยา มีการเติมสารเพิ่มความยืดหยุ่น เช่น sorbitol และ glycerine จะช่วยให้พลาสติกทนต่อความร้อนได้มากขึ้น โดยตลาดการผลิตพลาสติกชีวภาพชนิดนี้มีถึง 50 เปอร์เซ็นต์ของพลาสติกชีวภาพทั้งหมด

พอลิเอสเทอร์จัดเป็นพอลิเมอร์ที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ เนื่องจากมีพันธะเอสเทอร์จำนวนมาก โดยพันธะเอสเทอร์มีความแข็งแรงน้อยและสามารถแตกตัวเป็นโมเลกุลที่มีขนาดเล็กได้เมื่อทำปฏิกิริยากับน้ำ (hydrolysis) พอลิเอสเทอร์แบ่งออกเป็นสองประเภท คือ อะลิฟาติก (aliphatic) และ อะโรมาติก (aromatic) พอลิเอสเทอร์ ดังแสดงในภาพประกอบ 1

ปัจจุบันมีการผลิตพอลิเมอร์กลุ่มอะลิฟาติกพอลิเอสเทอร์เป็นส่วนใหญ่เนื่องจากสายโซ่พอลิเมอร์ถูกสลายพันธะได้ง่าย ส่วนของอะโรมาติกพอลิเอสเทอร์นั้นได้มีการปรับปรุงโครงสร้างโดยนำไปผสมกับอะลิฟาติกพอลิเอสเทอร์ จนได้เป็นโคพอลิเมอร์ (aliphatic- aromatic copolyester) ซึ่งจะช่วยเพิ่มความสามารถในการย่อยสลายได้มากขึ้น พลาสติกที่ย่อยสลายได้ในกลุ่มของอะลิฟาติกพอลิเอสเทอร์ ประกอบด้วยพอลิเมอร์ 4 กลุ่ม ได้แก่ polyhydroxyalkanoate (PHA), polylactic acid (PLA), polybutylene succinate (PBS) และ polycaprolactone (PCL) (กรมวิทยาศาสตร์บริการ. 2553: Online)



ภาพประกอบ 1 แผนภาพแสดงประเภทและตัวอย่างพอลิเอสเตอร์ที่ประกอบด้วยอะลิฟาติกและอะโรมาติก

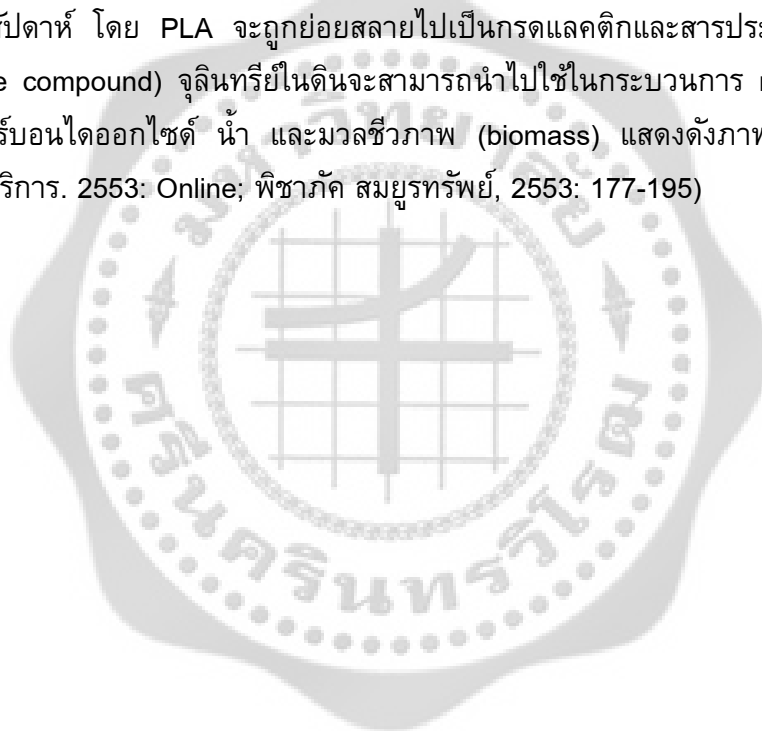
PHA - polyhydroxyalkanoates	PHB - polyhydroxybutyrate,
PHH – polyhydroxyhexanoate	PH - polyhydroxyvalerate
PLA - polylactic acid	PCL - polycaprolactone
PBS – polybutylene succinate	PBSA – polybutylene succinate adipate
PET - polyethylene terephthalate	AAC - Aliphatic-Aromatic copolyesters

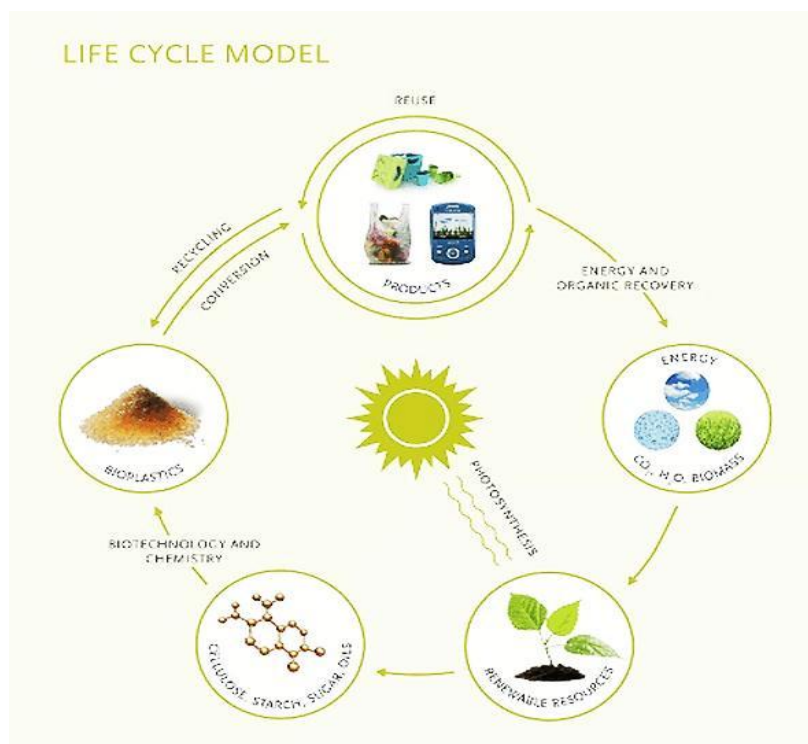
ที่มา: สำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติ (NIA)

<http://www.nia.or.th/bioplastics/introduction.php>

Polyactic acid หรือ **PLA** เป็นพอลิเมอร์ที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบหลักในการผลิต ซึ่งแป้งถือเป็นวัตถุดิบจากทรัพยากรธรรมชาติที่สามารถเกิดขึ้นใหม่ได้ (renewable resource) เช่น ข้าวโพด และมันสำปะหลัง ซึ่งเป็นพืชที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบหลัก กระบวนการผลิต PLA เริ่มจากการบดหรือม่พืชให้ละเอียดจนเป็นแป้ง จากนั้นทำการย่อยแป้งให้ได้น้ำตาลแล้วนำไปหมัก (fermentation) ด้วยจุลินทรีย์ เช่น เชื้อ *Lactobacillus brevis* จนเกิดเป็นกรดแลกติก (lactic acid) โมเลกุลเดี่ยวซึ่งจะถูกนำมาใช้เป็นมอนอเมอร์ (monomer) ในขั้นตอนการสังเคราะห์พอลิเมอร์ต่อไป การสังเคราะห์พอลิเมอร์แบ่งได้เป็น 2 กระบวนการ ได้แก่ กระบวนการควบแน่น (polycondensation) และกระบวนการเปิดวง (ring-opening polymerization) พอลิเมอร์ที่ได้จากทั้งสองกระบวนการนั้นมีโครงสร้างและคุณสมบัติเหมือนกันทุกประการ เนื่องจากกระบวนการสังเคราะห์ที่แตกต่างกันทำให้ผลิตภัณฑ์พอลิเมอร์ที่ได้จากทั้ง 2 กระบวนการนั้นมีชื่อแตกต่างกัน คือ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จาก

กระบวนการควบแน่น เรียกว่า พอลิแลคติกแอซิด (polylactic acid) เนื่องจากกระบวนการนี้มีการใช้กรดแลคติกในการสังเคราะห์พอลิเมอร์โดยตรง ในส่วนของกระบวนการเปิดวงนั้นมีการเปลี่ยนกรดแลคติกโดยใช้ปฏิกิริยาการรวมตัวของกรดแลคติก 2 โมเลกุล ได้สารประกอบที่มีชื่อว่า แลคไทด์ (lactide) จากนั้นจึงนำวงแหวนแลคไทด์มาสังเคราะห์จนได้เป็นสายพอลิเมอร์ ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ชื่อว่า พอลิแลคไทด์ (polylactide) โดยความยาวของสายพอลิเมอร์นั้นเป็นตัวกำหนดให้ PLA มีคุณสมบัติเปลี่ยนไปตามลักษณะการใช้งาน ซึ่ง PLA สามารถนำไปเป็นวัตถุดิบในการผลิตพลาสติกได้เช่นเดียวกับเม็ดพลาสติกจากอุตสาหกรรมปิโตรเลียมที่มีคุณสมบัติเป็นเทอร์โมพลาสติก (thermoplastic) PLA สามารถกักเก็บกลิ่นและรสชาติได้ดี รวมถึงคุณสมบัติพิเศษที่เกิดจากการใช้สารเติมแต่ง เช่น มีความใส และความวาวสูง PLA จะไม่เกิดสามารถย่อยสลายในสภาพแวดล้อมทั่วไป แต่สามารถย่อยสลายได้เองเมื่อนำไปฝังกลบในดินที่มีตั้งแต่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสขึ้นไปเป็นเวลามากกว่า 2 สัปดาห์ โดย PLA จะถูกย่อยสลายไปเป็นกรดแลคติกและสารประกอบที่ละลายน้ำได้ (water-soluble compound) จุลินทรีย์ในดินจะสามารถนำไปใช้ในกระบวนการ metabolism จนได้เป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และมวลชีวภาพ (biomass) แสดงดังภาพประกอบ 2 (กรมวิทยาศาสตร์บริการ. 2553: Online; พิชากัด สมยูรทรัพย์, 2553: 177-195)





ภาพประกอบ 2 วัฏจักรของการย่อยสลายของพลาสติกชีวภาพ

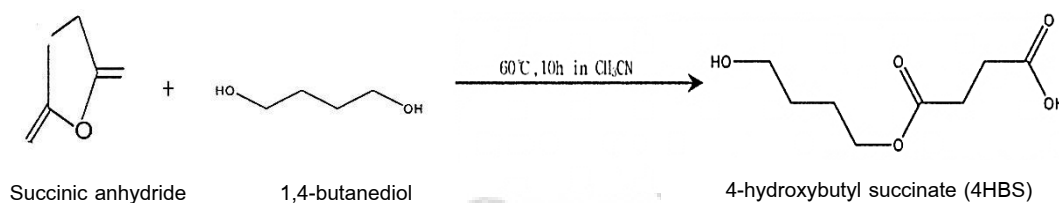
ที่มา: European Bioplastics. 2011

<http://en.european-bioplastics.org/environment/lcelca/>

Polycaprolactone หรือ **PCL** สังเคราะห์ได้จากกระบวนการ polymerization ของ ϵ -caprolactone (6-hexanolide) ซึ่งเป็นพลาสติกชีวภาพสังเคราะห์ที่สามารถย่อยสลายได้โดยอาศัยจุลินทรีย์ในกลุ่ม aerobe และ anaerobe ที่พบในสิ่งแวดล้อม โดย PCL นั้นมีข้อจำกัดในการนำมาขึ้นรูป จึงได้มีการพัฒนาโดยการนำ PCL ไปผสมกับ thermoplastic starch (TPS) เพื่อผลิตเป็นวัสดุต่างๆ เช่น ถุงใส่ขยะ (พิชาภักดิ์ สมยูรทรัพย์, 2553: 177-195, Tokiwa; et al. 2009: 3722-3742)

Polybutylene succinate หรือ **PBS** เป็นอะลิฟาติกพอลิเอสเตอร์ที่สามารถย่อยสลายทางชีวภาพได้ การสังเคราะห์โดยใช้ succinic acid และ 1,4-butanediol เป็นมอนอเมอร์ทั้งสองชนิดสามารถผลิตได้จากวัตถุดิบที่มาจากทรัพยากรธรรมชาติที่เกิดขึ้นใหม่ได้ เช่น แป้ง โดย succinic acid เกิดจากกระบวนการหมักทางชีวภาพของแป้ง โดย succinic acid จะถูกเปลี่ยนเป็น maleic hydride ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของ 1,4-butanediol เมื่อเกิดการรวมตัวกันของมอนอเมอร์ ทั้งสองจะได้

4-hydroxybutyl succinate (4HBS) เป็นโพลิโกเมอร์ (oligomer) ดังแสดงในภาพประกอบ 3 และถูกเชื่อมต่อกันจนเป็นสายโซ่ยาวของ PBS โดยอาศัยปฏิกิริยาการควบแน่น (Lee; Kimura; & Chung. 2008: 651-658) PBS สามารถนำมาใช้แทนพลาสติกสังเคราะห์หลายชนิดรวมถึง PLA ได้ ดังนั้น PBS จึงถูกนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น ผลิตภัณฑ์ที่ใช้ครั้งเดียวแล้วทิ้ง ผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในการบรรจุอาหาร ผลิตภัณฑ์อเนกประสงค์ หลอดฉีดยา ในด้านการเกษตรนำมาใช้เป็น กระจกต้นไม้ ฟิล์มคลุมดินสำหรับการเกษตร รวมถึงสามารถผลิตเป็นส่วนประกอบของชิ้นส่วนตกแต่งภายในรถยนต์ (กรมวิทยาศาสตร์บริการ. 2553: Online)

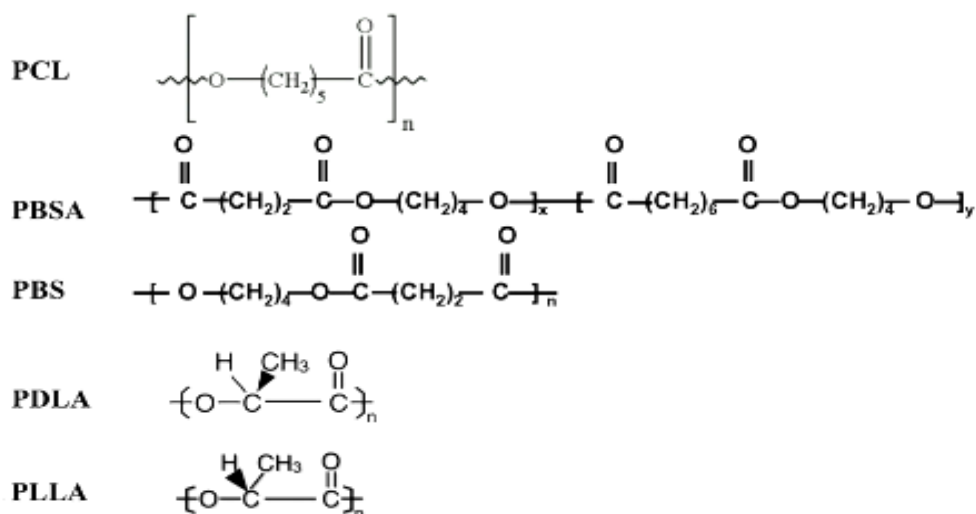


ภาพประกอบ 3 การสังเคราะห์ 4-hydroxybutyl succinate (4HBS)

ที่มา: Lee; Kimura; & Chung.(2008). Mechanism of enzymatic degradation of poly (butylene succinate). *Macromolecular Research* (16):p. 654.

Polybutylene succinate-co- adipate หรือ **PBSA** สังเคราะห์ขึ้นจากการผสมระหว่าง PBS และ adipate copolymer หรือเกิดจากกระบวนการ polymerization ของ butylene glycol, succinic acid และ adipic acid สายพอลิเมอร์ของ PBSA นั้นประกอบด้วย butylene succinate และ butylene adipate ซึ่ง PBSA มีคุณสมบัติทางกายภาพที่ดี และมีต้นทุนในการผลิตต่ำกว่าพอลิเอสเตอร์ชนิดอื่นๆ โดยสามารถนำมาผลิตเป็นบรรจุภัณฑ์วัสดุทางการเกษตรและทางอิเล็กทรอนิกส์ได้ (Lee; & Kim. 2010: 184-190; พิชากัด สมบูรณ์ทรัพย์, 2553: 177-195)

ภาพประกอบ 4 แสดงพลาสติกชีวภาพที่ย่อยสลายได้ ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มของอะลิฟาติกพอลิเอสเตอร์ที่ประกอบด้วยพอลิเมอร์ 4 กลุ่ม ได้แก่ PLA (PDLA, PLLA), PBSA, PBS และ PCL

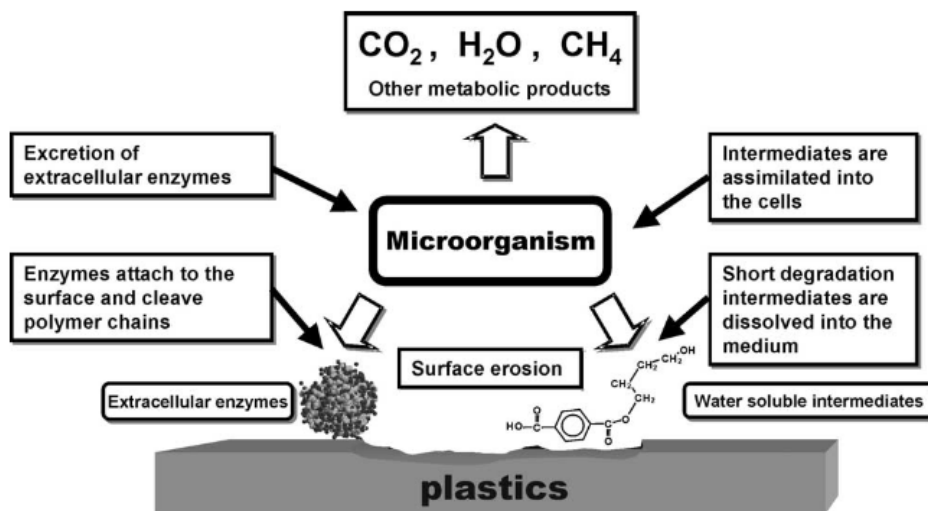


ภาพประกอบ 4 โครงสร้างพลาสติกชีวภาพในกลุ่มของอะลิฟาติกพอลิเอสเทอร์

ที่มา: Thumarat; et al. (2012). Biochemical and genetic analysis of a cutinase-type polyesterase from a thermophilic *Thermobifida alba* AHK119. *Applied Microbiology and Biotechnology* (95):p. 423.

เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ

การย่อยสลายของพลาสติกชีวภาพเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้น การย่อยสลายนั้นแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนแรกเกิดขึ้นบริเวณภายนอกเซลล์ เนื่องจากพอลิเมอร์มีขนาดใหญ่และไม่ละลายน้ำ ทำให้การย่อยสลายในช่วงแรกเกิดจากการที่จุลินทรีย์ได้ปลดปล่อยเอนไซม์ออกนอกเซลล์ เอนไซม์จะเข้ายึดเกาะกับผิวของพอลิเมอร์ได้โดยอาศัยแรงที่เกิดขึ้นระหว่างบริเวณ active site ของเอนไซม์กับพื้นผิวของพอลิเมอร์ เช่น การเกิด hydrophobic interaction การเกิดพันธะเอสเทอร์ พันธะไกลโคซิดิก และพันธะเปปไทด์ ดังแสดงในภาพประกอบ 5 (Jaeger; et al. 1994: 29-63, Tserki; et al. 2006a: 367-376, Tserki; et al. 2006b: 377-384) เอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์นั้นมี 2 ประเภท คือ endo-enzyme เป็นเอนไซม์ที่ทำให้เกิดการแตกตัวของพันธะภายในสายพอลิเมอร์อย่างไม่เป็นระเบียบ และ exo-enzyme เป็นเอนไซม์ที่ทำให้เกิดการแตกหักของพันธะอย่างเป็นระเบียบจากบริเวณปลายของสายพอลิเมอร์ เมื่อพอลิเมอร์แตกตัวจนมีขนาดเล็กพอที่จะแพร่ผ่านผนังเซลล์เข้าสู่เซลล์นั้นจะทำให้เกิดการย่อยสลายต่อในขั้นตอนที่ 2 ซึ่งได้ผลิตภัณฑ์ในขั้นตอนนี้สุดท้าย (ultimate biodegradation) เป็น พลังงาน ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ก๊าซมีเทน น้ำ เกลือ แร่ธาตุต่างๆ และมวลชีวภาพ (National Metal and Materials Technology Center (MTEC). 2007: Online)

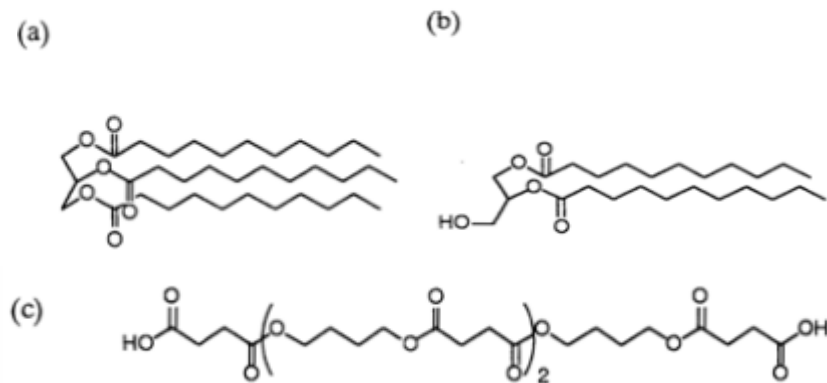


ภาพประกอบ 5 กระบวนการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพของจุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์ปล่อยเอนไซม์ออกนอกเซลล์ทำให้ได้ผลผลิตเป็นมอนอเมอร์และไดเมอร์ (dimers) ซึ่งสามารถส่งผ่านเข้าผนังเซลล์ได้

ที่มา: Marten; Muller; & Deckwer. (2003). Studies on the enzymatic hydrolysis of polyesters I. Low molecular mass model esters and aliphatic polyesters. *Polymer Degradation and Stability* (80):p. 486.

กระบวนการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพในสิ่งแวดล้อมเกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้น เอนไซม์ที่มีการศึกษาวิจัยและพบว่ามีบทบาทในกระบวนการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพนั้นมี 3 ชนิด ได้แก่

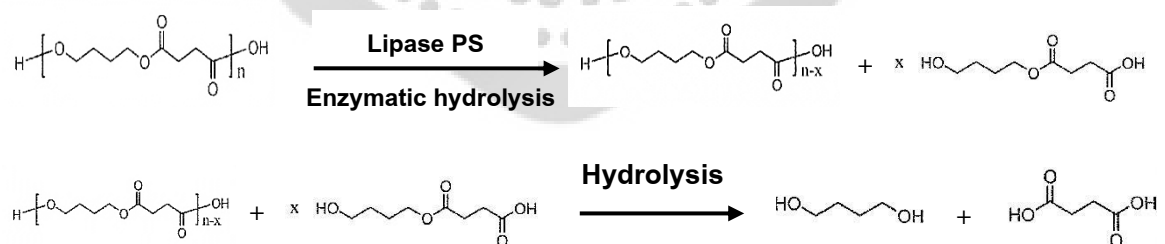
1. เอนไซม์ไลเปส (lipase) เป็นเอนไซม์ที่สามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยา hydrolysis บริเวณพันธะเอสเทอร์ของโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) ที่มีสายคาร์บอนยาวกว่า 10 อะตอม ได้ผลผลิตเป็น มอนอกลิเซอไรด์ (monoglyceride) ไดกลีเซอไรด์ (diglyceride) และกรดไขมันอิสระ (free fatty acid) เอนไซม์ไลเปสสามารถย่อยสลายพอลิเมอร์ประเภท อะลิฟาติกพอลิเอสเทอร์ เช่น เอนไซม์ไลเปส จากเชื้อ *Pseudomonas cepacia* ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม subfamily *Pseudomonas lipase* เอนไซม์นี้สามารถย่อยสลาย PBS และ polybutylene succinate-co-lactate (PBSL) (Taniguchi; et al. 2002: 447-455) นอกจากนี้ยังมีรายงานที่ศึกษาการย่อยสลาย PBS โดยใช้เอนไซม์ไลเปสทางการค้า (lipase PS[®]) พบว่าสามารถย่อยสลาย PBS ได้ เนื่องจาก PBS มีโครงสร้างทางเคมีคล้ายกับ ไดกลีเซอไรด์และไตรกลีเซอไรด์ ดังแสดงในภาพประกอบ 6



ภาพประกอบ 6 โครงสร้างของ (a) tridecanoyl-glyceride, (b) didecanoyl-glyceride และ (c) PBS

ที่มา:Lee; Kimura; & Chung.(2008). Mechanism of enzymatic degradation of poly(butylene succinate). *Macromolecular Research* (16):p. 655.

เนื่องจากส่วน succinate unit ที่บริเวณปลายพอลิเมอร์ มีลักษณะคล้ายกับโมเลกุลของกลีเซอรอลและโครงสร้างของ 4-hydroxybutyl succinate (4HBS) ที่เป็นโพลิโกลิเมอร์มีสายคาร์บอนยาวคล้ายกับสายของกรดไขมัน (fatty acid) จึงทำให้บริเวณ active site ของเอนไซม์ไลเปสเข้าจับกับ PBS โดยอาศัย hydrophobic interaction และเกิดการย่อยสลายของ PBS ได้ จากงานวิจัยส่วนใหญ่พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมนั้นสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส ย่อยสลาย PBS ได้ ดังแสดงในภาพประกอบ 7 (Lee; Kimura; & Chung. 2008: 651-658)



ภาพประกอบ 7 การย่อยสลาย PBS ด้วยเอนไซม์ไลเปส

ที่มา:Lee; Kimura; & Chung.(2008). Mechanism of enzymatic degradation of poly(butylene succinate). *Macromolecular Research* (16):p. 654.

2. เอนไซม์เอสเทอเรส (esterase) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการ hydrolysis โดยการตัดพันธะเอสเทอร์ ของกรดไขมันที่มีสายคาร์บอนสั้นกว่า 10 อะตอม จากงานวิจัยพบว่าเชื้อจุลินทรีย์หลายสายพันธุ์สามารถสร้างเอนไซม์เอสเทอเรสที่ย่อยสลายพอลิเมอร์ประเภทอะลิฟาติกพอลิเอสเทอร์ ได้แก่ เชื้อ *Bacillus pumilus* สายพันธุ์ KT1012 ที่สามารถย่อยสลาย PCL, PBSA, และ polyethylene succinate (PESu) (Tezuka; et al. 2004: 115-121) มายูมิและคนอื่นๆ (Mayumi; et al. 2008: 743-750) ได้ทำการศึกษาเอนไซม์ชนิดใหม่ (novel enzyme) ที่ย่อยสลาย PLA จากสิ่งแวดล้อม โดยพบว่าเอนไซม์เอสเทอเรสชนิดใหม่ถูกจัดอยู่กลุ่มของ carboxylesterase (EC 3.1.1.1) และมีรายงานว่าเอนไซม์เอสเทอเรสของเชื้อ *Leptothrix* sp. สายพันธุ์ TB-71 สามารถย่อยสลาย PBSA (Nakajima-Kambe; et al. 2009a: 1901-1905) ในปี ค.ศ. 2010 เซาผิง ฮูและคนอื่นๆ (Xiaoping Hu; et al. 2010: 771-779) แยกเชื้อ *Thermobifida alba* สายพันธุ์ AHK119 ที่สามารถย่อยสลาย PBS, PBSA, PCL, PES และ PHB และเชื้อผลิตเอนไซม์เอสเทอเรส (Est119) ทร้อนที่สามารถย่อยพลาสติกชีวภาพทางการค้า (Ecoflex™) ได้เช่นกัน

3. เอนไซม์โปรติเอส (protease) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการ hydrolysis ในการตัดพันธะเปปไทด์ ของโปรตีน ในปี ค.ศ. 2005 ลิม รากุและโทคิวะ (Lim; Raku; & Tokiwa. 2005: 459-464) ศึกษาการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพโดยใช้เอนไซม์ α -chymotrypsin ทางการค้า เปรียบเทียบกับเอนไซม์ในกลุ่ม serine protease ชนิดอื่นๆ คือ trypsin, elastase, proteinase K และ subtilisin ในการย่อยสลาย PLA, PBS, PBSA, PHB, PCL, PBS/C และ PES พบว่าเอนไซม์ทั้งหมดสามารถย่อยสลาย PLA ได้ ส่วนเอนไซม์ α -chymotrypsin สามารถย่อยสลาย PLA และ PBSA ซึ่งเอนไซม์ α -chymotrypsin ถูกสร้างขึ้นจากตับอ่อนของมนุษย์ และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ทำให้เอนไซม์ย่อยสลาย biomedical material ที่มีส่วนประกอบเป็นพลาสติกชีวภาพได้ เช่น ไหมเย็บแผล และแคปซูลยา เป็นต้น และยังพบว่าเอนไซม์สามารถย่อยพลาสติกชีวภาพได้เนื่องจากมีความจำเพาะต่อพันธะ α - ester ของ PLA

จุลินทรีย์ที่ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ

PLA

ในปี ค.ศ. 1997 พานามุดะ โทคิวะและทานากะ (Pranamuda; Tokiwa; & Tanaka. 1997: 1637 – 1640) แยกเชื้อจุลินทรีย์ *Amycolatopsis* sp. สายพันธุ์ HT32 ซึ่งเป็นเชื้อชนิดแรกที่จัดอยู่ในกลุ่มแอคติโนมัยสัทที่สามารถย่อยสลาย PLA ได้ และยังพบว่าเอนไซม์มีลักษณะคล้ายกับเอนไซม์โปรติเอส ในปี ค.ศ. 2001 นาคามูระและคนอื่นๆ (Nakamura; et al. 2001: 345-353)

คัดแยกเชื้อ *Amycolatopsis* sp. สายพันธุ์ K104-1 และ K104-2 ที่สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยสลาย PLA จากดิน ซึ่งเอนไซม์นี้มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกับเอนไซม์ fibrinolytic serine protease ต่อมาในปี ค.ศ. 2001 ซากิและคนอื่นๆ (Sakai; et al. 2001: 298-300) ได้รายงานว่ามีเอนไซม์ที่ย่อยสลาย PLA นั้นมีคุณสมบัติของเอนไซม์เอสเทอร์และเอนไซม์ไลเปส

ในปี ค.ศ. 2004 มีรายงานการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์หลายกลุ่มที่สามารถย่อยสลาย PLA ได้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เชื้อส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่มของ Family Pseudonocardiaceae และสกุลอื่นๆ ได้แก่ *Lentzae*, *Kibdelosporangium*, *Streptoalloteichus*, *Saccharothrix* และ *Amycolatopsis* (Tokiwa; & Jarerat. 2004: 771-777) ต่อมาในปี ค.ศ. 2008 มายูมิและคนอื่นๆ (Mayumi; et al. 2008: 743-750) ศึกษาเอนไซม์ poly(DL-lactic acid) depolymerase ชนิดใหม่จากสิ่งแวดลอม โดยนำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแผ่นฟิล์มที่ฝังอยู่ในดินคอมโพสท์มาทำการศึกษากับเทคนิค metagenomic library พบว่าเอนไซม์ PlaM4, PlaM7 และ PlaM9 ถูกจัดอยู่ในกลุ่มของเอนไซม์ carboxylesterase (EC 3.1.1.1) ซึ่งเอนไซม์สามารถย่อยสลายอะลิฟาติกพอลิเอสเทอร์ได้หลากหลาย เช่น tributyrin, *p*-nitrophenyl ester (C₂-C₁₈), PBS, PBSA, PCL, PHB, และ PLA ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส

PCL

ในช่วงปี ค.ศ.1970 มีการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลาย PCL จากดินคอมโพสท์ (Goldberg; D. 1995: 61-67) ในปี ค.ศ. 1998 ทาเซโกะและโทคิวะ (Tansengco; & Tokiwa. 1998: 133-138) ศึกษาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อย PCL ในดิน พบว่ามีปริมาณเชื้อ 3- 49 เปอร์เซ็นต์ (0.4-3.5 x10⁴CFU/น้ำหนักดิน 1 กรัม) ของจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดที่เจริญบนอาหารแข็ง PCL ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ในปี ค.ศ. 2003 ธีรภัทรพรชัยและคนอื่นๆ (Teeraphatpornchai; et al. 2003: 23-28) แยกเชื้อสายพันธุ์ TB-13 ที่คล้ายกับเชื้อ *Paenibacillus amylolyticus* สามารถย่อยสลาย PCL, PLA, PBS, PBSA และ poly(ethylene succinate) หรือ PES, PESu ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ต่อมาในปี ค.ศ. 2004 ชิซูกะและคนอื่นๆ (Tezuka; et al. 2004: 115-121) แยกเชื้อ *Bacillus pumillus* สายพันธุ์ KT1012 ที่สามารถสร้างเอนไซม์เอสเทอร์ ย่อยสลาย PCL, PBSA , PESu และ olive oil ได้ที่อุณหภูมิ 20- 50 องศาเซลเซียส ซึ่งเชื้อเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จัดเป็นเชื้อในกลุ่ม mesophile ในปี ค.ศ. 2009 สมบูรณ์ทรัพย์และศิริโชค (Somyoonsap; & Siripoke. 2009) แยกเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่ม ชอบร้อน (thermophilic) ที่มีความสามารถในการย่อยสลาย PCL จากดินบริเวณกองขยะในประเทศไทย การคัดแยกเชื้อใช้วิธีการเกิดวงใสบนอาหารแข็ง PCL ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และสามารถคัดแยกได้ทั้งหมด 11 ไอโซเลท โดย 7 ไอโซเลทคล้ายกับ *Brevibacillus thermoruber* อีก 2 ไอโซเลทคล้ายกับ *Brevibacillus brevis* และ 1 ไอโซเลทคล้ายกับ *Ureibacillus suwonensis* นอกจากนั้นยังคัดแยกเชื้อในกลุ่มแอกติโนมัยซีท์ได้ 1 ไอโซเลทคล้ายกับเชื้อ *Actinomadura keratinilytica*

PBS

ในปี ค.ศ. 2002 อุซิดะและคนอื่นๆ (Uchida; et al. 2002: 245-247) ศึกษาเชื้อ *Acidovorax delafieldii* สายพันธุ์ BS-3 สามารถสร้างเอนไซม์ที่ย่อยสลาย PBS ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับเอนไซม์ไลเปส ของ *Streptomyces* sp. และ *Mollaxilla* sp. ในปี ค.ศ. 2005 มาเอตะและคนอื่นๆ (Maeda; et al. 2005: 778-788) ศึกษาเอนไซม์ที่ย่อยสลาย PBS จากเชื้อ *Aspergillus oryzae* ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับเอนไซม์คิวติเนส ต่อมาในปี ค.ศ. 2010 อาเบะและคนอื่นๆ (Abe; et al. 2010:138-143) แยกเชื้อจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพด้านการเกษตร โดยคัดแยกเชื้อรา *Fusarium solani* สายพันธุ์ WF-6 ที่ย่อยสลายฟิล์ม PBS (GS Pla[®]) จากดินในพื้นที่เกษตรกรรม และศึกษาเชื้อ *Stenotrophomonas maltophilia* ที่ไม่สามารถย่อยสลาย PBS ได้แต่นำมาเลี้ยงรวมกันสามารถช่วยส่งเสริมให้เชื้อราสายพันธุ์ WF-6 ย่อยสลายฟิล์ม PBS ได้ดีกว่าการใช้เชื้อราเพียงสายพันธุ์เดียว ในปี ค.ศ. 2011 อชิบาและคนอื่นๆ (Asheeba; et al. 2011: 1021-1029) คัดแยกเชื้อ *Bacillus subtilis* และเชื้อ *Pseudomonas fluorescens* ที่สามารถสร้างเอนไซม์ไลเปส จากดินในบริเวณต่างๆ ของเมือง Chennai ประเทศอินเดีย ซึ่งเอนไซม์สามารถย่อยสลายฟิล์ม PBS และเกิดบริเวณใสใต้บนอาหารแข็ง tributyrin เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ ลิ ฟาน และคนอื่นๆ (Li, Fan; et al. 2011: 2591-2596) ศึกษาการทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของเชื้อ *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ XH0501-a ที่เป็น wild type โดยการใช้ UV และ LiCl เพื่อช่วยให้เอนไซม์จากสายพันธุ์กลายมีการทำงานได้สูงกว่า wild type ถึง 38.89 เปอร์เซ็นต์ โดยเอนไซม์ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส pH 8.5

PBSA

ในปี ค.ศ 2000 อุซิดะและคนอื่นๆ (Uchida; et al. 2000: 25-29) แยกเชื้อ *Acidovorax delafieldii* สายพันธุ์ BS-3 ซึ่งเป็นสายพันธุ์แรกที่สามารถย่อยสลายเม็ดพลาสติกของ PBSA และสามารถย่อย PBS ที่อยู่ในรูปของสารละลาย (emulsified) โดยเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสได้ดีเมื่อมีการกระตุ้นให้เกิดการสร้างเอนไซม์โดยการใช้ตัวกระตุ้นเป็น PBSA ในปี ค.ศ. 2005 ซ่าวและคนอื่นๆ (Zhao; et al. 2005: 2273-2278) แยกเชื้อ *Aspergillus vercolor* ที่สามารถย่อยสลายฟิล์ม PBSA ได้ประมาณ 91 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 25 วัน ในปี ค.ศ. 2009 นาคาจิม่า คาเบะและคนอื่นๆ (Nakajima-Kambe; et al. 2009b: 1901-1905) แยกเชื้อ *Leptothrix* sp. สายพันธุ์ TB 71 ที่สามารถย่อยสลายฟิล์ม PBSA ความหนา 0.5 มิลลิเมตรได้อย่างสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เอนไซม์มีลักษณะการทำงานคล้ายเอนไซม์เอสเทอร์ส ต่อมาในปี ค.ศ. 2010 ลีและคิม (Lee; & Kim. 2010: 184 - 190) คัดแยกเชื้อที่ย่อยสลาย PBSA จากดินในพื้นที่การเกษตรและแอกทิเวตเต็ดสลัดจ์ (activated sludge) ซึ่งพบเชื้อ *Burkholderia cepacia* สายพันธุ์ PBSA -1 และเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ PBSA-2 ที่สามารถย่อยสลายฟิล์ม PBSA

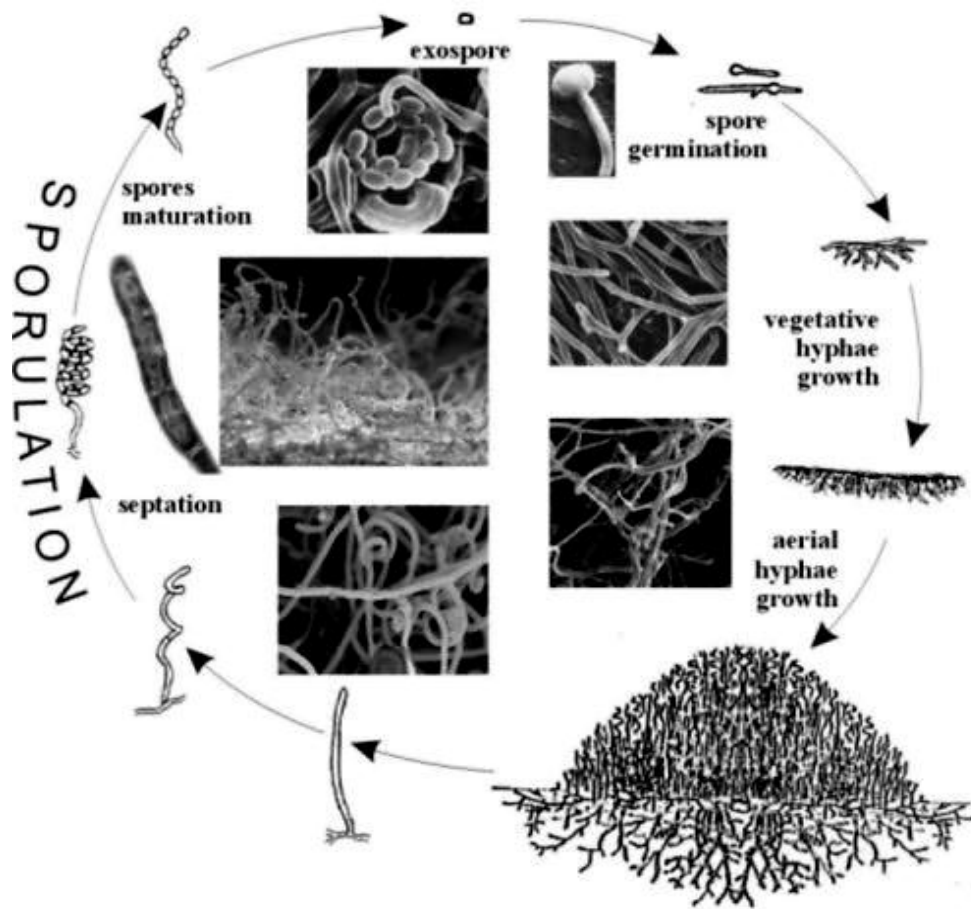
ความหนา 0.2 มิลลิเมตร ที่อุณหภูมิ 27 และ 37 องศาเซลเซียส ภายในเวลา 40 วัน และทำการศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PBSA (*lipA*) ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมการทำงานของเอนไซม์ไลเปส โดยมีลำดับกรดอะมิโนเป็น Gly-X₁-Ser-X₂-Gly ซึ่งเป็นลำดับกรดอะมิโนจำเพาะ (consensus motif) ที่พบได้ในลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ไลเปสและเอนไซม์เอสเทอเรส ของเชื้อสายพันธุ์ PBSA-1 และ PBSA-2 คล้ายกับเอนไซม์ไลเปสของเชื้อ *Pseudomonas lemoignei* สายพันธุ์ LMG2207 ประมาณ 24 เปอร์เซ็นต์ ต่อมาชาวผิง ฮูและคนอื่นๆ (Xiaoping ; et al. 2010:771-779) ศึกษาเชื้อทอร์ธ *Thermobifida alba* สายพันธุ์ AHK119 ที่ผลิตเอนไซม์เอสเทอเรส (Est119) ซึ่งพบว่าลำดับกรดอะมิโนคล้ายกับบริเวณกรดอะมิโนจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสและเอนไซม์เอสเทอเรส เอนไซม์ Est119 ทำงานได้ดีกับซบัสเตรทที่มีสายคาร์บอนสั้นและ สามารถย่อยสลายอะลิฟาติกอะโรมาติกโคพอลิเอสเทอร์ (aliphatic-aromatic copolyesters) ทางการค้า (Ecoflex™), PCL และ PBSA ได้ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

การกระจายตัวของแอกติโนมัยสีทในดิน

เชื้อแอกติโนมัยสีทส่วนใหญ่พบได้ในชั้นดินที่อยู่ลึกจากผิวดินประมาณ 10 เซนติเมตร หรือไม่เกิน 1 เมตร สามารถพบได้ในน้ำ ปุ๋ยหมัก หรือบริเวณรากพืช (Alexander. 1997; Hayakawa; Ishizawa; & Nonumura. 1988: 367-373; Khan & Williams. 1975: 345-348) โดยปกติจะพบเชื้อแอกติโนมัยสีทในดินประมาณ 10⁵-10⁸ เซลล์ต่อดิน 1 กรัม ปริมาณและชนิดของเชื้อที่พบขึ้นอยู่กับชนิด ลักษณะ ค่า pH คุณสมบัติทางกายภาพ และปริมาณอินทรีย์วัตถุในดิน ดินที่มีลักษณะแห้งและมีสภาพเป็นด่างจะพบเชื้อแอกติโนมัยสีทมากที่สุดถึง 95 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด ดินที่มีลักษณะเปียกชื้นและมีสภาพเป็นกรดจะพบเชื้อแอกติโนมัยสีทประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ ของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด (Alexander, 1997) การกระจายตัวของแอกติโนมัยสีทหายาก (rare actinomycete) นั้นขึ้นอยู่กับชนิดของดิน ค่า pH ลักษณะของกรดฮิวมิก (humic acid) และปริมาณฮิวมัส (humus) ที่พบในดิน โดยดินที่ใช้เพาะปลูกจะพบปริมาณฮิวมัสสูง และมีค่า pH ประมาณ 6.5-7.0 ซึ่งดินลักษณะนี้จะพบปริมาณเชื้อมากที่สุด ส่วนดินที่มีปริมาณฮิวมัสสูงแต่มีสภาพเป็นกรด (pH 5.0-6.5) พบเชื้อแอกติโนมัยสีทหายากสกุล *Microbispora* และ *Streptosporangium* มากที่สุด ส่วนดินที่เป็นด่างและมีปริมาณฮิวมัสต่ำจะพบเชื้อในสกุล *Saccharomonospora* (Hayakawa; et al. 1988: 367-373) เชื้อแอกติโนมัยสีทส่วนใหญ่เป็นพวก mesophile อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ที่ 25 – 30 องศาเซลเซียส แต่สามารถพบเชื้อนี้ที่เจริญได้ที่อุณหภูมิ 50 – 65 องศาเซลเซียส ได้ในดินกองปุ๋ยหมัก และปุ๋ยคอก (Cross. 1968: 36-53) นอกจากนี้ยังพบว่า ดินในป่ามีความหลากหลายของเชื้อแอกติโนมัยสีทมากกว่าดินที่ใช้ในการทำการเกษตรและเมื่อความอุดมสมบูรณ์ลดลงปริมาณแอกติโนมัยสีทจะมีปริมาณลดลงตามไปด้วย (Xu; Li; & Jiang. 1996: 244-248)

ลักษณะโดยทั่วไปของเชื้อแอสโคไมซีต

เชื้อในกลุ่มแอสโคไมซีตจัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่หลากหลาย ตั้งแต่ลักษณะเป็นก้อน ทรงกลม มีลักษณะเป็นเส้นสายคล้ายเชื้อรา เชื้อในกลุ่มนี้มีการสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศเกิดจากการแตกหักของเส้นใย (fragmentation) หรือการสร้างสปอร์บนเส้นใยชูขึ้นมาในอากาศ (aerial mycelium) ซึ่งเป็นลักษณะที่พบในแอสโคไมซีต สปอร์ที่สร้างขึ้นมีทั้งลักษณะสปอร์แบบไม่มีถุงหุ้มซึ่งเกิดขึ้นบริเวณปลายเส้นใย (conidia) อาจพบเป็นเม็ดเดี่ยวๆหรือเรียงตัวต่อกันเป็นสายยาว และแบบที่สร้างสปอร์อยู่ในอับสปอร์ (sporangium) ดังแสดงในภาพประกอบ 8 เชื้อในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่เป็นผู้ย่อยสลาย (saprophyte) ที่สามารถย่อยสลายสารอินทรีย์ได้ เช่น แป้ง (starch) เซลลูโลส (cellulose) เคอราติน (keratin) และไคติน (chitin) (McCarthy; & Williams, 1992: 189-192; Holmalahti; Wright; & Raatikainen. 1994: 1544-1546) แอสโคไมซีตเมื่อเจริญบนอาหารแข็งสามารถสร้างเส้นใยเจริญลงไปใต้ผิวหน้าอาหาร (substrate mycelium) โดยเกิดขึ้นในการเจริญระยะแรก ซึ่งโคโลนีมีผิวเรียบ และต่อมาสร้างเส้นใยชูขึ้นมาในอากาศทำให้โคโลนีที่เกิดขึ้นนั้นมีลักษณะเป็นกลุ่มก้อนคล้ายกำมะหยี่ (velvet) หรือเป็นผงฝุ่นคล้ายแป้ง (powdery) ลักษณะโคโลนีมีอยู่หลายแบบ เช่น ลักษณะคล้ายไลเคน (lichenoid) คล้ายเนยเหลว (butterous) แบบแผ่กระจาย (discrete) หรือแข็งคล้ายแผ่นหนัง (leathery) ผิวโคโลนีมีลักษณะเรียบหรือขรุขระ สีของโคโลนีนั้นขึ้นอยู่กับสีของสปอร์ที่เกิดขึ้น เช่น ขาว เทา เหลือง ส้ม เขียว แดง ม่วง และน้ำเงิน ส่วนเส้นใยด้านล่างอาหารมักมีสีน้ำตาลเป็นส่วนใหญ่ แต่อาจพบว่ามีสีเหมือนกับสปอร์ได้



ภาพประกอบ 8 วงชีวิตของแอสเพอริลโลนัม

ที่มา: Institute of Immunology and Experimental Therapy. Laboratory of Molecular Biology of Microorganisms. From <http://www2.iitd.pan.wroc.pl/dept/mic/gb/projects.html>

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของเชื้อแอสเพอริลโลนัม โดยดูจาก DAP และกรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ รวมทั้งชนิดของน้ำตาลภายในเซลล์ ทำให้สามารถจำแนกชนิดขององค์ประกอบของผนังเซลล์ได้เป็น 4 ลักษณะดังแสดงในภาพประกอบ 9

Type	Cell wall type		Whole cell sugar pattern	
	Major wall amino acid	Distinguishing major constituents	Type	Diagnostic sugar
I	LL-DAP	Glycine	-	-
II	<i>meso</i> -DAP	Glycine	D	Xylose, Arabinose
III	<i>meso</i> -DAP or	None	B	Madurose
	OH-DAP		C	None
IV	<i>meso</i> -DAP	Arabinose, Galactose	A	Arabinose, Galactose

ภาพประกอบ 9 องค์ประกอบของผนังเซลล์ และชนิดของน้ำตาลภายในเซลล์ของเชื้อแอคติโนมัยซีท

ที่มา: Williams.(1989). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. (Vol.4)

การจัดจำแนกประเภทของเชื้อแอคติโนมัยซีท (Classification of Actinomycetes)

เชื้อแอคติโนมัยซีทถูกจัดจำแนกออกเป็นกลุ่มโดย Bergey's Manual of Systematic Bacteriology เล่มที่ 4 (Williams R.H. 1989) ซึ่งใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลักษณะองค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ โดยแบ่งออกเป็น 8 กลุ่มดังนี้ Nocardioforms, Multilocularsporangia, Actinoplanetes, Streptomycetes, Maduromycete, Thermomonospora, Thermoactinomycetes และสกุลที่เกี่ยวข้อง

ต่อมาในปี ค.ศ. 1997 ได้มีการจัดกลุ่มเชื้อแอคติโนมัยซีทขึ้นใหม่ โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและองค์ประกอบของผนังเซลล์ ตามวิธีการของ The Atlas of Actinomycetes (Shinji, 1997.) ซึ่งสามารถแบ่งเชื้อแอคติโนมัยซีทออกเป็น 8 กลุ่ม ดังนี้

1. *Micrococcus*, *Microbacterium* และสกุลที่เกี่ยวข้อง

เชื้อแอคติโนมัยซีทกลุ่มนี้จัดเป็นเชื้อที่มีความสำคัญทางอุตสาหกรรม บางสปีชีส์ (species) นั้นเป็นเชื้อก่อโรคที่พบในคน สัตว์และพืช เชื้อกลุ่มนี้ไม่สามารถสร้างสปอร์ในรูปกลมและรูปแท่งได้ เป็นพวก aerobic สามารถใช้ลักษณะของ DAP บนผนังเซลล์ในการจำแนกได้ เชื้อกลุ่มนี้มีทั้งหมด 8 สกุล คือ *Arthrobacter*, *Promicromonospora*, *Oerskovia*, *Dermatophilus*, *Aureo-*

bacterium, *Curtobacterium*, *Argomyces* และ *Nocardoides* การจัดกลุ่มโดยการศึกษาแผนภูมิทางวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) พบว่าสกุล *Nocardoides* จัดอยู่ในกลุ่มที่ 1 ซึ่งเป็นกลุ่มเดียวกับสกุล *Luteococcus*, *Microlunatus* เป็นต้น ซึ่งกลุ่มนี้ไม่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับกลุ่มที่ 1 กลุ่มอื่น

2. *Mycobacterium*, *Nocardia* และสกุลที่เกี่ยวข้อง

เชื้อกลุ่มนี้มีทั้งหมด 8 สกุลคือ *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Gordona*, *Dielzia*, *Rhodococcus*, *Tsukamurella* และ *Turicella* ซึ่งเชื้อในกลุ่มนี้มีความสำคัญทางอุตสาหกรรม และเป็นเชื้อก่อโรคที่พบในคน สัตว์เลี้ยงลูกนมและปลา เชื้อในกลุ่มนี้มีโครงสร้างผนังเซลล์ที่ซับซ้อน ลักษณะผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้พบ meso-A₂pm บน peptidoglycan พบ mycolic acid และ arabinogalactan ซึ่งเป็นลักษณะหนึ่งที่ใช้ในการจัดจำแนกเชื้อกลุ่มนี้ได้ เชื้อหลายสกุลมีผนังเซลล์เป็นแบบ glycolyl type

3. Family Pseudonocardiaceae และ สกุลที่เกี่ยวข้อง

เชื้อกลุ่มนี้มีทั้งหมด 6 สกุลคือ *Saccharopolyspora*, *Actinopolyspora*, *Amycolatopsis*, *Kibdelosporangium*, *Pseudonocardia* และ *Saccharomonospora* เชื้อกลุ่มนี้มี DAP บนผนังเซลล์เป็นแบบ meso-A₂pm มีน้ำตาลในเซลล์เป็นอะราบิโนสและกาแลคโทส ไม่พบ mycolic acid บนผนังเซลล์ menaquinone ส่วนใหญ่เป็นแบบ MK-9(H₄) ยกเว้นสกุล *Pseudocardia* ที่มีลักษณะเป็น MK-8(H₄) การจัดกลุ่มเชื้อโดยการใช้ลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ในการศึกษาแผนภูมิทางวิวัฒนาการ พบว่าเชื้อสกุล *Actinokineospora* และ *Saccharothrix* จัดอยู่ใน Family Pseudonocardiaceae

4. Family Micromonosporaceae

แอคติโนมัยซีทในกลุ่มนี้มี 3 สกุลคือ *Actinoplanes*, *Dactylosporangium* และ *Pilimelia* ลักษณะสำคัญของเชื้อในกลุ่มนี้คือ สามารถสร้างสปอร์ที่เคลื่อนที่ได้ โดยสปอร์จะอยู่ภายใน sporangium หรือ spore vesicle ที่พบบน substrate mycelium ผนังเซลล์เป็นแบบ glycolyl type พบน้ำตาลไซโลสและกรดอะมิโน L-lysine หรือ meso-A₂pm บนผนังเซลล์

5. Family Thermomonosporaceae

กลุ่มนี้ประกอบด้วยเชื้อทั้งหมด 4 สกุลคือ *Thermomonospora*, *Actinomadura*, *Spirillospora* และ *Actinocorallia* จากการศึกษาแผนภูมิทางวิวัฒนาการ ร่วมกับการศึกษาเคมีอนุกรมวิธาน (chemotaxonomy) พบว่าสกุล *Excelllospora viridilutea* และ *Excelllospora rubro-*

brunea ได้ถูกเปลี่ยนเป็น *Actinomadura viridilutea* และ *Actinomadura rubrobrunea* (Zhang; et al. 2001: 373-383; Greiner-Mei; et al. 1987:96-109) ผนังเซลล์ของสกุล *Thermomonospora* พบกรดอะมิโนแบบ meso-A₂pm ไม่พบน้ำตาลไซโลส อะราบิโนส และกาแลคโทส มี menaquinones เป็นแบบ MK-9(H₄), (H₆) และ MK-10(H₆), (H₈) ในสกุล *Thermomonospora* และ *Excellospora* จัดเป็นพวกชอบร้อน อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ที่ 45-55 องศาเซลเซียส

6. Family Streptosporangiaceae

เชื้อแอคติโนมัยซีทในกลุ่มนี้มีทั้งหมด 6 สกุลคือ *Microbispora*, *Microtetraspora*, *Planobispora*, *Planomonospora*, *Herbidospira* และมี *Streptosporangium* เป็นสกุลหลัก (type genus) ลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจำแนกคือลักษณะการสร้างหรือไม่สร้าง sporangia รวมถึงจำนวนสปอร์ที่พบบน sporophore และ sporangia ผนังเซลล์ของเชื้อในกลุ่มนี้จะพบ DAP แบบ meso-A₂pm มี menaquinones แบบ MK-9(H₂), MK-9(H₄) และ MK-9 เป็นหลัก ยกเว้นสกุล *Herbidospira* ที่มีลักษณะเป็น MK-10(H₄) พบน้ำตาลมาตูโรส เป็นน้ำตาลที่พบได้ในเชื้อสกุล *Actinomadura* โดยเชื้อสกุลนี้ไม่ได้จัดอยู่ใน Family Streptosporangiaceae การศึกษาลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ร่วมกับการศึกษา lipid composition จะทำให้แยกเชื้อกลุ่มนี้ออกจากสกุล *Actinomadura* ได้

7. Family Streptomycetaceae

เชื้อสกุล *Streptomyces* นั้นถูกจัดอยู่ใน Family Streptomycetaceae โดยเชื้อสกุลนี้เป็นกลุ่มที่มีการกระจายตัวในสิ่งแวดล้อม เช่น ทะเล แม่น้ำ อากาศ และพบมากที่สุดในดิน เชื้อบางสายพันธุ์เป็นเชื้อก่อโรคในคน สัตว์ และพืช สกุลนี้จะพบลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และลักษณะทางชีวเคมี (biochemical characteristic) ที่หลากหลาย ต่อมาพบเชื้ออีก 6 สกุล ได้แก่ *Kitasatoa*, *Chainia*, *Microellobosporia*, *Elyrosporangium*, *Actinosporangium* และ *Actinopycnidium* ได้ถูกจัดอยู่ในสกุลของ *Streptomyces* โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น ลักษณะโครงสร้างที่คล้ายกับ sporangium, sclerotia และ pyrenidia เป็นต้น รวมถึงการศึกษาลำดับเบสของบริเวณ 16S rDNA

ลักษณะของ aerial mycelium นั้นจะพบสปอร์ที่ต่อกันเป็นสายยาว มีเพียงบางสายพันธุ์เท่านั้นที่จะพบสปอร์สายสั้น และจะไม่พบการแตกหักของ substrate mycelium ลักษณะการเกิดสปอร์ (sporulation) ลักษณะของสายโซ่สปอร์และพื้นผิวของสปอร์นั้นสามารถนำมาใช้ในการจัดกลุ่ม และจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อในกลุ่มนี้ได้ ลักษณะของ peptidoglycan ของ *Streptomyces* ยกเว้นสกุล *Kitasatosporia* นั้นมีลักษณะ DAP เป็น LL-A₂pm จะพบ phosphatidylethanolamine และไม่พบ glucosamine ในส่วนของ phospholipid

8. สกุลอื่นๆ

เชื้อในกลุ่มนี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเคมีอนุกรมวิธานที่หลากหลาย เช่น เชื้อสกุล *Actinobispora* มีผนังเซลล์ประกอบด้วยกรดอะมิโนแบบ meso-A₂pm พบน้ำตาล อะราบีโนส กาแลคโทส และไซโลส มี menaquinones เป็นแบบ MK-7(H₂) และ MK-9(H₂) สกุล *Actinocorallia* กรดอะมิโนแบบ meso-A₂pm ไม่พบน้ำตาลที่จำเพาะบนผนังเซลล์ นอกจากนี้ยังพบเชื้อสกุลอื่นๆเช่น *Geodermatophilus*, *Nocardiosis*, *Kineosporia*, *Spirillospora*, *Sporichtha*, *Actinocorallia*, *Actinobispora*, *Glycomyces* และ *Frankia*

ลักษณะการจัดกลุ่มของแอกติโนมัยซีท โดยการวิเคราะห์ในส่วน small subunit ของ ribosome (16S rRNA) ร่วมกับลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ของเชื้อทั้งหมด 30 families และ 10 suborder ดังภาพประกอบ 10 การใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยานั้นช่วยในการแยก true bacteria ออกจากเชื้อแอกติโนมัยซีทได้ นอกจากนี้การนำลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ของเชื้อทั้งหมด 90 สกุล มาจัดกลุ่มด้วยการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ด้วยแผนภูมิทางวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) พบว่าสามารถแบ่งเชื้อได้เป็น 8 กลุ่ม ดังภาพประกอบ 11 (Yokata. 1997)

ภาพประกอบ 12 ได้แสดงการจัดกลุ่มแอกติโนมัยซีทในปัจจุบันซึ่งมีทั้งหมด 219 สกุลออกเป็น 48 families และ 13 suborder ได้แก่ *Corynebacterineae*, *Pseudonocardineae*, *Streptomycineae*, *Catenulisporineae*, *Micromonosporineae*, *Frankineae*, *Kineosporineae*, *Microccineae*, *Streptosporangineae*, *Propionibacterineae*, *Actinopolysporineae*, *Actinomycineae*, และ *Glycomycineae* (Zhi; et al. 2009;589-608)

Class Actinobacteria

Subclass Acidimicrobidae	Order Acidimicrobiales	Family Acidimicrobiaceae
Subclass Rubrobacteridae	Order Rubrobacterales	Family Rubrobacteraceae
Subclass Coriobacteridae	Order Coriobacteriales	Family Coriobacteriaceae
Subclass Sphaerobacteridae	Order Sphaerobacterales	Family Sphaerobacteraceae
Subclass Actinobacteridae	Order Actinomycetales	

Suborder	Suborder	Suborder	Suborder	Suborder
Actinomycineae	Micrococcineae	Corynebacterineae	Micromonosporineae	Propionibacterineae
Family	Families	Families	Families	Families
Actinomycetaceae	Micrococcaceae	Corynebacteriaceae	Micromonosporaceae	Propionibacteriaceae
	Brevibacteriaceae	Dieziaceae		Nocardioideaceae
	Cellulomonadaceae	Gordoniaceae		
	Dermatophilaceae	Mycobacteriaceae		
	Intrasporangiaceae	Nocardiaceae		
	Jonesiaceae	Tsukamurellaceae		
	Microbacteriaceae			
	Promicromonosporaceae			

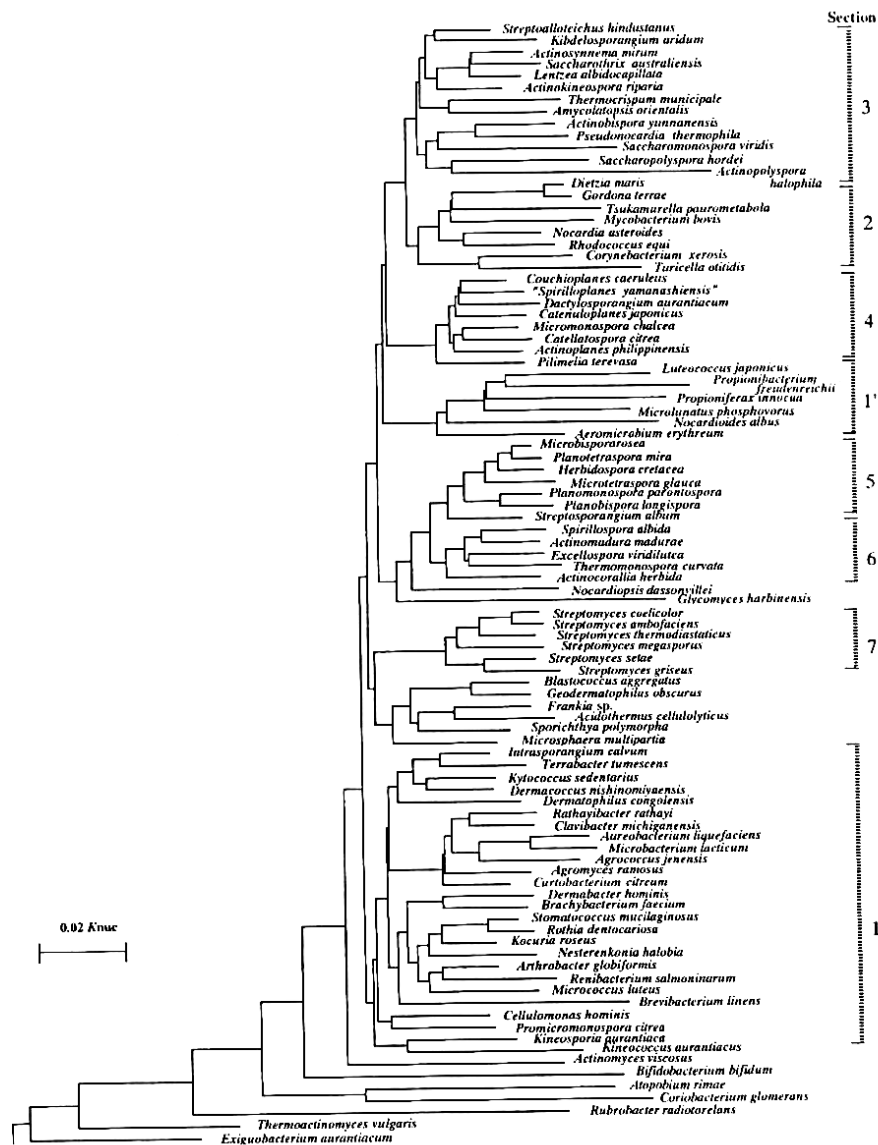
Suborder	Suborder	Suborder	Suborder	Suborder
Pseudonocardineae	Streptomycineae	Streptosporangineae	Frankineae	Glycomycineae
Family	Family	Family	Family	Family
Pseudonocardaceae	Streptomycetaceae	Streptosporangiaceae	Frankiaceae	Glycomycetaceae
		Nocardiopsaceae	Acidothermaceae	
		Thermomonosporaceae	Geodermatophilaceae	
			Microsphaeraceae	
			Sporichthyaceae	

Order Bifidobacteriales

Family Bifidobacteriaceae

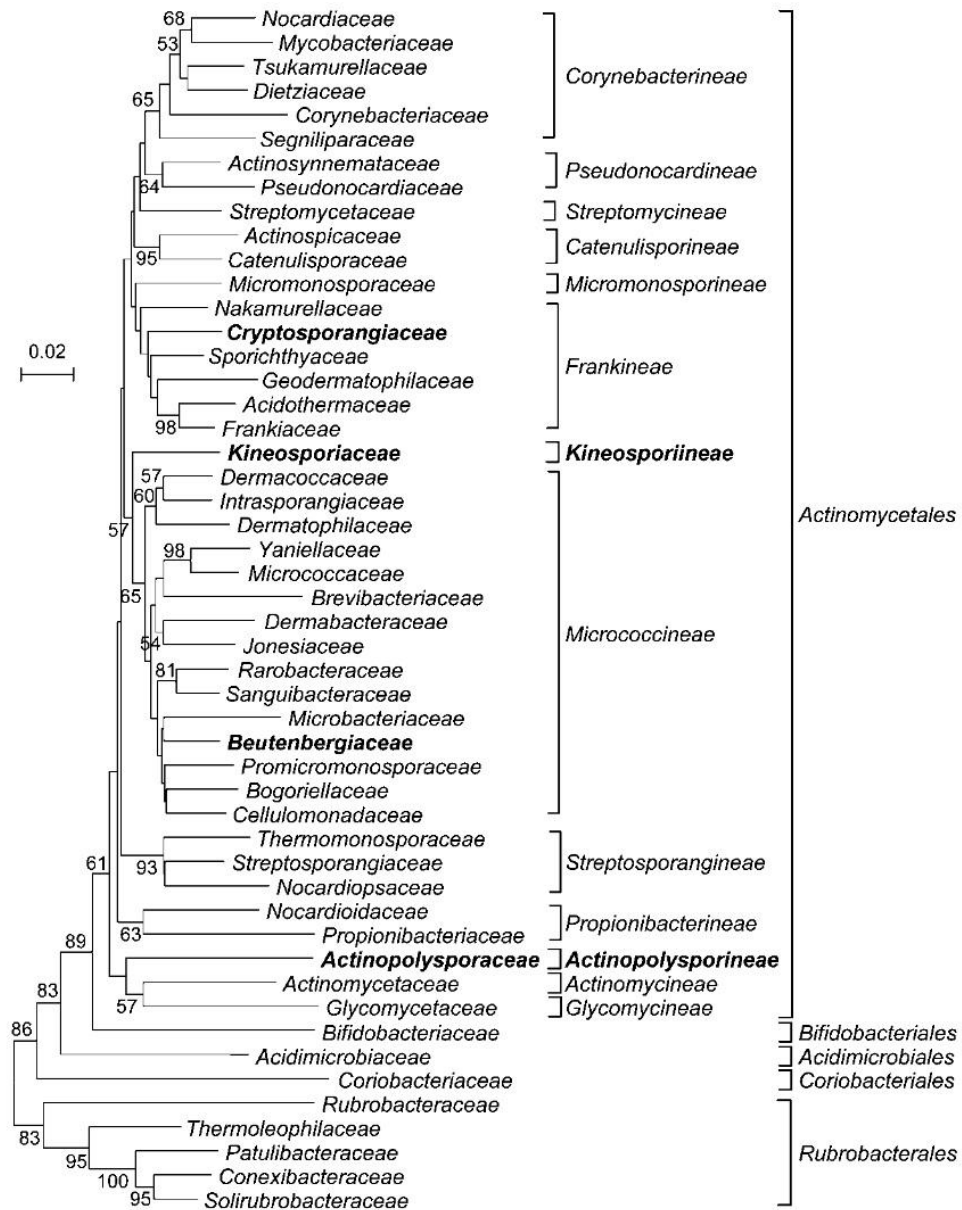
ภาพประกอบ 10 การจัดหมวดหมู่ของชั้น Actinobacteria ตามความสัมพันธ์ของบริเวณ 16S rDNA

ที่มา: Stackebrandt; Rainey; & Rainey. (1997). Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria classis nov.* *International Journal of Systematic Bacteriology* (47):p. 480.



ภาพประกอบ 11 การจัดกลุ่มของเชื้อแอกติโนมัยซีตามความสัมพันธ์ของลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ด้วยแผนภูมิทางวิวัฒนาการ วิธีของ neighbor-joining ซึ่งสามารถจัดกลุ่มแอกติโนมัยซีได้ทั้งหมด 7 กลุ่ม ดังนี้ 1. *Micrococcus*, *Microbacterium* และ สกุลที่เกี่ยวข้อง 2. *Mycobacterium*, *Nocardia* และสกุลที่เกี่ยวข้อง 3. Family Pseudonocardiaceae และสกุลที่เกี่ยวข้อง 4. Family Micromonosporaceae 5. Family Streptosporangiaceae, 6. Family Thermonosporaceae 7. Family Streptomycetaceae

ที่มา: Yokota. (1997). Phylogenetic relationship of actinomycetes. In M. Shinji. Atlas of actinomycetes. Japan: Asakura publishing.



ภาพประกอบ 12 แสดงการจัดกลุ่มของแอกติโนไมซีทโดยใช้ลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ในการศึกษาแผนภูมิทางวิวัฒนาการ สามารถจัดกลุ่มเชื้อได้ทั้งหมด 5 orders ดังนี้ *Actinomycetales*, *Bifidobacteriales*, *Acidimicrobiales* และ *Rubrobacterales*

ที่มา: Zhi; et al. Stackebrandt.(2009). An update of the structure and 16S rRNA gene sequence-based definition of higher ranks of the class Actinobacteria, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* .(59):p. 601.

อนุกรมวิธานของแอกติโนมัยสีท (Taxonomy of actinomycetes)

การจัดจำแนกเชื้อแอกติโนมัยสีทในระดับสกุล

การจัดจำแนกในระดับสกุลใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาในการจัดกลุ่มของแอกติโนมัยสีท เช่น ศึกษาลักษณะของเชื้อที่มีการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อโดยตรง ลักษณะของเส้นใยที่เจริญในอาหารซึ่งมีการสร้าง aerial mycelium หรือ substrate mycelium ลักษณะการเรียงตัวของสปอร์ รวมถึงการใช้องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์มาใช้ในการจัดจำแนก เช่น ชนิดของน้ำตาล, phospholipid, menaquinone และ ชนิดของ diaminopimelic acid (DAP) ในผนังเซลล์ เป็นต้น (Yamaguchi.1965: 445-453; Yamada. 1998)

1. ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นสิ่งสำคัญที่ใช้ในการจัดจำแนกเชื้อแอกติโนมัยสีท โดยอาศัยกล้องจุลทรรศน์เพื่อศึกษาลักษณะการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ต้องพิจารณาในการจำแนกเชื้อในระดับสกุล (Holt; et al. 1994) ได้แก่

1.1 เส้นใย (mycelium) แบ่งออกเป็น aerial mycelium และ substrate mycelium ซึ่งเชื้อแต่ละสายพันธุ์จะมีลักษณะการสร้างเส้นใยที่แตกต่างกัน โดยเชื้อสามารถสร้างเส้นใยแบบใดแบบหนึ่ง หรือสร้างทั้งสองแบบ มีเชื้อเพียงบางชนิดเท่านั้นที่พบการสร้างเฉพาะ aerial mycelium เส้นใยที่เกิดขึ้นอาจแข็งแรงหรือมีการแตกหักได้ บางชนิดเส้นใยที่แตกหักสามารถเคลื่อนที่ได้ บางชนิดเส้นใยมีลักษณะเป็น vesicle และไม่สร้างสปอร์

1.2 โคนีเดีย (conidia) คือสปอร์แบบไม่อาศัยเพศ ซึ่งแอกติโนมัยสีทนั้นสามารถสร้างโคนีเดียได้หลายแบบ ดังนี้

1.2.1 โคนีเดียเดี่ยว (single conidia) มีลักษณะเป็นสปอร์เดี่ยว พบได้ทั่วไปโดยเฉพาะในกลุ่มของ *Saccharomonospora*, *Thermonospora* และ *Micromonospora* เป็นต้น บางชนิดมี endospore ที่สามารถทนความร้อนได้ดี

1.2.2 โคนีเดียแบบคู่ (pairs of conidia) ลักษณะเรียงตัวตามยาวอยู่บน aerial mycelium เช่น *Planobispora* และ *Microbispora* เป็นต้น

1.2.3 โคนีเดียเรียงตัวเป็นสายสั้น (short chains of conidia) โคนีเดียในลักษณะนี้มีการเรียงตัวของจำนวนสปอร์ไม่เกิน 20 สปอร์ เชื้อที่สามารถสร้างสปอร์ในลักษณะนี้มีหลายชนิด บางชนิดสร้างสปอร์สายสั้นและมีถุงหุ้มล้อมรอบ ซึ่งอาจอยู่บน aerial mycelium หรือ substrate mycelium ได้

1.2.4 โคนีเดียเรียงตัวเป็นสายยาว (long chains of conidia) เชื้อที่สามารถสร้างสปอร์ในลักษณะนี้มีหลายชนิด บางชนิดโคนีเดียสามารถเคลื่อนที่ได้

1.3 อับสปอร์ เป็นถุงที่บรรจุสปอร์ไว้ภายใน อาจสร้างบน aerial mycelium หรือ substrate mycelium บางชนิดอาจสร้างอยู่ในเนื้อวุ้น

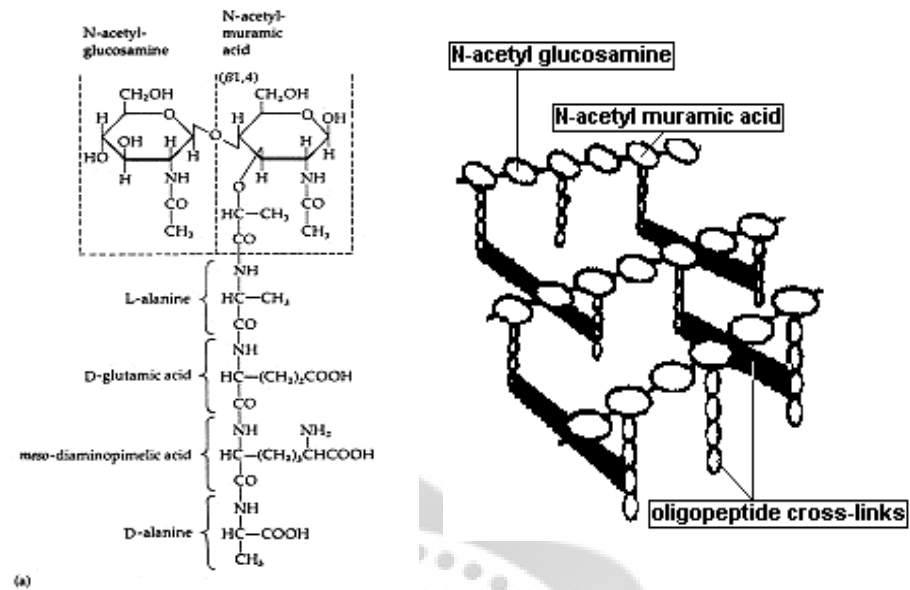
1.4 โครงสร้างอื่นๆ แอคติโนมัยสีทบางชนิดสามารถสร้างโครงสร้างที่มีลักษณะพิเศษ เช่น การสร้างกลุ่มสปอร์บริเวณแกนของเส้นใย การสร้างสปอร์ในลักษณะนี้เรียกว่า multilocular sporangia

แอคติโนมัยสีทหลายชนิดสร้างโครงสร้างที่มีลักษณะกลมบน aerial mycelium มีลักษณะเป็นเส้นใยม้วนบิดตัวเป็นวงกลมในสายสปอร์ โครงสร้างนี้อาจพบใน substrate mycelium โดยพบโครงสร้างมีรูปร่างที่ไม่แน่นอน เช่น sclerotia ที่เชื้อ *Streptomyces* บางชนิดสร้างขึ้น ซึ่งอาจไม่มีสปอร์อยู่ภายในแต่จะพบไขมันอยู่แทน

2. องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์

การจัดจำแนกในระดับสกุลโดยใช้องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์มาใช้ในการจัดจำแนกร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ที่นำมาพิจารณา เช่น

2.1 ชนิดของ 2,6-Diaminopimelic acid (DAP) เป็นกรดอะมิโนซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรียทุกชนิด ยกเว้น archaeobacteria และ mycoplasma แบคทีเรียทั่วไปมี peptidoglycan หรือ murein เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ ซึ่ง peptidoglycan ประกอบด้วย peptidoglycan monomer ที่เกิดจากการเชื่อมต่อกันของน้ำตาลอะมิโน (amino sugar) 2 ชนิด คือ *N*-acetylglucosamine (NAG) และ *N*-acetylmuramic acid (NAM) ที่เชื่อมอยู่กับกรดอะมิโน 4 ชนิด เช่น glycine, lysine, alanine กรดกลูตามิก และ DAP เป็นต้น แอคติโนมัยสีทส่วนใหญ่ผนังเซลล์มีการเชื่อมข้ามสายระหว่าง alanine กับ lysine หรือ DAP กับ alanine โดย peptidoglycan ของแอคติโนมัยสีทอาจพบ DAP ได้หลายแบบ เช่น meso-isomer, LL-isomer และ OH-isomer หรือไม่มีก็ได้ จึงสามารถนำชนิดของ DAP มาใช้จัดจำแนกระดับสกุลได้ ดังแสดงตามภาพประกอบ 13 (Lechevalier; & Gerber. 1971: 47-72)



ภาพประกอบ 13 โครงสร้างและการจัดเรียงตัวของชั้น peptidoglycan ที่ประกอบด้วย DAP บนผนังเซลล์ของแบคทีเรีย

ที่มา: Todar, K. 2012. Peptidoglycan. Cell wall of bacteria. Retrieved May 10, 2012, from <http://www.textbookofbacteriology.net>.

2.2 ผนังเซลล์ของแบคทีเรีนั้นประกอบด้วยน้ำตาลหลายชนิด เช่น น้ำตาลกลูโคส กาแลคโตส แรมโนส ไฮโลส อะราบีโนส แมนโนส โรโบส และมาตูโรส รูปแบบน้ำตาลนั้นสามารถแบ่งแอดติโนมัยสัทที่มี DAP แบบ *meso-isomer* ออกเป็น 4 ประเภท คือ Type A ที่มีน้ำตาลอะราบีโนสและกาแลคโทส แต่ไม่มีน้ำตาลไฮโลส แบบ Type B มีน้ำตาลมาตูโรส แต่ไม่มีน้ำตาลไฮโลสกับน้ำตาลอะราบีโนส แบบ Type C นั้นไม่สามารถระบุน้ำตาลที่เฉพาะได้และ Type D มีน้ำตาลอะราบีโนส และไฮโลสเป็นองค์ประกอบ ดังที่แสดงไว้ในภาพประกอบ 9 (Lechevalier; & Gerber. 1971: 47-72)

ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ

การศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพส่วนใหญ่นั้นพบว่ามีลักษณะคล้ายกับยีนของเอนไซม์ไลเปสเอสเทอร์เอสและโปรติเอส ซึ่งมีหลายงานวิจัยที่ได้ทำการศึกษา เช่น ในปี ค.ศ. 2002 อุชิตะและคนอื่นๆ (Uchida; et al. 2002: 245-247) ได้ศึกษายีนของเอนไซม์ PBS depolymerase (*pbsA*) ที่สามารถย่อยสลาย PBS และ PBSA จากเชื้อ *Acidovorax delafieldii* สายพันธุ์ BS-3 โดยใช้เทคนิคห้องสมุดจีโนม (genomic library) พบว่าเอนไซม์ *pbsA* มีลำดับเบสคล้ายกับเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Streptomyces* sp. และ *Mollaxwlla* sp. พบลำดับกรดอะมิโนจำเพาะ $^{172}\text{Gly-Trp-Ser-Met-Gly}^{176}$ คล้ายกับบริเวณ lipase box ของเอนไซม์ไลเปส ที่มีลำดับกรดอะมิโนเป็น $\text{Gly-X}_1\text{-Ser-X}_2\text{-Gly}$ ปี ค.ศ. 2003 อุกุชิ ชิเคโนะและคนอื่นๆ (Akutsu-Shigeno; et al. 2003: 2498-2504) ได้ใช้เทคนิคห้องสมุดจีโนมในการศึกษายีนของเอนไซม์ PLA depolymerase (*plaA*) จากเชื้อ *Paenibacillus amylolyticus* สายพันธุ์ TB-13 พบลำดับกรดอะมิโน $\text{Ala-X}_1\text{-Ser-X}_2\text{-Gly}$ ซึ่งเป็นลำดับกรดอะมิโนจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสที่พบในเชื้อสกุล *Bacillus* (*Bacillus* family I-4 lipase) โดยเอนไซม์ PlaA สามารถย่อยสลาย PLA, PBS, PBSA, PES, triglycerides, tributyrin และ triolein ได้ ต่อมาในปี ค.ศ. 2005 มะสึตะและคนอื่นๆ (Matsuda; et al. 2005: 7333-7340) ได้ทำการศึกษายีนของเอนไซม์ PLA depolymerase (PLD) จากเชื้อ *Amycolatopsis* sp. สายพันธุ์ K104-1 โดยใช้เทคนิคห้องสมุดจีโนม พบว่าเอนไซม์ PLD นั้นคล้ายกับเอนไซม์ eukaryotic serine protease และมีลำดับกรดอะมิโนจำเพาะ His⁵⁷ Asp¹⁰² และ Ser¹⁹⁵ ซึ่งเป็นบริเวณ catalytic domain ที่พบในเอนไซม์ chymotrypsin ปี ค.ศ. 2010 ซ่าวผิงและคนอื่นๆ (Xiaoping; et al.2010:771-779) ได้ทำการศึกษายีนของเอนไซม์เอสเทอร์เอสเทอร์เอส (*est119*) จากเชื้อ *Thermobifida alba* สายพันธุ์ AHK119 โดยออกแบบ degenerated primer ในการทำ inverse PCR พบลำดับกรดอะมิโน Gly-His-Ser-Met-Gly ที่คล้ายกับกรดอะมิโนจำเพาะบริเวณ lipase box มีลำดับกรดอะมิโนบริเวณ catalytic tried (Ser, Asp และ His) และพบบริเวณ oxyanion hole ซึ่งเป็นลักษณะที่พบในเอนไซม์กลุ่ม esterase-lipase superfamily (serine hydrolase) โดยลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ *est119* นั้นมีความคล้ายกับเอนไซม์ ไฮโดรเลส (hydrolase) จากเชื้อ *Thermobifida fusca* สายพันธุ์ DSM 43793 84 เปอร์เซนต์ เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Streptomyces albus* 62 เปอร์เซนต์ และเชื้อ *Streptomyces exfoliates* 61 เปอร์เซนต์ และในปี ค.ศ. 2011 สุขขุมและคนอื่นๆ (Sukkhum; et al. 2011:2575-2582) ได้ทำการศึกษาลำดับเบสบางส่วนของเอนไซม์ Poly (L-lactide) depolymerase (*pla*) จากเชื้อ *Actinomadura keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1 พบว่ามีลำดับกรดอะมิโนบริเวณ N terminal คล้ายกับเอนไซม์ subtilisin like serine protease จากเชื้อ *Streptomyces griseus* subsp. *griseus* สายพันธุ์ NBRC 13350 43 เปอร์เซนต์ และคล้ายกับ *Streptomyces pristinaespiralis* สายพันธุ์ ATCC 25486 46 เปอร์เซนต์ ดังภาพประกอบที่ 14

```

S.griseus      AKVVQNKKEFSIDATQDNPPSWGLDRIDQTETAGDNAYTYPDAGGE--GVTAYVIDTGVRV 58
S.pristina    AKVVQNKKEFINATQDNPPSWGLDRVDQADTAGDSKYNYPDSAGE--GVTAYVIDTGVRI 58
S.vermiti     ASVAQDTEVALDHYQKNPPSWGLDRIDQNDLPLDHGYTWPESSGAGAGVTTYVIDTGIKV 60
Pla gene      -----GLDRIDQRKLPKLSKSYYYKNTGK-----GVNAYVIDTGLAW 36
              ****:* . . . * : : . ** :*****:

S.griseus      THEDFEGRATSGFDVAVDNDDDDADDGNGHGTHVAGT IAGAAHGVAKKANIVAVRVLDNNGS 118
S.pristina    SHKDFEGRATHGFDVAVDNDDSDADDGNGHGTHVAGT IAGAAHGVAKKAKIVAVRVLDNNGS 118
S.vermiti     THRDFGGRASYGWFVDGDRTAGDNGHGTHVAGT IAGTTYGVAKQAKVAVRVLDNEGS 120
Pla gene      SHPQFEGRAKSVWKAPSFS--SGWDCNGHGTHVAGT IGSKTYGVAKKVNLRSLRVLDCEGF 95
              :* :* ***. :. . . . * *****.. :*****: :***** :*

S.griseus      GTFEQVIAGIDWVTENASGSPVANMSLGGGADPALDAAVQKATAAGITFGVAAGNESSDA 178
S.pristina    GTFEQVVAGIDWVTQNHQGPSVANMSLGGGADEALDEAVRKATAAGVTFGVAAGNESSDA 178
S.vermiti     GTFARVIAGIDWVTRHAKKPAVANLSLGGFANAQLDAAVRNSIASGVTYAVAAGNDGLAA 180
pla gene      GELSDIIAAVDWLRKNAVKPAVANLSLGGAKSTALNTAVTNLSKSGVFVAVAAGNENQNA 155
              * :*:***: : * :***:**** . * : ** : :*: .*****: *

S.griseus      GEGSPSRVPEAITVASSTEADEQSSFSNYGPVVDIYAPGSDITSTWNSDSGNTTISGTS 238
S.pristina    AOGSPSRVKEAITVASSTKEDAQSDFSNFGEIVDIYAPGSDITSSWNSDDEGTKTISGTS 238
S.vermiti     GLYSPAHVQAITVGAGDRKDRASFSNWGPRLDLFAPGVAITSASNASDTAKATFSGTS 240
Pla gene      CNTSPASAGWVQAVGATTIYDNRAAFSNYGGCVDI FAPGYG IKSTYLGK--KTATLSGTV 213
              ** : . . :* : * : :***:* :*:*** *.*: . . * :***

S.griseus      MATPHVVGAA 248
S.pristina    MATPHVVGAA 248
S.vermiti     MATPHVTGAA 250
pla gene      QARDGGTEL- 222

```

ภาพประกอบ 14 แสดงการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนบริเวณปลาย N terminal ของเอนไซม์ Poly(L-lactide) depolymerase (*pla*) จาก *Actinomadura keratinilytica* สายพันธุ์ T16-1 กับ ลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ serine protease จากเชื้อ *Streptomyces griseus* subsp. *griseus* สายพันธุ์ NBRC 13350, *Streptomyces pristinaespiralis* สายพันธุ์ ATCC 25486 และ *Streptomyces avermitilis* สายพันธุ์ MA-4680

ที่มา: Sukkhum S.; et al. (2011). A novel poly (L-lactide) degrading thermophilic actinomycetes, *Actinomadura keratinilytica* strain T16-1 and *pla* sequencing. *Journal of Microbiology* (5):p. 2581.

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

1. เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

ตาราง 1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

	เครื่องมือที่ใช้การทดลอง	บริษัท
1.	ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow)	Science Tech
2.	ตู้บ่มเพาะเชื้อ (incubator)	Shel-lab
3.	ตู้บ่มเพาะเชื้อแบบเขย่า (Incubator Shaker)	New Brunswick Scientific
4.	หม้อนิ่งความดันไอน้ำ (autoclave)	Meditop.Co.,Ltd
5.	ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air sterilizing oven)	Astell
6.	เครื่องวัดพีเอช (pH meter)	Fisher Scientific
7.	เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)	Hsiangtat
8.	เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบความคมอุณหภูมิต่ำ (refrigerated centrifuge)	Sorvall
9.	กล้องจุลทรรศน์ (microscope)	Olympus
10.	เครื่อง Thermo cycler	Eppendorf
11.	เครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส และ อุปกรณ์ (electrophoresis apparatus)	Bioer Technology
12.	ชุดถ่ายภาพเจล	Viber Lourmat
13.	เครื่อง sonicator	Labquip
14.	เครื่อง evaporator	Buchi

2. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

ตาราง 2 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี	บริษัท
1. Poly(lactide) (PLA) (MW 54,000 Da)	Kyoto Institute of Technology (KIT)
2. Polycaprolactone (PCL) (MW14,000 Da), (MW 70,000-100,000 Da)	Kyoto Institute of Technology (KIT)
3. Polybutylene succinate (PBS)	Kyoto Institute of Technology (KIT)
4. Polybutylene succinic adipate (PBSA)	Kyoto Institute of Technology (KIT)
5. Luria Bertani broth (LB broth)	Bio Basic Inc.
6. Tris	Research Organics, Inc
7. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Bio Basic Inc.
8. Sucrose	Bio Basic Inc.
9. Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Sigma
10. TAE buffer	Merck
11. Nucleospin [®] Extract II Kit	Macherey-Nagel
12. 100bp. DNA Ladder	Favorgen
13. Lysozyme	Bio Basic Inc.
14. Ex <i>Taq</i> DNA polymerase	TaKaRa
15. Ribonuclease A (RNase A)	US Biological
16. Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma
17. Ampicilin	Sigma
18. Bradford Reagent	Fermentas
19. Bovine serum albumin (BSA)	Sigma
20. Agarose	Sigma
21. HPTLC cellulose	Merck

วิธีดำเนินการวิจัย

ขั้นตอนการดำเนินการสรุปได้ดังนี้

การเก็บตัวอย่างดิน



การคัดแยกแบคทีเรียที่ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพจากตัวอย่างดิน



การจัดจำแนกแบคทีเรียด้วยการวิเคราะห์ยีน 16S rDNA



การศึกษาทางสัณฐานวิทยา และลักษณะทางชีวเคมีของแบคทีเรีย



ศึกษาการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ



การแยกยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินจากบริเวณต่างๆ ของประเทศไทยทั้งหมด 7 จังหวัด คือ กรุงเทพมหานคร ทั้งหมด (5 ตัวอย่าง) ปทุมธานี (4 ตัวอย่าง) อุตรดิตถ์ (4 ตัวอย่าง) พิจิตร (1 ตัวอย่าง) สิงห์บุรี (1 ตัวอย่าง) และ น่าน (2 ตัวอย่าง) รวมทั้งสิ้น 17 ตัวอย่าง โดยเก็บตั้งแต่ เดือนตุลาคม 2551 ถึง สิงหาคม 2553 เก็บตัวอย่างดินที่ความลึกลงไปประมาณ 10 เซนติเมตร จากบริเวณที่มีการทับถมกันของกองขยะหรือปุ๋ยหมัก ตัวอย่างดินทั้งหมดถูกเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส จนกระทั่งนำมาทดลอง

2. การตัดแยกแบคทีเรียที่ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพจากตัวอย่างดิน

พลาสติกชีวภาพที่ใช้ในงานวิจัยนี้ได้แก่ PCL, PLA, PBS และ PBSA พลาสติกเหล่านี้ถูกใช้เป็นแหล่งคาร์บอนของเชื้อแบคทีเรียในการเตรียมอาหารแข็ง (bioplastics agar plate) การทดสอบการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพของเชื้อนั้นใช้วิธีสังเกตการเกิดบริเวณใส โดยประยุกต์ใช้วิธีการของ นิชิตะและโทคิวะ (Nishida & Tokiwa; 1993: 227-233)

การเตรียมตัวอย่างดิน นำตัวอย่างดินมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ โดยเจือจางจนถึงความเข้มข้น 10^{-4} ดูดตัวอย่างดินที่ทำการเจือจางแล้ว 0.1 มิลลิลิตร มาเกลี่ยบนผิวหน้าอาหารที่มี PCL, PLA, PBS และ PBSA เป็นแหล่งคาร์บอน (emulsified agar plate) (ภาคผนวก ก ข้อที่ 1) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 45 และ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน ตรวจสอบผลทุกวัน แบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายพลาสติกชีวภาพได้นั้นจะสังเกตเห็นบริเวณใส (clear zone) รอบโคโลนีบนจานเพาะเชื้อ จากนั้นแยกเชื้อด้วยวิธีการทำ cross streak จนได้เชื้อบริสุทธิ์ เพื่อนำไปทดสอบในขั้นต่อไป

การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ เริ่มจากนำแบคทีเรียที่แยกได้ มาทดสอบโดยการจุดเชื้อ (spot) ลงในอาหารแข็ง PLA, PCL, PBS และ PBSA บ่มที่อุณหภูมิ 37 45 และ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน สังเกตและวัดขนาดบริเวณใสที่เกิดขึ้น

3. การจัดจำแนกแบคทีเรียโดยศึกษาลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA

3.1 การสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรีย

การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ (genomic DNA) ของเชื้อแต่ละไอโซเลท (isolates) ทำตามวิธีการของ คีเซอร์และคนอื่นๆ (Kieser; et al. 2000) โดยเริ่มจากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว Luria Bertani low salt broth (LB low salt broth) 10 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ก ข้อ 2) ในหลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 190 - 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 - 4 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นเก็บเซลล์โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใส (supernatant) ทิ้ง จากนั้นเติม TES buffer

pH 8 (ภาคผนวก ข ข้อ 2) ลงไปละลายเซลล์ เติมนอนไซม์ lysozyme (ความเข้มข้น 0.1 กรัม/มิลลิลิตร) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 1 – 2 ชั่วโมง เติม 50 mM MgCl₂ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม HTE buffer pH 8 (ภาคผนวก ข ข้อ 3) ลงไป จากนั้น resuspend เซลล์ให้เป็นเนื้อเดียวกัน และเติม 10 เปอร์เซ็นต์ sodium dodecyl sulfate (SDS) (ภาคผนวก ข ข้อ 8) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติม solution III (ภาคผนวก ข ข้อ 4) บ่มที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใสด้านบนมาตกตะกอนดีเอ็นเอ โดยใช้ isopropanol บ่มที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียสข้ามคืนหรือที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จนเห็นส่วนตะกอน (pellet) ตกอยู่ด้านล่าง เทส่วนใสด้านบนทิ้ง ตั้งทิ้งไว้จนแห้ง เติม double distilled water (ddH₂O) ปราศจากเชื้อเพื่อละลายตะกอนด้านล่าง จากนั้นนำไปบ่มกับเอนไซม์ RNaseA (ความเข้มข้น 0.1 กรัม/มิลลิลิตร) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำดีเอ็นเอไปวิเคราะห์ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) ใช้ 1 เปอร์เซ็นต์ agarose gel โดยซังอะกาโรส 1 กรัม ผสมกับ 0.5X TAE buffer 100 มิลลิลิตร นำมาหลอมให้ละลาย จากนั้นเทลงใน gel apparatus ทิ้งไว้จนเจลแข็งตัว จึงนำมาใส่ chamber เท 0.5 X TAE buffer จนท่วมเจล นำดีเอ็นเอผสมกับ loading dye แล้ว load ลงในช่องภายในเจล ใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที นำเจลมาย้อมด้วยสารละลาย ethidium bromide เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างน้ำเป็นเวลา 10 นาที ตรวจสอบดูเจลภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตซึ่งจะเห็นแถบดีเอ็นเอเป็นสีส้ม การตรวจสอบด้วยวิธีนี้จะเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100bp. DNA Ladder จากนั้นเก็บดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อทำการศึกษารุ่นต่อไป

3.2 การจำแนกเชื้อโดยวิธีวิเคราะห์บริเวณ 16S rDNA และการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis)

การจัดจำแนกเชื้อโดยใช้ส่วนบริเวณ 16S rDNA มาทำการศึกษาเพื่อยืนยันและระบุเชื้อแต่ละไอโซเลทที่แยกได้นั้นมีความใกล้เคียงกับเชื้อชนิดใดที่มีรายงานอยู่ในฐานข้อมูล GenBank โดยเริ่มจากนำจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (template DNA) ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) ส่วน primer จะมีความจำเพาะกับบริเวณ 16S rDNA ที่ประยุกต์จากวิธีของเลน (Lane. 1991: 371-375)

Primer สำหรับเพิ่มจำนวนบริเวณ 16S rDNA มีลำดับเบส ดังนี้

Forward primer: 16sE8-F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')

Reverse primer: 16sE1509-R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')

ตาราง 3 ส่วนผสมของการทำ PCR เพื่อสังเคราะห์บริเวณส่วน 16S rDNA

ส่วนผสมของ PCR reaction	ความเข้มข้นสุดท้าย
1. Sterile ddH ₂ O	-
2. Genomic DNA	-
3. 10X Ex buffer	1.0X
4. 0.2 mM dNTP	0.012 mM
5. Ex <i>Taq</i> DNA polymerase (5 units/μl)	0.02 unit
6. 16sE8-F (10 μM/ μl)	0.08 μM
7. 16sE1509-R (10 μM/ μl)	0.08 μM
ปริมาตรสุทธิ	25.0

กำหนดอุณหภูมิ และเวลาของเครื่อง thermal cycle สำหรับเพิ่มจำนวนบริเวณ 16S rDNA ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 initial denaturation	อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา	5	นาที
ขั้นตอนที่ 2 denaturation	อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา	45	วินาที
ขั้นตอนที่ 3 annealing	อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา	30	วินาที
ขั้นตอนที่ 4 extension	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา	2	นาที
ขั้นตอนที่ 5 ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2 – 4 เป็นจำนวน 30 รอบ (cycles)				
ขั้นตอนที่ 6 final extension	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา	10	นาที
ขั้นตอนที่ 7 อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส คงที่ตลอด				

นำผลผลิตของ PCR มาวิเคราะห์ขนาดด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสเช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 3.1 จากนั้นตัดแถบดีเอ็นเอที่ต้องการออกจากแผ่นเจล เพื่อทำการสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลโดยใช้ชุดสกัด Nucleospin[®] Extract II การจัดจำแนกแบคทีเรียแต่ละไอโซเลทโดยการนำผลผลิต PCR แต่ละไอโซเลทมาหาลำดับเบสด้วยการทำ ABI PRISM BigDye[™] (บริษัท WARD MEDIC) วิเคราะห์ลำดับเบสด้วยโปรแกรม Bioedit และ BLAST (Thompson; Higgins; & Gibson. 1994:4673–4680) การสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ โดยใช้โปรแกรม MEGA 5 (Tamura; et al. 2011: 2731-2739) ด้วยวิธี neighbor-joining ที่ค่า bootstrap 1,000 ครั้ง

4. การศึกษาทางสัณฐานวิทยา องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์และลักษณะทางชีวเคมีของจุลินทรีย์

4.1 การศึกษาสัณฐานวิทยา (Morphological characterization)

การศึกษาสัณฐานวิทยาของแอกติโนมัยซีทได้ประยุกต์ใช้วิธีการของเซอร์ลิง และ กือทลีฟ (Shirling; & Gottlieb. 1966: 313-340) โดยศึกษาลักษณะการเจริญเติบโต เช่น การสร้างเม็ดสี (pigment) ลักษณะสปอร์ของ aerial mycelium และ substrate mycelium ที่เกิดขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อต่างชนิดกัน และการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ โดยใช้วิธีการของ สเน็ค และโรเบิร์ต (Staneck & Roberts;. 1974: 226-231) ได้แก่ การวิเคราะห์ไอโซเมอร์ของ diaminopimelic acid (DAP) ในผนังเซลล์ และการวิเคราะห์น้ำตาลในเซลล์

4.1.1 การศึกษาลักษณะการเจริญของแอกติโนมัยซีท

เลี้ยงแอกติโนมัยซีทโดยใช้อาหารของ International Streptomyces Project (ISP) ได้แก่ Yeast – malt extract agar (ISP2), Oatmeal agar (ISP3), Inorganic salt-starch agar (ISP4) และ Glycerol-asparagine agar (ISP5) (ภาคผนวก ก ข้อ 4, 5, 6, 7) การศึกษาเริ่มจากการเขี่ยเชื้อลงในอาหาร ISP2, ISP3, ISP4, ISP5 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-21 วัน โดยดูผลในวันที่ 7, 14 และ 21 สังเกตและบันทึกลักษณะการเจริญและสีของมวลสปอร์ (color of spore mass) ที่สร้างขึ้นบน aerial mycelium และ substrate mycelium

4.1.2 การศึกษาลักษณะของแอกติโนมัยซีทภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (SEM)

เลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง Rye medium (ภาคผนวก ก ข้อ11) ที่อุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 - 14 วัน จากนั้นศึกษาลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทโดยใช้วิธีการของวิลเลียมและเดวิส (Williams S. T. & Davies F. L.; 1967: 171-177)

4.1.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์

4.1.3.1 การศึกษาไอโซเมอร์ของ diaminopimelic acid (DAP) ในผนังเซลล์

ชั่งเซลล์แห้ง 10 มิลลิกรัมใส่ในหลอดทดลอง นำมาย่อยเซลล์ด้วย 6 N HCl ปริมาตร 20 – 50 มิลลิลิตรในหลอดฝาปิดสนิท นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที โดยอาศัยเครื่อง autoclave จากนั้น ดูดสารละลายที่ได้ไปทำ Thin Layer Chromatography (TLC) โดยใช้แผ่น TLC อลูมิเนียมที่เคลือบด้วย cellulose ขนาด 10 x 20 เซนติเมตร การทำ TLC เริ่มจากนำสารละลายที่ได้หยดลงบนแผ่น TLC ซึ่งเทียบกับ สารมาตรฐาน คือ 0.01 M LL-DAP และ meso-DAP ทั้งให้แห้ง จากนั้นจุ่มลงในสารละลายผสมที่ประกอบด้วย methanol: deionized water: HCl: pyridine [80:17.5:2.5:10, v/v] ที่จุ่มจนสารละลายเคลื่อนที่จนสุดแผ่น ทั้งแผ่น TLC ที่ได้ไว้จนแห้ง แล้วฉีดพ่นด้วยสารละลาย 0.2 เปอร์เซ็นต์ ninhydrin ผสมกับ acetone นำไปอบที่

อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 - 5 นาที บันทึกตำแหน่งการเคลื่อนที่ของ DAP ในแต่ละตัวอย่างเมื่อเทียบกับ DAP มาตรฐาน (Staneck; & Roberts. 1974: 226-231)

4.1.3.2 การวิเคราะห์น้ำตาลในเซลล์

ซึ่งเซลล์แห้ง 50 มิลลิกรัมในหลอดทดลอง ย่อยเซลล์ด้วย 1 N H₂SO₄ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็น จากนั้นปรับ pH ด้วยสารละลายอิมิตัว Ba(OH)₂ จนได้ pH ประมาณ 5.2-5.5 จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ส่วนใสที่ได้จะถูกทิ้งให้ระเหยจนแห้ง ละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่น 0.3 มิลลิลิตร ตูตสารละลายที่ได้ ไปทำ TLC โดยใช้แผ่นลูมิเนียม เคลือบด้วยเซลลูโลสขนาด 10 x 20 เซนติเมตร การทำ TLC นั้นจะนำสารละลายที่ได้หยดลงบน แผ่น TLC เทียบกับน้ำตาลมาตรฐาน 6 ชนิดที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ คือน้ำตาลไซโลส อะราบีโนส กาแลคโตส แมนโนส แรมโนสและกลูโคส ทิ้งให้แห้งแล้วจุ่มแผ่น TLC ลงในสารละลายผสมที่ประกอบด้วย *n*-butanol:distilled water:pyridine :toluene [10:6:6:1,v/v] ที่ไว้นสารละลายเคลื่อนที่ จนสุดแผ่น ทิ้งแผ่น TLC ไว้นแห้ง ฉีดพ่นด้วยสารละลายผสมของ aniline phthalate ที่ประกอบด้วย phthalic acid 3.25 กรัม และ aniline 2 มิลลิลิตร ในบิวทานอลที่อิมิตัวด้วยน้ำ 100 มิลลิลิตร นำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-10 นาที บันทึกแถบสีของน้ำตาลแต่ละชนิดของตัวอย่างเปรียบเทียบกับน้ำตาลมาตรฐาน

4.2 การศึกษารูปร่างของเชื้อ (Physiological characterization)

การศึกษารูปร่างของเชื้อในกลุ่มแอคติโนมัยสิท โดยการศึกษาแหล่งคาร์บอน (1 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ ความสามารถในการทนเค็มของเชื้อที่ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ที่แตกต่างกัน ตั้งแต่ 0-10 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร และการศึกษาความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสโดยมีวิธีการศึกษา ดังนี้

4.2.1 การศึกษาการใช้แหล่งคาร์บอนในการเจริญของเชื้อ

เริ่มจากการเลี้ยงเชื้อใน Tryptone-yeast extract broth (ISP1) (ภาคผนวก ก ข้อ 3) เป็นเวลา 3-5 วัน จากนั้นเก็บเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำเซลล์มาล้าง และ resuspend ด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ จากนั้นหยดเชื้อ 0.05 มิลลิลิตร ลงบน Carbon utilization medium (ISP9) (ภาคผนวก ก ข้อ 7) ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลกลูโคส ราฟฟิโนส อินโนซิทอล ไซโลส แมนโนส อะราบีโนส แรมโนมโนส ซูโครส ฟรุคโตส และซอร์บิทอล นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 - 12 วัน โดยใช้น้ำตาลกลูโคส เป็นตัวควบคุม (control) เพื่อเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อบนอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน

4.2.2 การศึกษาความสามารถในการทนเค็ม และอุณหภูมิที่ใช้ในการเจริญ

เริ่มจากเชื้อเชื้อบนอาหาร ISP2 ที่มีระดับความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) เท่ากับ 0, 2, 4, 6, และ 10 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 – 12 วัน โดยใช้อาหาร ISP2 ที่ไม่เติมเกลือเป็นตัวควบคุม สำหรับการศึกษาน้ำหนักที่ใช้น้ำหนักในการเจริญนั้น โดยเริ่มจากเชื้อเชื้อลงบน ISP2 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 – 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน สังเกตดูการเจริญของเชื้อ

4.2.3 ศึกษาความสามารถในการย่อยสลายของเชื้อ

การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายของเชื้อทั้ง 8 สายพันธุ์ โดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง Actinomyces medium (ภาคผนวก ก ข้อ 12) ที่มีการเติมซับสเตรท เช่น xylan, soluble starch, carboxymethylcellulose (CMC), และ skim milk นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน สังเกตการย่อยสลายและวัดขนาดบริเวณที่เกิดการย่อยสลายของซับสเตรทบนอาหารแข็ง และการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสของเชื้อ โดยเชื้อเชื้อลงในหลอดทดลองที่มีอาหาร cellulose medium (ภาคผนวก ก ข้อ 9) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน สังเกตลักษณะการย่อยสลายเซลลูโลส

5. การศึกษาการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ

5.1 การศึกษาอุณหภูมิและค่า pH ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ (bioplastic – degrading enzyme)

เลี้ยงเชื้อในอาหาร basal medium broth (ภาคผนวก ก ข้อ 1) ที่มีค่า pH 7-8 ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอนเป็น PBSA ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาณ 20 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 125 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 และ 45 องศาเซลเซียส นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 180 – 190 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมงเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำตัวอย่างที่เก็บในแต่ละวันมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนใสด้านบนมาวัดการทำงานของเอนไซม์ มาวัดความขุ่นที่ลดลงของสารละลายซับสเตรทซึ่งเป็นสารละลาย PBSA ที่มีความเข้มข้น 0.1% ใน Tris-HCl buffer pH 7-8 (ภาคผนวก ข ข้อ 1.1) โดยประยุกต์วิธีของสุขขุมและคนอื่นๆ (Sukkhum; et al. 2009: 459-467) โดยการทดลองนั้นจะทำทั้งหมด 3 ครั้ง

การเตรียมสารละลายเอนไซม์ทำการเจือจางให้เหมาะสมปริมาณ 2 มิลลิลิตร โดยผสมเป็น reaction mixture ซึ่งประกอบด้วย สารละลายเอนไซม์ 0.25 มิลลิลิตร และสารละลายซับสเตรท 2.25 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 30 นาที

กำหนดให้ 1 ยูนิตของเอนไซม์ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้ค่า optical density ที่ 630 นาโนเมตร (OD_{630}) ลดลงไป 0.05 ในเวลา 30 นาที ภายใต้สภาวะทดสอบ

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน โดยการวัดปริมาณโปรตีนในตัวอย่างเอนไซม์โดยใช้วิธีการของแบรดฟอร์ด (Bradford, 1976: 248-254) เตรียมสารละลาย Bovine serum albumin (BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐานเพื่อสร้างเป็นกราฟมาตรฐาน (standard curve)

5.2 การศึกษาแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ

เลี้ยงในอาหาร basal medium broth ที่มีค่า pH 7 ซึ่งประกอบด้วยแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาล และพลาสติกชีวภาพที่มีความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ได้แก่ น้ำตาล กลูโคส ฟรุกโตส แลคโตส ซูโครส PCL PLA PBS และ PBSA ปริมาณ 20 มิลลิลิตร ใน ฟลาस्क ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 190 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมงเป็นเวลา 5 วัน จากนั้นนำตัวอย่างที่เก็บในแต่ละวันมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนใสด้านบนมาวัดการทำงานของเอนไซม์มาวัดความขุ่นที่ลดลงของสารละลายซับสเตรทซึ่งเป็นสารละลาย PLA, PCL, PBS และ PBSA ที่มีความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ใน Tris-HCl buffer pH 7 (ภาคผนวก ข ข้อ 1.1) ทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง โดยทำการเตรียม reaction mixture เช่นเดียวกับการทดลองข้อ 5.1

5.3 การศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ

เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว basal medium ที่ค่า pH 7 ซึ่งประกอบด้วยแหล่งคาร์บอนเป็น PCL, PLA, PBS และ PBSA ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0.1 – 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาณ 20 มิลลิลิตร ในฟลาस्कขนาด 125 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นำมาเขย่าที่ความเร็วรอบ 190 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมงเป็นเวลา 5 วัน เก็บส่วนใสด้านบนมาวัดกิจกรรมของเอนไซม์ มาวัดความขุ่นที่ลดลงของสารละลายซับสเตรท (enzyme activity) ซึ่งเป็นสารละลาย PLA, PCL, PBS และ PBSA ที่มีความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ใน Tris-HCl buffer pH 7 ทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง โดยทำการเตรียม reaction mixture เช่นเดียวกับการทดลองข้อ 5.1

5.4 การศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ

เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว basal medium ที่ประกอบด้วยแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ Yeast exact $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Gelatin, Casein, Yeast extract กับ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และการไม่เติมแหล่งไนโตรเจน ในส่วนของแหล่งคาร์บอนจะใช้พลาสติกชีวภาพที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 5.3 ปริมาณ 20 มิลลิลิตร ในฟลasks ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นำมาเขย่าด้วยความเร็วรอบ 190 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมงเป็นเวลา 5 วัน เก็บส่วนใสด้านบนมาวัดการทำงานของเอนไซม์ มาวัดความขุ่นที่ลดลงของสารละลายซับสเตรทซึ่งเป็นสารละลาย PBS ที่มีความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ใน Tris-HCl buffer pH ทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง โดยทำการเตรียม reaction mixture เช่นเดียวกับการทดลองข้อ 5.1

6. การศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ โดยใช้เทคนิค Degenerated primer

การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอทำเช่นเดียวกับขั้นตอนที่ 3.1 เพื่อนำมาใช้ในการค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ โดยใช้ degenerated primer ที่ออกแบบจากเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ PBS depolymerase (*pbsA*) จากเชื้อ *Acidovorax delafieldii* สายพันธุ์ BS-3 (BAB86909.1) (Uchida; et al. 2002: 245-247) เอนไซม์เอสเทอร์เอส (*est119*) จากเชื้อ *Thermobifida alba* สายพันธุ์ AHK119 (AB445476.2) และลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์มีความคล้ายกับเอนไซม์ *est119* เช่น เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Streptomyces albus* (U03114.2), *Streptomyces coelicolor* (AF009336.1) และ *Streptomyces exfoliates* (AAB51445) (Xiaoping; et al. 2010:771-779)

Degenerated primer สำหรับเพิ่มจำนวนยีนของเอนไซม์เกี่ยวข้องกับกลายพันธุ์ของยีน *ipa5* ซึ่งมีลำดับเบส ดังนี้

Forward primer: LPAF1 (5'-GGCTWCSGSGSSGGCACCRSTACTAC-3')
Reverse primer: LPAR1 (5'-SSWGCCGCCGCCGCCATSSWSYRGCC-3')

ตาราง 4 ส่วนผสมของการทำ PCR เพื่อสังเคราะห์ยีนบางส่วนของเอนไซม์ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ

ส่วนผสมของ PCR reaction	ความเข้มข้นสุดท้าย
1. Sterile ddH ₂ O	-
2. Genomic DNA	-
3. 10X Ex buffer	1.0X
4. 0.2 mM dNTP	0.012 mM
5. Ex <i>Taq</i> DNA polymerase (5 units/μl)	0.02 unit
6. LPAF1 (10 μM/ μl)	0.08 μM
7. LPAR1 (10 μM/ μl)	0.08 μM
ปริมาตรสุทธิ	25.0 μl

กำหนดอุณหภูมิ และเวลาของเครื่อง thermal cycle สำหรับเพิ่มจำนวนยีน ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 initial denaturation	อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา	5	นาที
ขั้นตอนที่ 2 denaturation	อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา	10	วินาที
ขั้นตอนที่ 3 annealing	อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา	30	วินาที
ขั้นตอนที่ 4 extension	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา	30	นาที
ขั้นตอนที่ 5 ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2 – 4	เป็นจำนวน 35 รอบ (cycles)			
ขั้นตอนที่ 6 final extension	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา	10	นาที
ขั้นตอนที่ 7	อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส คงที่ตลอด			

นำผลผลิตของ PCR มาวิเคราะห์ขนาดด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสเช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 3.1 โดยผลผลิต PCR ของยีนเอนไซม์ไลเปส (*lipase*) มีขนาดประมาณ 300 คู่เบส (bp) จากนั้นตัดแถบดีเอ็นเอที่ต้องการออกจากแผ่นเจลเพื่อทำการสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลโดยใช้ชุดสกัด Nucleospin[®] Extract II

6.1 การวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอ

ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสดีเอ็นเอ ตรวจสอบ ORF (open reading frame) โดยใช้โปรแกรม ORF Finder ในฐานข้อมูล NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>) วิเคราะห์ลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม Bioedit และโปรแกรม BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) เพื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนกับลำดับกรดอะมิโนที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank

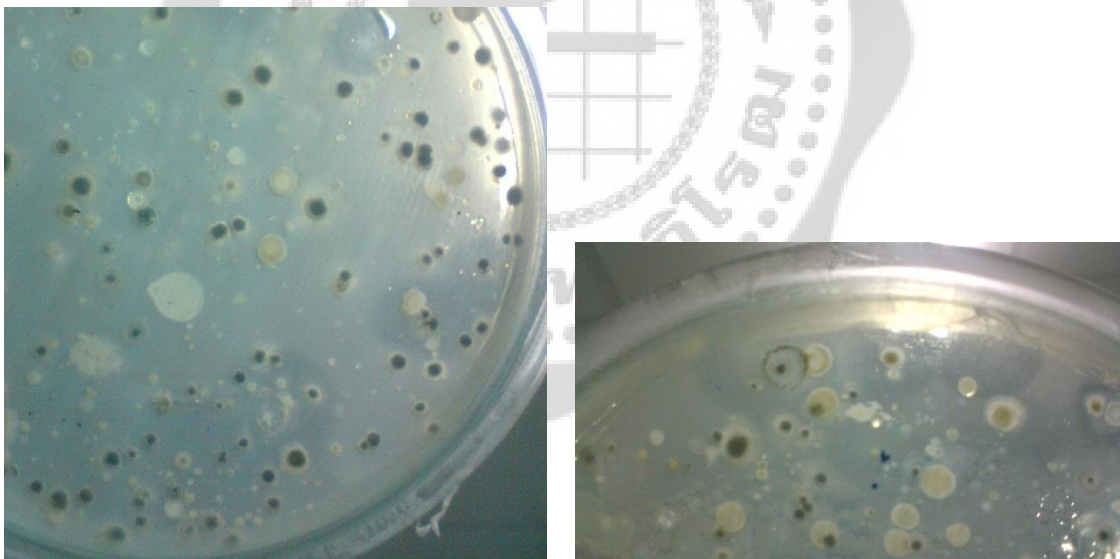


บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพจากตัวอย่างดิน

แยกเชื้อแบคทีเรียที่ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพจากตัวอย่างดินที่เกิดจากการทับถมกันบริเวณกองขยะหรือปุ๋ยหมักจากบริเวณต่างๆของประเทศไทยทั้งหมด 6 จังหวัด คือ ปทุมธานี กรุงเทพมหานคร อุตรดิตถ์ พิจิตร สิงห์บุรี และน่าน การคัดแยกเชื้อที่ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพบนอาหารแข็งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบเชื้อทั้งหมด 40 ไอโซเลท ได้แก่ เชื้อที่ย่อยสลายบนอาหารแข็ง PLA 9 ไอโซเลท คิดเป็น 22.5 เปอร์เซ็นต์จากเชื้อทั้งหมด เชื้อที่ย่อยสลาย PCL 18 ไอโซเลท คิดเป็น 45 เปอร์เซ็นต์จากเชื้อทั้งหมด เชื้อที่ย่อยสลาย PBS 15 ไอโซเลทคิดเป็น 37.5 เปอร์เซ็นต์จากเชื้อทั้งหมด และเชื้อที่ย่อยสลาย PBSA 6 ไอโซเลท คิดเป็น 15 เปอร์เซ็นต์จากเชื้อทั้งหมด ดังภาพประกอบ 15 พบเชื้อ 8 ไอโซเลท ที่สามารถย่อยสลายพลาสติกชีวภาพได้มากกว่า 1 ชนิด ได้แก่ ไอโซเลท APL1, APL2, APL3, APL4, APL5, APL6, APL7 และ APL8



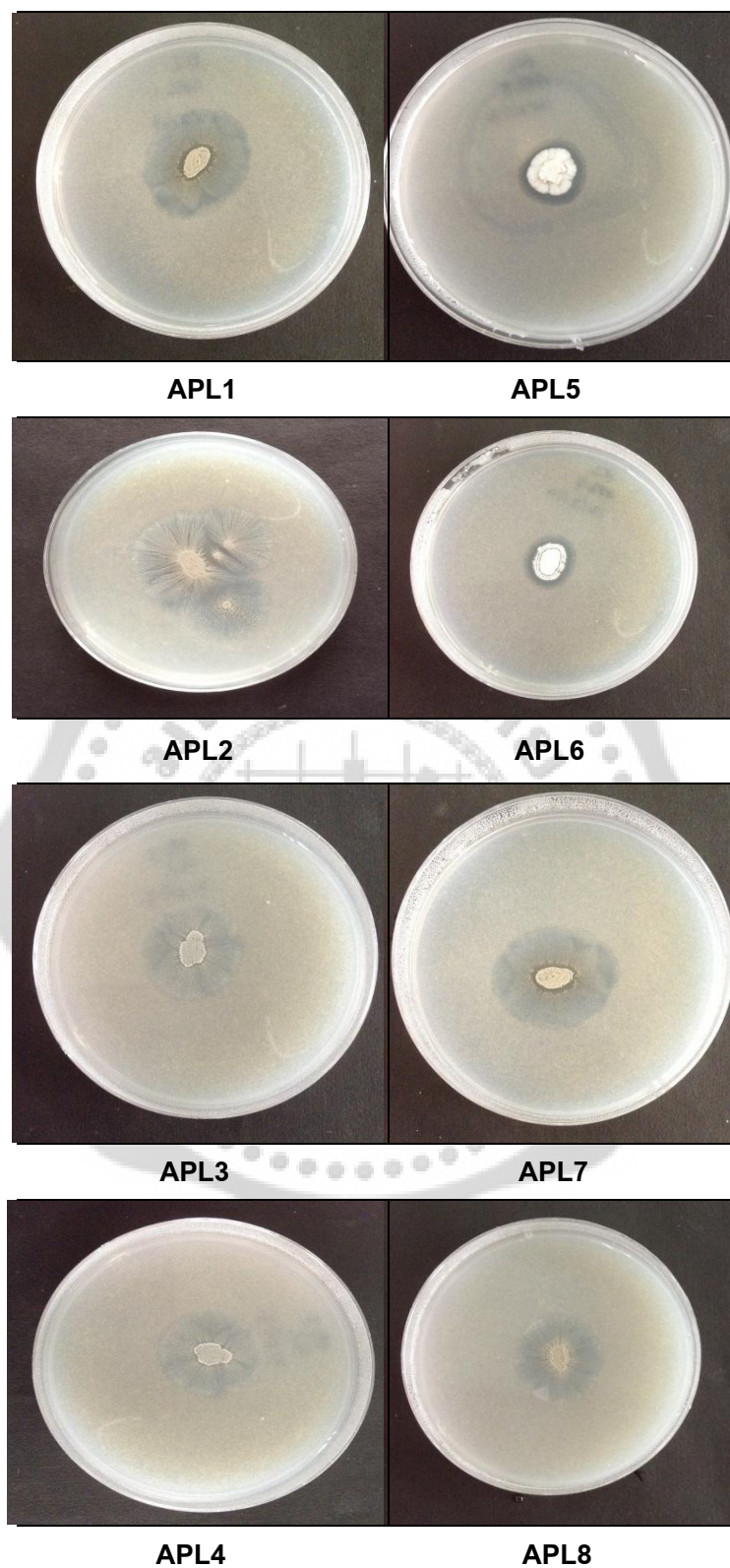
ภาพประกอบ 15 การคัดแยกแบคทีเรียที่ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพบนอาหารแข็ง PLA ที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน

ตาราง 5 ขนาดบริเวณใสที่เกิดจากการเลี้ยงเชื้อที่แยกได้บนอาหารแข็งพลาสติกชีวภาพ โดยบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน

ไอโซเลท	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส (เซนติเมตร)			
	PCL	PLA	PBS	PBSA
APL1	1.5	1.0	0.8	-
APL2	1.4	1.2	0.9	-
APL3	1.5	1.4	0.8	-
APL4	1.5	1.4	-	-
APL5	1.2	1.0	0.6	1.3
APL6	1.3	1.0	-	1.1
APL7	1.5	1.5	0.6	-
APL8	1.5	1.4	0.5	-

หมายเหตุ : - ไม่พบการย่อยสลาย

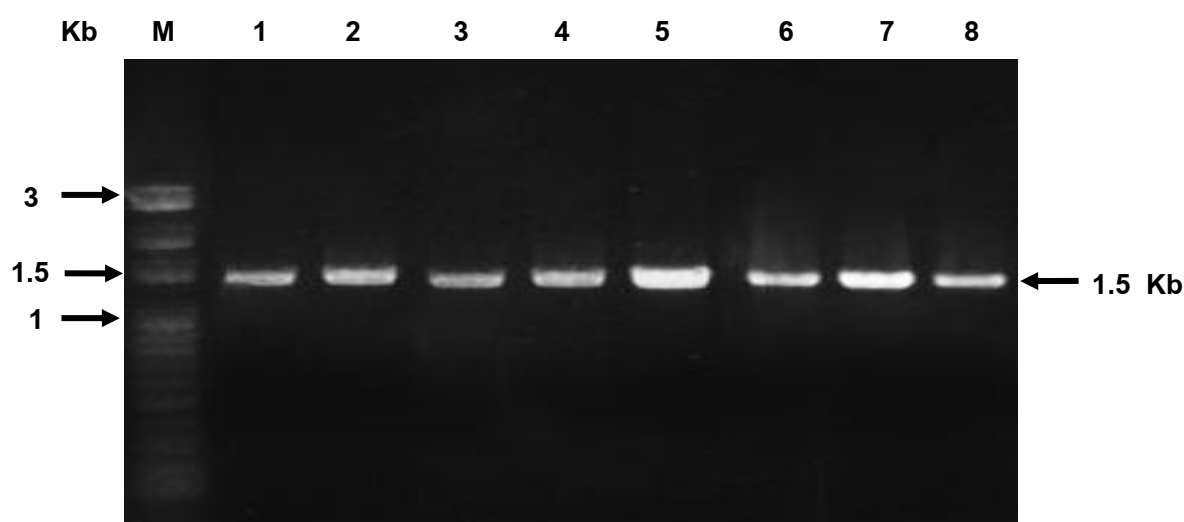
จากตาราง 5 พบว่าเชื้อทั้ง 8 ไอโซเลทสามารถเกิดบริเวณใสบนอาหารแข็ง PLA และ PCL ดังแสดงในภาพประกอบ 16 โดยพบ 6 ไอโซเลทซึ่งได้แก่ APL1, APL2, APL3, APL4, APL7 และ APL8 ที่สามารถย่อยสลาย PLA, PCL และ PBS ได้ ไอโซเลท APL5 สามารถย่อยสลาย PLA, PCL, PBS และ PBSA ไอโซเลท APL6 สามารถย่อยสลาย PLA, PCL และ PBSA ได้ โดยทั้ง 2 ไอโซเลทสามารถเกิดบริเวณใสบนอาหารแข็ง PLA และ PBSA ได้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เช่นกัน



ภาพประกอบ 16 การเกิดบริเวณใสของเชื้อทั้งหมด 8 ไอโซเลทที่แยกได้จากดินบนอาหารแข็ง PCL ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน

2. การจำแนกเชื้อโดยวิธีวิเคราะห์บริเวณ 16S rDNA และ การศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic analysis)

ลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA เป็นบริเวณพบได้ในแบคทีเรียทุกชนิด โดยมีความสำคัญและส่งผลต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิต (housekeeping gene) ดังนั้นลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA จึงเกิดการเปลี่ยนแปลงได้ยาก ยกเว้นในกรณีการเกิดวิวัฒนาการ (evolution) ของสิ่งมีชีวิตเท่านั้น และบริเวณ 16S rDNA มีขนาดใหญ่เท่ากับ 1500 คู่เบส (bp) ซึ่งเป็นขนาดที่เหมาะสมในการจำแนกแบคทีเรีย (Janda; J. Michael & Abbott; Sharon L. 2007: 2761-2764) การศึกษาลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ที่มีขนาด 1500 bp ของเชื้อแบคทีเรีย 8 ไอโซเลท แสดงดังภาพประกอบ 17 เปรียบเทียบความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียสปีชีส์ต่างๆในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST คัดเลือกสปีชีส์ที่มีความคล้าย 3 อันดับแรกในแต่ละไอโซเลทมาทำการเปรียบเทียบและทำการวิเคราะห์ผลในรูปแบบของแผนภูมิทางวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ดังภาพประกอบ 18



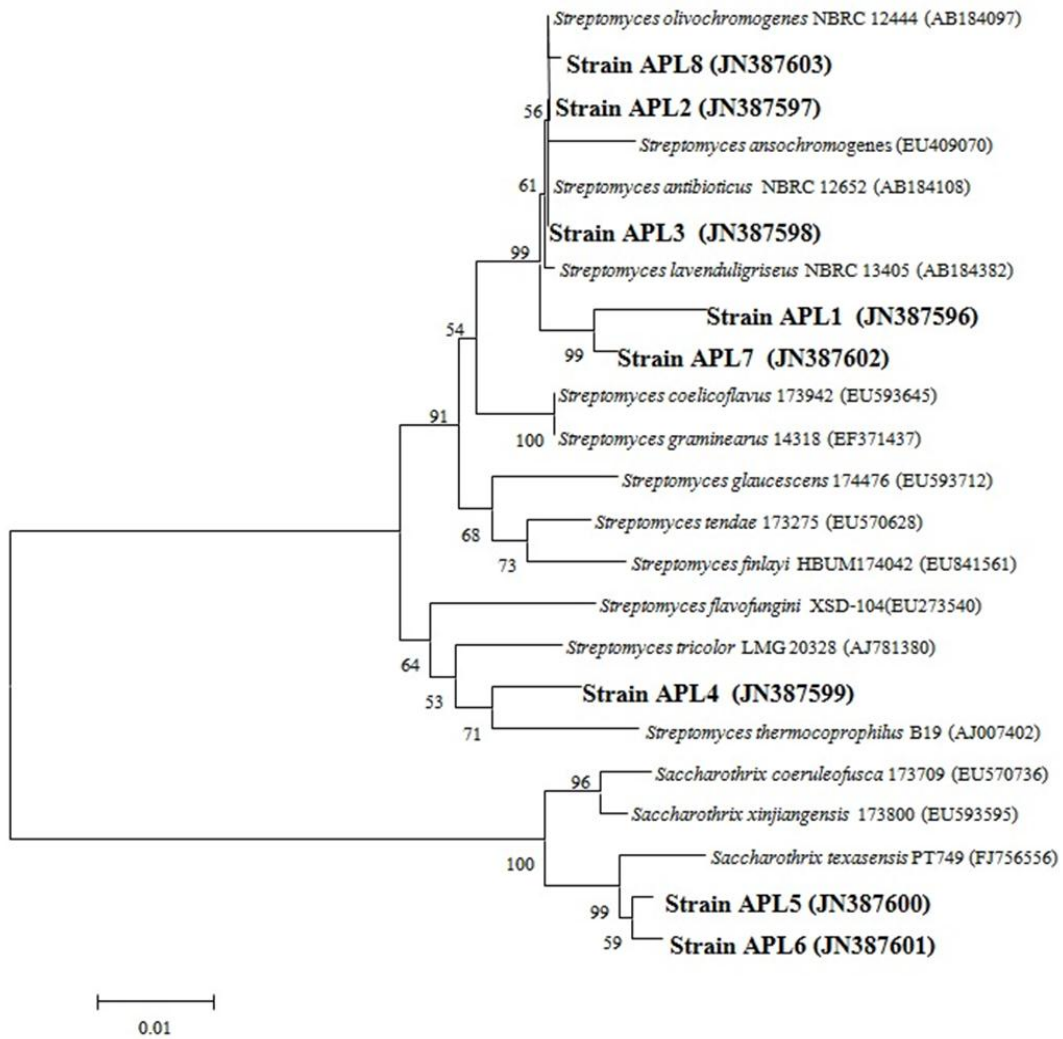
ภาพประกอบ 17 บริเวณ 16S rDNA ขนาด 1500 คู่เบส ของเชื้อ 8 ไอโซเลท จากการทำ PCR

- | | |
|-----------------------------------|-----------------------|
| Lane M : 100 bp DNA Ladder marker | Lane 5 : Strain APL 5 |
| Lane 1 : Strain APL 1 | Lane 6 : Strain APL 6 |
| Lane 2 : Strain APL 2 | Lane 7 : Strain APL 7 |
| Lane 3 : Strain APL 3 | Lane 8 : Strain APL 8 |
| Lane 4 : Strain APL 4 | |

เมื่อนำลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ของสายพันธุ์ APL1 (JN387596.1) เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลพบว่าคล้ายกับเชื้อ *Streptomyces antibioticus* 100 เปอร์เซ็นต์ สายพันธุ์ APL2 (JN387597.1) คล้ายกับเชื้อ *Streptomyces olivochromogenes* 100 เปอร์เซ็นต์ สายพันธุ์ APL3 (JN387598.1) คล้ายกับเชื้อ *Streptomyces antibioticus* 98 เปอร์เซ็นต์ สายพันธุ์ APL4 (JN387599.1) คล้ายกับเชื้อ *Streptomyces thermocoprophilus* 98 เปอร์เซ็นต์ สายพันธุ์ APL 5 (JN387600.1) และ APL6 (JN387601.1) นั้นคล้ายกับเชื้อ *Saccharothrix texasensis* 98 เปอร์เซ็นต์ สายพันธุ์ APL7 (JN387602.1) คล้ายกับเชื้อ *Streptomyces ansochromogenes* 98 เปอร์เซ็นต์ และสายพันธุ์ APL8 (JN387603.1) คล้ายกับเชื้อ *Streptomyces coelicoflavus* 99 เปอร์เซ็นต์ โดยแสดงผลทั้งหมดดังตาราง 6

ตาราง 6 เปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงของเชื้อแต่ละไอโซเลท เมื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank

ไอโซเลท	สายพันธุ์ (% identity)	Accession number
APL1	<i>Streptomyces antibioticus</i> 100%	JN387596.1
APL2	<i>Streptomyces olivochromogenes</i> 100 %	JN387597.1
APL3	<i>Streptomyces antibioticus</i> 98 %	JN387598.1
APL4	<i>Streptomyces thermocoprophilus</i> 98 %	JN387599.1
APL5	<i>Saccharothrix texasensis</i> 98 %	JN387600.1
APL6	<i>Saccharothrix texasensis</i> 98 %	JN387601.1
APL7	<i>Streptomyces ansochromogenes</i> 98 %	JN387602.1
APL8	<i>Streptomyces coelicoflavus</i> 99 %	JN387603.1



ภาพประกอบ 18 แผนภูมิทางวิวัฒนาการของลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA จากเชื้อ 8 สายพันธุ์ และเชื้อที่มีความคล้ายกับเชื้อทั้ง 8 สายพันธุ์จากฐานข้อมูล GenBank ที่ค่า bootstrapping 1,000 ครั้ง

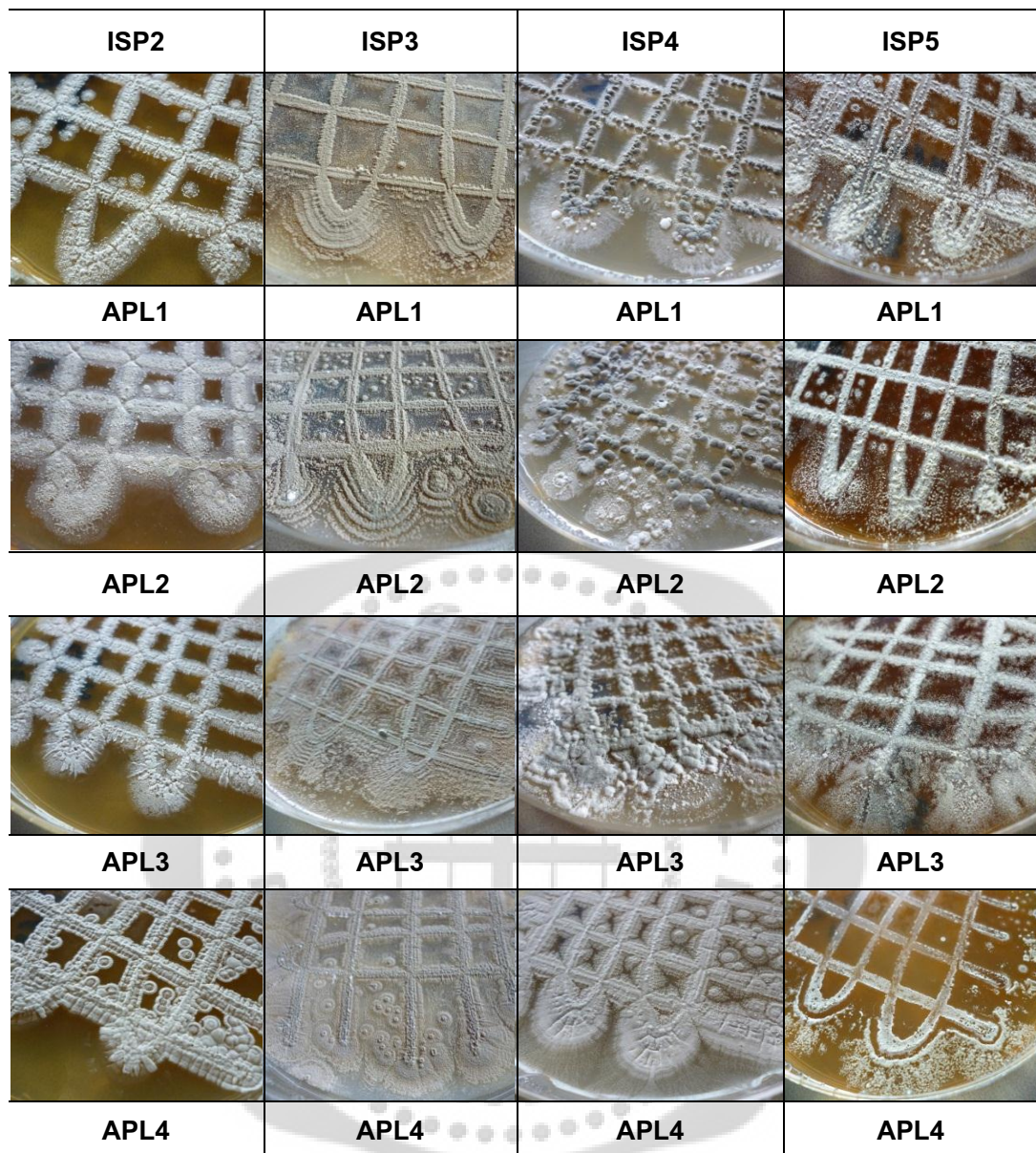
3. การศึกษาทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางชีวเคมีของจุลินทรีย์

3.1 การศึกษาสัณฐานวิทยา (Morphological characterization)

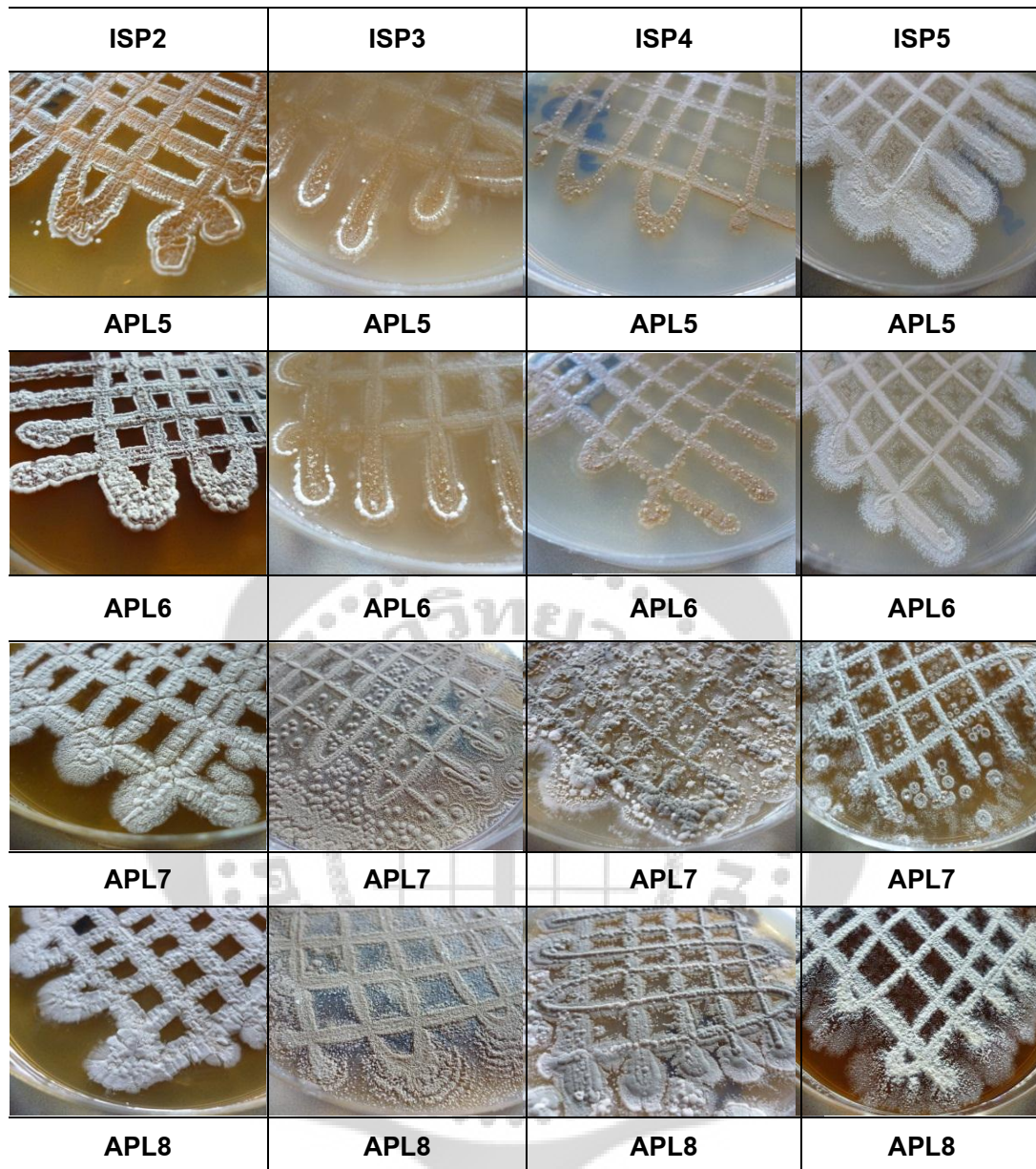
การศึกษาสัณฐานวิทยาของเชื้อแอกติโนมัยซีท 8 สายพันธุ์ โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารแข็ง yeast – malt extract agar (ISP2) พบว่าเชื้อสกุล *Streptomyces* ทั้ง 6 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ APL1, APL2, APL3, APL4, APL7 และ APL8 สร้าง substrate mycelium ที่มีลักษณะเป็นสีครีม แต่พบลักษณะสีของ aerial mycelium ที่แตกต่างกัน โดยสายพันธุ์ APL1, APL2, APL3 และ APL4 มีลักษณะเป็นสีขาว สายพันธุ์ APL7 และ APL8 นั้นพบเป็นสีเทา เชื้อสกุล *Saccharothrix* มีลักษณะ substrate mycelium และ aerial mycelium ที่แตกต่างจากเชื้อสกุล *Streptomyces* ได้แก่ สายพันธุ์ APL5 มีลักษณะ substrate mycelium เป็นแผ่นสีส้มคล้ายยางบริเวณขอบโคโลนีบนพบการสร้าง aerial mycelium สีขาว แตกต่างจากสายพันธุ์ APL6 ที่พบลักษณะ substrate mycelium และ aerial mycelium เป็นสีเทา สายพันธุ์ APL6 เป็นเพียงสายพันธุ์เดียวที่สามารถสร้างรงควัตถุสีน้ำตาลบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ โดยสังเกตจากการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อจากสีส้มเป็นสีน้ำตาล การศึกษาลักษณะของเชื้อเมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง oatmeal agar (ISP3) เชื้อสกุล *Streptomyces* สายพันธุ์ APL1, APL2, APL3, APL4, APL7 และ APL8 มีลักษณะ substrate mycelium และ aerial mycelium เป็นสีน้ำตาล โดยสายพันธุ์ APL8 และ APL2 สามารถสร้างรงควัตถุสีน้ำตาลบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ เชื้อสกุล *Saccharothrix* สายพันธุ์ APL5 และ APL6 นั้นพบลักษณะ substrate mycelium สีน้ำตาล และ aerial mycelium สีขาว การศึกษาลักษณะของเชื้อบนอาหารแข็ง inorganic salt-starch agar (ISP4) เชื้อสกุล *Streptomyces* สายพันธุ์ APL1, APL2, APL3, APL4, APL7 และ APL8 มีลักษณะ aerial mycelium เป็นสีเทา แต่มีลักษณะ substrate mycelium ที่แตกต่างกัน โดยสายพันธุ์ APL1 และ APL8 มีลักษณะ substrate mycelium เป็นสีครีม สายพันธุ์ APL3, APL4 และ APL7 มีลักษณะ substrate mycelium เป็นสีน้ำตาล และสายพันธุ์ APL2 มีลักษณะ substrate mycelium เป็นสีขาว เชื้อสกุล *Saccharothrix* สายพันธุ์ APL5 และ APL6 นั้นไม่พบการสร้าง aerial mycelium และมีลักษณะ substrate mycelium เป็นสีน้ำตาล ไม่พบสายพันธุ์ใดที่สามารถสร้างรงควัตถุได้ การศึกษาลักษณะของเชื้อเมื่อเลี้ยงบนอาหาร glycerol-asparagine agar (ISP5) เชื้อสกุล *Streptomyces* สายพันธุ์ APL1, APL2, APL3, APL7 และ APL8 มีลักษณะ aerial mycelium เป็นสีเทา แต่พบลักษณะ substrate mycelium ที่แตกต่างกัน โดยสายพันธุ์ APL1 และ APL8 พบ substrate mycelium เป็นสีส้ม สายพันธุ์ APL2, APL3 และ APL7 มีลักษณะ substrate mycelium เป็นสีน้ำตาล สายพันธุ์ APL4 มีลักษณะ substrate mycelium และ aerial mycelium ที่แตกต่างจากเชื้อสกุล *Streptomyces* สายพันธุ์อื่น โดยมีลักษณะเป็นสีน้ำตาลทั้ง substrate mycelium และ aerial mycelium เชื้อสกุล *Streptomyces* ทั้ง 6 สายพันธุ์สามารถสร้างรงควัตถุสีเหลืองบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ เชื้อสกุล *Saccharothrix* สายพันธุ์ APL5 และ APL6 มีลักษณะ substrate mycelium เป็นสีครีม และ aerial mycelium เป็นสีขาว จากการเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีท 8 สายพันธุ์ ในอาหาร ISP1, ISP2, ISP3, ISP4 และ ISP 5 นั้นพบว่าเชื้อสกุล

Streptomyces สามารถสร้าง aerial mycelium ได้ดีกว่าเชื้อสกุล *Saccharothrix* โดยลักษณะการเจริญของเชื้อทั้ง 8 สายพันธุ์ บนอาหาร ISP ดังแสดงในภาพประกอบ 19 และ 20





ภาพประกอบ 19 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแอคติโนมัยซีท 4 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ APL1, APL2, APL3 และ APL4 บนอาหารแข็ง ISP2, ISP3, ISP4 และ ISP5



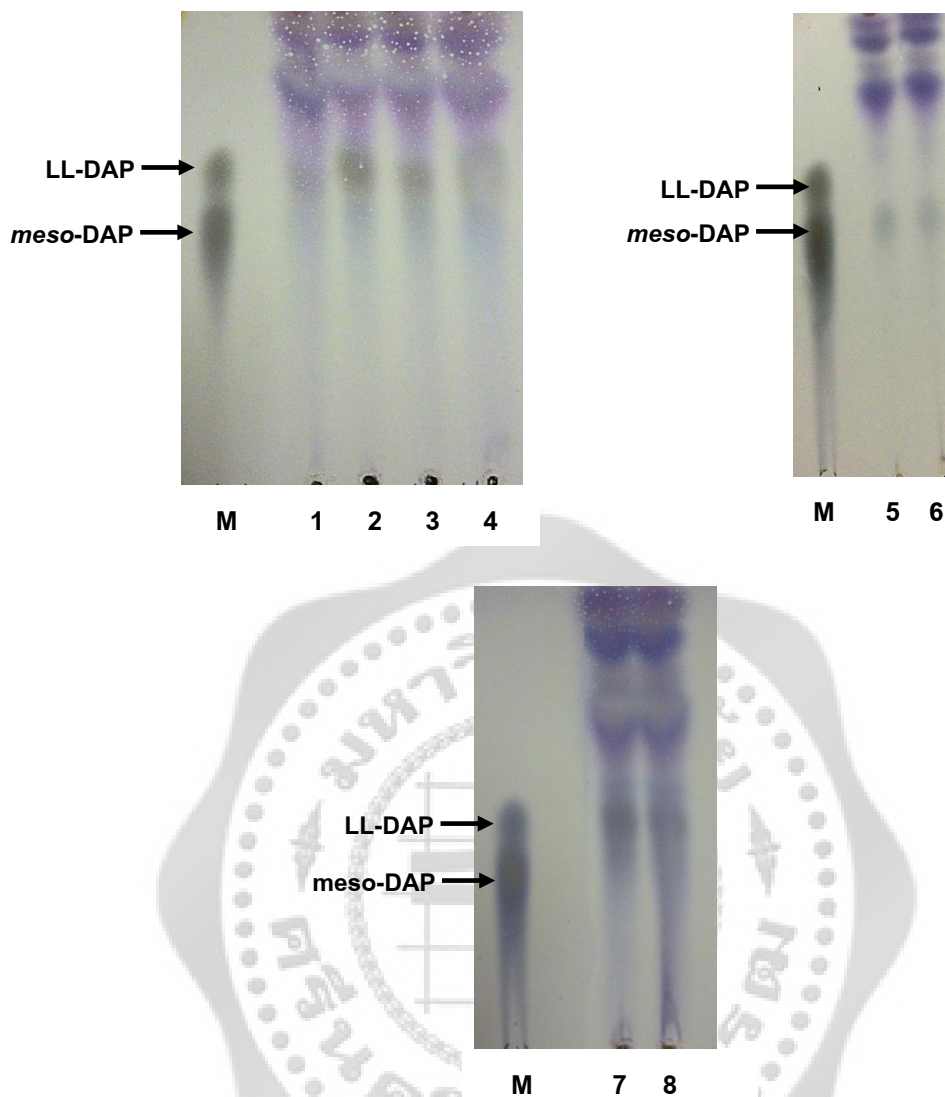
ภาพประกอบ 20 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแอคติโนมัยซีท 4 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ APL5, APL6, APL7 และ APL8 บนอาหารแข็ง ISP2, ISP3, ISP4 และ ISP5

3.1.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบของเซลล์

3.1.1.1 การศึกษาไอโซเมอร์ของ diaminopimelic acid (DAP) ในผนังเซลล์

การศึกษาไอโซเมอร์ของ DAP ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบบนผนังเซลล์ของเชื้อแอคติโนมัยซีท 8 สายพันธุ์ว่าเป็นแบบ LL-isomer หรือ meso-isomer โดยเทียบกับ DAP มาตรฐาน ตรวจสอบโดยการพันด้วยสารละลาย 0.2 เปอร์เซ็นต์ นินไฮดรินผสมกับอะซิโตน จะพบแถบของ DAP โดยตำแหน่งของ LL-isomer จะอยู่เหนือแถบของ meso-isomer เล็กน้อย พบว่าเชื้อสกุล *Streptomyces* สายพันธุ์ APL1, APL2, APL3, APL4, APL7 และ APL8 นั้นมีรูปแบบของ DAP เป็น LL-isomer ทั้งหมด ส่วนเชื้อสกุล *Saccharothrix* สายพันธุ์ APL5 และ APL6 นั้นมีรูปแบบ DAP เป็น meso-isomer ดังแสดงในภาพประกอบ 21





ภาพประกอบ 21 ตำแหน่งไอโซเมอร์ของ DAP จากแอคติโนมัยซีท 8 สายพันธุ์ เปรียบเทียบกับ DAP มาตรฐานบนแผ่น Thin layer chromatography (TLC)

Lane M: LL-isomer และ *meso*- DAP

Lane 1 : Strain APL 1

Lane 2 : Strain APL 2

Lane 3 : Strain APL 3

Lane 4 : Strain APL 4

Lane 5 : Strain APL 5

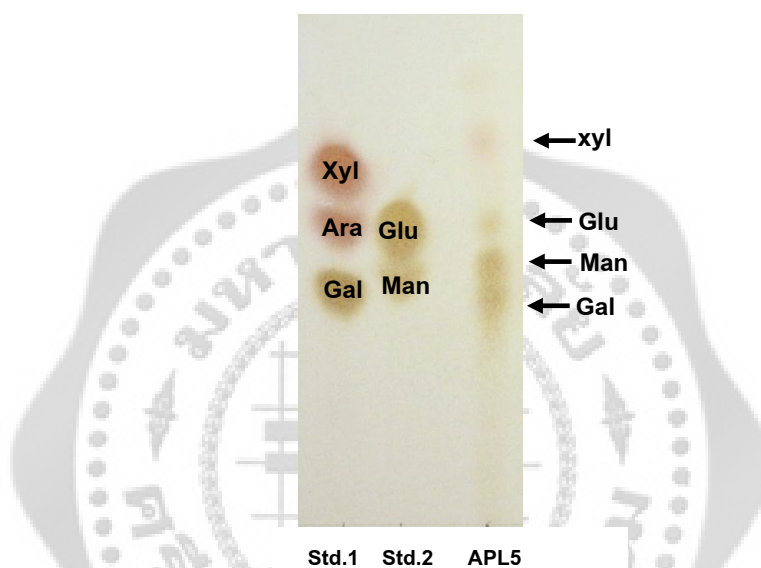
Lane 6 : Strain APL 6

Lane 7 : Strain APL 7

Lane 8 : Strain APL 8

3.1.1.2 การวิเคราะห์น้ำตาลในเซลล์

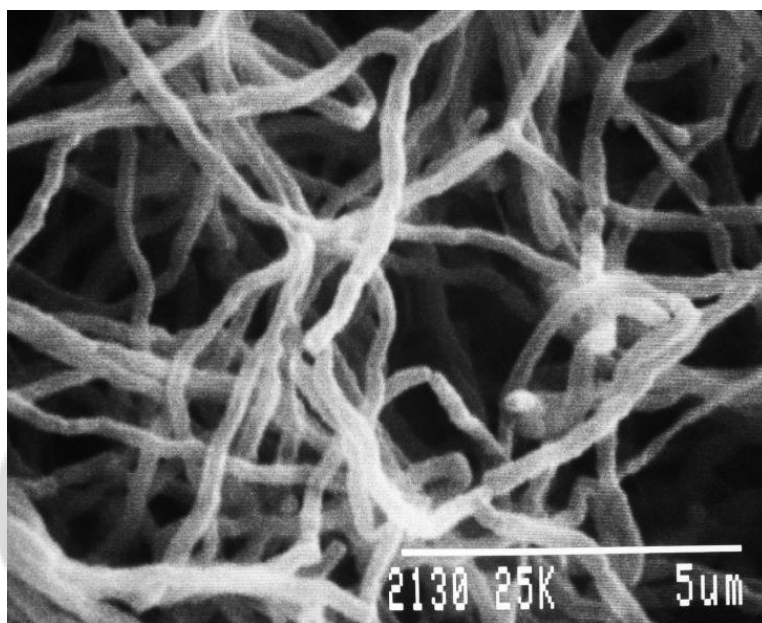
ในการวิเคราะห์น้ำตาลในเซลล์จะทำการศึกษาเชื้อสกุล *Saccharothrix* เนื่องจากเชื้อสกุล *Streptomyces* นั้นมีลักษณะรูปแบบน้ำตาลภายในเซลล์ (Whole-cell sugar pattern) ที่ไม่แน่นอน (Williams R.H. 1989) โดยนำเชื้อ *Saccharothrix* sp. สายพันธุ์ APL5 ที่มาทำการวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลภายในเซลล์ โดยเปรียบเทียบกับน้ำตาลมาตรฐาน พบน้ำตาลกาแลคโตส แมนโนส กลูโคสและไซโลส ดังแสดงตามภาพประกอบ 22



ภาพประกอบ 22 รูปแบบของน้ำตาลในเซลล์ของเชื้อสายพันธุ์ APL5 เปรียบเทียบกับน้ำตาลมาตรฐาน บนแผ่น Thin layer chromatography (TLC) Std.1 : น้ำตาลไซโลส น้ำตาลอะราบิโนส น้ำตาลกาแลคโตส Std.2 : น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลแมนโนส น้ำตาลแรมโนส
Gal : น้ำตาลกาแลคโตส Rham : น้ำตาลแรมโนส
Ara : น้ำตาลอะราบิโนส Man : น้ำตาลแมนโนส
Xyl : น้ำตาลไซโลส Glu : น้ำตาลกลูโคส

3.1.2 การศึกษาลักษณะของเชื้อสายพันธุ์ APL5 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน (SEM)

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Saccharothrix* sp. สายพันธุ์ APL5 บนอาหารแข็ง Rye medium เป็นเวลา 12 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อมีการสร้างสปอร์ผิวเรียบรูปไข่บน aerial mycelium และเกิดการแตกหักของเส้นใย (fragmentation) ดังแสดงตามภาพประกอบ 23



ภาพประกอบ 23 ลักษณะ aerial mycelium ของเชื้อ *Saccharothrix* sp. สายพันธุ์ APL5 โดยเลี้ยงบนอาหาร Rye medium ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (SEM)

ตาราง 7 สรุปผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยสีท

ลักษณะของเชื้อ	สายพันธุ์			
	APL1	APL2	APL3	APL4
DAP type	LL	LL	LL	LL
Morphological character				
ISP2				
Substrate mycelium	Cream	Cream	Cream	Cream
Aerial mycelium	White	White	White	White
ISP3				
Substrate mycelium	Brown	Brown	Brown	Brown
Aerial mycelium	Brown	Brown	Brown	Brown
ISP4				
Substrate mycelium	Cream	White	Brown	Brown
Aerial mycelium	Gray	Gray	Gray	Gray
ISP5				
Substrate mycelium	Orange	Brown	Brown	Brown
Aerial mycelium	Gray	Gray	Gray	Brown

ตาราง 7 (ต่อ)

ลักษณะของเชื้อ	สายพันธุ์			
	APL5	APL6	APL7	APL8
DAP type	<i>meso</i>	<i>meso</i>	LL	LL
Morphological character				
ISP2				
Substrate mycelium	Orange	Gray	Cream	Cream
Aerial mycelium	White	Gray	Gray	Gray
ISP3				
Substrate mycelium	Brown	Brown	Brown	Brown
Aerial mycelium	White	White	Brown	Brown
ISP4				
Substrate mycelium	Brown	Brown	Brown	Cream
Aerial mycelium	-	-	Gray	Gray
ISP5				
Substrate mycelium	Cream	Cream	Brown	Orange
Aerial mycelium	White	White	Gray	Gray

3.2 การศึกษาสรีรวิทยาของเชื้อ (Physiological characterization)

3.2.1 การศึกษาการใช้แหล่งคาร์บอนในการเจริญของเชื้อ

การศึกษาความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนในการเจริญโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสเป็นตัวควบคุม (positive control) เนื่องจากเป็นน้ำตาลที่จุลินทรีย์ส่วนใหญ่สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญได้ พบว่าทุกสายพันธุ์สามารถใช้น้ำตาลอินโนซิทอล ไชโลส แมนโนส แรมโนส กลูโคส และฟรุกโตสได้ โดยสามารถใช้น้ำตาลกลูโคสและฟรุกโตสได้ดีที่สุด น้ำตาลซูโครสและซอร์บิทอล นั้นมีเพียงเชื้อ *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ APL1, APL2, APL3, APL4 และเชื้อ *Saccharothrix* sp. สายพันธุ์ APL5 เท่านั้นที่สามารถใช้ได้ น้ำตาลราฟฟิโนสนั้นมีเพียงเชื้อ *Saccharothrix* sp. สายพันธุ์ APL5 ที่ไม่สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญได้

3.2.2 การศึกษาความสามารถในการทนเค็ม และอุณหภูมิที่ใช้ในการเจริญ

การศึกษาความสามารถในการทนเค็มของเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ที่ความเข้มข้น 2-10 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร พบว่าเชื้อสกุล *Streptomyces* ทั้ง 6 สายพันธุ์นั้นสามารถเจริญได้ถึงความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร เชื้อ *Saccharothrix* sp. สายพันธุ์ APL5 และ APL6 สามารถเจริญได้ในช่วงความเข้มข้น 2-4 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร และไม่มีสายพันธุ์ใดสามารถเจริญได้ที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร

การศึกษาอุณหภูมิที่ใช้ในการเจริญ พบว่าทุกสายพันธุ์สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 30 – 40 องศาเซลเซียส โดยสามารถเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส มีเพียงเชื้อ *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ APL3, APL7 และ APL8 ที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

3.2.3 การศึกษาความสามารถในการย่อยสลายของเชื้อแอกติโนมายซีท

การศึกษาความสามารถในการย่อยสลายของเชื้อแอกติโนมายซีท พบว่าเชื้อทุกสายพันธุ์สามารถย่อยสลายแป้ง (starch) และ skim milk ได้ โดยสังเกตบริเวณสีเหลืองที่เกิดจากการหยดสารละลายไอโอดีนลงบนอาหารที่มีแป้งเป็นส่วนประกอบและสังเกตบริเวณสีที่เกิดขึ้นบนอาหารที่มี skim milk เป็นส่วนประกอบ พบว่าเชื้อ *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ APL1, APL2, APL3, APL7 และ *Saccharothrix* sp. สายพันธุ์ APL6 5 สามารถย่อยสลาย xylan ได้ โดยสังเกตจากบริเวณสีที่เกิดขึ้นรอบโคโลนี พบเพียงเชื้อ *Saccharothrix* sp. สายพันธุ์ APL5 และ APL6 เท่านั้นที่สามารถย่อยสลาย carboxymethylcellulose (CMC) ได้ สังเกตจากการเกิดบริเวณสีล้อมรอบโคโลนี เมื่อทำการย้อมด้วยสี congo red โดยผลการทดลองแสดงดังตาราง 9 การศึกษาการย่อยสลายเซลลูโลส (cellulose) โดยสังเกตการย่อยสลายของกระดาษ Whatman No.1 พบว่าไม่มีสายพันธุ์ใดที่สามารถย่อยสลายได้

ตาราง 8 ผลการศึกษาลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อแอสคิตินอิมยีสท์

ลักษณะของเชื้อ	สายพันธุ์			
	APL1	APL2	APL3	APL4
Growth at				
0% NaCl (control)	+	+	+	+
2 % NaCl	++	++	++	++
4 % NaCl	++	++	++	++
6 % NaCl	+	+	+	+
10 % NaCl	-	-	-	-
Growth temperature				
	30-40 °C	30-40 °C	30-50 °C	30-40 °C
C-utilization				
Glucose (control)	+	+	+	+
Raffinose	+	++	+	+
Inositol	+	+	+	++
Xylose	++	++	+	++
Manitol	++	++	++	++
Arabinose	++	++	++	++
Rhamnose	++	++	+	++
Sucrose	+	+	+	+
Fructose	++	++	++	++
Sorbitol	+	+	+	+

หมายเหตุ : + เจริญเท่า positive control
 : ++ เจริญมากกว่า positive control
 : - ไม่พบการเจริญ

ตาราง 8 (ต่อ)

ลักษณะของเชื้อ	สายพันธุ์			
	APL5	APL6	APL7	APL8
Growth at				
0% NaCl (control)	+	+	+	+
2 % NaCl	+	+	++	++
4 % NaCl	+	+	++	++
6 % NaCl	-	-	++	++
10 % NaCl	-	-	-	-
Growth temperature				
	30-40 °C	30-40 °C	30-50 °C	30-50 °C
C-utilization				
Glucose (control)	+	+	+	+
Raffinose	-	+	++	++
Inositol	+	+	+	+
Xylose	+	+	++	++
Manitol	+	++	++	++
Arabinose	++	+	++	++
Rhamnose	+	+	++	++
Sucrose	+	-	-	-
Fructose	++	++	++	++
Sorbitol	+	-	-	-

หมายเหตุ : + เจริญเท่า positive control
 : ++ เจริญมากกว่า positive control
 : - ไม่พบการเจริญ

ตาราง 9 การศึกษาความสามารถในการย่อยสลายของเชื้อแอคติโนมัยซีท

ลักษณะ	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง (เซนติเมตร)							
	APL1	APL2	APL3	APL4	APL5	APL6	APL7	APL8
Degradation								
CMC	-	-	-	-	2.25	2.55	-	-
xylan	2.3	2.1	2.2	-	2.4	2.6	-	-
Starch	2.4	2.5	2.0	2.8	2.6	2.2	2.6	2.0
Skim milk	2.0	2.2	2.4	3.0	3.2	3.4	2.3	2.8

หมายเหตุ : - ไม่พบการย่อยสลาย

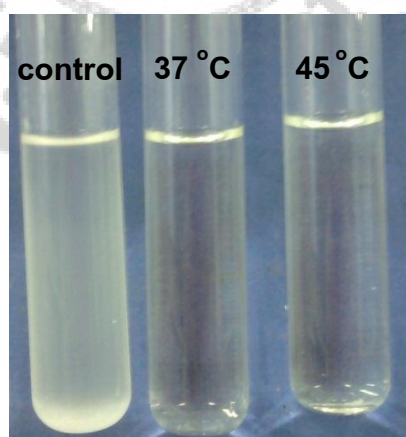
4. การศึกษาการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ

4.1 การศึกษาค่า pH และ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ

เนื่องจากเชื้อ *Saccharothrix* sp. สายพันธุ์ APL5 สามารถเกิดบริเวณใสบนอาหารแข็ง PBSA ได้ดีที่สุด ดังผลที่แสดงในตาราง 5 การทดลองในขั้นตอนนี้จึงทำการเลี้ยงเชื้อในอาหาร basal medium broth ที่ค่า pH 7-8 โดยใช้ PBSA ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PBSA ที่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์จำเพาะ (specific activity) ได้สูงสุดเท่ากับ 6.40 ยูนิต์ต่อมิลลิกรัมโปรตีน (U/mg) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ค่า pH 7 เป็นเวลา 96 ชั่วโมง พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อมีลักษณะใสกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อในชุดควบคุม ดังภาพประกอบ 24 ดังนั้นจึงใช้สภาวะดังกล่าวในการเลี้ยงเชื้อเพื่อศึกษาแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพของเชื้อสายพันธุ์ APL5 ในขั้นตอนนี้ต่อไป โดยค่าการทำงานของเอนไซม์จำเพาะทั้งหมดแสดงดังตาราง 10

ตาราง 10 ค่ากิจกรรมเอนไซม์จำเพาะของเอนไซม์ย่อยสลาย PBSA ของเชื้อสายพันธุ์ APL5

เวลา	ค่ากิจกรรมเอนไซม์จำเพาะ (U/mg protein)			
	37 องศาเซลเซียส		45 องศาเซลเซียส	
	pH 7	pH 8	pH 7	pH 8
24 ชั่วโมง	0	0	0	0
48 ชั่วโมง	1.85	1.16	0	0
72 ชั่วโมง	5.25	2.24	0	0
96 ชั่วโมง	6.40	4.37	2.26	1.63
120 ชั่วโมง	3.21	2.11	1.92	1.06
144 ชั่วโมง	1.88	1.46	1.03	0.94
168 ชั่วโมง	1.2	0.3	0.88	0.45

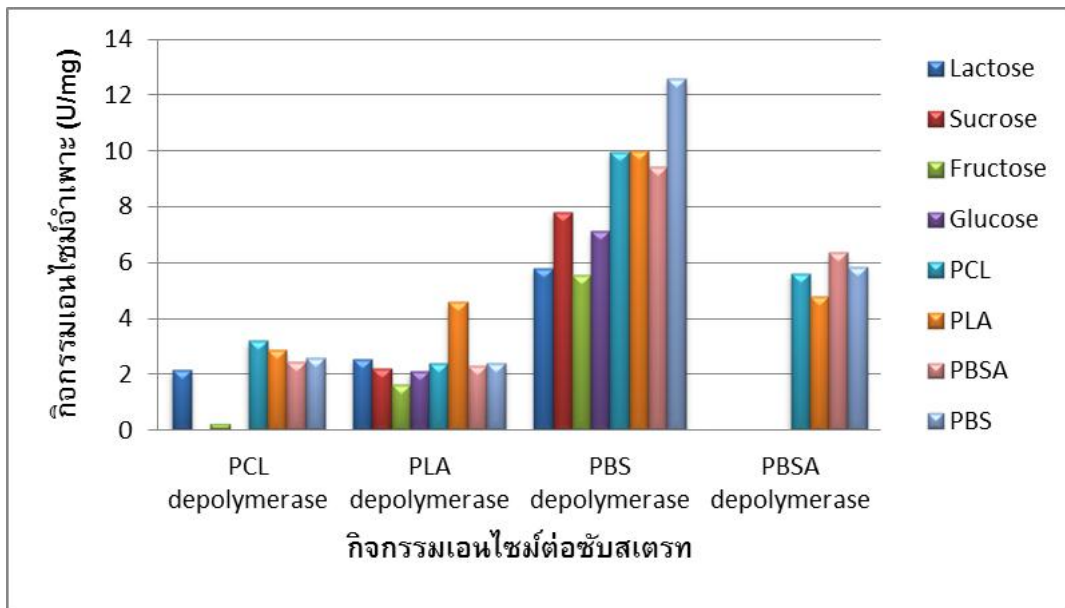


ภาพประกอบ 24 การเปรียบเทียบระหว่างชุดควบคุม (control) กับ PBSA -basal medium broth ที่มีการเลี้ยงเชื้อสาย *Saccharothrix* sp. สายพันธุ์ APL5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 168 ชั่วโมง

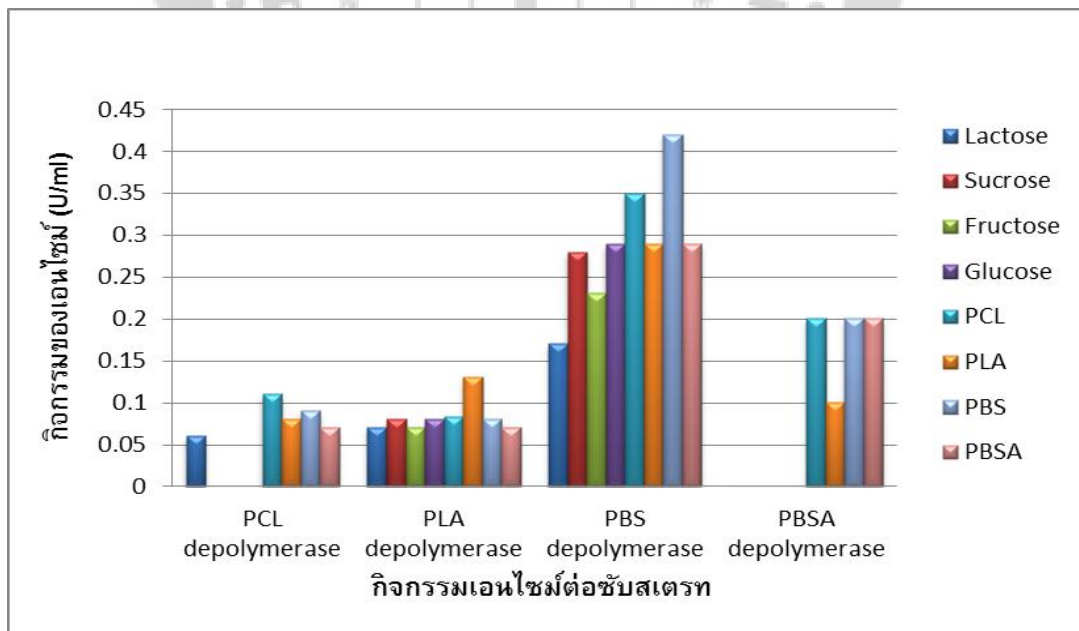
4.2 การศึกษาแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลายพลาสติก

ชีวภาพ

การเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ APL5 ในอาหาร basal medium broth ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน พบว่าเชื้อสามารถใช้ PCL, PLA, PBS และ PBSA เป็นแหล่งคาร์บอนในการสร้างเอนไซม์ย่อยสลาย PCL, PLA, PBS และ PBSA ที่มีค่าการทำงานของเอนไซม์จำเพาะได้ดีที่สุด ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 96 ชั่วโมง โดยเชื้อสามารถใช้ PCL, PLA, PBS และ PBSA เป็นแหล่งคาร์บอนในการสร้างเอนไซม์ย่อยสลาย PCL (PCL depolymerase) ที่มีค่าการทำงานของเอนไซม์จำเพาะเท่ากับ 3.18, 2.86, 2.6 และ 2.41 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน การผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PBS (PBS depolymerase) เชื้อสามารถใช้ PBS, PLA, PCL และ PBSA เป็นแหล่งคาร์บอนในการสร้างเอนไซม์ที่มีค่าการทำงานของเอนไซม์จำเพาะเท่ากับ 12.6, 10.02, 9.95 และ 9.43 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน และการเอนไซม์ย่อยสลาย PBSA (PBSA depolymerase) เชื้อสามารถใช้ PBSA, PBS, PCL และ PLA เป็นแหล่งคาร์บอนในการสร้างเอนไซม์ที่มีค่าการทำงานของเอนไซม์จำเพาะเท่ากับ 6.34, 5.84, 5.61 และ 4.8 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อสามารถใช้น้ำตาลแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PCL, PLA และ PBS ที่มีค่าการทำงานของเอนไซม์จำเพาะเท่ากับ 2.14, 2.53 และ 5.8 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน แต่ไม่สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PBSA ได้ โดยผลการทดลองทั้งหมดแสดงดังภาพประกอบ 25 จากการศึกษาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าเชื้อสามารถผลิตได้ปริมาณสูงเมื่อใช้พลาสติกชีวภาพเป็นแหล่งคาร์บอน โดยเชื้อสามารถใช้ PCL, PLA และ PBSA เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PCL, PLA และ PBSA ที่มีปริมาณเท่ากับ 0.11, 0.13 และ 0.2 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (U/ml) ตามลำดับ เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PBS ได้ปริมาณสูงที่สุดเท่ากับ 0.42 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้ PBS เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิต โดยผลที่ได้นั้นสอดคล้องกับการศึกษาค่าการทำงานของเอนไซม์จำเพาะ นอกจากนี้เชื้อยังสามารถใช้น้ำตาลแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PCL และ PLA ที่มีปริมาณเอนไซม์เท่ากับ 0.06 และ 0.07 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PBS ได้ปริมาณสูงถึง 0.29 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ดังแสดงในภาพประกอบ 26



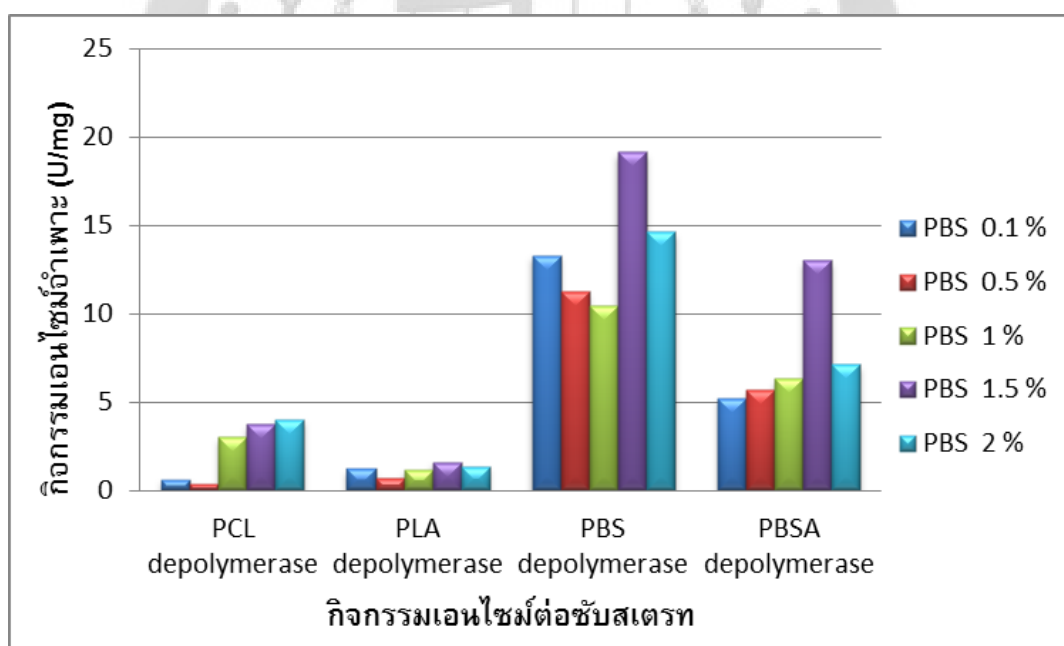
ภาพประกอบ 25 ค่ากิจกรรมเอนไซม์จำเพาะของเอนไซม์ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ (U/mg) เมื่อเลี้ยงในแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆที่ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง



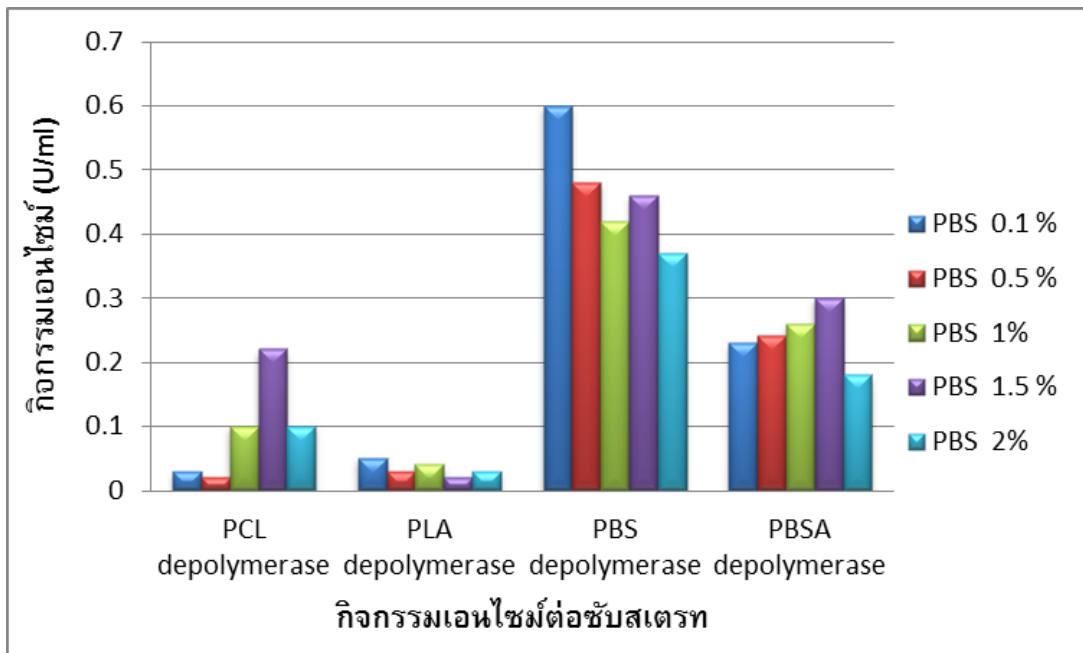
ภาพประกอบ 26 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ (U/ml) เมื่อเลี้ยงในแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆที่ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

4.3 การศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ

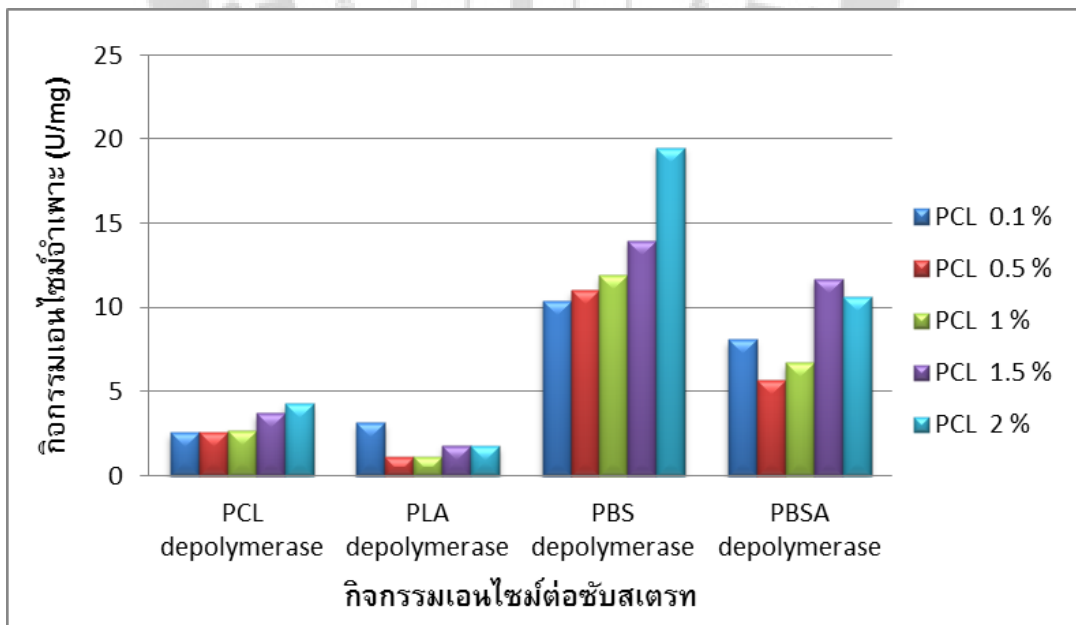
การศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนพบว่าเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดเมื่อใช้ PBS ที่ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PCL PLA, PBS และ PBSA ที่มีค่าการทำงานของเอนไซม์จำเพาะเท่ากับ 3.7, 1.58, 19.1 และ 13 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง เชื้อยังสามารถใช้ PCL ที่ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PCL, PLA, PBS และ PBSA ที่มีค่าการทำงานของเอนไซม์จำเพาะเท่ากับ 3.7, 1.8, 14 และ 11.7 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนตามลำดับ แสดงผลการทดลองดังภาพประกอบ 27 และ 29 การศึกษาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพต่อปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PBS ได้ปริมาณสูงที่สุดเมื่อใช้ PBS ที่ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีปริมาณเอนไซม์เท่ากับ 0.6 หน่วยต่อมิลลิตร (U/ml) และเชื้อสามารถใช้ PCL ที่ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PBS ได้ปริมาณสูงที่สุดเท่ากับ 0.54 หน่วยต่อมิลลิตรดังแสดงในภาพประกอบ 28 และ 30 ตามลำดับ



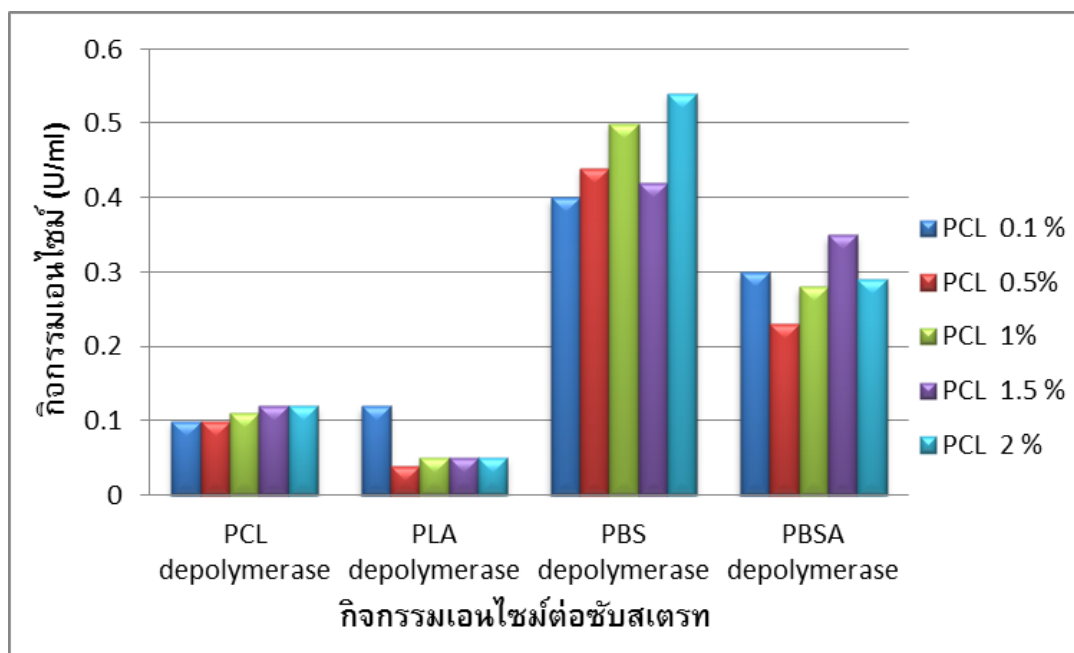
ภาพประกอบ 27 ค่ากิจกรรมเอนไซม์จำเพาะของเอนไซม์ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ (U/mg) เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่า pH 7 โดยใช้ PBS ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 96 ชั่วโมง



ภาพประกอบ 28 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ของเอนไซม์ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ (U/ml) เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่า pH 7 โดยใช้ PBS ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นแหล่งคาร์บอนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง



ภาพประกอบ 29 ค่ากิจกรรมเอนไซม์จำเพาะของเอนไซม์ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ (U/mg) เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่า pH 7 โดยใช้ PCL ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 96 ชั่วโมง

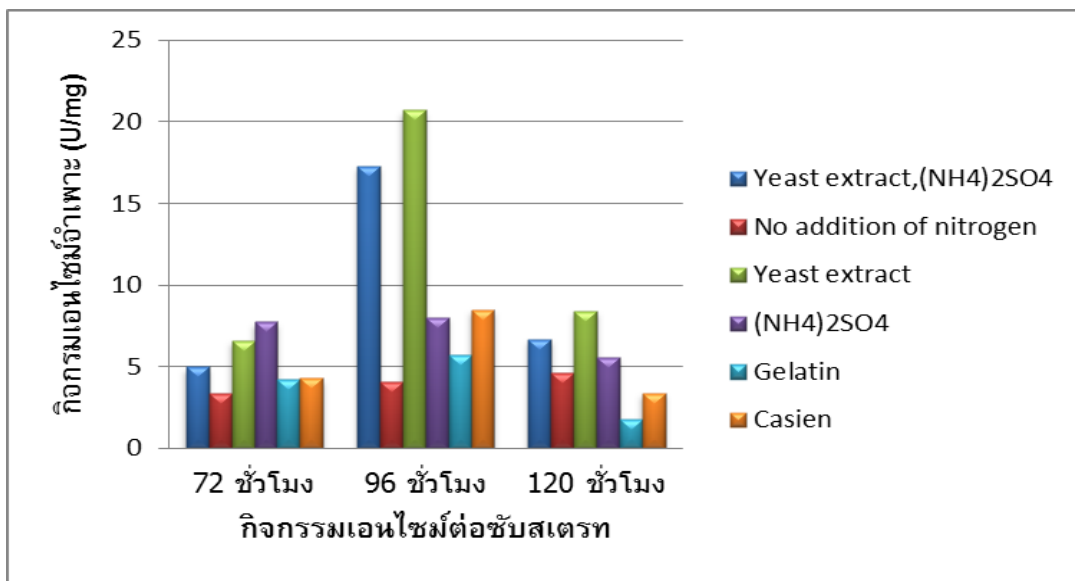


ภาพประกอบ 30 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ของเอนไซม์ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ (U/ml) เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่า pH 7 โดยใช้ PCL ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นแหล่งคาร์บอนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 96 ชั่วโมง

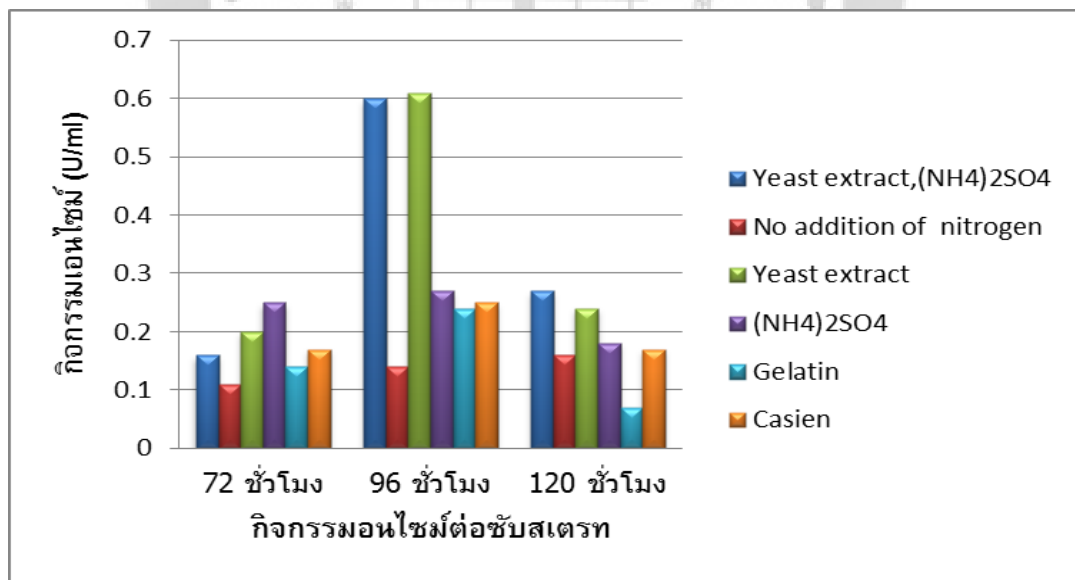
4.4 การศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ

การศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ พบว่าเชื้อสายพันธุ์ APL5 สามารถใช้ PBS ที่ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดในขั้นตอนนี้จึงได้ใช้ PBS ที่ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน และมีใช้แหล่งไนโตรเจนที่ต่างกัน ดังนี้ Yeast extract กับ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Yeast extract, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Gelatin, Casien และไม่เติมแหล่งไนโตรเจน

จากผลการศึกษาพบว่า การใช้ Yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงอย่างเดียวเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PBS (PBS depolymerase) ที่มีค่าการทำงานของเอนไซม์จำเพาะเท่ากับ 20.7 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งสูงกว่าสูตรอาหารปกติที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย Yeast extract และ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 96 ชั่วโมง แสดงผลการทดลองดังภาพประกอบ 31 การศึกษาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ PBS depolymerase ได้ปริมาณสูงที่สุดเมื่อใช้ Yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยมีปริมาณเอนไซม์เท่ากับ 0.61 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งพบปริมาณเอนไซม์มากกว่าการใช้ Yeast extract กับ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงเล็กน้อย ดังแสดงในภาพประกอบ 32



ภาพประกอบ 31 ค่าการทำงานของเอนไซม์จำเพาะของเอนไซม์ (U/mg) ย่อยสลาย PBS เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่า pH 7 ใช้ PBS ที่ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอนและใช้แหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 96 ชั่วโมง

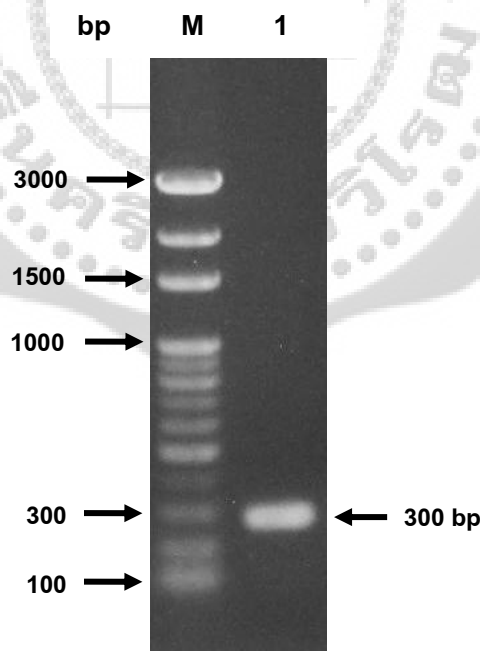


ภาพประกอบ 32 ค่าการทำงานของเอนไซม์ (U/ml) ย่อยสลาย PBS เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่า pH 7 ใช้ PBS ที่ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอนและใช้แหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 96 ชั่วโมง

5. การศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ โดยใช้ Degenerated primer

การใช้ degenerated primer นั้นเป็นเทคนิคที่ใช้ในการหาลำดับเบสของยีนที่ต้องการศึกษาจากเชื้อสายพันธุ์ APL5 โดยการทดลองนี้จะใช้ degenerate primer ที่ถูกออกแบบจากบริเวณลำดับกรดอะมิโนอนุรักษ์ (conserved sequence) ของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Streptomyces* ร่วมกับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ไลเปสและเอนไซม์เอสเทอร์เอสจากเชื้อที่มีรายงานการวิจัยว่าสามารถผลิตเอนไซม์ในการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพได้

จากการทดลองพบว่า degenerated primer สามารถสังเคราะห์และเพิ่มจำนวนยีนของเอนไซม์ในกลุ่มที่มีขนาด 300 คู่เบส ดังแสดงในภาพประกอบ 33 เนื่องจากพบลำดับกรดอะมิโนจำเพาะ Gly-His-Ser-Met-Gly ที่คล้ายกับบริเวณ lipase box ของเอนไซม์ไลเปส ที่มีลำดับกรดอะมิโนเป็น Gly-X₁-Ser-X₂-Gly ดังแสดงในภาพประกอบ 34 และเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนในฐานข้อมูลพบว่ามีความคล้ายกับเอนไซม์ triacylglycerol lipase ของเชื้อ *Streptomyces flavogriseus* สายพันธุ์ ATCC 33331 81 เปอร์เซ็นต์คล้ายกับเอนไซม์ไลเปสของเชื้อ *Streptomyces pristinaespiralis* สายพันธุ์ ATCC 25486 78 เปอร์เซ็นต์ และคล้ายกับเอนไซม์ Triacylglycerol lipase ของเชื้อ *Amycolatopsis* sp. สายพันธุ์ ATCC 39116 77 เปอร์เซ็นต์



ภาพประกอบ 33 ขนาดของเอนไซม์ไลเปส (*lpa5*) ที่มีขนาดเท่ากับ 300 คู่เบส ที่ได้จากการทำ PCR เมื่อเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100bp DNA Ladder marker

```

S.coeli      TESSIEALRGPYSVADTSVSSLAVTFGGGGTIYYPTSTSDGTFGAVVIAPGFTAYQSSIA 119
S.albus     TRASIEAPRGPYAVSQTSVSSLVVSFGGGGTIYYPTSTGDGTFGAVVVIIPGFTATESSMA 113
S.exfol     TNASIEASRGPYATSQTSVSSLVASGFGGGTIYYPTSTADGTFGAVVISPGFTAYQSSIA 119
LPA5       -----GFGGGTIYYPTSTGDGTFGAVVAIPGFTATQSSLS 35
T.alba     TESMLEARSGPFSVSEERASRFADGFGGGTIYYPR--ENNTYGAI AISPGYTGTQSSIA 107
AcidoPBSA  TTSSLEASRGPFSYQSFVTS--RPSGYRAGTVYYPTN-AGGPVGAIAIVPGFTARQSSIN 109
              *: .**:* **  ... **:. **:* .**:*

```

```

S.coeli      WLGPRLASQGFVVFTIDTNTTLDQPDSRGRQLLAALDYLTG-----RSSVRGRIDSGRLG 174
S.albus     WLGPRLASQGFVVFTIDTLTTLDPDSRGRQMLAALDYLTE-----RSSARTRIDGTRLG 168
S.exfol     WLGPRLASQGFVVFTIDTNTTLDQPDSRGRQLLSALDYLTQ-----RSSVTRVVDATRLG 174
LPA5       WLGPRLASQGFVVIIIDTNSRYDQPSSRD-QLLAALDYLT-----TSSRSRVDASRLG 88
T.alba     WLGERIASHGFVVIAIDTNTTLDQPDSRARQLNAALDYMLTDA---SSAVNRIDASRLA 164
AcidoPBSA  WWGPRLASHGFVVITIDTNTSLDQPDSRSRQQAALSQVAILSRITSSSPIYNKVDTSRLG 169
              * * *:*:*:*:*: * * : * * . * * : * * . * * . : * * .

```

```

S.coeli      VMGHSMGGGGTLEAAKSRPSLQAAIPLTPWNLDKSWPEVSTPTLVVVGADGDTIAPVASHA 234
S.albus     VMGHSMGGGGTLEAAKSRPSLKAAIPLTPWNLDKTWPEVITPTLVVVGADGDTVAPVATHA 228
S.exfol     VMGHSMGGGGTLEAAKSRPSLKAAIPLTGWNTDKTWPELRTPTLVVVGADGDTVAPVATHS 234
LPA5       VMGHSMGGGGTLE----- 100
T.alba     VMGHSMGGGGTLERLASQRPDLKAAIPLTPWHLNKSWRDITVPTLIIIGAEYDTIASVTLHS 224
AcidoPBSA  VMGWSMGGGGSLISARNNPISIKAAAPQAPWSASKNFSSLTVPPLIIACENDTIAPVNHQA 229
              * * * * * * * * *

```

Gly-X₁-Ser-X₂-Gly

ภาพประกอบ 34 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ (lpa5) กับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Streptomyces coelicolor* สายพันธุ์ A3(2) M145 (*S. coeli*), *Streptomyces albus* (*S. albus*), *Streptomyces exfoliates* สายพันธุ์ M11 (*S.exfol*), *Acidovorax delafieldii* สายพันธุ์ BS-3 (*A.delafieldii*) และลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์เอสเทอเรสจากเชื้อ *Thermobifida alba* สายพันธุ์ AHK119 (*T. alba*) ภายในกรอบแสดงบริเวณ lipase box

บทที่ 5

สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

การแยกเชื้อแบคทีเรียที่ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพจากตัวอย่างจากดินที่เกิดจากการทับถมกันของกองขยะหรือปุ๋ยหมัก บริเวณต่างๆของประเทศไทยทั้งหมด 17 ตัวอย่าง สามารถแยกเชื้อที่ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพบนอาหารแข็ง (bioplastic agar plate) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ได้ทั้งหมด 40 ไอโซเลท ได้แก่ เชื้อที่ย่อยสลายบนอาหารแข็ง PLA 9 ไอโซเลท คิดเป็น 22.5 เปอร์เซ็นต์จากเชื้อทั้งหมด เชื้อที่ย่อยสลาย PCL 18 ไอโซเลท คิดเป็น 45 เปอร์เซ็นต์จากเชื้อทั้งหมด เชื้อที่ย่อยสลาย PBS 15 ไอโซเลทคิดเป็น 37.5 เปอร์เซ็นต์จากเชื้อทั้งหมด และเชื้อที่ย่อยสลาย PBSA 6 ไอโซเลท คิดเป็น 15 เปอร์เซ็นต์จากเชื้อทั้งหมด ตามลำดับ จำนวนเชื้อที่แยกได้สอดคล้องกับจำนวนประชากรเชื้อที่สามารถย่อยสลายพลาสติกชีวภาพในดิน โดยมีปริมาณเชื้อที่ย่อยสลาย PCL ได้มากกว่า PBS และ PLA (Pranamuda, H.; Tokiwa, Y.; & Tanaka, H. 1997: 1637–1640; Tansengco, M.L.; & Tokiwa, Y. 1998:133-138) พบ 8 ไอโซเลท ที่สามารถย่อยสลายพลาสติกชีวภาพได้มากกว่า 1 ชนิด ได้แก่ APL1, APL2, APL3, APL4, APL5, APL6, APL7 และ APL8 เมื่อทำการจัดจำแนกด้วยวิธีวิเคราะห์บริเวณ 16S rDNA และการนำลำดับเบสของเชื้อทั้ง 8 สายพันธุ์ มาใช้ในการสร้างแผนภูมิทางวิวัฒนาการ โดยสามารถจำแนกเชื้อแอกติโนมัยซีททั้ง 8 สายพันธุ์ได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มเชื้อสกุล *Saccharothrix* ประกอบด้วยสายพันธุ์ APL5 และ APL6 ซึ่งมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันและแยกตัวออกจากกลุ่มของเชื้อสกุล *Streptomyces* 6 สายพันธุ์อย่างชัดเจน

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอกติโนมัยซีท โดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร ISP พบว่าการเจริญของเชื้อสกุล *Saccharothrix* มีลักษณะการสร้าง aerial mycelium, substrate mycelium และสีของมวลสปอร์ (color of spore mass) แตกต่างจากเชื้อสกุล *Streptomyces* การศึกษาชนิดไอโซเมอร์ของ diaminopimelic acid (DAP) พบว่าเชื้อทั้ง 2 สกุลมีลักษณะ DAP ที่แตกต่างกัน โดยเชื้อสกุล *Streptomyces* มีรูปแบบ DAP เป็น LL-isomer เชื้อสกุล *Saccharothrix* มีรูปแบบเป็น meso-isomer ซึ่งเป็นลักษณะของแอกติโนมัยซีทในกลุ่มที่ไม่ใช่สเตรปโตมัยซีท (non-streptomyces) (Williams et al., 1989) ของเชื้อสกุล *Saccharothrix* พบน้ำตาลไซโลส กลูโคส

กาแลคโตส และแมนโนส ซึ่งสอดคล้องกับชนิดของน้ำตาลที่พบในผนังเซลล์ของเชื้อสกุล *Saccharothrix* คือ น้ำตาลกาแลคโตส และน้ำตาลแมนโนส (Labeda D.P.; et al. 1984:426-431; Labeda D.P; & Lyons A.J.1989:355-358; Xia, Yan; et al.2012:141-146)

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Saccharothrix* sp. สายพันธุ์ APL5 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่าเชื้อมีการสร้างสปอร์ผิวเรียบรูปไข่บน aerial mycelium และสามารถเกิดการแตกหักของเส้นใย (fragmentation) ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะโครงสร้างของเชื้อในสกุล *Saccharothrix* (Xia, Yan; et al.2012:141-146)

การศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาเชื้อแอคติโนมัยซีทโดยศึกษาแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการเจริญ พบว่าทุกสายพันธุ์สามารถใช้น้ำตาลฟรุกโตสได้ดีที่สุด มีเพียงบางสายพันธุ์เท่านั้นที่สามารถใช้น้ำตาลซูโครส ซอร์บิทอล และราฟิโนสได้ การศึกษาความสามารถในการทนเค็มเชื้อสกุล *Streptomyces* สามารถเจริญในอาหารที่มีความเข้มข้นของ NaCl สูงได้ดีกว่าเชื้อสกุล *Saccharothrix* ที่สามารถเจริญในอาหารที่มีความเข้มข้นของ NaCl ระหว่าง 2-4 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร การศึกษาอุณหภูมิที่ใช้ในการเจริญของเชื้อ พบว่าทุกสายพันธุ์สามารถเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งใกล้เคียงกับอุณหภูมิปกติที่เชื้อใช้ในการเจริญ เชื้อสายพันธุ์ APL3, APL7 และ APL8 สามารถเจริญได้ถึงอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จึงจัดเป็นพวกชอบร้อน (Thermophile) การศึกษาความสามารถในการย่อยสลายของทั้ง 8 สายพันธุ์ พบว่าทุกสายพันธุ์สามารถย่อยสลายแป้งและ skim milk ได้ พบเชื้อสกุล *Streptomyces* 3 สายพันธุ์และสกุล *Saccharothrix* 2 สายพันธุ์ที่สามารถย่อยสลาย xylan ได้ มีเพียงเชื้อ *Saccharothrix* สายพันธุ์ APL5 และ APL6 เท่านั้นที่สามารถย่อยสลาย carboxymethylcellulose (CMC) และทุกสายพันธุ์ไม่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้

การศึกษาค่า pH และ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพของเชื้อ *Saccharothrix* sp. สายพันธุ์ APL5 พบว่าอาหารที่มีค่า pH 7 และเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อและการทำงานของเอนไซม์ โดยเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PBSA ที่มีค่าการทำงานจำเพาะได้สูงที่สุดเท่ากับ 6.4 ยูนิต์ต่อมิลลิกรัมโปรตีน การศึกษาแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ พบว่าเมื่อใช้ PCL, PLA, PBS และ PBSA เป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพที่มีค่าการทำงานของเอนไซม์จำเพาะต่อพลาสติกชีวภาพชนิดนั้นได้สูง ซึ่งเชื้อจะสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PCL, PLA, PBS และ PBSA ที่มีค่าการทำงานจำเพาะเท่ากับ

3.18, 4.58, 12.6 และ 5.35 ยูนิต์ต่อมิลลิกรัมโปรตีน การใช้ PBS ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์มีค่าการทำงานของเอนไซม์จำเพาะต่อพลาสติกชีวภาพได้มากกว่า 1 ชนิด เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLA, PCL, PBS และ PBSA ที่มีค่าการทำงานของเอนไซม์จำเพาะเท่ากับ 7.26, 2.6, 12.6 และ 5.84 ยูนิต์ต่อมิลลิกรัมโปรตีน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 96 ชั่วโมง นอกจากการใช้พลาสติกชีวภาพแล้วเชื้อยังสามารถใช้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PCL, PLA และ PBS ได้ เอนไซม์ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพที่เชื้อผลิตขึ้นจึงจัดอยู่ในกลุ่มของ constitutive enzyme เป็นเอนไซม์ที่มีความจำเป็นต่อการดำรงชีวิตของเซลล์ซึ่งถูกผลิตขึ้นอยู่ตลอดเวลา ในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PBSA ต้องใช้พลาสติกชีวภาพเป็นแหล่งคาร์บอนเท่านั้นเชื้อจึงสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพได้ เอนไซม์ที่เชื้อผลิตขึ้นจึงจัดอยู่ในกลุ่มของ inducible enzyme เนื่องจากเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ได้ต่อเมื่อมีสภาวะที่ชักนำให้เกิดการสร้างเอนไซม์เท่านั้น (หัทธยา กาวีวงศ์. 2546) การศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลาย PCL, PLA, PBS และ PBSA ได้ดีที่สุด เมื่อใช้ PBS ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน โดยสามารถผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลาย PCL, PLA, PBS และ PBSA ที่มีค่าการทำงานของเอนไซม์จำเพาะเท่ากับ 3.7, 1.58, 20.7 และ 13 ยูนิต์ต่อมิลลิกรัมโปรตีนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง การศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่ส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์ พบว่าการเลี้ยงเชื้อโดยใช้ PBS ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน และ Yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจนนั้น เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PBS ที่มีค่าการทำงานของเอนไซม์จำเพาะที่สูงกว่าสูตรอาหารปกติที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อที่ใช้ yeast extract กับ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน แต่เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณเท่ากันกับการใช้ Yeast extract กับ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

ดังนั้นจากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพของเชื้อสายพันธุ์ APL5 พบว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่า pH 7 โดยใช้พลาสติกชีวภาพ PBS ที่ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PBS ที่มีค่าการทำงานจำเพาะสูงที่สุดเท่ากับ 20.7 ยูนิต์ต่อมิลลิกรัมโปรตีน

จากการศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ พบว่าเชื้อสายพันธุ์ APL5 สามารถใช้ PBS เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ

(depolymerase) ได้ดีกว่า PCL โดยเอนไซม์ที่เชื้อผลิตขึ้นมีความสามารถคล้ายกับเอนไซม์กลุ่ม esterase-lipase superfamily (serine hydrolase) เนื่องจากโครงสร้างของ PBS มีลักษณะที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายของเอนไซม์ไลเปส มากกว่าโครงสร้างของ PCL โดยส่วน succinate unit บริเวณปลายพอลิเมอร์ของ PBS มีลักษณะคล้ายโมเลกุลของกลีเซอรอล และส่วนโอลิโกเมอร์ หรือ 4-hydroxybutyl succinate (4HBS) มีลักษณะเป็นสายคาร์บอนยาวคล้ายกรดไขมัน (Lee; Kimura; & Chung. 2008: 651-658) ดังนั้นการใช้ PBS เป็นแหล่งคาร์บอนจึงสามารถกระตุ้นให้เชื้อเกิดการสร้างเอนไซม์ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ (depolymerase) ที่มีลักษณะคล้ายเอนไซม์ไลเปสได้ เอนไซม์ depolymerase ยังสามารถย่อยสลาย PBSA ที่มีลักษณะโครงสร้างคล้ายกับ PBS และย่อยสลาย PCL กับ PLA ที่มีลักษณะเป็น aliphatic polyester ได้ เอนไซม์สามารถย่อยสลาย PCL ได้เนื่องจากโครงสร้างของ ϵ -caprolactone ซึ่งเป็นมอนอเมอร์ของ PCL มีลักษณะคล้ายกรดไขมัน โดย ϵ -caprolactone มีลักษณะเป็นไฮโดรคาร์บอนสายยาวและพบหมู่คาร์บอนซิลอยู่บริเวณปลายโมเลกุลซึ่งเป็นบริเวณที่เอนไซม์สามารถย่อยสลายได้ (Sivalingam G.; Chattopadhyay S.; & Madras G. 2003:2911-2919) เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PLA ที่มีลักษณะแตกต่างจากเชื้อสกุล *Saccharothrix* สายพันธุ์อื่นๆ ที่มีลักษณะคล้ายเอนไซม์โปรติเอส (Jarerat A.; Pranamuda H.; & Tokiwa Y. 2002: 420–428) เอนไซม์ที่ย่อยสลาย PLA ได้ส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่มของเอนไซม์โปรติเอส เนื่องจากเอนไซม์มีความจำเพาะต่อพันธะ α - ester ของ PLA และโครงสร้างของ PLA มีลักษณะเป็น analogue กับกรดอะมิโน L-alanine (Lim; Raku; & Tokiwa. 2005: 459-464; Jarerat, A.; Tokiwa Y.;& Tanaka H. 2004: 139-146) ทำให้เอนไซม์โปรติเอสสามารถย่อยสลาย PLA ได้ดีกว่าเอนไซม์ไลเปสและเอสเทอเรส ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่พบว่าเอนไซม์ที่สร้างขึ้นมีค่าการทำงานของเอนไซม์จำเพาะต่อ PLA น้อยที่สุด

การศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพจากเชื้อสายพันธุ์ APL5 โดยใช้ degenerated primer ที่ออกแบบจากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายพลาสติกชีวภาพได้ โดยพบว่า degenerate primer สามารถสังเคราะห์และเพิ่มจำนวนยีนที่มีขนาด 300 คู่เบส โดยพบลำดับกรดอะมิโนจำเพาะ Gly-His-Ser-Met-Gly ที่คล้ายกับ Gly-X₁-Ser-X₂-Gly ในบริเวณ lipase box ของเอนไซม์กลุ่ม esterase-lipase superfamily (serine hydrolase) เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนในฐานข้อมูลพบว่ามี ความคล้ายกับเอนไซม์ triacylglycerol lipase ของเชื้อ *Streptomyces flavogriseus* สายพันธุ์ ATCC 33331 (YP_004925694.1) 81 เปอร์เซ็นต์คล้ายกับเอนไซม์ไลเปสของเชื้อ *Streptomyces pristinaespiralis* สายพ

พันธุ์ ATCC 25486 (ZP_06912326.1) 78 เปอร์เซ็นต์ และคล้ายกับเอนไซม์ Triacylglycerol lipase ของเชื้อ *Amycolatopsis* sp. สายพันธุ์ ATCC 39116 (ZP_10048653.1) 77เปอร์เซ็นต์

สำหรับงานวิจัยนี้ได้ทำการหาลำดับเบสบางส่วนของเอนไซม์ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพได้ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทำการหาลำดับเบสทั้งหมดของยีน โดยการใช้เทคนิคการทำ inverse PCR หรือการทำ primer walking เพื่อให้ได้ลำดับเบสที่ครบสมบูรณ์ จากนั้นทำการโคลนขึ้นยีนเข้าสู่ expression vector และศึกษาลักษณะการแสดงออกของยีนต่อไป เพื่อเป็นการสรุปและยืนยันอย่างแน่ชัดว่ายีนที่ได้ทำการคัดแยกนั้นเป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายพลาสติกชีวภาพได้จริง





บรรณานุกรม

- กรมวิทยาศาสตร์บริการ. (2553). พลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (Biodegradable plastics). สืบค้น เมื่อ 5 พฤษภาคม 2555, จาก <http://siweb.dss.go.th/repack/fulltext/IR12.pdf>
- หัตยา กาวิวงศ์ (2546). อนุพันธุศาสตร์. เชียงใหม่: ห้างหุ้นส่วนจำกัด บุญไชยการพิมพ์; หน้า 200-201
- พิชานัด สมยูรทรัพย์. (2553). พลาสติกชีวภาพ: นวัตกรรมของผลิตภัณฑ์สีเขียว .วารสารวิทยาศาสตร์ มศว 26: 177-195
- พิชานัด สมยูรทรัพย์.; และคณะ. (2554). การแยกและการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียชอบร้อนที่ย่อยสลาย พอลิคาร์โพรแลคโตน. วารสารวิทยาศาสตร์ มศว 27: 229-243
- มหาวิทยาลัยรามคำแหง. (2550). เว็บไซต์เพื่อให้ข้อมูลทางวิชาการเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศสำหรับประเทศไทย (Thailand and Climate Change): ก๊าซเรือนกระจก (greenhouse gases). สืบค้นเมื่อ 5 พฤษภาคม 2555, จาก <http://www.ru.ac.th/climate-change/GHG.htm>.
- สำนักนวัตกรรมแห่งชาติ (NIA). (2002). สืบค้นเมื่อ 5 พฤษภาคม 2555. จาก <http://www.nia.or.th/bioplastics/introduction.php>.
- Abe; et al. (2010). Microbial degradation of poly(butylene succinate) by *Fusarium solani* in soil environments. *Polymer Degradation and Stability* 95: 138-143.
- Akutsu-Shigeno ; et al. (2003). Cloning and sequencing of a poly(DL-lactic Acid) depolymerase gene from *Paenibacillus amylolyticus* strain TB-13 and its functional expression in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 69: 2498-2504.
- Alexander, M. (1977). Introduction to Soil Microbiology. 2nd ed. New York John Wiley and Sons Inc.
- Asheeba ; et al. (2011). Effect of lipase in biodegrading polybutylene succinate. *International Journal of Environmental Science*. 2: 1021-1029.
- Bradford, M. (1976). A rapid method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein – dye binding, *Analytical biochemistry*. 72: 248 – 254.
- Cross, T. (1968). Thermophilic actinomycetes. *Journal of Applied Bacteriology*. 31: 36-53.

- Czoch, W. P.; & Mordarski, M. (1988). Actinomycete enzymes. In Goodfellow, M.; Williams S.T.; and Mordaski, M. editor. *Actinomycetes in biotechnology*. San Diego: Academic Press., pp. 219-283.
- European Bioplastics. (2011). Retrieved May 7, 2012, from http://en.europeanbioplastics.org/_environment/lcelca/
- Goldberg, D. (1995). A review of the biodegradability and utility of poly(caprolactone). *Journal of Environmental Polymer Degradation* 3: 61-67.
- Greiner-Mai, E.; et al.(1987). Morphological and biological characterization and emended description of thermophilic actinomycetes species. *Systematic and applied microbiology* 9: 97-109
- Hayakawa, M.; Ishizawa, K.; & Nonomura, H. (1988). Distribution of rare actinomycetes in Japanese soils. *Journal of Fermentation Technology* 66: 367-373.
- Holmalahti, J.; Wright, A. Von; & Raatikainen, A.O. (1994). Variations in the spectra of biological activities of actinomycetes isolated from different soils. *Letters in Applied Microbiology* 18: 1544-1546.
- Holt; et al.(1994). *Bergey's of determinative bacteriology*. 9th ed. Baltimore : Williams & Wilkins.
- Institute of Immunology and Experimental Therapy. Laboratory of Molecular Biology of Microorganisms. Retrieved May 10, 2012, from <http://www2.iitd.pan.wroc.pl/dept/mic/gb/project.html>
- Jaeger, K.E.; et al. (1994). Bacterial lipases. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews* 15: 29-63.
- Jararat , A.; Pranamuda, H.; & Tokiwa Y. (2002) .Poly(L-lactide)-Degrading Activity in Various Actinomycetes. *Macromolecular Bioscience*.2: 420–428.
- Jararat, A.; Tokiwa Y.;& Tanaka H. (2004). Microbial poly (L-lactide)-degrading enzyme induced by amino acids peptide and poly(L-amino acid). *Journal of Polymers and the Environment*. 12(3):139-146.
- Khan, M.R.; & Williams, S.T. (1975). Studies on the ecology of actinomycetes in soil. VIII. Distribution and characteristics of acidophilic actinomycetes. *Soil Biology and Biochemistry* 7:345-348.
- Kleeberg; et al. (2005). Characterization of a new extracellular hydrolase from *Thermobifida fusca* degrading aliphatic-aromatic copolyesters. *Biomacromolecules* 6: 262-270.

- Koichiro, T.; et al. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28 (10) : 2731-2739.
- Lane, D.J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt, E.; & Goodfellow, M., editor. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Chichester : John Wiley and Sons.p.371-375.
- Lechevalier, H.A.; & Lechevalier, M.P. (1970). *The Actinomycetales*. Gustav Fischer, Jena.
- Lechevalier, H.A.; Lechevalier, M.P.; & Gerber, N.N. (1971). Chemical composition as criterion in the classification of actinomycetes. *Advances in Applied Microbiology* 14: 47-72.
- Lee, W. C.; Kimura, Y.; & Chung, J.-D. (2008). Mechanism of enzymatic degradation of poly(butylene succinate). *Macromolecular Research* 16: 651-658
- Lee, S.-H.; & Kim M.-N. (2010). Isolation of bacteria degrading poly (butylene succinate-co-butylene adipate) and their *lip A* gene. *International Biodeterioration & Biodegradation* 64: 184-190.
- Li, F.; et al. (2011). Purification and characterization of a novel poly(butylene succinate)-degrading enzyme from *Aspergillus* sp. XH0501-a. *World Journal Microbiology Biotechnology* 27:2591–2596.
- Lim, H.-A.; Raku, T.; & Tokiwa, Y. (2005). Hydrolysis of polyesters by serine proteases. *Biotechnology Letters* 27: 459–464.
- Maeda; et al. (2005). Purification and characterization of a biodegradable plastic-degrading enzyme from *Aspergillus oryzae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 67: 778-788.
- Marten, E.; Muller, R.-J.; & Deckwer, W.-D. (2003) Studies on the enzymatic hydrolysis of polyesters I. Low molecular mass model esters and aliphatic polyesters. *Polymer Degradation and Stability* 80: 485–501
- Matsuda; Emiko & et al. Gene cloning and molecular characterization of an extracellular poly(L-lactic acid) depolymerase from *Amylatopsis* sp. strain K104-1. *Journal of Bacteriology* 187: 7333-7340.
- Mayumi, D.; et al. (2008). Identification and characterization of novel poly (DL-lactic acid) depolymerases from metagenome. *Applied Microbiology and Biotechnology* 79: 743-750.

- McCarthy, A.J.; & Williams, S.T. (1992). Actinomycetes as agents of biodegradation in the environment a review. *Gene* 115: 189-192.
- mRNA.gene-quantification.info. Retrieved June 18, 2012. from <http://www.genequantification.demrna.html>
- Murphy C.; et al. (1996). *Fusarium* polycaprolactone depolymerase is cutinase. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 456-460.
- Nakamura, K.; Tomita, T.; Abe, N.; & Kamio, Y. (2001). Purification and characterization of an extracellular poly(L-lactic acid) depolymerase from a soil isolate, *Amycolatopsis* sp. strain K104-1. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 345–353.
- Nakajima-Kambe, T.; et al. (2009a). Degradation of aliphatic–aromatic copolyesters by bacteria that can degrade aliphatic polyesters. *Polymer Degradation and Stability* 94: 1901–1905.
- _____ (2009b). Rapid monomerization of poly(butylene succinate) -co- (butylene adipate) by *Leptothrix* sp. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 108: 513 – 516.
- National Metal and Materials Technology Center (MTEC). (2007). Retrieved May 5,2012,. from http://www2.mtec.or.th/th/special/biodegradable_plastic/type_de_plas.html.
- Nishida, H.;& Tokiwa, Y. (1993).Distribution of poly(β -hydroxybutyrate) and poly(ϵ -caprolactone) aerobic degrading microorganisms in different environments. *Journal of Polymers and the Environment* 1: 227-233.
- Oda; et al. (1997). Ploycaprolactone depolymerase produced by the bacterium *Alcaligenes faeaclis*. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters* 152: 339-343.
- Pranamuda, H.; Tokiwa, Y.; & Tanaka, H. (1997). Polylactide degradation by an *Amycolatopsis* sp. *Applied and Environmental Microbiology*. 63: 1637–1640.
- Sakai, K.; Kawano, H.; Iwami, A.; Nakamura, M.; & Moriguchi, M. (2001). Isolation of a thermophilic polyL-lactide degrading bacterium from compost and its enzymatic characterization. *Journal of Bioscience Bioengineering* 92: 298–300.

- Shinji, M. (1997). Phylogenetic relationship of actinomycetes. *In* M. Shinji. Atlas of actinomycetes. Japan: Asakura publishing.
- Shirling, E. B.; & Gottlieb, D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* Species. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 16: 313-340.
- Sivalingam G.; Chattopadhyay S.; & Madras G. (2003). Enzymatic degradation of poly (ϵ -caprolactone), poly(vinyl acetate) and their blends by lipases. *Chemical Engineering Science* .58:2911-2919
- Somyoonsap, P.; & Siripoke S. (2009). Screening of poly(ϵ -caprolactone) – degrading thermophilic microorganisms in soil samples from compost. Proceeding in the 35 Congress on Science and Technology of Thailand (STT35). 15-17 October 2009. The Tide Resort. Chonburi. p. 1-6.
- Stackebrandt, E.; Rainey, F. A.; & Rainey, N. W. (1997). Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria classis nov.* *International Journal of Systematic Bacteriology* 47: 479-491.
- Staneck, J. L.; & Roberts, G. D. (1994). Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by Thin-Layer Chromatography. *Applied Microbiology* 28: 226-231
- Sukkhum ; et al. (2009). A novel poly(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.
- Sukkhum S.; et al. (2009). Development of fermentation process for PLA-degrading enzyme production by a new thermophilic *Actinomadura* sp. T16-1. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 14 : 302-306.
- Sukkhum S.; et al. (2011). A novel poly (L-lactide) degrading thermophilic actinomycetes, *Actinomadura keratinilytica* strain T16-1 and *pla* sequencing . *Journal of Microbiology* 5: 2575-2582
- Tansengco, M.L.; & Tokiwa, Y. (1998). Thermophilic microbial degradation of Polyethylene Succinate. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 14: 133-138
- Taniguchi; et al. (2002). Mechanism of enzymatic hydrolysis of poly(butylene succinate) and poly(butylene succinate-co-L-lactate) with a lipase from *Pseudomonas cepacia*. *Macromolecular Bioscience* 2: 447 - 455.
- Teeraphatprongchai ; et al. (2003). Isolation and characterization of a bacterium that degrades various polyester-based biodegradable plastics. *Biotechnology Letters* 25: 23-28.

- Tezuka, Y.; et al. (2004). Degradation of poly(ethylene succinate) by mesophilic bacteria. *Polymer Degradation and Stability* 84: 115-121.
- Thumarat; et al. (2012). Biochemical and genetic analysis of a cutinase-type polyesterase from a thermophilic *Thermobifida alba* AHK119. *Applied Microbiology and Biotechnology* 95: 419-430.
- Thompson; J.D., Higgins; D.G., & Gibson; T.J. (1994) CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research*. 22: 4673–4680
- Tserki; et al (2006a). Biodegradable aliphatic polyester. Part I. properties and biodegradation of poly(butylene succinate-co-butylene adipate). *Polymer Degradation and Stability* 91: 367-376.
- _____ (2006b). Biodegradable aliphatic polyester. Part II. Synthesis and characterization of chain extended poly(butylene succinate-co-butylene adipate). *Polymer Degradation and Stability* 91: 377-384.
- Todar, K. 2012. Peptidoglycan. Cell wall of bacteria. Retrieved May 10, 2012, from <http://www.textbookofbacteriology.net>.
- Tokiwa; et al. (2009). Biodegradability of plastics. *International Journal of Molecular Sciences* 10: 3722-3742
- Tokiwa, Y.; & Jarerat, A. (2004). Biodegradation of poly(L-lactide). *Biotechnology Letters* 26: 771-777.
- Uchida; et al. (2000). Properties of a bacterium which degrades solid poly (tetramethylene succinate)-co- adipate, a biodegradable plastic. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letter* 189: 25-29.
- Uchida; et al. (2002). Cloning and sequence analysis of poly(tetramethylene succinate) depolymerase from *Acidovorax delafieldii* strain BS-3. *J. Biosci. Bioeng.* 93: 245-247.
- Williams S. T. & Davies F. L. (1967). Use of a Scanning Electron Microscope for the Examination of Actinomycetes . *Journal of General Microbiology*. 48: 171-177.
- Williams, R.H. (1989). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol4. Baltimore :Williams & Wilkins,
- Xia, Yan; et al. (2012). *Saccharothrix yanglingensis* sp. nov., an antagonistic endophytic actinomycete isolated from cucumber plant. *Antonie van Leeuwenhoek* 101:141-146

- Xiaoping; et al. (2010). Diversity of polyester-degrading bacteria in compost and molecular analysis of a thermoactive esterase from *Thermobifida alba* AHK119. *Applied Microbiology and Biotechnology* 87: 771-779.
- Xu, L.H.; Li, Q.R.; & Jiang, C.L. (1996). Diversity of soil actinomycetes in Yunnan, China. *Applied Environmental and Microbiology* 62: 244-248.
- Yamada, Y. (1998). Identification of isoprenoid quinone homologs in the classification of bacteria. tentative program for workshop on isolation and identification of actinomycetes, National Science and Technology Development Agency, Bangkok, Thailand. March 16-19.
- Yamaguchi, T. (1965). Comparison of cell-wall composition of morphologically distinct Actinomycetes. *Journal of Bacteriology* 89: 445-453.
- Yokota, A. (1997). Phylogenetic relationship of actinomycetes. In M. Shinji. Atlas of actinomycetes. Japan: Asakura publishing.
- Zhang; et al. (2001) Clarification of the relationship between the members of family *Thermomonosporaceae* on the basic of 16S rDNA, 16S-23S rRNA internal transcribed spacer and 23S rDNA sequence and chemotaxonomic analyses. *Journal of systematic and evolutionary microbiology*. 51: 373-383.
- Zhao; et al. (2005). Biodegradation of poly(butylene succinate) in compost. *Journal of Applied Polymer science* 97: 2273-2278.
- Zhi; et al. Stackebrandt.(2009). An update of the structure and 16S rRNA gene sequence-based definition of higher ranks of the class Actinobacteria, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* . 59: 589-608





ภาคผนวก ก
สูตรอาหารและวิธีการเตรียม

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ตัดแยกแบคทีเรีย (Basal medium)

ละลาย PLA, PBS, PBSA หรือ PCL 1 กรัม ใน dichloromethane 20 มิลลิลิตร และนำไปผสมกับ basal medium 1 ลิตร โดยใช้เครื่องอัลตราโซนิคเคเตอร์ (ultrasonicator) อาหาร basal medium ประกอบด้วย

Yeast extract	0.2	กรัม
(NH ₄) ₂ SO ₄	1	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2	กรัม
NaCl	0.1	กรัม
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.02	กรัม
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01	กรัม
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.0005	กรัม
Na ₂ WO ₄ ·2H ₂ O	0.005	กรัม
MnSO ₄	0.005	กรัม
K ₂ HPO ₄	1.6	กรัม
KH ₂ PO ₄	0.2	กรัม

ปรับ pH ให้ได้ประมาณ 7-8 นำไปต้มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อระเหย dichloromethane จากนั้นใส่วุ้น (agar) 20 กรัม/ลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. Luria Bertani low salt broth

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

นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. Tryptone-yeast extract broth (ISP1)

Tryptone	5	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. Yeast – malt extract agar (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

5. Oatmeal agar (ISP3)

Oatmeal	20	กรัม
Agar	18	กรัม

นำ oatmeal 20 กรัม ต้มกับน้ำกลั่น 1 ลิตร เป็นเวลา 20 นาทีจนสุก แล้วไปกรองเอาแต่น้ำ โดยใช้ผ้าขาวบาง นำน้ำที่ได้ผสมกับ Trace salt solution 1 มิลลิลิตร ซึ่งมีส่วนผสมดังนี้

Trace salt solution

FeSO ₄ .7H ₂ O	0.1	กรัม
MnCl ₂ .4H ₂ O	0.1	กรัม
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	100	ลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 7.2 และนำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

6. Inorganic salt-starch agar (ISP4)

Solution I

Soluble starch	10	กรัม
น้ำกลั่น	500	มิลลิลิตร

Solution II

K_2HPO_4	1	กรัม
NaCl	1	กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1	กรัม
$CaCO_3$	2	กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	2	กรัม
น้ำกลั่น	500	มิลลิลิตร
Agar	20	กรัม
Trace salt solution	1	มิลลิลิตร

Trace salt solution

$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1	กรัม
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0.1	กรัม
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	100	ลิตร

นำ solution I และ solution II ผสมกัน ปรับ pH ให้ได้ 7.0 -7.4 และนำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

7. Glycerol-asparagine agar (ISP5)

L-asparagine	1	กรัม
Glycerol	10	กรัม
K_2HPO_4	1	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร
Agar	20	กรัม
Trace salt solution	1	มิลลิลิตร

Trace salt solution

FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.1	กรัม
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.1	กรัม
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	100	ลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 7.0 -7.4 และนำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

8. Carbon utilization medium (ISP9)

(NH ₄) ₂ SO ₄	2.64	กรัม
K ₂ HPO ₄	2.38	กรัม
KH ₂ PO ₄	5.65	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.00	กรัม
น้ำกลั่น	1.00	ลิตร
Agar	15.00	กรัม
Pridham and Gottlied trace salts	1.00	มิลลิลิตร

Pridham and Gottlied trace salts

CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.64	กรัม
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.11	กรัม
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.79	กรัม
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.15	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

9. Cellulose medium

NaNO ₃	0.2	กรัม
K ₂ HPO ₄	0.1	กรัม
KCl	0.05	กรัม
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.05	กรัม
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.001	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 7.0-7.2 จากนั้นเติมอาหารลงในหลอดแก้วทดลอง หลอดละ 3 มิลลิลิตร ตัดกระดาษกรอง (Whatman No.1) ขนาด 1 x 13.5 เซนติเมตร ใส่ลงในหลอดทดลอง และนำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

10. SOC medium

SOB medium

Tryptone	2	กรัม
Yeast extract	0.5	กรัม
NaCl	0.05	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

การผสม SOC medium ประกอบด้วย SOB medium 10 มิลลิลิตร 1M MgCl₂ 100 ไมโครลิตร, 1M KCl 100 ไมโครลิตร และ 50 % glucose 72 ไมโครลิตร

11. Rye flakes medium

Rye flakes	10	กรัม
Yeast extract	1	กรัม
Glucose	2	กรัม
CaCO ₃	2	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 7.2 และนำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

12. Actinomyces medium

Yeast extract	2	กรัม
Peptone	1	กรัม
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.4	กรัม
K ₂ HPO ₄	2	กรัม
KH ₂ PO ₄	1.5	กรัม
Tween 80	2	มิลลิลิตร
Trace element solution	1	มิลลิลิตร

เติม xylan, carboxymethylcellulose (CMC), soluble starch และ skim milk ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปรับ pH ให้ได้ 5.0 โดยใช้ 0.1 M HCl และนำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที





ภาคผนวก ข
บัพเพอร์และวิธีการเตรียมสาร

บัฟเฟอร์และสารเคมีที่ใช้

1. Stock solution

1.1 1 M Tris-HCl pH 7-8

Tris	12.11	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100	มิลลิลิตร
ปรับ pH ด้วย 0.1 N HCl		

1.2 0.5 M EDTA pH 8

EDTA	18.6	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100	มิลลิลิตร
ปรับ pH ด้วย 0.1 NaOH		

1.3 1 M Sucrose

Sucrose	34.23	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100	มิลลิลิตร

2. TES buffer pH 8 (10 mM Tris, 25mM EDTA, 0.6 M Sucrose)

1 M Tris-HCl pH 8	1	มิลลิลิตร
0.5 M EDTA	5	มิลลิลิตร
1 M Sucrose	60	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	34	มิลลิลิตร

3. HTE buffer pH 8

1 M Tris-HCl pH 8	5	มิลลิลิตร
0.5 M EDTA	4	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	91	มิลลิลิตร

4. Solution III

CH ₃ COOH	11.5	มิลลิลิตร
CH ₃ COOK	29.4	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100	มิลลิลิตร

5. 1 M MgCl₂

MgCl ₂	9.52	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100	มิลลิลิตร

นำ stock solution และ บัฟเฟอร์ไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

6. 250 mM KCl

KCl	1.86	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100	มิลลิลิตร

นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

7. 50% glucose

Glucose	20	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100	มิลลิลิตร

นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

8. 10 % sodium dodecyl sulfate (SDS)

sodium dodecyl sulfate	10	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100	มิลลิลิตร



ภาคผนวก ค
วิธีการทำกราฟโปรตีนมาตรฐาน
และลำดับของเชื้อสายพันธุ์ APL1-8

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Bradford

วิธีการนี้เป็นการวัดปริมาณโปรตีน โดยใช้ Coomassie brilliant blue G-250 ซึ่งโมเลกุลของสีนี้มีประจุลบที่สามารถจับกับประจุบวกบนโมเลกุลของโปรตีนได้ (Bradford. 1976: 248-254) ภายในสีชนิดนี้ประกอบด้วยองค์ประกอบ 2 รูปแบบ คือรูปแบบสีแดง (red form) มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 465 นาโนเมตร และรูปแบบสีน้ำเงิน (blue form) มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 595 นาโนเมตร เมื่ออยู่ในรูปของสารละลาย รูปแบบสีแดงจะมีมากกว่าสีน้ำเงิน ทำให้สารละลายมีลักษณะเป็นสีม่วง เมื่อประจุลบของโมเลกุลสีเข้าจับกับประจุบวกบนโมเลกุลโปรตีนจะทำให้รูปแบบสีแดงเปลี่ยนเป็นรูปแบบสีน้ำเงิน จึงทำให้สามารถใช้วิธีการนี้ในการวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมดในสารละลายได้ นอกจากนี้วิธีการนี้ยังไม่ถูกรบกวนปฏิกิริยาโดยสารชนิดอื่น โดยปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ ภายใน 2 นาที สีที่เกิดขึ้นจะคงที่อยู่นาน 1 ชั่วโมง

การสร้างกราฟมาตรฐานโปรตีน

ผสมสารละลายโปรตีนมาตรฐานกับน้ำให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 0, 1.25, 2.5, 5, 10, 15, 20 และ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ดังตาราง ลงในหลอดทดลองความเข้มข้นละ 3 หลอด ส่วนหลอดที่ ความเข้มข้น 0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเป็น blank ทำเพียงหลอดเดียว รวมเป็น 22 หลอด จากนั้นเปิดสารละลายโปรตีนมาตรฐานปริมาตร 750 ไมโครลิตร เติมสารละลายสีย้อมปริมาตร 750 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ ไปสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนกับค่าการดูดกลืนแสง โดยให้แกน x เป็นปริมาณความเข้มข้นของ BSA (ไมโครกรัม) ส่วนแกน y เป็นค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

ตาราง 11 ปริมาณสารที่ใช้ในการทำกราฟมาตรฐานความเข้มข้นของโปรตีน

Stock BSA ($\mu\text{g/ml}$)	ความเข้มข้น สุดท้าย	BSA (μl)	น้ำ (μl)
200	25	250	1750
50	20	800	1200
50	15	600	140
10	10	-	-
10	5	1000	1000
5	2.5	1000	1000
5	1.25	500	1500
Blank	0	-	2000

ลำดับเบสของเชื้อสายพันธุ์ APL1-8

Streptomyces sp. APL1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: JN387596.1

>GAACGATGAACCTCCTTCGGGAGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGG
CAATCTGCCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATACGAGC
CTCCAAGGCATCTTGAGGTTGGAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAGCCCGCGGCCTA
TCAGCTTGTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAG
GGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
GGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACG
GCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAGAGTGACGGTACCTGCAG
AAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTT
GTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTACGTCGGTTGTGAAAGC
CCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGA
GATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGC
GAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAAC
AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACA
TTCCACGTTGTCCGTGCCGAGCTAACGCATTAAGTCCCCGCCTGGGGAGTACGGCC
GCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGC
TTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAAGCATTAG
AGATAGTGCCCCCTTGTGGTCCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTG
TCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCCGTGTGCCAGCA
GGCCCTTGTGGTGCTGGGGACTCACGGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGT
GGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGG
CCGGTACAAAGAGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAG
TTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATC
AGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAA
AGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCTTGTGGGAGGGAGCTGTCAAGT

Streptomyces sp. APL2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: JN387597.1

```
>ATGAACCTCCTTCGGGAGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATC
TGCCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATACGAGCCTCCA
AGGCATCTTGGAGGTTGGAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGC
TTGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCG
ACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG
AATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCT
TCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAGAGTGACGGTACCTGCAGAAGAA
GCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCG
GAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCACGTCGGTTGTGAAAGCCCGG
GGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCG
GAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCCGAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGG
CGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATT
AGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCCAC
GTTGTCCGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGG
CTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATT
CGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAAGCATTAGAGATAG
TGCCCCCCTTGTGGTCCGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCTCAGCTCGTGTCTGTA
GATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCCGTGTGCCAGCAGGCC
TTGTGGTGCTGGGGACTCACGGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGA
CGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGT
ACAAAGAGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGG
ATTGGGGTCTGCAACTCGACCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAT
TGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTC
GGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCC
```

Streptomyces sp. APL3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: JN387598.1

>TGCAGTCGAACGATGAACCTCCTTCGGGAGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAAC
ACGTGGGCAATCTGCCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCCG
GATACGAGCCTCCAAGGCATCTTGGAGGTTGGAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAGCC
CGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCG
GCCTGAGAGGGCGACCGGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGG
AGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTG
AGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGGAAGAAGCGAGAGTGAC
GGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGG
GCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCACGTC
GGTTTGTAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAG
TTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGG
AACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCG
TGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGGTGGGCACTAG
GTGTGGGCAACATTCCACGTTGTCCGTGCCGCGAGCTAACGCATTTAAGTGCCCCGCCTG
GGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGG
CGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACAC
CGGAAAAGCATTAGAGATAGTGCCCCCTTGTGGTTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCT
GTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTG
CCGTGTTGCCAGCAGGCCCTTGTGGTGTGGGACTCACGGGAGACCGCCGGGGTCA
ACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCA
CACGTGCTACAATGGCCGGTACAAAGAGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCTCA
AAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCG
CTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCG
CCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCTTGTGGGA
GGGAG

Streptomyces sp. APL4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: JN387599.1

>CTTACCATGCAGTCGACGATGAACCTCCTTCGGGAGGGGATTAGTGGCGAACGGGTG
AGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGAAACGGGGTCTAA
TACCGGATACGACTCAGGACCGCATGGTCTCTGGGTGGAAAGCTCCGGCGGTGCAGGA
TGAGCCC GCGCCTATCAGCTTGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGACGGG
TAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCC
TACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGC
CGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGGAAGAAGCGAG
AGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA
CGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGT
CGCGTCGGTTTGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGG
CTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCA
GGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCG
AAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGG
CACTAGGTGTGGGCAACATTCCACGTTGTCCGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGTGCCC
CGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACA
AGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTGACGCAACGCGCAGAACCTTACCAAGGCTTGAC
ATACACCGGCAAACATCCAGAGATGGGTGCCCCCTTGTGGTCCGGTGTACAGGTGGTGC
ATGGCTGTTCGTGAGCTCGTGTTCGTGAGAATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAAC
CCTTGTCCCGTGTGGCCAGCAGGCCCTTGTGGTGCTGGGGACTCACGGGAGACCGCCC
GGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCCCTTTATGTCTTG
GGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCG
AATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCG
GAGTCGCTAGTAAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTA
CACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCT
TGTGGGAGGGAGCTGTCTGAAGTG

Saccharothrix sp. APL5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: JN387600.1

```
>AAGTCGAGCGGTAAGGCCCTTCGGGGTACACGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGT
GGGTAACCTGCCCTGTA CTCTGGGATAAGCCTGGGAAACTAGGTCTAATACCGGATATG
ACCTTCTCAGGCATCTTCGATGGTGGAAAGTTCCGGCGGTACGGGATGGACCCGCGGC
CTATCAGCTTGTTGGTGGGGT GATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGA
GAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGC
AGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATG
ACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGTGAGTGACGGTACCTG
CAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGAGC
GTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTTCGTCGGCCGTGAA
AACTTCACGCTTAACGTGGAGCCTGCGGTGATACGGGCAGACTTGAGTTCGGCAGGG
GAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCATGAGGAACACCGGTG
CGAAGGCGGGTCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGA
ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCCACGCCGTAACCGGTGGGTGCTAGGTGTGGGGG
ACTCCACGTTCTCCGTGCCG CAGCTAACGCATTAAGCACCCCGCCTGGGGAGTACGG
CCGCAAGGCTAAA ACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCCGGCGGAGCATGT
GGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGCTTGACATGCACCGGAAACCTG
CAGAGATGTAGGCCTCTTCGGACTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCG
TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTCCATGTTGCCAG
CGCGTTATGGCGGGGACTCATGGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGG
ATGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATGGTCCAGGGCTTCACACATGCTACAATGGCCG
GTACAGAGGGCTGCTAAGCCGTGAGGTGGAGCGAATCCACAAAGCCGGTCTCAGTTC
GGATCGGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCCGCAGATCA
GCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTG TACACACCGCCCGTCACGTCACGAA
AGTCGGTAACACCCGAAGCCCGTGGCCCAACCAGCTTGCTGGGGGAGCGGTCTGAAG
```

Saccharothrix sp. APL6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: JN387601.1

```
>CCCTTCGGGGTACACGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTGT
ACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACTAGGTCTAATACCGGATATGACCATTCAGGCATCC
TCGATGGTGGAAAGTTCCGGCGGTACGGGATGGACCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGT
GGGGTGATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCA
CACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCA
CAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGT
AAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGTGAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGC
TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTG
GGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTGCGTCCGGCCGTGAAAAC TTCACGCTTAACGT
GGAGCCTGCGGTGCATACGGGCAGACTTGAGTTCGGCAGGGGAGACTGGAATTCCTGT
GTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCT
GGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCT
GGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGTGCTAGGTGTGGGGGACTTCCACGTTCTCCGTG
CCGCAGCTAACGCATTAAGCACCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAAC TCA
AAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAACG
CGAAGAACCTTACCTGGGCTTGACATGCACCGGAAACCTGCAGAGATGTAGGCCTCTTC
GGACTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTT
AAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCTCGTTCCATGTTGCCAGCGCGTTATGGCGGGGACT
CATGGGAGACTGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATG
CCCCTTATGTCCAGGGCTTCACACATGCTACAATGGCCGGTACAGAGGGCTGCTAAGCC
GTGAGGTGGAGCGAATCCCACAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATCGGGGTCTGCAACTCG
ACCCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTT
CCCGGGCCTTG TACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCCG
TGGCCCAACCAGCTTGCT
```

Streptomyces sp. APL7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: JN387602.1

```
>GGCTAAATGGCAAGTCGAACGATGAACCTCCTTCGGGAGGGGATTCGTGGCGAACGG
GTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCTTACTCTGGGACAAGCCCTGAAACGGGGTCTAA
TACCCGGATACGAGCCTCCAAGGCATCTTCGGAGGTTGAAAGCTCCGGCGGTGAAGG
ATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGACGG
GTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTC
CTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACG
CCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGGAAGAAGCGA
GAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT
ACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTG
TCACGTCGGTTTGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAG
GCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATAT
CAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAG
CGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTG
GGCACTAGGTGTGGGCAACATTCCACGTTGTCCGTGCCGCAGCTAACGCATTAAAGTGC
CCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGC
ACAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTT
GACATACACCGGGAAAGCATTAGAGATAGTGCCCCCTTGTGGTTCGGTGTACAGGTGGT
GCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGC
AACCTTGTCCCGTGTGGCCAGCAGGCCCTTGTGGTGCTGGGGACTCACGGGAGACCG
CCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTTATGTC
TTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAAAGAGCTGCGATACCGTGAGGTGGA
GCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAG
TCGGAGTCGCTAGTAAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTT
GTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACCACCCGAAAGCCGGTGGCCCCA
CCCCTTTGTGGGAGGGAGCTTCGAAGGT
```

Streptomyces sp. APL8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: JN387603.1

>CTTACCATGCAGTCGAACGATGAACCTCCTTCGGGAGGGGATTAGTGGCGAACGGGT
GAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGAAACGGGGTCTA
ATACCCGGATACGAGCCTCCAAGGCATCTTGGAGGTTGGAAAGCTCCGGCGGTGAAGG
ATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGACGG
GTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTC
CTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACG
CCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGGAAGAAGCGA
GAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT
ACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTG
TCACGTCGGTTTGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAG
GCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATAT
CAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAG
CGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTG
GGCACTAGGTGTGGGCAACATTCCACGTTGTCCGTGCCGCAGCTAACGCAATTAAGTGC
CCCGCCTGGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCG
CACAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTTATTTTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCT
TGACATACACCGGGAAAGCATTAGAGATAGTGCCCCCTTGTGGTCCGGTGTACAGGTGG
TGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCGTGAGATTGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGC
AACCTTGTCCCGTGTGGCCAGCAGGCCCTTGTGGTGCTGGGGACTCACGGGAGACCG
CCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCT
TGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAAAGAGCTGCGATACCGTGAGGTGGAG
CGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGT
CGGAGTCGCTAGTAAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTG
TACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCC/
CTTGTGGGAGGGAGCTTCGAAGGTG



ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ - ชื่อสกุล	นางสาวลักษมี ศุกระกาญจนะ
วันเดือนปี เกิด	30 ธันวาคม 2530
สถานที่เกิด	กรุงเทพฯ
สถานที่อยู่	2002/25 แขวงดินแดง เขตดินแดง ถนนประชาสงเคราะห์ จ.กรุงเทพฯ 10400
ตำแหน่งหน้าที่ การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงาน	Sukrakanchana L, Sriyapai T, Sukkhum S, Somyoonsap P. (2011) Screening, isolation and characterization of bacterium that degrades various bioplastics. The 4 th Young Scientist Seminar Capacity building and development of microbial potential and fermentation technology towards ear, 26-27 September 2011, Kasetsart University, Thailand (oral presentation) Luksamee Sukrakanchana, Sukhumaporn Sukkhum, and Peechapack Somyoonsap (2012) Isolation of bioplastics-degrading bacteria form compost soil in Thailand. The 23 rd Annual Meeting of the Thai Society of Biotechnology. 1-2 February 2012 at the Imperial Queen;s Park Hotel,Bangkok,Thailand (poster presentation)
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2548	ระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย จากโรงเรียนสุรศักดิ์มนตรี
พ.ศ. 2552	วท.บ. (จุลชีววิทยา) จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ จังหวัดกรุงเทพฯ
พ.ศ. 2556	วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ) จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ จังหวัดกรุงเทพฯ