

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินรายได้คณะวิทยาศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ 2554

ชุดโครงการวิจัย

เรื่อง การศึกษาเอนไซม์ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพโดยแบคทีเรียชอบร้อน

โครงการวิจัยย่อยที่ 1

เรื่อง การทำให้บริสุทธิ์และการศึกษาลักษณะของเอนไซม์เอสเทอร์จาก

แบคทีเรียชอบร้อน *Actinomadura* sp. S14 ที่ย่อยสลาย

พอลิคาร์โพรแลคโตน

ระยะเวลาดำเนินการ ตั้งแต่ เดือน มีนาคม 2554 ถึง กุมภาพันธ์ 2555

จัดทำโดย

อาจารย์ ดร. พิชักดิ์ สมยุทธ์พย์

รองศาสตราจารย์ สมใจ สิริโชค

ส่ง

มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

บทคัดย่อ

แบคทีเรียแอคติโนมัยสีทชอบร้อน, *Actinomadura* sp. S14 มีความสามารถในการย่อยสลายโพลีคาร์โปแลคโตน ซึ่งแยกได้จากกองขยะคอมโพสท์ในประเทศไทยและยังถูกเลือกให้เป็นสายพันธุ์ที่ดีที่สุดในการหาเอ็นเอสเตอเรส ชนิดใหม่ จากงานวิจัยนี้พบว่ายีน *estS14* ถูกโคลนเข้า expression vector (pQE80L) ยีน *estS14* มีขนาด 777 bp มีลำดับกรดอะมิโน 259 amino acids มีน้ำหนักมวลโมเลกุลประมาณ 30 kDa และมีบริเวณอนุรักษ์ของ GX SXG motif ซึ่งเป็นลักษณะของ alpha/beta hydrolase การทำบริสุทธิ์เอ็นไซม์ พบว่า cell-free extract มีค่า specific activity ที่ 6.9 U/mg และเมื่อผ่านการ heat-treated cell-free extract ที่ 60°C เป็นเวลา 10 min จะให้ค่า specific activity 16.5 U/mg ซึ่งมีค่า purification fold เท่ากับ 2.4 เท่า และเมื่อผ่าน Ni²⁺ column พบว่ามีค่า specific activity ที่ 159.2 U/mg และมีค่า purification fold เท่ากับ 23.1 เท่า เมื่อศึกษาคุณสมบัติของเอ็นไซม์ พบว่าเอ็นไซม์ทำงานได้ดีที่ pH 8 และที่อุณหภูมิ 55°C เอ็นไซม์มีความคงทนในช่วง pH 7-8 และที่อุณหภูมิ 40-55°C

ประกาศคุณูปการ

การศึกษาโครงการวิจัยนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ เนื่องจากการได้รับการสนับสนุนจากเงินรายได้คณะวิทยาศาสตร์ ประจำปี 2554 มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ขอขอบคุณ รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการ รองศาสตราจารย์ ดร. วิภาวี อนุพันธ์พิศิษฐ์ คณบดีคณะวิทยาศาสตร์ รองศาสตราจารย์ ดร. วิเชียร มากตุ่น และรองคณบดีฝ่ายวิจัยและวิเทศสัมพันธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อัจฉริยา รังษิรุจิ ที่ให้โอกาส และคำแนะนำที่มีประโยชน์สำหรับการดำเนินการในโครงการวิจัยนี้

ขอขอบคุณ หัวหน้าฝ่ายวิจัย นางกรอุษา ศรีสุวรรณและบุคลากรฝ่ายวิจัยที่ให้ความช่วยเหลือในการดำเนินงานเอกสาร โครงการที่มีความรวดเร็วและถูกต้อง

ขอขอบคุณคณาจารย์และบุคลากรภาควิชาชีววิทยาที่ให้ความสะดวกในการปฏิบัติงานวิจัย และให้การช่วยเหลือเกื้อกูลและคอยให้กำลังใจเป็นอย่างดี

คุณค่าและประโยชน์ที่ได้จากการศึกษาในโครงการวิจัยนี้ขอมอบบูชาพระคุณบิดา คุณมารดา คุณครูบาอาจารย์ ผู้มีพระคุณทุกท่าน

พิชาภัค สมยูรทรัพย์

มีนาคม 2555

สารบัญ

	หน้า
บัญชีตาราง	ii
บัญชีภาพประกอบ	iii
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	2
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	9
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล	14
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง	22
บรรณานุกรม	23
ประวัติย่อผู้วิจัย	26

บัญชีตาราง

ตาราง	หน้า
1 แสดงผลการทำเอนไซม์ EstS14 ให้บริสุทธิ์	17
2 แสดงค่า substrate specificity โดยเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์ของค่า relative activity	20
3 แสดงผลของสารละลายโลหะหนัก (1 mM) ต่อการทำงานของเอนไซม์	21



บัญชีภาพประกอบ

ภาพ		หน้า
1	PCR product ของ <i>estS14</i> gene จากเชื้อ <i>Actinomadura</i> sp. strain S14.	14
2	โคลนรีคอมบิแนนท์ (recombinant) ของ esterase	14
3	การศึกษาวีธี Heat treatment ของ supernatant จากอุณหภูมิต่างๆ	15
4	Elution buffer fraction no. 1-10 ที่หยดบน tributyrin plate	16
5	กราฟแสดง protein standard curve	16
6	การทำบริสุทธิ์ของเอนไซม์ EstS14	17
7	Optimal pH ของเอนไซม์ EstS14	18
8	Optimal temperature ของเอนไซม์ EstS14	18
9	pH stability ของเอนไซม์ EstS14	19
10	Temperature stability ของเอนไซม์ EstS14	19
11	Temperature stability ของเอนไซม์ EstS14 เมื่อป้อนที่อุณหภูมิ 50, 55, 60 และ 70 °C ในเวลา 2 ชั่วโมง	20

บทที่ 1 บทนำ

พอลิคาร์โพรแลคโตน (PCL) เป็นพลาสติกชีวภาพที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นด้วยวิธีทางเคมีโดยอาศัยปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชัน (polymerization) ของ ϵ -caprolactone (6-hexanolide) มีจุดหลอมเหลวที่ 60 °C (Mayer and Kaplan, 1994) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับพลาสติกชีวภาพชนิดนี้กับชนิดอื่นๆ เช่น polyhydroxybutyrate (PHB) จะพบว่ามีความต่ำกว่า แต่อย่างไรก็ตามการนำเอา PCL ไปประยุกต์ใช้ในการผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ ยังถูกจำกัดในเรื่องของความยืดหยุ่น (elasticity) ดังนั้นผู้ผลิตจึงเกิดความคิดในการนำข้อดีของพลาสติกชีวภาพชนิดต่างๆ มาผสมผสานคุณสมบัติที่ดีในการผลิตผลิตภัณฑ์พลาสติกชีวภาพขึ้นมาเพื่อให้เป็นที่ต้องการของตลาด

Biodegradation เป็นกระบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์ให้มีขนาดเล็กลงโดยอาศัยกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่สำคัญได้แก่ พวก heterotrophic ซึ่งอาศัยอยู่ในดิน (Glass and Swift, 1989) ในการย่อยสลาย PCL นั้นพบว่าเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายได้แก่เอนไซม์ lipase, esterase, cutinase และ PCL depolymerase (Tokiwa and Suzuki, 1977) ในปี ค.ศ. 1996 Murphy และคณะศึกษา phytopathogens ที่ผลิตเอนไซม์ cutinase ที่ย่อย cutin ซึ่งเป็นโครงสร้างพอลิเมอร์บริเวณ cuticle ของพืช โดยพบว่าเอนไซม์ *Fusarium* cutinase มีคุณสมบัติคล้าย PCL depolymerase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลาย PCL และในปี ค.ศ. 1997 Oda และคณะศึกษาเอนไซม์ PCL polymerase ที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Alcaligenes faecalis* จะเห็นได้ว่าจุลินทรีย์หลายชนิดไม่ว่าจะเป็น รา และ แบคทีเรียจะมีหน้าที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพ

เอนไซม์ที่มีบทบาทในกระบวนการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพในขั้นตอนแรกได้แก่ lipase เป็นเอนไซม์ที่เร่งการเกิดปฏิกิริยา hydrolysis ของพันธะ ester linkage ของไขมันเพื่อเปลี่ยนให้เป็นแอลกอฮอล์และกรดไขมันซึ่งส่วนใหญ่เป็นโซ่คาร์บอนที่ยาวกว่า 10 อะตอม ต่อมาเอนไซม์ esterase จะเร่งการเกิดปฏิกิริยา hydrolysis โดยการตัดพันธะเอสเทอร์สายสั้นๆ ส่วนใหญ่เป็นโซ่คาร์บอนที่มีความยาวสั้นกว่า 10 อะตอม และสุดท้ายเอนไซม์ depolymerase จะเร่งปฏิกิริยาเคมีโดยการตัดสายพอลิเมอร์เพื่อเปลี่ยนให้เป็นโมเลกุลเดี่ยว

จะเห็นได้ว่ากลุ่มเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพจะอยู่ในกลุ่มลิพอลิติกเอนไซม์ (lipolytic enzyme) ซึ่งเชื้อที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ได้แก่เชื้อ *Actinomadura* sp. S14 ที่แยกได้จากดินและพบว่าสามารถย่อยสลาย PCL ได้ นอกจากนี้ยังพบว่าเป็นเชื้อในกลุ่มแอคติโนมัยซีทชอบร้อน (thermophilic actinomycete) โดยสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 60°C จากการศึกษาการทำให้บริสุทธิ์และศึกษาลักษณะของเอนไซม์ชนิดนี้ว่าเกี่ยวข้องกับกระบวนการย่อยสลาย PCL หรือไม่ และยังพบว่าการรายงานของเอนไซม์ชนิดนี้ในเขื่อนยังไม่มียางาน ดังนั้นในงานวิจัยจึงถือเป็นรายงานแรกในการศึกษาเอนไซม์ esterase จาก *Actinomadura* sp. S14

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพจะอยู่ในกลุ่มของ ลิพอลิติกเอนไซม์ (lipolytic enzyme) ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ได้แก่ เอนไซม์ชนิดแรก esterase (EC 3.1.1.1) สามารถย่อยสลายสับสเตรทที่ละลายน้ำได้ (water-soluble) และยังสามารถประกอบประเภท glycerolesterases ที่ประกอบด้วย acyl chain สายสั้นๆ (≤ 10 คาร์บอนอะตอม) ชนิดที่ 2 เอนไซม์ lipase (EC 3.1.1.3) จะย่อยสลายสับสเตรทที่ประกอบด้วยพันธะ ester ที่ไม่สามารถละลายน้ำได้ (water-insoluble) และสลายสารประกอบประเภท triglycerides ของ fatty acid chain สายยาว (≥ 10 คาร์บอนอะตอม) โดยส่วนใหญ่จะพบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายๆ ชนิดได้แก่ พืช สัตว์ ฟังไจ และแบคทีเรีย เป็นต้น เมื่อไม่นานมานี้ได้มีการศึกษาถึงโครงสร้างของเอนไซม์กันอย่างแพร่หลายโดยศึกษาในระดับยีนตลอดจนโครงสร้างทางเคมี และพบว่าลิพอลิติกเอนไซม์สามารถจัดจำแนกได้ 8 families โดยอาศัยส่วนลำดับเบสที่อนุรักษ์ (conserved sequence), motif และคุณสมบัติทางชีวภาพ (Tirawongsaroj *et al.*, 2008) ได้แก่ true lipase, GDSL, hormone-sensitive lipase (HSL) และ families III, V-VIII (Arpigny และ Jaeger, 1999) ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้มีโครงสร้างเป็นแบบ $\alpha\beta$ hydrolase ที่ประกอบด้วย catalytic triad site คือ serine (S), histidine (H) และ aspartate (D) residues ที่ซึ่ง serine residue จะอยู่ในบริเวณ active site motif ของ GX SXG (Ollis *et al.*, 1992) นอกจากนี้เอนไซม์ยังสามารถจัดจำแนกได้อีก 2 กลุ่มโดยอาศัย sequence motif บริเวณ oxyanion hole (ทั้ง GX หรือ GGGX) (Soliman *et al.*, 2007)

ลิพอลิติกเอนไซม์ 8 families อธิบายได้ดังนี้

1. **True lipases** ปัจจุบันแบ่งออกได้อีก 6 subfamilies ซึ่งพบได้ทั้งในแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ แต่เดิมนั้นจะถูกจัดจำแนกให้เรียกว่า *Pseudomonas* groups 1, 2 และ 3 เนื่องจากเป็นเชื้อกลุ่มแรกที่ค้นพบเอนไซม์นี้และเป็นเชื้อที่มีบทบาทในทางอุตสาหกรรม ต่อมาสายพันธุ์ *Pseudomonas* ที่ผลิตเอนไซม์ lipase ที่สำคัญนี้ได้ถูกเปลี่ยนชื่อใหม่เป็น *Burkholderia* (Yabuuchi *et al.*, 1992) และ lipase ที่ได้จาก *Burkholderia glumae* ได้ถูกนำมาศึกษาหาโครงสร้างสามมิติ (3D-structure) และ crystal structures นอกจากนี้ยังค้นพบเอนไซม์ในกลุ่มนี้ที่ผลิตได้จากเชื้อ *Vibrio cholera*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Proteus vulgaris* ซึ่งขนาดเอนไซม์ที่พบจะอยู่ในช่วง 30-32 kDa เมื่อนำ crystal structures มาอธิบายพบว่าในส่วน catalytic triad ประกอบด้วยกรดอะมิโน serine (Ser), histidine (His) และ aspartic acid (Asp) ซึ่งบริเวณ Asp จะมี Ca^{2+} เข้ามาจับ (Ca^{2+} -binding site) และยังพบว่าเกิดพันธะ disulphide ขึ้นในบริเวณของ His และ Asp ซึ่งเชื่อว่าบริเวณนี้มีความสำคัญสำหรับความเสถียรของเอนไซม์ สำหรับ lipase ที่ผลิตได้จาก *Bacillus* พบว่ามีบริเวณอนุรักษ์คือ Ala-Xaa-Ser-Xaa-Gly ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นเชื้อที่ทนอุณหภูมิปกติ (mesophilic) เช่น *B. subtilis* และ *B. pumilus* ซึ่งขนาดของเอนไซม์จะมีขนาดประมาณ 20 kDa สำหรับ lipase ที่

ทนความร้อนได้สูงจะพบได้ใน *B. thermocatenulatus* และ *B. stearothermophilus* โดยสามารถผลิตเอนไซม์ lipase ที่ทนความร้อนได้ถึง 65°C และทนต่อความเป็นเบสที่ pH 9 ซึ่งเอนไซม์มีขนาดประมาณ 45 kDa สำหรับ *Staphylococcal* lipases จะพบเอนไซม์ protease ที่มีขนาดใหญ่ (75 kDa)

2. **The GDSL** เป็นเอนไซม์ที่ให้อำนาจบริเวณอนุรักษ์ เป็น Gly-Asp-Ser-(Leu) [GDS(L)] motif ซึ่งประกอบด้วย active-site serine residue เชื่อที่พบได้แก่ *Aeromonas hydrophila*, *Streptomyces scabies*, *Salmonella typhimurium* เป็นต้น

3. **Family III** ในกลุ่มนี้ได้ถูกจัดจำแนกเป็นครั้งแรกโดย Cruz และคณะ (Cruz *et al.*, 1994) โดยศึกษาจาก 3D ของ *Streptomyces exfoliatus* (M11) lipase พบว่าเอนไซม์จะมีลักษณะแบบ α/β -hydrolase และประกอบด้วย catalytic triad และพบว่าประมาณ 20% ของลำดับเบสกรดอะมิโนจะเหมือนกับ intracellular และ plasma isomer ของ human PAF-AH

4. **The hormone-sensitive lipase (HSL)** เอนไซม์ในกลุ่มนี้จะมีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับ mammalian HSL (Hemilä *et al.*, 1994) และพบได้ใน prokaryotes เช่น *Moraxella* sp. เป็นเชื้อที่เจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 15°C ซึ่งพบเอนไซม์ที่มีโครงสร้างคล้าย human HSL นอกจากนี้ยังพบเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ esterase ที่ทนอุณหภูมิต่ำ (psychrophilic) ได้เช่น; *Moraxella* sp., *Psychrobacter immobilis* พวกที่ทนอุณหภูมิปกติ (mesophilic) เช่น *E. coli*, *Alcaligenes eutrophus* และพวกที่ทนอุณหภูมิสูง (thermophilic); *Alicyclobacillus acidocaldarius*, *Archeoglobus fulgidus* เป็นต้น

5. **Family V** มีลักษณะคล้ายกลุ่ม HSL เอนไซม์ในกลุ่มนี้พบได้ในเชื้อที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง เช่น *Pseudomonas oleovorans*, *Haemophilus influenza*, *Acetobacter pasteurianus*, เชื้อในกลุ่มทนเย็น เช่น *Moraxella* sp., *Psychrobacter immobilis* และเชื้อในกลุ่มทนร้อน เช่น *Sulfolobus acidocaldarius* ลำดับกรดอะมิโนจะเหมือนกับ non-lipolytic enzyme (epoxide hydrolases, dehalogenases และ haloperoxidase) ของแบคทีเรียประมาณ 20-25% ซึ่งเอนไซม์จะมีลักษณะแบบ α/β -hydrolase และประกอบด้วย catalytic triad เช่นกัน

6. **Family VI** เอนไซม์ในกลุ่มนี้มีขนาดเล็กประมาณ 23-26 kDa ลักษณะโปรตีนเป็นแบบ dimer แต่ละ subunit เป็นแบบ α/β -hydrolase และมี catalytic site ที่ประกอบด้วย Ser-Asp-His และยังพบว่าลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์กลุ่มนี้ประมาณ 40% ที่เหมือนกับ eukaryotic lysophospholipases (Ca^{2+} -independent phospholipases A₂) เชื่อที่พบในกลุ่มนี้ได้แก่ *Pseudomonas fluorescens*, *Spirulina platensis*

7. **Family VII** เอนไซม์ esterase ที่พบในกลุ่มนี้มีขนาด 55 kDa ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับ eukaryotic acetylcholine esterase และ intestine liver carboxylesterase ประมาณ 40% เชื่อที่พบได้แก่ *Arthrobacter oxydans*, *Bacillus subtilis* เอนไซม์สามารถไฮโดรไลซ์ *p*-nitrobenzyl esters ซึ่งนำมาประยุกต์ใช้ในการผลิตยาปฏิชีวนะพวก β -lactam และเชื้อ *Streptomyces coelicolor*

8. **Family VIII** เอนไซม์ esterase ในกลุ่มนี้มีบริเวณอนุรักษ์เหมือน Ser-Xaa-Xaa-Lys motif ในปี ค.ศ. 1994 Kim และคณะ ได้ค้นพบว่าเอนไซม์ lipase/esterase มีบริเวณอนุรักษ์ Gly-Xaa-Ser-Xaa-Gly ที่พบใน *Pseudomonas fluorescens* และ *Streptomyces chrysomallus* บริเวณ C-terminus และไม่มี His ในลำดับกรดอะมิโน

ลิพอลิติกเอนไซม์นอกจากจะพบว่าสามารถย่อยสลายพลาสติกชีวภาพได้แล้วยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ ในอุตสาหกรรมต่างๆ ได้อีก เช่น อุตสาหกรรมอาหาร ยา โพลีเมอร์และไบโอดีเซล เป็นต้น ซึ่งคุณสมบัติเอนไซม์ที่เหมาะสมที่จะนำไปใช้ได้ ได้แก่ การทนอุณหภูมิสูง (high temperature) การทนต่อการย่อยสลายในตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvents) (Owusu and Cowan, 1989) และการทนได้ในที่มีความเป็นกรด-เบสสูง (strong alkalinity or acidity) ดังนั้นพวก thermostable enzyme จึงเป็นที่ต้องการในอุตสาหกรรม เนื่องจากพบว่าเอนไซม์ที่ไม่ทนร้อนนั้นจะไม่มีประสิทธิภาพเมื่อนำไปใช้ในสภาวะที่ไม่เหมาะสม

เอนไซม์ thermostable lipase/esterase ได้มีการรายงานในแบคทีเรียหลายชนิด เช่น *Bacillus stearothermophilus* JY144 ที่แยกมาจากคอมโพสต์ในประเทศเกาหลีใต้ (Kim *et al.*, 2002), *Acinetobacter lwoffii* I6C-1 ที่แยกมาจากดินบริเวณที่ทิ้งของเสียของน้ำมันเครื่อง ประเทศเกาหลี (Kim *et al.*, 2003), *Sulfolobus solfataricus* P2 ซึ่งเป็นพวก Thermoacidophilic archaeon ที่แยกมาจากประเทศเยอรมัน (Kim and Lee, 2004), *Thermus thermophilus* HB27 ที่แยกได้จากบ่อน้ำพุ ในประเทศสเปน (Fuciños *et al.*, 2005), *Geobacillus thermoleovorans* YN ที่แยกจากทะเลทรายในประเทศอียิปต์ (Soliman *et al.*, 2007) และ *Fervidobacterium nodosum* Rt17-B1 แยกได้จากประเทศเยอรมัน (Yu *et al.*, 2010)

สำหรับเชื้อในกลุ่มแอคติโนมัยซีต (actinomycete) ยังไม่พบการรายงานมากนักโดยเฉพาะเชื้อในกลุ่ม *Actinomadura* ในการวิจัยก่อนหน้านี้ได้แยกเชื้อ *Actinomadura* sp. S14 จากดินกองขยะในประเทศไทย โดยพบว่ามีความสามารถในการย่อยสลาย PCL ซึ่งเป็นพลาสติกชีวภาพชนิดหนึ่ง นอกจากนี้ยังทนความร้อนได้ที่อุณหภูมิ 60°C จากการศึกษาเชื้อชนิดนี้พบว่ามีรายงานไม่มากนักเกี่ยวกับยีน esterase ที่เกี่ยวข้องในกลไกการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ เมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียชนิดอื่น งานวิจัยนี้จึงเป็นการศึกษาการทำบริสุทธิ์และศึกษาคูสมบัติของ esterase ซึ่งอาจเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญอยู่ในกลไกการย่อยพลาสติก PCL

แบคทีเรียเป็นแหล่งที่สำคัญสำหรับการค้นพบโปรตีนชนิดใหม่มากมาย เนื่องจากสามารถพบได้ตามแหล่งต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นดิน หรือน้ำ เป็นต้น ซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้บางชนิดคัดแยกได้ในห้องปฏิบัติการ แต่บางชนิดไม่สามารถแยกได้จากห้องปฏิบัติการจึงต้องการเทคนิคใหม่เข้ามาเพื่อช่วยในการแยกเชื้อเพื่อนำมาสู่การหาโปรตีนชนิดใหม่ ซึ่งเทคนิคที่วุ่นคือ การทำ metagenomic library ซึ่งเป็นการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างดินโดยตรงและทำการหาฮีนจากตัวอย่างดินที่ทดลอง (Rodon *et al.*, 2000) ทำให้ได้เอนไซม์ชนิดใหม่ๆ มากมาย เช่น

lipases/esterases (Robertson *et al.*, 2004), amylase (Handelsman *et al.*, 1998), chitinase (Cottrell *et al.*, 1999) และ nitrilases (Robertson *et al.*, 2004) สำหรับงานวิจัยที่เกี่ยวข้องในการศึกษาเอนไซม์ lipase/esterase มีดังนี้

ในปี ค.ศ. 1998 Nomura และคณะศึกษาการโคลนยีนและการวิเคราะห์ลำดับเบสของเอนไซม์ polyurethane esterase จากเชื้อ *Comamonas acidovorans* TB-35 โดยพบว่าเอนไซม์นี้สามารถย่อยสลาย polyurethane (PUR) ได้ จากนั้นได้โคลนยีน *pudA* เข้า *E.coli* และพบว่าลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ประกอบด้วย Gly-X¹-Ser-X²-Gly โดย motif ประกอบด้วย serine hydrolases นอกจากนี้ยังพบว่าลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนจาก *Torpedo californica* acetylcholinesterase (TAcHE) ที่มี Ser-His-Glu catalytic triad โดยมี glutamate residue แทนที่ aspartate residue ยังพบว่าจำนวนกรดอะมิโน, ตำแหน่งของ cysteine และ salt bonds ยังเหมือนกันระหว่าง PudA และ TAcHE และยังเหมือนกันในส่วน α -helix และ β -strand เมื่อใช้โปรแกรม neighborhood พบว่า glutamate residue ของ Ser¹⁹⁹-His⁴³³-Glu³²⁴ catalytic domain ของ PudA จะเป็น hydrophobic domains ซึ่งหนึ่งในนั้นจะประกอบด้วย surface-binding domain โดยเกิดขึ้นบริเวณ C-terminus ของเอนไซม์ bacterial poly(hydroxyalkanoate) (PHA) depolymerases

ในปี ค.ศ. 2002 Kim และคณะศึกษาการคัดแยกเชื้อชนิดใหม่ *Bacillus stearothermophilus* JY 144 ที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ esterase ชนิดใหม่ที่สามารถไฮโดรไลซ์ *rac*-ketoprofen ethyl ester ไปเป็น enantiomer ของ ketoprofen สำหรับการคัดเลือกยีนนั้นจะใช้เทคนิค selective plate โดยการสังเกตการทำงานของเอนไซม์บน plate ที่มี (*R,S*)-ketoprofen ethyl ester เป็นสับสเตรต เอนไซม์ที่คัดเลือกได้นี้คือ (*R*)-stereospecific esterase โดยมีคุณสมบัติคือ ความเสถียรสูง (high stability) มีช่วง pH กว้าง (pH 6-9) และทนความร้อนได้สูงกว่า 65°C เอนไซม์จะทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 50°C และ pH 9 ในการทดลองนี้ได้มีการแสดงออกของยีนใน *E.coli* พบว่ามี ORF ที่มีลำดับกรดอะมิโน 250 อะมิโนซึ่งคำนวณมวลโมเลกุลได้ 27.4 kDa เมื่อเปรียบเทียบโครงสร้างของเอนไซม์ชนิดนี้กับในฐานข้อมูลที่เคยมีรายงานมาพบว่ามีค่าความเหมือนประมาณ 32-52%

ในปี ค.ศ. 2003 Kim และคณะศึกษายีน *estA* ซึ่งถูกโคลนจากเชื้อ *Acinetobacter lwoffii* I6C-1 พบว่ายีน esterase มีลำดับกรดอะมิโน 366 อะมิโนและมีมวลโมเลกุล 40,687 Da ค่า pI เท่ากับ 9.17 โปรตีน EstA มี signal peptide ยาว 31 อะมิโน ดังนั้นลำดับ mature esterase มีความยาว 335 อะมิโน (37.5 kDa) ตำแหน่ง catalytic serine ของ EstA อยู่ตำแหน่งที่ 210 เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของ EstA เปรียบเทียบในฐานข้อมูลพบว่า EstA มีความเหมือนกับ carboxylesterase จาก *Acinetobacter calcoaceticus* (75% identity, 85% similarity), *Archaeoglobus fulgidus* (37% identity, 59% similarity) และ *Mycobacterium tuberculosis* (35% identity, 51%

similarity) เอนไซม์ประกอบด้วย conserved motif $G-X_1-S-X_2-G$ และมี active-site serine ของเอนไซม์ hydrolytic

ในปี ค.ศ. 2004 Kim และคณะศึกษา thermostable esterase จากเชื้อ thermoacidophilic archaeon, *Sulfolobus solfataricus* P2 ซึ่งเป็นลิโพลิดิกเอนไซม์ที่มี consensus sequence Gly-X-Ser-X-Gly โดยพบว่ายีน *est3* จะถูกแสดงออกใน *E. coli* และเมื่อนำโปรตีน Est3 มาทำให้บริสุทธิ์และศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์พบว่า โปรตีนมีลักษณะแบบ trimeric protein มีมวลโมเลกุล 32 kDa มี pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมเท่ากับ 7.4 และ 80 °C ตามลำดับ เมื่อศึกษาสับสเตรทที่เหมาะสมพบว่าสามารถใช้สับสเตรทได้ในช่วงกว้างของ *p*-nitrophenyl esters ที่มีคาร์บอน C2 ถึง C16 เมื่อศึกษาผลของตัวยับยั้ง (inhibitor) พบว่า Est3 จะถูกยับยั้งด้วย phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) และ diethyl *p*-nitrophenyl phosphate นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์ Est3 สามารถไฮโดรไลซ์ methyl(±)-2-(3-benzoylphenyl)propionate-hydrolyzing ไปเป็น (-)-2-(3-benzoylphenyl)propionic acid ดังนั้นเอนไซม์ *S. solfataricus* esterase สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการสังเคราะห์สารจำพวก chiral compound ได้

ในปี ค.ศ. 2004 Su Ro และคณะศึกษาการโคลนนิ่งและคุณสมบัติของเอนไซม์ esterase ที่แยกได้จากแบคทีเรีย โดยพบ 30 ORF ที่ encode เอนไซม์ esterase และได้เลือก 13 ORF มาหาลำดับเบสและโคลนเข้า expression vector การทำงานของเอนไซม์ถูกทดสอบด้วย tributyrin ในการเป็นสับสเตรทสำหรับ 9 โคลนที่มีการทำงานของเอนไซม์ได้แก่ เอนไซม์ S5 จากยีน *b0494* ของ *E. coli*, เอนไซม์ S12 จากยีน *STMO506* ของ *Salmonella typhimurium* และ เอนไซม์ S28 จากยีน *AF1716* ของเชื้อ *Archaeoglobus fulgidus* ซึ่งเอนไซม์ทั้งหมดนี้จะมีการทำงานของเอนไซม์ที่ pH เป็นเบสสูง โดยเอนไซม์ S11 จากยีน *PA3859* ของ *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 และ เอนไซม์ S21 จากยีน *SMc0133* ของ *Sinorhizobium meliloti* 1021 จะทำงานที่ pH 8.0 นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์ S5, S12, S21 และ S28 ทำงานได้ที่อุณหภูมิ 50 °C

ในปี ค.ศ. 2004 Lee และคณะคัดเลือกลิโพลิดิกเอนไซม์ชนิดใหม่จากจุลินทรีย์ในดินที่ไม่สามารถเลี้ยงได้ในห้องปฏิบัติการ โดยเลือกเทคนิค metagenomic libraries เข้ามาใช้ในการทดลองนี้ โดยได้เก็บตัวอย่างดินจากป่า นำดินมาสกัดดีเอ็นเอแล้วโคลนเข้า fosmid จากนั้นคัดเลือกโคลนจากทั้งหมด 33,700 โคลน พบว่ามีโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอขนาด 35 kb เมื่อนำไปหาลำดับเบสพบว่า 8 โคลนที่มีการทำงานของเอนไซม์จากนั้นเลือกโคลนมาแสดงออกใน expression vector จะพบว่ามีลำดับกรดอะมิโนที่เหมือนในฐานข้อมูลเพียง 34-48% ซึ่งถือว่าเป็นการค้นพบเอนไซม์ชนิดใหม่

ในปี ค.ศ. 2005 Fuciños และคณะพบว่าเชื้อ *Thermus thermophilus* HB27 ผลิตเอนไซม์ extracellular lipases/esterases วิธีที่ใช้ในการตรวจสอบเอนไซม์ esterase คือการทำ non-reducing SDS-polyacrylamide electrophoresis ซึ่งเป็นวิธีที่ให้โปรตีนเกิด renaturalisation ใน SDS-gels เมื่อนำมาล้างด้วย Triton-X ที่อุณหภูมิสูง พบว่าสามารถแยกเอนไซม์ esterase ได้ 3 ชนิดที่มีมวล

โมเลกุลต่างกันได้แก่ 108, 62, และ 34 kDa ซึ่งชนิดที่มีขนาด 34 และ 108 โพรตีนมีลักษณะเป็น monomer และ trimer ตามลำดับ สำหรับวิธีการทำบริสุทธิ์เอนไซม์จะใช้ 3 ขั้นตอนคือ 1. การ treat ด้วย sodium cholate (sodium cholate treatment) 2. การตกตะกอนด้วย ethanol/ether (ethanol/ether precipitation) และ 3. hydrophobic chromatography และพบว่าเอนไซม์สามารถย่อยสลาย *p*-nitrophenyl laurate ที่ pH มีความเป็นเบส ที่อุณหภูมิ 80°C และยังสามารถทนต่อความเข้มข้นของ isopropanol ที่สูงได้ดีอีกด้วย

ในปี ค.ศ. 2007 Soliman และคณะศึกษาการโคลนและคุณสมบัติของเอนไซม์ thermostable esterase และ lipase จากเชื้อ *Geobacillus thermoleovorans* YN ที่แยกจากดินทะเลทรายในอียิปต์ การทดลองได้นำวิธี genomic library มาใช้ในการหา ยีน *EstA* และ *LipA* โดยคัดเลือกโคลนทั้งหมด 3,000 โคลน โคลนของยีน *EstA* มี ORF ขนาด 744 bp มีลำดับกรดอะมิโน 247 อะมิโน มีมวลโมเลกุล 29 kDa มีส่วน conserved GX SXG motif ซึ่งเหมือนกับ carboxyl esterases สำหรับยีน *LipA* พบว่ามี ORF 1251 bp มีลำดับกรดอะมิโน 416 อะมิโน มีมวลโมเลกุลขนาด 46 kDa โดยรวมโปรตีน signal peptides (28 อะมิโน) ดังนั้น mature lipase จะมีขนาด 43 kDa เมื่อศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ทั้งสองพบว่า มีการทำงานที่ pH ประมาณ 9.5 อุณหภูมิที่เหมาะสมประมาณ 70°C

ในปี ค.ศ. 2009 Meilleur และคณะคัดเลือกและศึกษาคุณสมบัติของ alkali-thermostable lipase ชนิดใหม่โดยอาศัยวิธี metagenomic library จากชีวมวล (biomass) ที่ได้จากการผลิตด้วยวิธี Sequencing Fed-Batch Reactor (SFBR) พบว่ายีนมี ORF ขนาด 928 bp มีลำดับกรดอะมิโน 308 อะมิโนและมีมวลโมเลกุล 32.6 kDa มีลำดับเบสที่บริเวณอนุรักษ์เป็น GX SXG เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนกับฐานข้อมูลพบมีความเหมือนประมาณ 52% ซึ่งถือว่าเป็นการค้นพบยีนชนิดใหม่ สำหรับการโคลนนั่น ได้ทำการโคลนยีนและดูการแสดงออกของเอนไซม์ใน *Streptomyces lividans* ในการทำบริสุทธิ์เอนไซม์จะใช้วิธี hydrophobic interaction และ size-exclusion chromatography และยังพบว่าเอนไซม์นี้มีการทำงานดีที่สุดที่ 60°C และ pH 10.5

ในปี ค.ศ. 2010 Yu และคณะศึกษาการโคลนยีนและคุณสมบัติของเอนไซม์ thermophilic esterase ชนิดใหม่จากเชื้อ *Fervidobacterium nodosum* Rt17-B1 เอนไซม์ FNE มีการทำงานของ esterase 14,000 U/mg โดยการใช้ *p*-nitrophenyl acetate (*p*NPC₂) เป็นสับสเตรท ค่า catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) ของ *p*-nitrophenyl acetate (C₂) จะสูงเป็น 120 เท่าเมื่อเทียบกับสับสเตรท *p*-nitrophenyl butyrate (C₄) แต่เอนไซม์ esterase จะไม่ทำงานเมื่อสับสเตรทมีสายคาร์บอนสูงกว่าหรือเท่ากับ 8 (≥8) เมื่อทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์พบว่าเป็นโปรตีนแบบ monomeric ที่มีมวลโมเลกุล 27.5 kDa และให้การทำงานได้ดีที่สุดที่ อุณหภูมิ 75°C ที่ pH 8.5 เมื่อวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของ FNE พบว่ามีลักษณะอยู่ในกลุ่ม GSDL family และถูกจัดจำแนกในกลุ่ม SGNH hydrolase

จากรายงานที่กล่าวมานั้น จะเห็นได้ว่าจุลินทรีย์ในดินมีขึ้นที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในดินซึ่งเป็นพวกไลโปไลติกเอนไซม์มากมาย แต่การศึกษายีน esterase/lipase ในกลุ่มแอคติโนมัยซีตยังมีผู้วิจัยไม่มากนัก ดังนั้นจึงเกิดความสนใจในการหาเอนไซม์ esterase/lipase ในเชื้อ *Actinomadura* sp. S14 เพื่อให้ทราบคุณสมบัติของเอนไซม์ที่ได้จากยีนของเชื้อชนิดนี้ นอกจากนี้ยังถือเป็นรายงานครั้งแรกและสามารถต่อยอดในงานวิจัยเพื่อนำไปสู่การประยุกต์ใช้ได้ในอนาคต



บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

1. สายพันธุ์แบคทีเรีย, พลาสมิด และสถานะที่เลี้ยงเชื้อ

เชื้อแบคทีเรีย *Actinomadura* sp. S14 ที่แยกได้จากตัวอย่างดินในประเทศไทยโดยการจัดจำแนกสายพันธุ์ด้วยลำดับเบสของยีน 16S rDNA (accession number GQ340794)

E. coli Rosetta gami B (DE3) ถูกนำมาใช้เป็น host สำหรับขั้นตอนการแสดงออกของยีน และ pQE80L สำหรับใช้เป็น expression vector

Tributyryn agar plate ใช้สำหรับคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียทนร้อนที่ย่อยสลาย tributyrin เพื่อคัดเลือกเอนไซม์ esterase

2. การสกัด Chromosomal DNA

ทำการสกัด chromosomal DNA ของ *Actinomadura* sp. S14 โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร LB medium low salt ซึ่งประกอบด้วย (g/L) yeast extract 5 g, peptone 10 g, NaCl 5 g ที่อุณหภูมิ 55 °C บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 3-4 วัน จากนั้นนำมาสกัด DNA

3. การแสดงออกของยีนและการทำบริสุทธิ์ของเอนไซม์ esterase

3.1 การสังเคราะห์และเพิ่มจำนวนชิ้น DNA ของยีน esterase โดยวิธี PCR

ทำการเพิ่มจำนวนชิ้น DNA ของยีน esterase โดยวิธี PCR ส่วนผสมของ PCR ทั้งหมด (PCR mixtures 25 μ l) ประกอบด้วย 10 pmol ของแต่ละ primer Hydo-Bam 5'GGATCCAGCAGGTTTCGCGCGCACGGT3' และ Hydo-Pst 5'CTGCAGCTATGCGGCGGTCTCGTCGA3' 0.25U ของ KOD-Plus DNA polymerase, 1x KOD-Plus DNA polymerase buffer, 2mM MgCl₂, 0.2 mM ของ dNTP and 1 μ l dimethyl sulfoxide (DMSO). PCR condition จะถูก set ไว้ที่ 35 รอบ โดยแต่ละรอบประกอบด้วยขั้นตอนที่ 98°C เป็นเวลา 15 วินาที, 65°C เป็นเวลา 1 นาที, และ 68°C เป็นเวลา 1 นาที. PCR product จะถูกโคลนเข้า pGEM-T easy vector เพื่อนำไปหาลำดับเบสอีกครั้ง

3.2 การแสดงออกของยีน esterase

ทำได้โดยสกัดพลาสมิด DNA (pGEM-T ที่เชื่อมกับ PCR product) จากนั้นนำพลาสมิดมาตัดด้วย *Bam*HI และ *Pst*II ที่มีขนาด 777 bp นำมาเชื่อมกับ pQE80L expression vector ที่ตัดด้วย *Bam*HI และ *Pst*II เช่นกัน ภายหลังการเชื่อมกันจะได้ pQE80L-*estS14* ซึ่งจะถูกนำเข้า *E. coli* Rosetta-gami B(DE3)

3.3 การทำให้เอนไซม์ บริสุทธิ์

โดยมีวิธีการดังนี้ เลี้ยงเชื้อ *E. coli* Rosetta-gami (pQE80L-*est14*) ใน 5 ml LB amp medium เชยที่ 180 rpm ที่อุณหภูมิ 37°C ตลอดคืนเพื่อเตรียมเป็น stock culture จากนั้นนำ stock culture 1 ml ถ่ายใส่ 100 ml ของอาหาร LB amp medium ใหม่ที่อยู่ใน flask ขนาด 500 ml นำไปเลี้ยงบนเครื่องเชยที่ 180 rpm ที่ 37°C และวัดค่า OD₆₀₀ ให้ได้ประมาณ 0.6 เติม Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) เพื่อให้เกิดการเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีน โดยมีความเข้มข้นสุดท้ายคือ 1 mM จากนั้นเลี้ยงเซลล์ต่อไปอีก 10 ชั่วโมงที่ 37°C จากนั้นเก็บเซลล์โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที นำเซลล์มาล้างด้วย 0.85% NaCl และนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง เซลล์จะถูกนำมาละลายด้วย binding buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl and 20 mM imidazole, pH8.0) จากนั้นทำให้เซลล์แตกโดยใช้วิธี sonication ด้วย Ultrasonic machine นำเซลล์ที่แตกแล้วไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm ที่ 4°C เป็นเวลา 25 นาที ส่วน supernatant จะนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Heat treatment และ Ni⁺ column

Heat treatment

โดยการนำส่วนของ supernatant มาบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 40, 50, 60, 70, และ 80°C เป็นเวลา 10 นาที เพื่อกำจัดหรือลดปริมาณโปรตีนชนิดอื่นๆ ก่อนที่จะนำ supernatant นี้ลง Ni⁺ column ของขั้นตอนต่อไป

การทำวิธีนี้ได้เนื่องจากเอนไซม์ esterase จากเชื้อ *Actinomadura* sp. S14 เป็นเชื้อชอบร้อน และยังเป็นพวก thermophilic enzyme คือ สามารถทนอุณหภูมิได้สูงกว่า 45°C ดังนั้นวิธีนี้จึงเป็นขั้นตอนหนึ่งในการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์

Ni⁺ column

เริ่มต้นโดยการล้างคอลัมน์ให้สะอาด นำ Ni⁺ resin ใส่ลงในคอลัมน์ จากนั้นล้างด้วยน้ำสะอาดเป็นจำนวน 5 เท่า (5x) ของเรซินที่ pack อยู่ในคอลัมน์ จากนั้นล้างด้วย binding buffer เป็นจำนวน 5x ของเรซินเช่นกัน จากนั้นนำ supernatant ที่ผ่านการทำ heat treatment มา load ลงในคอลัมน์ โดยให้ supernatant อยู่ในเรซิน เป็นเวลา 10-30 นาที ล้างคอลัมน์ด้วย binding buffer เป็นจำนวน 5x ของเรซิน เก็บ fraction ทุกๆ fraction ประมาณ 1 ml โปรตีนที่บริสุทธิ์จะถูกชะออกมาด้วย elution buffer

4. การวัดความเข้มข้นของโปรตีน

การวัดความเข้มข้นของโปรตีนโดยวิธี Bradford method (Bradford, 1976) เป็นวิธีที่รวดเร็วและง่ายอาศัยการเกิดสีและวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ OD 595 ด้วยเครื่อง spectrophotometer วิธีการเริ่มจากการเตรียม protein standard คือ BSA (Bovine serum albumin) ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 0, 1.25, 2.5, 5, 10, 15, 20 และ 25 µg/ml จากนั้นดูด BSA แต่ละความเข้มข้นใส่ในหลอดทดลอง 0.7 ml เติม dye stock (ready to use) ปริมาณ 0.7 ml เชยและผสมกัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง

เป็นเวลา 5 นาที และนำไปวัดค่า OD 595 บันทึกผลการทดลอง จากนั้นนำมาวาดกราฟมาตรฐาน (protein standard curve)

ในการวัดความเข้มข้นโปรตีนของตัวอย่าง เริ่มจากดูดโปรตีนตัวอย่าง 0.7 ml ใส่ในหลอดทดลอง จากนั้นเติม dye stock (ready to use) 0.7 ml เขย่าและผสมกัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที และนำไปวัดค่า OD595

ข้อควรระวัง ในการวัดความเข้มข้นของโปรตีนตัวอย่าง ถ้าความเข้มข้นที่วัดได้มากกว่าค่าที่มากที่สุดในกราฟมาตรฐาน ควรนำโปรตีนมาทำการเจือจางเพื่อให้อยู่ในช่วงค่าที่มีอยู่ในกราฟ

5. การวัดการทำงานของเอนไซม์ esterase

ในการวัดเอนไซม์ esterase จะวัดที่อุณหภูมิ 55°C ซึ่ง reaction mixture ประกอบด้วย 50 μ l ของ 1 M Tris-HCl pH 8, 10 μ l ของ 10% TritonX-100, 10 μ l ของ 10% Gum Arabic, 100 μ l ของ 30 mM pNP-butyrate in DMSO and 100 μ l ของเอนไซม์ ดังนั้น reaction mixture ทั้งหมด 1 ml การเกิดสีของ pNP จะวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 (OD410) ด้วยเครื่อง spectrophotometer

1 ยูนิต (unit) ของเอนไซม์ esterase หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ปลดปล่อย 1 ไมโครโมลล์ ของ *p*-nitrophenol ออกมาในเวลา 1 นาที

6. Electrophoresis of protein

การควบคุมบริสุทธิ์และการประมาณขนาดของโปรตีนบนแผ่นเจลออสซิลี Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) โดยใช้ 12.5% polyacrylamide gel โดยเปรียบเทียบกับ protein marker ที่รู้ขนาด เริ่มจากการเตรียมโปรตีนตัวอย่าง โดยละลายโปรตีนตัวอย่างใน 6X buffer (3.8 ml ของ H₂O, 1 ml ของ 0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 0.8 ml ของ glycerol, 1.6 ml ของ 10% SDS, 0.4 ml ของ β -mercaptoethanol และ 0.4 ml ของ bromophenol blue) จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที หลังจากนั้นนำมาทำ electrophoresis แล้วจะนำมาย้อมด้วยสี Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB)

7. การตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ esterase ภายหลังการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์โดยวิธี zymography

วิธีนี้เป็นเทคนิคที่เรียกว่า electrophoretic technique โดยอาศัยการทำ SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) ซึ่งประกอบด้วยชั้นสเตรทที่รวม (copolymerized) กับ polyacrylamide gel สำหรับตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์

โดยมีหลักการดังนี้ เริ่มจากเตรียมโปรตีนตัวอย่างที่ run อยู่ใน SDS-PAGE จากนั้นนำมา treat ด้วย buffer เพื่อกำจัด SDS ออกจากเจลแล้วนำมาบ่มกับ Triton X-100 ที่ 37°C สำหรับสี zymogram ที่ใช้ย้อมจะใช้ Amido Black หรือ Coomassie Brilliant Blue ก็ได้ ซึ่ง band ที่ปรากฏบนแผ่นเจลจะเป็นสีดำแสดงว่าเอนไซม์สามารถย่อยสลายได้ นั่นคือ มีการทำงานของเอนไซม์

วิธีการทดลองเริ่มจากการเตรียมแผ่นสำหรับ run gel เป็นจำนวน 2 แผ่น โดยแผ่นที่ 1 สำหรับนำโปรตีนมา run gel มีส่วนประกอบเหมือนกับหัวข้อที่ 4 สำหรับแผ่นที่ 2 เป็นการเตรียม 12.5 % polyacrylamide gel ที่ประกอบด้วย 0.5% tributyrin ซึ่งเป็นสับสเตรทของเอนไซม์ esterase ภายหลัง run gel แผ่นที่ 1 เสร็จเรียบร้อยแล้ว จะต้องนำมากำจัด SDS ออกโดยการนำมาแช่และเขย่าเบาๆใน 25% (v/v) isopropanol ที่ 4 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำ gel มาล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง เพื่อกำจัด isopropanol สำหรับ gel ที่ล้างแล้วจะถูกนำมา reform เพื่อให้เอนไซม์ทำงานได้อีกครั้ง โดยการนำมาบ่มใน buffer ที่ประกอบด้วย 100 mM Tris-HCl pH 8, 0.5% tributyrin และ 0.5% triton X 100 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำโปรตีน gel แผ่นที่ 1 ไปทับกับแผ่น gel ที่ 2 โดยเอาฟรอยด์ห่อไว้ และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55°C ทิ้งไว้ข้ามคืน

8. การศึกษาคุณสมบัติต่างๆของเอนไซม์ esterase

การศึกษาการทำงานของเอนไซม์ (enzymatic assay) วัดจากปฏิกิริยา hydrolysis ของ *p*-nitrophenyl esters โดยส่วนประกอบในการวัดปฏิกิริยาประกอบด้วย Tris-HCl pH 7, *p*-nitrophenyl butyrate, เอนไซม์ esterase ทำการบ่มเป็นเวลา 5 นาที และวัดค่า optimal density (OD) ที่ 410 นาโนเมตร ซึ่งเป็นการวัดสีเหลืองจากผลิตภัณฑ์ *p*-nitrophenol ที่เกิดขึ้น

การวัดความจำเพาะของสับสเตรท (substrate specificity) ทำได้โดยใช้สับสเตรทที่มีสายคาร์บอนต่างกัน เช่น *p*-nitrophenyl butyrate (C4), *p*-nitrophenyl valerate (C5), *p*-nitrophenyl caprate (C10) เป็นต้น

การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ โดยนำเอนไซม์ reaction บ่มที่อุณหภูมิตั้งแต่ 30-90°C จากนั้นนำไปหาปริมาณ *p*-nitrophenol ที่เกิดขึ้น ในส่วนของการวัด pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ ทำได้โดยการเตรียมสับสเตรทที่ pH ต่างๆ เช่น ช่วง pH 3-7, pH 7-9 และ pH 9-10 และนำมาใช้ในการทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ เพื่อวัดกิจกรรมของเอนไซม์

การหาความคงทนต่ออุณหภูมิในการทำงานของเอนไซม์ (thermostability) นำเอนไซม์ บ่มที่อุณหภูมิในช่วง 30-90°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำให้เย็นทันที และนำเอนไซม์ไปวิเคราะห์กิจกรรมโดยวิธีข้างต้น การหาความคงทนของเอนไซม์ต่อค่าพีเอช (pH stability) นำเอนไซม์ไปบ่มที่ พีเอชต่างๆ เป็นเวลา 12 ชั่วโมงที่ 4°C จากนั้นนำเอนไซม์ที่ได้มาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

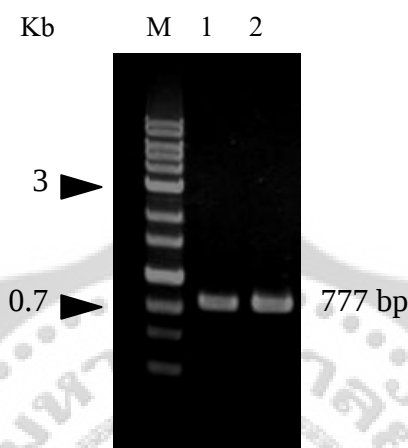
การวัดผลของโลหะต่อการทำงานของเอนไซม์ทำได้โดยการเตรียมสารละลายไอออนชนิดต่างๆ เช่น Na^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} และ Co^{2+} เป็นต้น ผสมกับเอนไซม์และบ่มที่ 4°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเจือจาง และวัดกิจกรรมของเอนไซม์



บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

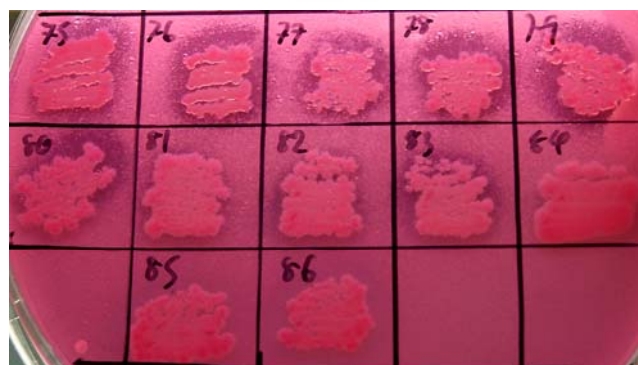
1. การโคลนนิ่ง การแสดงออกของเอนไซม์ esterase (EstS14)

การโคลนนิ่งยีน esterase (*estS14*) เริ่มจากการสกัด chromosomal DNA ของ *Actinomadura* sp. strain S14 สำหรับใช้เป็น DNA template สำหรับการทำให้ PCR ของยีน esterase ผลการทดลองพบว่า PCR product ที่ได้มีขนาดประมาณ 777 bp ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 PCR product ของ *estS14* gene จากเชื้อ *Actinomadura* sp. strain S14. Lane M คือ 1kb leader และ lane 1 และ 2 คือ PCR product ที่มีขนาด 777 bp.

เมื่อได้ PCR product ที่เป็น target DNA ของยีน esterase จึงนำไปโคลนเข้า pGEM-T easy vector ซึ่งเป็น cloning vector สำหรับตรวจสอบผลลำดับเบสของยีนนี้อีกครั้ง จากนั้นนำ target DNA โคลนเข้า pQE80L vector ซึ่งเป็น expression vector สำหรับการแสดงออกของเอนไซม์ EstS14 ผลการทดลองพบว่า โคลนที่มียีนทำงานของเอนไซม์ EstS14 จะให้ clear zone รอบๆ โคลนบน LB_{amp-tributylin} agar plate ดังแสดงในภาพที่ 2

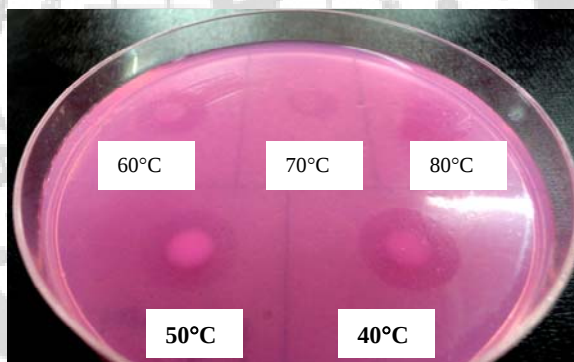


ภาพที่ 2 โคลนรีคอมบิแนนท์ (recombinant) ของ esterase โดยเชื้อโคลนบน LB_{amp-tributylin} agar ซึ่งบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 1-2 วัน

เมื่อวิเคราะห์ลำดับเบส open reading frame (ORF) ของยีน *estS14* ที่มีขนาด 777 bp ซึ่ง encode โปรตีนที่มีลำดับกรดอะมิโนขนาด 259 aa (amino acid) และมีน้ำหนักมวลโมเลกุลประมาณ 30 kDa โดยวิธี SDS-PAGE โดยพบว่าเมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของยีนนี้ไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Blast จะถูกจัดจำแนกอยู่ในกลุ่มของ α/β -hydrolase ที่มีลำดับเบสแบบ GX SXG ซึ่งเป็นลำดับเบสสำคัญที่พบได้ในยีนของ lipase/esterase นอกจากนี้ GX SXG motif ของ esterase ประกอบด้วย highly conserved GX-motif ของ oxyanion hole architecture จึงจัดอยู่ใน class GX (Pleiss et al., 2000)

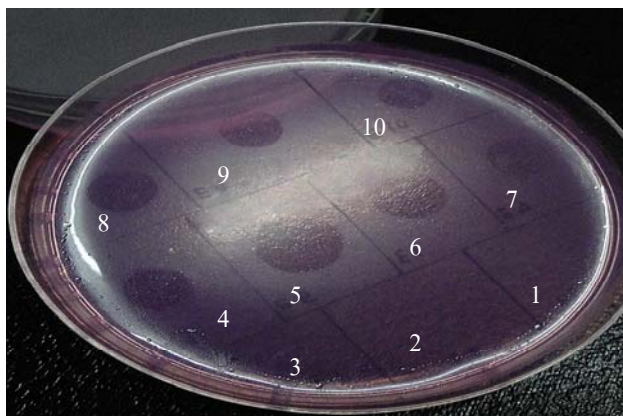
2. การทำเอนไซม์ EstS14 ให้บริสุทธิ์โดยวิธี heat treatment และวิธี Ni⁺ column

การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนแรกคือ การนำ supernatant มา treat ด้วยความร้อนที่อุณหภูมิต่างๆ กัน ผลการทดลองพบว่าเมื่อนำ supernatant มาบ่มที่อุณหภูมิ 40, 50, 60 °C เอนไซม์ยังสามารถทำงานได้ แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิ เป็น 70 และ 80 °C เอนไซม์ทำงานได้ลดลง โดยดูจากการเกิด clear zone รอบๆ เอนไซม์ที่หยดบน tributyrin plate ที่ประกอบด้วย 0.7% agar, 50 mM Tris-HCl pH 7, 0.1% tributyrin และ 0.001% rhodamine B ดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 การศึกษาวิธี Heat treatment ของ supernatant จากอุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นจึงนำมาบ่มที่ 55 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อดูผลการเกิด clear zone บน plate

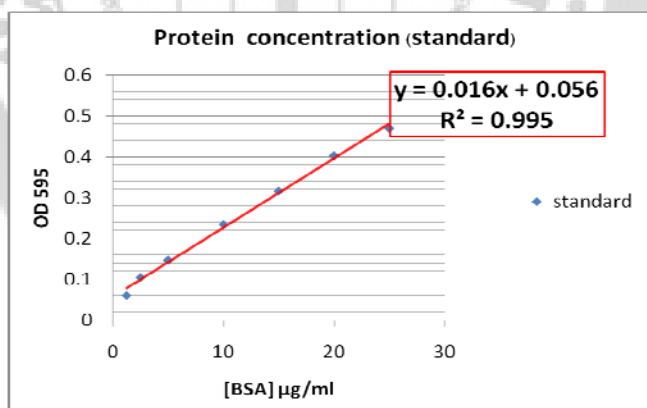
ในการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ในขั้นที่ 2 โดยเลือก supernatant ที่ผ่านการ treat ด้วยความร้อนที่ 60 °C เป็นเวลา 10 นาทีมาทำให้บริสุทธิ์ต่ออีกครั้งด้วยการ load ลงใน Ni⁺ column เมื่อเก็บ elution buffer fraction ตั้งแต่ fraction number 1-10 พบว่า ตั้งแต่ no. 4 – no. 10 พบการทำงานของเอนไซม์ esterase โดยสังเกตได้จากการเกิด clear zone บน tributyrin plate ดังแสดงในภาพที่ 4



ภาพที่ 4 Elution buffer fraction no. 1-10 ที่หยดบน tributyrin plate และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดย fraction ที่มีการทำงานของเอนไซม์จะเห็น clear zone บน plate

3. การวัดความเข้มข้นของโปรตีน

การวัดความเข้มข้นของโปรตีน เริ่มจากการทำ protein standard curve ของ Bovine serum albumin (BSA) ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 1.25, 2.5, 5, 10, 15, 20 และ 25 µg/ml ดังแสดงในภาพที่ 5



ภาพที่ 5 กราฟแสดง protein standard curve

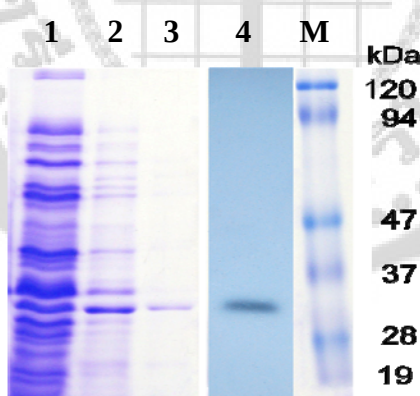
ดังนั้นเมื่อทราบความเข้มข้นของโปรตีนแล้ว จากนั้นจะเข้าสู่ขั้นตอนการหาค่าที่สำคัญ เช่น การหาค่าการทำงานของเอนไซม์ เช่น การทำงานจำเพาะของเอนไซม์ (specific activity) เป็นต้น ซึ่งค่าต่างๆ ได้แสดงผลไว้ในตารางที่ 1 เป็นตารางแสดงผลการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ในแต่ละขั้นตอน

ตารางที่ 1 แสดงผลการทำเอนไซม์ EstS14 ให้บริสุทธิ์

Purification step	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Cell lysate	1810	264	6.9	1	100
Heat treatment	1565	95	16.5	2.4	86.5
Ni+column	573	3.6	159.2	23.1	31.7

การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ (ตารางที่ 1) พบว่า cell-free extract มีค่า specific activity ที่ 6.9 U/mg และ เมื่อผ่านการ heat-treated cell-free extract ที่ 60°C เป็นเวลา 10 นาที ให้ค่า specific activity 16.5 U/mg ซึ่งมีค่า purification fold เท่ากับ 2.4 เท่า และ เมื่อผ่าน Ni²⁺ column พบว่ามีค่า specific activity ที่ 159.2 U/mg และมีค่า purification fold เท่ากับ 23.1 เท่า

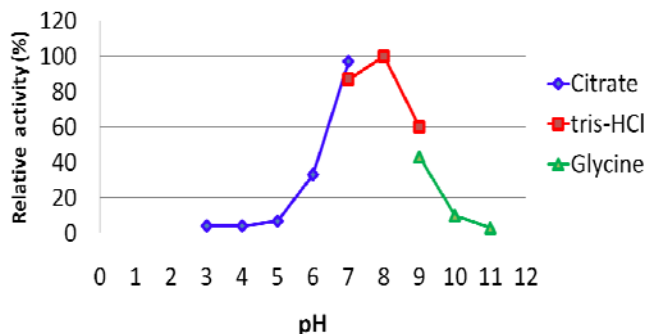
การตรวจสอบถึงความบริสุทธิ์และขนาดของเอนไซม์ด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่าเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มีขนาดประมาณ 30 KDa เมื่อเปรียบเทียบกับ protein marker ดังแสดงในภาพที่ 6 นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์ยังมีการทำงานของ esterase เนื่องจากตรวจสอบโดยการทำ zymogram ซึ่งมีการเกิดเป็น band ขึ้นบนแผ่น gel SDS-PAGE



ภาพที่ 6 การทำบริสุทธิ์ของเอนไซม์ EstS14 โดย lane 1 คือ cell free extract ของ *E. coli* Rosetta-gami (pQE80L-*est14*), lane 2 คือ supernatant จาก heat-treated cell-free extract (60°C), lane 3 คือ เอนไซม์ EstS14 ที่ทำบริสุทธิ์, lane 4 คือ zymogram ของ active fraction และ M คือ protein marker.

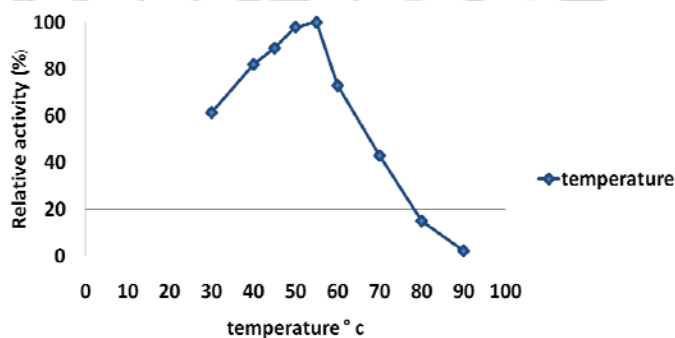
4. การศึกษาคุณสมบัติต่างๆของเอนไซม์ EstS14

การศึกษาค่าความเป็นกรด-เบส (pH) ที่เหมาะสมของเอนไซม์พบว่า เอนไซม์ทำงานได้ดีที่ pH 8 ดังแสดงในภาพที่ 7



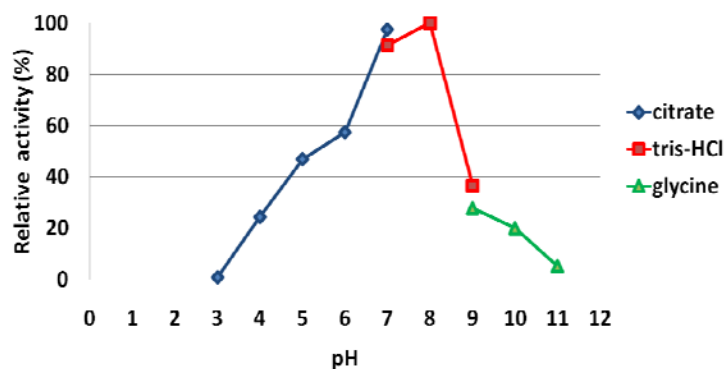
ภาพที่ 7 Optimal pH ของเอนไซม์ EstS14

การศึกษาค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมของเอนไซม์พบว่า EstS14 ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 55°C ดังแสดงในภาพที่ 8



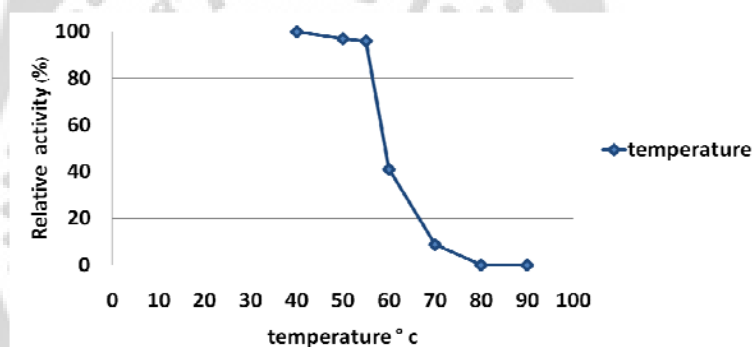
ภาพที่ 8 Optimal temperature ของเอนไซม์ EstS14

การศึกษาคงทนของค่าความเป็นกรด-เบส โดยบ่มเอนไซม์กับ buffer ที่มีค่า pH ต่างๆ ที่อุณหภูมิ 55°C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำวัดการทำงานของเอนไซม์ ผลการทดลองพบว่า เอนไซม์ทำงานได้ดีในช่วง pH 7-8 ดังแสดงในภาพที่ 9



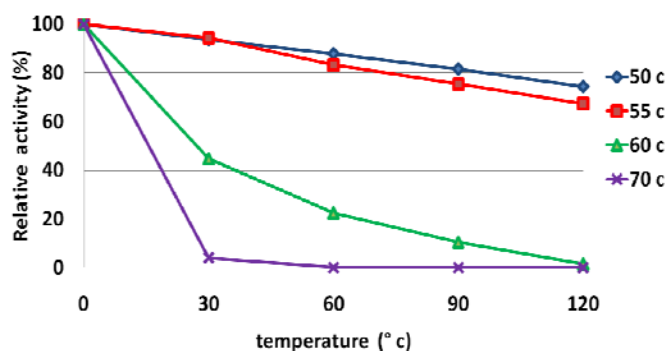
ภาพที่ 9 pH stability ของเอนไซม์ EstS14

การศึกษาความคงทนของเอนไซม์เมื่อบ่มไว้ที่อุณหภูมิต่างๆกัน โดยบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 40°C - 90°C เป็นเวลา 30 นาที และนำมาวัดการทำงานของเอนไซม์ ผลการทดลองพบว่า เอนไซม์ทำงานได้ตั้งแต่อุณหภูมิ 40 - 55°C ดังแสดงในภาพที่ 10



ภาพที่ 10 Temperature stability ของเอนไซม์ EstS14

เมื่อนำเอนไซม์มาบ่มกับ Tris-HCl pH 8 ที่อุณหภูมิ 50°C , 55°C , 60°C และ 70°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างที่เวลา 30, 60, 90 และ 120 นาที แล้วนำมาวัดการทำงานของเอนไซม์ ผลการทดลองพบว่า เอนไซม์มีความคงทนที่อุณหภูมิ 50 - 55°C ในเวลา 2 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพที่ 11



ภาพที่ 11 Temperature stability ของเอนไซม์ EstS14 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 50, 55, 60 และ 70 °C ในเวลา 2 ชั่วโมง

การวัดความจำเพาะของสับสเตรท (substrate specificity) โดยใช้สับสเตรทที่มีสายคาร์บอนต่างกัน พบว่า เอนไซม์ทำงานได้ดีต่อสับสเตรท pNp-butyrate (C4) ดังแสดงค่าในตารางที่ 2

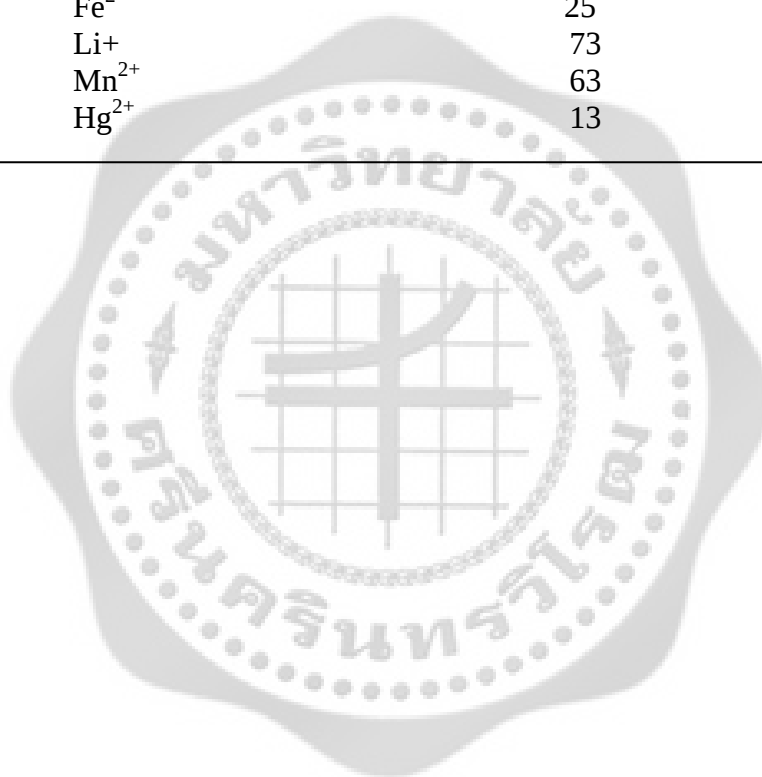
ตารางที่ 2 แสดงค่า substrate specificity โดยเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์ของค่า relative activity

Substrates	Relative activity (%)
pNp-acylestes	
pNp-acetate (C2)	89
pNp-butyrate (C4)	100
pNp-hexanoate (C6)	21
pNp-caprylate (C8)	14

การวัดผลของโลหะต่อการทำงานของเอนไซม์ พบว่า เมื่อผสมสารละลายโลหะที่ความเข้มข้น 1 mM กับเอนไซม์ และบ่มไว้ที่ 4 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวัดการทำงานของเอนไซม์ ผลการทดลองพบว่า Cu^{2+} , Fe^{2+} และ Hg^{2+} ลดการทำงานของเอนไซม์ 47%, 25% และ 13% ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงผลของสารละลายโลหะหนัก (1 mM) ต่อการทำงานของเอนไซม์

Metal	Relative activity (%)
Blank	100
Co ²⁺	71
Mg ²⁺	110
KCl	115
Ca ²⁺	102
Cu ²⁺	47
Ni ²⁺	80
Rb ²⁺	88
Zn ²⁺	64
Fe ²⁺	25
Li ⁺	73
Mn ²⁺	63
Hg ²⁺	13



บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

งานวิจัยนี้มีความสนใจในการศึกษายีน *esterase* จากเชื้อขอบรื้อน *Actinomadura* sp S14 (accession number QC 340794) ที่ย่อยสลาย PCL ซึ่งเป็นพลาสติกทางชีวภาพ จากรายงานก่อนหน้านี้ พบว่ายีน *estS14* โคลนเข้า expression vector เพื่อให้เกิดการแสดงออกของเอนไซม์ EstS14

การศึกษาเอนไซม์ EstS14 เป็นการตรวจสอบว่าการโคลนยีน *estS14* เป็นผลสำเร็จ เนื่องจากยีนมีการแสดงออก โดยเริ่มจากการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี heat treatment และ Ni⁺ column

วิธี heat treatment พบว่าการที่เอนไซม์สามารถทำวิธีนี้ได้ เนื่องจากเอนไซม์ขอบรื้อน ก็สามารถทนอุณหภูมิที่สูงกว่า 45 °C ได้ ดังนั้นเอนไซม์ใดที่ไม่ใช่เอนไซม์ขอบรื้อนก็จะถูกแยกออกไปจาก supernatant สำหรับวิธี Ni⁺ column นั้น เนื่องจาก expression vector มีส่วนของ 6xhis – tag protein เกาะอยู่กับเอนไซม์ EstS14 ดังนั้นเมื่อนำมาผ่านคอลัมน์พบว่ามีเฉพาะเอนไซม์ EstS14 เท่านั้นที่เกาะกับ Ni⁺ resin ส่วนโปรตีนอื่นๆที่ปนเปื้อนมาจะถูกล้างหรือชะออกไปหมด ซึ่งวิธีนี้อาศัยหลักการ ion-exchange chromatography

เมื่อนำเอนไซม์ที่บริสุทธิ์มา run gel เปรียบเทียบขั้นตอนการทำบริสุทธิ์และศึกษาขนาด พบว่า วิธี heat treatment ยังพบโปรตีนอื่นๆ ปะปนอยู่ใน supernatant และเมื่อนำมาผ่าน Ni⁺ column พบเฉพาะโปรตีนของเอนไซม์ *esterase* เท่านั้น ซึ่งถือว่าเป็นผลสำเร็จในการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ จากนั้นนำเอนไซม์มาตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ภายหลังที่ผ่านคอลัมน์ด้วยวิธี zymogram พบว่าเอนไซม์ยังมีการทำงานได้ดี โดยปรากฏ band ขึ้นบนแผ่นเจล

การศึกษาคณสมบัติต่างๆ ของเอนไซม์ พบว่า เอนไซม์ทำงานได้ดีที่ pH 8 ที่อุณหภูมิ 55°C เมื่อศึกษาความคงทนของเอนไซม์ พบว่าการทำงานของเอนไซม์คงตัวที่ pH 7-8 และที่อุณหภูมิในช่วง 40-55°C

การวัดความจำเพาะของสับสเตรท พบว่าเอนไซม์ทำงานได้ดีต่อสับสเตรท pNp-butyrate (C4) และ เมื่อศึกษาผลของสารละลายโลหะต่อเอนไซม์พบว่า Cu²⁺, Fe²⁺ และ Hg²⁺ ลดการทำงานของเอนไซม์ 47%, 25% และ 13% ตามลำดับ

จากข้อมูลทั้งหมดที่ได้ถือเป็นการรายงานครั้งแรกสำหรับการหายีน *esterase* ในเชื้อ *Actinomadura* ที่แยกได้จากดินในประเทศไทย สำหรับงานวิจัยที่สนใจและกำลังศึกษาต่อไปนั้นจะเป็นการหายีนที่ควบคุมการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ

บรรณานุกรม

1. Arpigny, J.L. and Jaeger, K.E. (1999) Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochemical Journal*. 343: 177-183.
2. Cottrell, M.T., Moore, J.A. and Kirchman, D.L. (1999) Chitinases from uncultured marine microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 2553-2557.
3. Cruz, H., Perez, C., Wellington, E., Castro, C. and Servin-Gonzalez, L. (1994) Sequence of the *Streptomyces albus* G lipase-encoding gene reveals the presence of a prokaryotic lipase family. *Gene*. 144: 141-142.
4. Fuciños, P., Abadín, C.M., Sanromán, A., Longo, M.A., Pastrana, L. and Rúa, M.L. (2005) Identification of extracellular lipases/esterases produced by *Thermus thermophilus* HB27: partial purification and preliminary biochemical characterization. *Journal of Biotechnology*. 117: 233-241.
5. Glass, J. E. and Swift, G. (1989) Agricultural and Synthetic Polymers, Biodegradation and Utilization, ACS symposium series, 433. Washington DC. American Chemical Society. p. 9-14.
6. Handelsman, J., Rondon, M.R., Brady, S.F., Clardy, J. and Goodman, R.M. (1998) Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chemistry and Biology*. 5: 245-249.
7. Hemilä, H., Koivula, T.T., and Palva, I. (1994) Hormone-sensitive lipase is closely related to several bacterial proteins, and distantly related to acetylcholinesterase and lipoprotein lipase: identification of a superfamily of esterases and lipases. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1210: 249-253.
8. Kim, H.E., Lee, I.S., Kim, J.H., Hahn, K.W., Park, U.J., Han, H.S., and Park, K.R. (2003) Gene cloning, sequencing, and expression of an esterase from *Acinetobacter lwoffii* I6C-1. *Current Microbiology*. 46: 291-295.
9. Kim, J.Y., Choi, G-S, Kim, Y-J, Ryu, Y-W and Kim, G-J. (2002) A new isolate *Bacillus stearothermophilus* JY144 expressing a novel esterase with high enantioselectivity to (R)-ketoprofen ethyl ester: strain selection and gene cloning. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 18: 133-145.
10. Kim, S. and Lee, S.B. (2004) Thermostable esterase from a thermoacidophilic archaeon: purification and characterization for enzymatic resolution of a chiral compound. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 68: 2289-2298.

11. Kim, Y.S., Lee, H.B., Choi, K.D., Park, S. and Yoo, O.J. (1994) Cloning of *Pseudomonas fluorescens* carboxylesterase gene and characterization of its product expressed in *Escherichia coli*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 58: 111-116.
12. Lee, S-W, Won, K., Lim, H.K., Kim, J-C, Choi, G.J. and Cho, K.Y. (2004) Screening for novel lipolytic enzymes from uncultured soil microorganisms. *Applied Microbiology Biotechnology*. 65: 720-726
13. Marmur, J.A. (1961) A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *Journal of Molecular Biology*. 3:208-218.
14. Mayer, J.M. and Kaplan, D.L. (1994) Biodegradable materials: balancing degradability and performance. *Trends in Polymer Science*. 2: 227-235.
15. Meilleur, C., Hupé, J-F, Juteau, P. and Shareck, F. (2009) Isolation and characterization of a new alkali-thermostable lipase cloned from a metagenomic library. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 36: 853-861.
16. Murphy, C.A., Cameron, J.A., Huang, S.J., and Vinopal R.T. (1996) Fusarium polycaprolactone depolymerase is cutinase. *Applied and Environmental Microbiology*. 62: 456-460.
17. Nomura, N., Shigeno-Akutsu, Y., Nakajima-Kambe, T., and Nakahara, T. (1998) Cloning and sequence analysis of a polyurethane esterase of *Comamonas acidovorans* TB-35. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 86: 339-345.
18. Oda, Y., Naoya, O., Teizi, U. and Kenzo, T. (1997) Polycaprolactone depolymerase produced by the bacterium *Alcaligenes faeacilis*. *FEMS Microbiology Letters*. 152:339-343.11
19. Ollis, D.L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S.M., et al. (1992) The alpha/beta hydrolase. *Protein Engineering*. 5: 197-211.
20. Owusu, R.K. and Cowan, D.A. (1989) A correlation between microbial protein thermostability and resistance to denaturation in aqueous-organic solvent two-phase systems. *Enzyme and Microbial Technology*. 11: 568-574.
21. Robertson, D.E., Chaplin, J.A., Desantis, G., Podar, M., Madden, M., Chi, E., Richardson, T., Milan, A., Miller, M., Weiner, D.P., Wong, K., McQuaid, J., Farwell, B., Preston, L.A., Tan, X., Snead, M.A. Keller, M., Mathur, E., Kretz, P.L., Burk, M.J. and Short, J.M. (2004) Exploring nitrilase sequence space for enantioselective catalysis. *Applied and Environmental Microbiology*. 70: 2429-2436.

22. Rodon, M.R., August, P.R., Bettermann, A.D., Brady, S.F., Grossman, T.H., Liles, M.R., Loiacono, K.A., Lynch, B.A., MacNeil, I.A., Minor, C., Tiong, C.L., Gilman, M., Osburne, M.S., Clardy, J., Handelsman, J. and Goodman, R.M. (2000) Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 2541-2547.
23. Soliman, N.A., Knoll, M., Abdel-Fattah, Y.R., Schmid, R.D., and Lange, S. (2007) Molecular cloning and characterization of thermostable esterase and lipase from *Geobacillus thermoleovorans* YN isolated from desert soil in Egypt. *Process Biochemistry*. 42:1090-1100.
24. Su Ro, H., Hong, H.P., Kho, B.H., Kim, S. and Chung, B.H. (2004) Genome-wide cloning and characterization of microbial esterases. *FEMS Microbiology Letters*. 233: 97-105.
25. Tirawongsaroj, P., Sriprang, R., Harnpicharnchai, P., Thongaram, T., Champreda, V., Tanapongpiput, S., Pootanakit, K., and Eurwilaichitr, L. (2008) Novel thermophilic and thermostable lipolytic enzymes from a Thailand hot spring metagenomic library. *Journal of Biotechnology*, 133: 42-49.
26. Tokiwa, Y., and Suzuki, T. (1977) Hydrolysis of Polyesters by Lipase. *Nature*. 270:76-78.
27. Yabuuchi, E., Kosako, Y., Oyaizu, H., Yano, I., Hotta, H., Hashimoto, Y., Ezaki, T., and Arakawa, M. (1992) Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiology and Immunology*. 36: 1251-1275.
28. Yu, S., Zheng, B., Zhao, X. and Feng, Y. (2010) Gene cloning and characterization of a novel thermophilic esterase from *Fervidobacterium nodosum* Rt17-B1. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. 42: 288-295.

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ นางสาวพิชาภัค สมบุรุษทรัพย์

เกิด 29 กุมภาพันธ์ 2523

สถานที่เกิด กรุงเทพมหานคร

ที่ทำงาน มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ คณะวิทยาศาสตร์ ภาควิชาชีววิทยา

โทร. (ที่ทำงาน) 02-649-5000 ต่อ 8507

อีเมล peechapack@swu.ac.th

การศึกษา

ระดับปริญญาตรี วท.บ (จุลชีววิทยา) มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ระดับปริญญาโท วท.ม (พันธุวิศวกรรม) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ระดับปริญญาเอก Ph.D. (Natural Science and Technology) Okayama University Japan

รางวัลและเกียรติประวัติ

1. นักเรียนทุนมอนบูโช (The MEXTscholarship) รัฐบาลประเทศญี่ปุ่น สำหรับการศึกษา ระดับปริญญาเอก (ปีการศึกษา 2548-2551)
2. นักเรียนทุนรัฐบาลตามความต้องการเร่งด่วนของส่วนราชการ เพื่อสนับสนุนนวัตกรรม ภาครัฐ ประจำปีงบประมาณ 2550 (ทุนสร้างสรรค์นวัตกรรมภาครัฐ)

ผลงานทางวิชาการ

Proceeding abstract

1. Somyoonsap P, Sriyapai T, Siripoke S, Chansiri K and Kawai F (2011) Cloning of thermostable esterase gene from *Actinomadura* sp. S14 and its expression in *E.coli* and *P. Pastoris*. The 4th Congress of European Microbiologists, FEMS 2011, 26-30 July 2011, Geneva, Switzerland (poster presentation)
2. Sriyapai T, Somyoonsap P, Kawai F and Chansiri K (2011) Sequence analysis, gene expression and characterization of the gene encoding endoxylanase from *Actinomadura* sp. S14. The 4th Congress of European Microbiologists, FEMS 2011, 26-30 July 2011, Geneva, Switzerland (poster presentation)
3. Sukrakanchana L, Sriyapai T, Sukkhum S, and Somyoonsap P (2011) Screening, isolation and characterization of bacterium that degrades various bioplastics. The 4th Young Scientist Seminar Capacity building and development of microbial potential and fermentation technology towards new era, 26-27 September 2011, Kasetsart University, Thailand (oral presentation)

Proceeding full paper

1. Somyoonsap P and Siripoke (2009) Screening of poly(carpolactone)-degrading thermophilic microorganisms in soil samples from compost. 35th Congress on Science and technology of Thailand. 15-17 October 2009 Thailand
2. พิชาภัค สมบูรณ์ทรัพย์, ทายาท ศรียาภัย, สมใจ ศิริโชค และ โกสุม จันทศิริ (2011) การโคลนยีนและการแสดงออกของเอนไซม์ thermostable esterase จาก *Actinomadura* sp. strain S14. The 17th National Genetics Conference. 7-9 เมษายน 2011 อิมพีเรียลแม่งปิ้ง เชียงใหม่
3. Luksamee Sukrakanchana, Sukhumaporn Sukkhum, and Peechapack Somyoonsap (2012) Isolation of bioplastics-degrading bacteria from compost soil in Thailand. The 23rd Annual Meeting of the Thai Society of Biotechnology. 1-2 February 2012 at the Imperial Queen's Park Hotel, Bangkok, Thailand

วารสารตีพิมพ์

1. Sriyapai T, Somyoonsap S, Matsui K, Kawai F and Chansiri K. (2011) Cloning of a thermostable xylanase from *Actinomadura* sp. S14 and its expression in *E. coli* and *Pichia pastoris*. Journal of Bioscience and Bioengineering. 111: 528-536
2. อรอนงค์ พริ้งสุทธกะ, ณัฏฐิกา สุวรรณาศรัย และ พิชาภัค สมบูรณ์ทรัพย์ (2553) การผลิตไวน์โดยใช้ *Saccharomyces cerevisiae* เซลล์ตรึงรูปในขึ้นผลไม้. วารสารวิทยาศาสตร์ มศว 26(2): 127-138.
3. พิชาภัค สมบูรณ์ทรัพย์, ทายาท ศรียาภัย, สมใจ ศิริโชค, และ โกสุม จันทศิริ (2554) การแยกและการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียชอบร้อนที่ย่อยสลายพอลิคาร์โพรแลกโตน วารสารวิทยาศาสตร์ มศว ปีที่ 27(2): 177-195.