สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพอลิบิวทิลีนซัคซิเนต (PBS) จาก *Saccharothrix* sp. APL5

Optimization of Polybutylene Succinate (PBS)-Degrading Enzyme Production from *Saccharothrix* sp. APL5

พิชาภัค ศรียาภัย[1*], ทายาท ศรียาภัย[2] และ ลักษมี ศุกระกาญจนะ[3]

Pichapak Sriyapai[1*], Thayat Sriyapai[2] and Luksamee Sukrakanchana[3]

[1]*ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ*

[2]*คณะวัฒนธรรมสิ่งแวดล้อมและการท่องเที่ยงเชิงนิเวศ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ*

[3]*ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ*

[1]*Department of Microbiology, Faculty of Science, Srinakharinwirot University*

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

[3]*Department of Biology, Faculty of Science, Srinakharinwirot University*

Received : 29 April 2019

Revised : 26 June 2019

Accepted : 2 August 2019

บทคัดย่อ

แอคติโนมัยสีท *Saccharothrix* sp. APL5 แยกได้จากดินกองขยะในประเทศไทยและสามารถย่อยสลาย พอลิบิวทิลีนซัคซิเนต (PBS) มีความเหมือนกับ *Saccharothrix texasensis* (ความคล้ายคลึง 98 เปอร์เซ็นต์) ด้วยการวิเคราะห์ยีน 16S rDNA สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ PBS depolymerase ในอาหารเลี้ยงเชื้อประกอบด้วยความเข้มข้นของ PBS ปริมาตร 1.5 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตรสำหรับเป็นแหล่งคาร์บอน, yeast extract ปริมาตร 0.12 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร สำหรับเป็นแหล่งไนโตรเจน pH 7 และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง เมื่อวัดค่าการทำงานของเอนไซม์จำเพาะสูงสุดเท่ากับ 35.6 $\pm$ 2.31 ยูนิตต่อมิลลิกรัม สายพันธุ์ APL5 สามารถย่อยสลายแผ่นฟิล์ม PBS ในอาหารเลี้ยงเชื้อ basal medium เป็นเวลา 56 วันที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงลักษณะผิวหน้า เช่น เกิดการกร่อนและพื้นผิวขรุขระด้วยรูพรุนเมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด การศึกษา IR spectra ของแผ่นฟิล์ม PBS ที่ถูก treated ด้วย APL5 แสดงแถบ broad absorption บริเวณ 3400-3000 cm^{-1} (OH stretch) และบริเวณ peak ที่ 1740 cm^{-1}(C=O stretch) พบว่า peak มีขนาดลดลง ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีนที่ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพจากสายพันธุ์ APL5 นำมาศึกษาลำดับกรดอะมิโนของ Lpa5 พบว่ามีความเหมือนกับ pentapeptide catalytic triad (Gly-His-Ser-Met-Gly) ที่เป็นส่วนหนึ่งใน esterase-lipase superfamily (serine hydrolase)

คำสำคัญ : พอลิบิวทิลีนซัคซิเนต, พีบีเอส ดีพอลิเมอเรส, พลาสติกชีวภาพ, *Saccharothrix* sp.

***Corresponding author. E-mail** : peechapack@g.swu.ac.th

Abstract

An actinomycete, *Saccharothrix* sp. APL5 was isolated from rubbish soil in Thailand and had the ability to degrade polybutylene succinate (PBS) that identified as *Saccharothrix texasensis* (98% similarity) by 16S rDNA gene analysis. The optimum conditions found for PBS depolymerase production in medium were 1.5% (w/v) PBS as carbon source, 0.12% (w/v) yeast extract as nitrogen source, pH 7 and incubated at 37°C for 96 hours. The highest of specific activity against PBS was determined as 35.6±2.31 U/mg. Strain APL5 could degrade PBS films in basal medium for 56 days at 37°C showed many changes in surface morphology such as erosion and extensive roughening of the surface with pit formation using scanning electron microscopy. The IR spectra of PBS film treated with APL5 showed a broad absorption band in the region of 3400-3000 cm^{-1}(OH stretch) and the less intense peak at of 1740 cm^{-1}(C=O stretch). Partial nucleotides of bioplastic depolymerase gene from strain APL5 was studied. The amino acid of Lpa5 had a highly conserved pentapeptide catalytic triad (Gly-His-Ser-Met-Gly), which has been shown to be part of the esterase-lipase superfamily (serine hydrolase).

Keywords : polybutylene succinate, PBS depolymerase, bioplastics, *Saccharothrix* sp.

บทนำ

ความเจริญก้าวหน้าทางเทคโนโลยีและการเพิ่มขึ้นของจำนวนประชากรโลกในปัจจุบันส่งผลให้เกิดความต้องการในการใช้พลาสติกในปริมาณสูงจึงก่อให้เกิดการสะสมขยะพลาสติกที่ใช้แล้วและที่เหลือใช้อยู่เป็นจำนวนมาก จึงเป็นปัญหาวิกฤตที่สำคัญในการกำจัดพลาสติกที่ส่งผลกระทบทางสิ่งแวดล้อมและเศรษฐกิจของประเทศ ในช่วงระยะเวลากว่า 50 ปีที่ผ่านมาการผลิตและความต้องการอุปโภคพลาสติกทั่วโลกยังคงสูงขึ้น ในปี ค.ศ. 2013 มีรายงานการผลิตพลาสติกทั่วโลกประมาณ 299 ล้านตัน ซึ่งเพิ่มขึ้นจากปี ค.ศ. 2012 ถึงร้อยละ 4 ในปี ค.ศ. 2016 การผลิตพลาสติกทั่วโลกประมาณ 322 ล้านตัน และมีแนวโน้มว่าจะเพิ่มสูงขึ้นเป็น 2 เท่าในอีก 20 ปีข้างหน้า สำหรับประเทศไทยจากข้อมูลปริมาณขยะพลาสติกคิดเป็นร้อยละ 20 ของปริมาณขยะทั้งหมดหรือมีประมาณ 2 ล้านตันต่อปีซึ่งมีการนำขยะพลาสติกกลับมาใช้ประโยชน์เฉลี่ยประมาณปีละ 0.5 ล้านตันซึ่งถือว่าน้อยมาก ส่วน 1.5 ล้านตันถูกนำไปกำจัดโดยการเผาและฝังกลบซึ่งส่งผลให้เกิดสารตกค้างอยู่ในสิ่งแวดล้อม (Department of Environmental Quality Promotion, 2018) เนื่องจากขยะพลาสติกต้องใช้เวลา 450 ปีในการย่อยสลายทำให้มีผลกระทบสู่สิ่งแวดล้อมในระยะยาว และเมื่อนำมาเผาจะทำให้เกิดมลพิษและเกิดสภาวะเรือนกระจกเพิ่มมากขึ้น (Simachaya, 2018) ข้อสังเกตเกี่ยวกับปัญหาขยะพลาสติกในประเทศไทยนั้นเกิดจากขาดการปลูกจิตสำนึกที่ดีในการลดละเลิกใช้ถุงพลาสติก ขาดความรู้และความเข้าใจที่ดีในการคัดแยกขยะอย่างจริงจัง ขาดการจัดการขยะอย่างมีประสิทธิภาพขาดงบประมาณในการสร้างนวัตกรรมเพื่อการกำจัดหรือการตั้งโรงงานสำหรับเปลี่ยนขยะพลาสติกไปเป็นพลังงานไฟฟ้า

พลาสติกชีวภาพ (bioplastic) ผลิตขึ้นจากวัสดุทางธรรมชาติ (ได้แก่ พืช) มีคุณสมบัติย่อยสลายได้ในธรรมชาติ และย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์ในสภาวะการหมักปุ๋ย (compost) จุลินทรีย์ (แบคทีเรียและรา) สามารถผลิตเอนไซม์ออกมาย่อยสลายพลาสติกชีวภาพเพื่อเปลี่ยนไปเป็นน้ำ ก๊าซมีเทน ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และมวลชีวภาพ โดยไม่ทิ้งสารพิษตกค้างที่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อมและไม่มีสารตกค้างที่เป็นพิษต่อผู้บริโภค ปัจจุบันพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพมีอยู่หลายชนิด

แต่ชนิดที่ได้รับความสนใจและกำลังพัฒนาสู่ระดับอุตสาหกรรม คือ พอลิแลคติคแอซิด (polylactic acid, PLA) และพอลิบิวทิลีนซัคซิเนต (polybutylene succinate, PBS) โดย PBS มีลักษณะเป็นสายตรงอะลิฟาติกพอลิเอสเทอร์ที่ย่อยสลายได้และมีสมบัติทางกลและทางกายภาพคล้ายพอลิเอทิลีนเทเรฟทาเลต (polyethylene terephthalate, PET) เข้ากับเนื้อเยื่อได้ดี (biocompatibility) มีจุดหลอมเหลวประมาณ 112-200 องศาเซลเซียส PBS เกิดจากกระบวนการเชื่อมต่อเป็นสายพอลิเมอร์ (polymerization) ของ succinic acid, butanediol, aliphatic dicarboxylic acid และalkyldiols (Fujimaki, 1998; Sriyapai *et al.,* 2014) โดยทั่วไป PBS ผลิตขึ้นด้วยการผสมกับสารประกอบต่างๆ เช่น ถ้าผสมกับแป้งจะได้เทอร์โมพลาสติกสตาร์ช (thermoplastic starch, TPS) และถ้า PBS ผสมกับ adipate copolymers จะได้พอลิบิวทิลีนซัคซิเนตโคอะดิเพท (polybutylene succinate-*co*-adipate, PBSA) PBS สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการผลิตฟิล์มคลุมพื้นดินรอบต้นไม้ ฟิล์มบรรจุอาหาร กระเป๋า รวมถึงชิ้นส่วนเพื่อการตกแต่งภายในรถยนต์ ดังนั้นจึงมีความสำคัญในการศึกษาความสามารถของจุลินทรีย์ในการย่อยสลาย PBS จุลินทรีย์ที่ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ PLA, PBS และ PCL (polycaprolactone) ส่วนใหญ่อยู่กลุ่มแอคติโนมัยสีท เช่น *Amycolatopsis* sp., *Saccharothrix* sp., *Actinomadura* sp. และ *Streptomyces* sp. กลุ่มรา เช่น *Paecilomyces* sp., *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp. และ กลุ่มยีสต์ เช่น *Pseudozyma* sp. (Penkhrue *et al.,* 2015) โดยเฉพาะกลุ่มแอคติโนมัยสีทที่ย่อยสลาย PBS นั้นพบว่ายังมีรายงานค่อนข้างน้อย เช่น *Amycolatopsis* sp. HT-6 (Pranamuda *et al.,* 1995), *Actinomadura* sp. TF1 (Sriyapai *et al.,* 2014), *Microbispora rosea*, *Excellospora japonica* และ*Excellospora viridilutea* (Ghosh *et al.,* 2013) ดังนั้นงานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยที่ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมใน การย่อยสลาย PBS ทั้งแบบเม็ดพลาสติกและแผ่นฟิล์ม นอกจากนี้ยังศึกษาลำดับกรดอะมิโนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PBS จาก *Saccharothrix* sp. APL5

วิธีดำเนินการวิจัย

1. จุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย และการทดสอบการย่อยสลาย PBS

Saccharothrix sp. APL5 แยกได้จากดินกองขยะในจังหวัดกรุงเทพมหานคร และวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rDNA (accession no. JN387600 ขนาดยีน 1,391 คู่เบส) (Sukrakanchana *et al.,* 2011) ทดสอบการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ PBS ด้วยวิธีวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณโซนใสที่เกิดขึ้นบนอาหารแข็ง PBS (Nishida & Tokiwa, 1993) ซึ่งประกอบด้วย 1 กรัม PBS ละลายใน dichloromethane ปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำมาผสมกับ basal medium 1 ลิตร (ประกอบด้วย yeast extract 0.2 กรัม, $(NH_4)_2SO_4$ 1 กรัม, NaCl 0.1 กรัม, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 กรัม, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.02 กรัม, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 กรัม, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.005 กรัม, $Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$ 0.005 กรัม, $MnSO_4$ 0.005 กรัม, K_2HPO_4 1.6 กรัม และKH_2PO_4 0.2 กรัม) โดยอาศัยเครื่องอัลตราโซนิคเคเตอร์ อาหารที่เตรียมถูกนำไประเหย dichloromethane จากนั้นเติมวุ้น 20 กรัม และนำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยวิธี autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. การศึกษาสัณฐานวิทยา องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ และคุณสมบัติทางชีวเคมีของ APL5

การศึกษาทางสัณฐานวิทยา โดยวิธีของ Shirling และ Gottlieb (1966) เพื่อศึกษาลักษณะการเจริญบนอาหาร International Streptomyces Project (ISP) ได้แก่ yeast–malt extract agar (ISP2), oatmeal agar (ISP3), inorganic salt-starch agar (ISP4) และ glycerol-asparagine agar (ISP5) โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง ISP2, ISP3, ISP4, ISP5 นำไปบ่มที่

อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-21 วัน สังเกตและบันทึกลักษณะการเจริญ สีของโคโลนี ลักษณะสีสปอร์ของเส้นใย (substrate mycelium และ aerial mycelium) และการสร้างสี

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ โดยวิธีการของ Staneck และ Roberts (1974) เพื่อศึกษาการวิเคราะห์ไอโซเมอร์ของ diaminopimelic acid (DAP) ในผนังเซลล์ เริ่มจากนำเซลล์แห้งประมาณ 10 มิลลิกรัมใส่ในหลอดทดลอง นำมาย่อยเซลล์ด้วย 6 นอร์มอล HCl ปริมาตร 50 มิลลิลิตรในหลอดฝาปิดสนิทที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นดูดสารละลายที่ได้ไปศึกษาด้วย Thin Layer Chromatography (TLC) โดยใช้แผ่น TLC อลูมิเนียมที่เคลือบด้วยเซลลูโลสขนาด 10 x 20 เซนติเมตร นำสารละลายที่ได้หยดลงบนแผ่น TLC ซึ่งเทียบกับสารมาตรฐานของ 0.01 โมลาร์ *LL*-DAP และ*meso*-DAP ทิ้งให้แห้ง จากนั้นจุ่มลงในสารละลายผสม (mobile phase) ที่ประกอบด้วยอัตราส่วนโดยปริมาตรต่อปริมาตรของ methanol: deionized water: HCl: pyridine (80:17.5:2.5:10) เมื่อสารละลายเคลื่อนที่จนสุดแผ่น นำแผ่น TLC ทำให้แห้ง และนำไปฉีดพ่นด้วยสารละลาย 0.2 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรต่อปริมาตรของ ninhydrin และ acetone นำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที บันทึกผลและเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน DAP สำหรับการวิเคราะห์น้ำตาลในเซลล์ เริ่มจากชั่งเซลล์แห้งปริมาณ 50 มิลลิกรัมในหลอดทดลอง ย่อยเซลล์ด้วย 1 นอร์มอล H_2SO_4 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ตั้งไว้ให้เย็น จากนั้นปรับ pH ด้วยสารละลายอิ่มตัว $Ba(OH)_2$ จนได้ pH ประมาณ 5.2-5.5 จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ส่วนใสที่ได้จะถูกทิ้งให้ระเหยจนแห้ง ละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ดูดสารละลายที่ได้ไปทำ TLC โดยใช้แผ่นอลูมิเนียมเคลือบด้วยเซลลูโลสขนาด 10 x 20 เซนติเมตร สารละลายที่ได้จะเปรียบเทียบกับน้ำตาลมาตรฐาน 6 ชนิดที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตรของ xylose, arabinose, galactose, mannose, rhamnose และglucose แผ่น TLC จะถูกจุ่มลงในสารละลายผสมที่ประกอบด้วยอัตราส่วนโดยปริมาตรต่อปริมาตรของ *n*-butanol:distilled water:pyridine:toluene (10:6:6:1) เมื่อสารละลายเคลื่อนที่จนสุดแผ่นและตั้งทิ้งไว้จนแห้ง จากนั้นฉีดพ่นด้วยสารละลายผสมของ aniline phthalate ที่ประกอบด้วย phthalic acid 3.25 กรัม และ aniline 2 มิลลิลิตรในบิวทานอลที่อิ่มตัวด้วยน้ำปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-10 นาที บันทึกแถบสีของน้ำตาลแต่ละชนิดของตัวอย่างและเปรียบเทียบกับน้ำตาลมาตรฐาน

การศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมี โดยศึกษาการใช้แหล่งคาร์บอนที่มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร (glucose, raffinose, inositol, xylose, mannitol, arabinose, rhamnose, sucrose, fructose และ sorbitol) อุณหภูมิที่เชื้อเจริญ (30, 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส) ความสามารถในการทนเค็ม (0, 2, 4, 6, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ NaCl โดยมวลต่อปริมาตร) ความสามารถในการย่อยสลายซับสเตรทชนิดต่างๆ ที่มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร (carboxymethyl cellulose (CMC), xylan, starch และ skim milk) ด้วยวิธีวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณโซนใสที่เกิดขึ้นบนอาหารแข็งที่มีการเติมซับสเตรท และโครงสร้างของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหาร Rye medium ปริมาตร 1 ลิตร ประกอบด้วย ข้าวไรย์ 10 กรัม, yeast extract 1 กรัม, glucose 2 กรัม และ $CaCo_3$ 2 กรัม นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน จากนั้นส่งตัวอย่างเชื้อไปวิเคราะห์ที่กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

3. การเตรียมเชื้อเริ่มต้นและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ PBS depolymerase ของ APL5 ในอาหารเหลว

การเตรียมเชื้อเริ่มต้น โดยเขี่ยสปอร์ของ APL5 มา 1 ลูป ที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB low salt (ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย peptone 10 กรัม, yeast extract 5 กรัม และ NaCl 5 กรัม) ปริมาตร 20 มิลลิลิตรในหลอดเซนติฟิวก์พลาสติกแบบมีฝาปิดขนาด 50 มิลลิลิตร นำไปบ่มในเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร ถ่ายลงในอาหาร LB low salt ปริมาตร 100 มิลลิลิตรในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมงเพื่อเตรียมเป็นเชื้อเริ่มต้น ในแต่ละการทดลองใช้เชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมในฟลาสก์ การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ PBS depolymerase ได้แก่ ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน ชนิดแหล่งไนโตรเจน และระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน เริ่มจากดูดเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 5 มิลลิลิตร เลี้ยงในอาหาร basal medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยแต่ละฟลาสก์จะประกอบด้วยแหล่งคาร์บอนแตกต่างกันได้แก่ lactose, sucrose, fructose, glucose, PCL, PBS และ PBSA ที่มีความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร ปรับค่า pH เป็น 7 และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใส (supernatant) มาวัดการทำงานของเอนไซม์ PBS depolymerase (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ) เพื่อเลือกชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม จากนั้นนำมาทดสอบความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมตั้งแต่ 0.1, 0.5, 1, 1.5 และ 2 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร ปรับค่า pH เป็น 7 และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง เก็บส่วนใส่เพื่อนำมาวัดการทำงานของเอนไซม์ต่อไป (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ)

ชนิดแหล่งไนโตรเจน เริ่มจากดูดเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 5 มิลลิลิตร เลี้ยงในอาหาร basal medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ในแต่ละฟลาสก์จะประกอบด้วยชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม แต่ประกอบด้วยแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน ได้แก่ yeast extract, ammonium sulfate, gelatin, casein และ ไม่เติมแหล่งไนโตรเจน และใช้ความเข้มข้นของสารแต่ละชนิดเท่ากับ 0.12 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร ปรับค่า pH เป็น 7 และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง เก็บส่วนใส่เพื่อนำมาวัดการทำงานของเอนไซม์ต่อไป (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ) ระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ เริ่มจากดูดเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 5 มิลลิลิตร เลี้ยงในอาหาร basal medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยแต่ละฟลาสก์จะประกอบด้วยชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม ปรับค่า pH เป็น 7 และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 168 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เก็บส่วนใส่เพื่อนำมาวัดการทำงานของเอนไซม์ต่อไป (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ)

4. การวัดการทำงานของเอนไซม์ PBS depolymerase

การวัดการทำงานของเอนไซม์ PBS depolymerase โดยดูจากความขุ่น (turbidity) ที่ลดลงของสารละลาย PBS โดยวิธีของ Oda และคณะ (1997) การเตรียมสารละลายซับสเตรท PBS ที่ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร โดยการชั่ง PBS 0.1 กรัม ละลายใน dichloromethane ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำมาผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่มี pH 7 โดยอาศัยเครื่องอัลตราโซนิคเคเตอร์ การเตรียมสารผสม

ปฏิกิริยาของเอนไซม์ (reaction mixture) ประกอบด้วยสารละลายซับสเตรท PBS ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร และส่วนใสปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง (optimal density) ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร (OD_{650}) กำหนดให้ 1 ยูนิตของเอนไซม์ที่ย่อยสลาย PBS เท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลง 0.1 หน่วยที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร ภายใต้สภาวะทดสอบ การวัดการทำงานของเอนไซม์จะทำการทดลอง 3 ซ้ำของทุกการทดลอง การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยใช้วิธีการของ Bradford (1976) และเตรียมสารละลาย Bovine serum albumin (BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐานเพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน (standard curve)

5. การศึกษาการย่อยสลายแผ่นฟิล์มพลาสติก PBS ในอาหารเหลว

ดูดเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 5 มิลลิลิตร เลี้ยงในอาหาร basal medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ปรับ pH เป็น 7 ภายในฟลาสก์ไม่เติมแหล่งคาร์บอนลงในอาหารแต่ใส่แผ่นฟิล์ม PBS จำนวน 2 แผ่นลงในแต่ละฟลาสก์ (แผ่นฟิล์ม PBS 1 แผ่น หนัก 0.35 กรัม มีขนาด 2 เซนติเมตร x 2 เซนติเมตร) ที่มีความหนา 100 ไมโครเมตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที โดยเก็บตัวอย่างในวันที่ 0, 14, 28, 42 และ 56 ตามลำดับ สำหรับฟลาสก์ควบคุมจะไม่มีการเติมเชื้อเริ่มต้นลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ การทดลองทำทั้งหมด 3 ซ้ำ จากนั้นนำแผ่นฟิล์มออกจากฟลาสก์โดยการเทอาหารเลี้ยงเชื้อผ่านกระชอนตาถี่และใช้ปากคีบค่อยๆ คีบเศษแผ่นฟิล์ม จากนั้นนำไปล้างด้วย 70 เปอร์เซ็นต์เอทานอล และล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง เช็ดให้แห้งและทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำแผ่นฟิล์มไปชั่งน้ำหนักเพื่อหาน้ำหนักที่หายไป ศึกษาลักษณะบนพื้นผิวด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด และวิเคราะห์โครงสร้างของแผ่นฟิล์มด้วยเครื่องฟูเรียร์ทรานฟอร์มอินฟราเรด สเปกโตรมิเตอร์ (FTIR) เพื่อเปรียบเทียบและดูการเปลี่ยนแปลงของหมู่ฟังชันก์ของแผ่นฟิล์มที่มีการเติมเชื้อและไม่มีการเติมเชื้อลงไปในฟลาสก์

6. การศึกษายีนบางส่วนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PBS

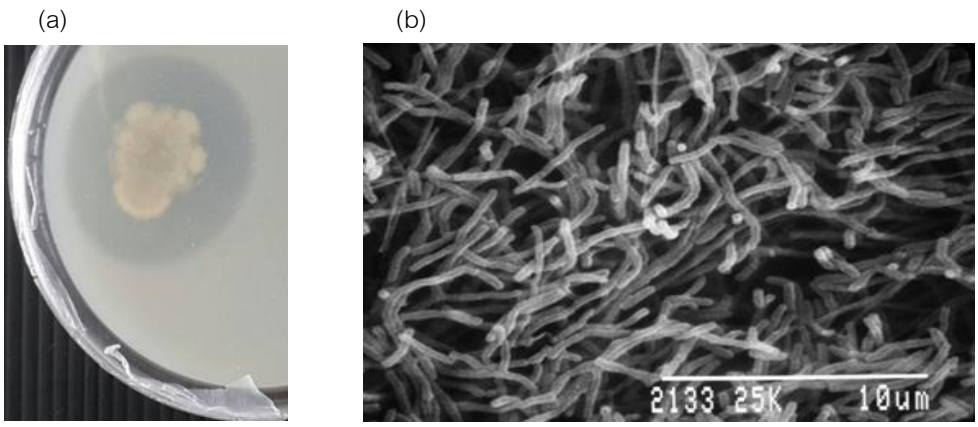
การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของ APL5 ใช้วิธีของ Kieser และคณะ (2000) โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว LB low salt ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในหลอดเซนติฟิวก์พลาสติกแบบมีฝาปิดขนาด 50 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นเก็บเซลล์โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม TES buffer pH 8 (10 mM Tris-HCl pH 8, 25 mM EDTA) ลงไปละลายเซลล์ เติมเอนไซม์ lysozyme (ความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อมิลลิลิตร) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง เติม 50 mM $MgCl_2$ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม HTE buffer pH 8 (50 mM Tris-HCl pH 8 และ 20 mM EDTA pH 8) ลงไป จากนั้นละลายเซลล์ให้เป็นเนื้อเดียวกัน และเติม 10 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร sodium dodecyl sulfate (SDS) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติม solution III (CH_3COOH 11.5 มิลลิลิตร และ CH_3COOK 29.4 กรัม) บ่มที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใสด้านบนมาตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย isopropanol บ่มที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที สังเกตเห็นส่วนตะกอนตกอยู่ด้านล่าง เทส่วนใสทิ้ง ตั้งทิ้งไว้จนแห้ง ละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำปราศจากเชื้อและนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส การศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PBS โดยใช้ degenerated primer ที่ออกแบบจากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ไลเปสจาก *Streptomyces coelicolor* (accession no. AF009336.1), *Streptomyces albus* (accession no. U03114.2), กรดอะมิโนของเอนไซม์ triacylglycerol acylhydrolase *Streptomyces* sp. (accession no. AAB51445),

กรดอะมิโนของเอนไซม์เอสเทอเรสจาก *Thermobifida alba* สายพันธุ์ AHK119 (accession no. AB445476.2) (Hu *et al.,* 2010) และกรดอะมิโนของเอนไซม์ PBS depolymerase จาก *Acidovorax delafieldii* สายพันธุ์ BS-3 (accession no. BAB86909.1) (Uchida *et al.,* 2000) สำหรับ degenerated primer (Sriyapai *et al.,* 2018) ที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ LPAF1(5'-GGCTWCSGSGSSGGCACCRTSTACTAC-3') และ LPAR1(5'-SSWGCCGCCGCCGCCCATSSWSYRGCC-3') การทำ PCR เริ่มจากเตรียมจีโนมิกส์ดีเอ็นสำหรับเป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (template) ขั้นตอนการทำ PCR เริ่มจากผสม PCR reaction mixture ประกอบด้วย จีโนมิกส์ดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้นประมาณ 50 นาโนกรัม, 1X PCR buffer, 0.1 ไมโครโมลาร์ LPAF1และ LPAR1, 0.01 มิลลิโมลาร์ dNTP, 0.01 U Ex Taq DNA polymerase (Takara, Japan) สภาวะในการทำ PCR เริ่มจากการทำให้สาย DNA แยกออกจากกันที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ในขั้นตอนของการเพิ่มจำนวน DNA (amplification) ตั้งโปรแกรมให้ดำเนินการ 35 รอบ (cycles) ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ denaturing อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10วินาที annealing อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อเครื่องดำเนินการครบ 35 รอบ เข้าสู่ขั้นตอน extension อีกครั้งที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และทำให้เย็นลงที่ 4 องศาเซลเซียส PCR product มีขนาดประมาณ 300 คู่เบส จากนั้นนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยอาศัย NucleoSpin®Extract II Kit (Clontech, Germany) เพื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PBS

ผลการวิจัย

1. สัณฐานวิทยา องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ และคุณสมบัติทางชีวเคมีของ APL5

การศึกษาสัณฐานวิทยาของ APL5 พบว่าเส้นใย substrate mycelium มีสีน้ำตาลอ่อน ขอบโคโลนีมีลักษณะย่น และเส้นใย aerial mycelium มีสีขาวบนอาหารแข็ง ISP2, ISP3, ISP4 และISP5 เมื่อบ่มไว้เป็นเวลา 21 วัน การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์พบว่าไอโซเมอร์ของ diaminopimelic acid ในผนังเซลล์เป็นแบบ *meso*-isomer เมื่อวิเคราะห์น้ำตาลภายในเซลล์พบว่าเป็นน้ำตาล galactose, mannose, glucose และ xylose การศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีพบว่า APL5 สามารถใช้น้ำตาล arabinose, fructose, glucose, inositol, xylose, manitol, rhamnose, sucrose และ sorbitol ช่วงอุณหภูมิที่เชื้อเจริญได้ตั้งแต่ 30-40 องศาเซลเซียสแต่สภาวะที่เจริญได้ดีที่สุด คือ 40 องศาเซลเซียส และเจริญได้ที่ช่วงความเค็มของ NaCl ที่มีความเข้มข้น 0, 2 และ 4 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร เมื่อศึกษาความสามารถในการย่อยสลายซับสเตรท CMC, xylan, starch และskim milk พบว่าวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางได้ 2.25, 2.4, 2.6 และ 3.2 เซนติเมตร ตามลำดับ การศึกษาสัณฐานวิทยา องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ และคุณสมบัติทางชีวเคมีของ APL5 แสดงไว้ในตารางที่ 1 APL5 สามารถย่อยสลายอาหารแข็งที่ประกอบด้วย PBS (ภาพที่ 1a) และศึกษาเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (ภาพที่ 1b)



ภาพที่ 1 *Saccharothrix* sp. APL5 (a) การเกิดวงใสบนอาหารแข็ง basal medium ที่ประกอบด้วย 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตรของ PBS (b) ลักษณะเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

ตารางที่ 1 ลั กษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางชีวเคมีของ *Saccharothrix* sp. APL5

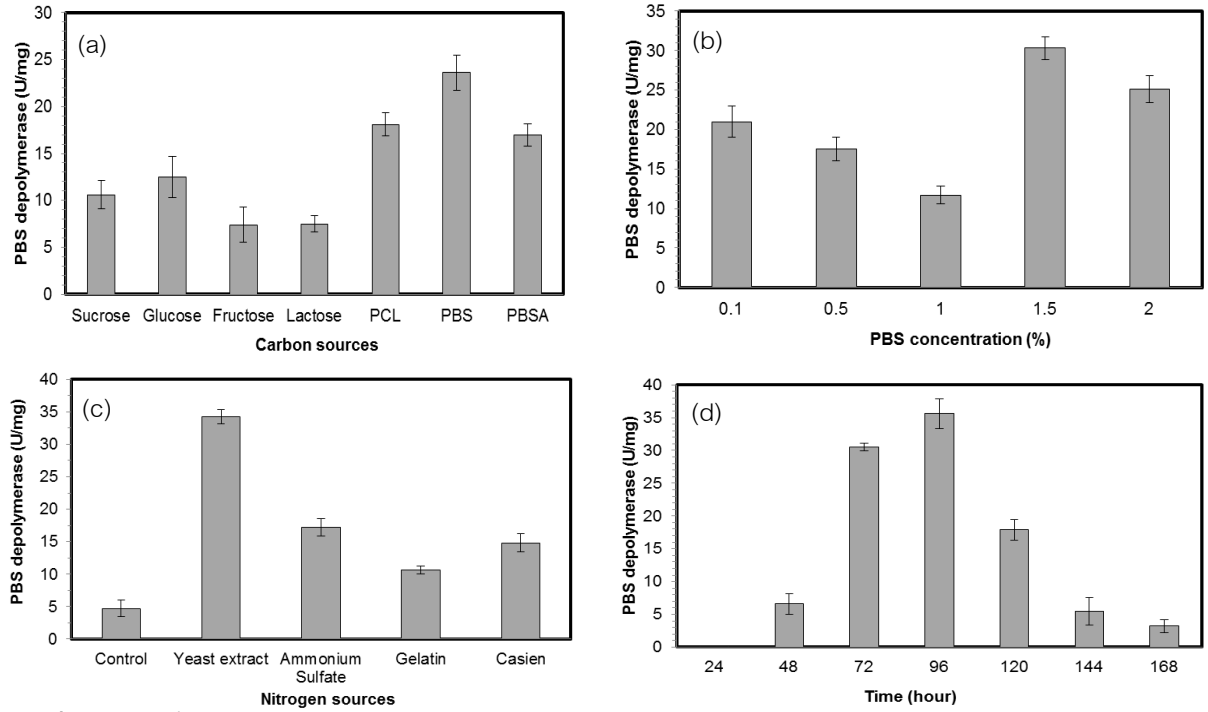
Characteristics	Results	Characteristics	Results
Morphological characteristics		**Carbon source utilization (% w/v)***	
Gram staining	positive	Glucose	+
Aerial hyphae colour	white	Raffinose	-
Isomer of diaminopimelic acid	meso	Inositol	+
Whole-cell sugars	galactose, mannose, glucose, xylose	Mannitol	+
Growth temperature(°C)	30-40	Xylose	+
Growth in NaCl (%)	0-4	Arabinose	++
Decomposition	CMC, xylan, starch, skim milk	Rhamnose	+
		Sucrose	+
		Fructose	++
		Sorbitol	+

หมายเหตุ

*บันทึกการเจริญของเชื้อบนอาหารแข็ง ISP2 ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างๆ เปรียบเทียบกับการเจริญบนน้ำตาลกลูโคส โดยมีระดับการเจริญดังนี้ (+++) เจริญดีที่สุด; (++) เจริญปานกลาง; (+) เจริญน้อย และ(-) ไม่เจริญ

2. สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ PBS depolymerase ของ APL5 ในอาหารเหลว

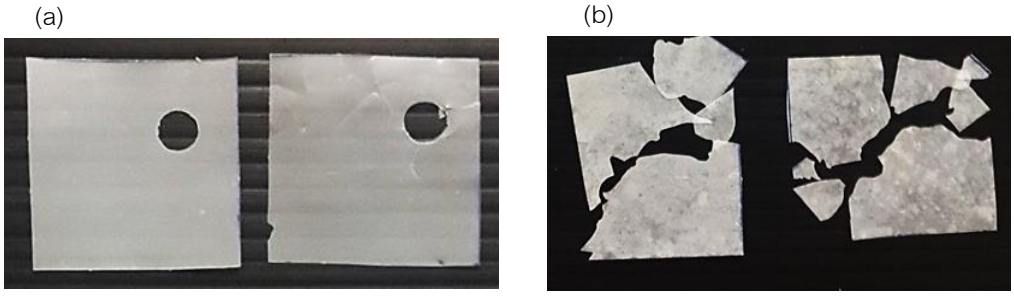
การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์ PBS depolymerase ได้ดีที่สุด คือ PBS โดยวัดการทำงานของเอนไซม์ได้ 23.6 ± 1.94 ยูนิตต่อมิลลิกรัม รองลงมาได้แก่ PCL, PBSA, glucose, sucrose, lactose และ fructose วัดการทำงานของเอนไซม์ได้เท่ากับ 18.1 ± 1.42, 17 ± 1.21, 12.5 ± 2.2, 10.6 ± 1.51, 7.4 ± 0.92 และ 7.4 ± 1.9 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ (ภาพที่ 2a) ที่ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตรของ PBS วัดการทำงานของเอนไซม์ได้ 30 ± 1.4 ยูนิตต่อมิลลิกรัม (ภาพที่ 2b) เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร pH 7 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง จากผลการทดลองพบว่าสายพันธุ์ APL5 สามารถผลิตเอนไซม์ PBS depolymerase ได้ดีเมื่อเลี้ยงในอาหาร PBS, PCL และPBSA เป็นแหล่งคาร์บอนและทุกชนิดเป็นพลาสติกชีวภาพ การศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุด คือ yeast extract โดยวัดการทำงานของเอนไซม์ได้ 34.2 ± 1.05 ยูนิตต่อมิลลิกรัม รองลงมาได้แก่ ammonium sulfate, casein และ gelatin ซึ่งวัดการทำงานของเอนไซม์ได้เท่ากับ 17.2 ± 1.3, 14.8 ± 1.37 และ 10.6 ± 0.64 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย PBS ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร เมื่อเติมแหล่งไนโตรเจนความเข้มข้น 0.12 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตรเท่ากัน ปรับ pH 7 เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ฟลาสก์ที่ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจนวัดการทำงานของเอนไซม์ได้ 4.73 ± 1.28 ยูนิตต่อมิลลิกรัม (ภาพที่ 2c) การศึกษาระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ APL5 พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 96 ชั่วโมงสามารถวัดการทำงานของเอนไซม์ได้ดีที่สุดเท่ากับ 35.6 ± 2.31 ยูนิตต่อมิลลิกรัม (ภาพที่ 2d)



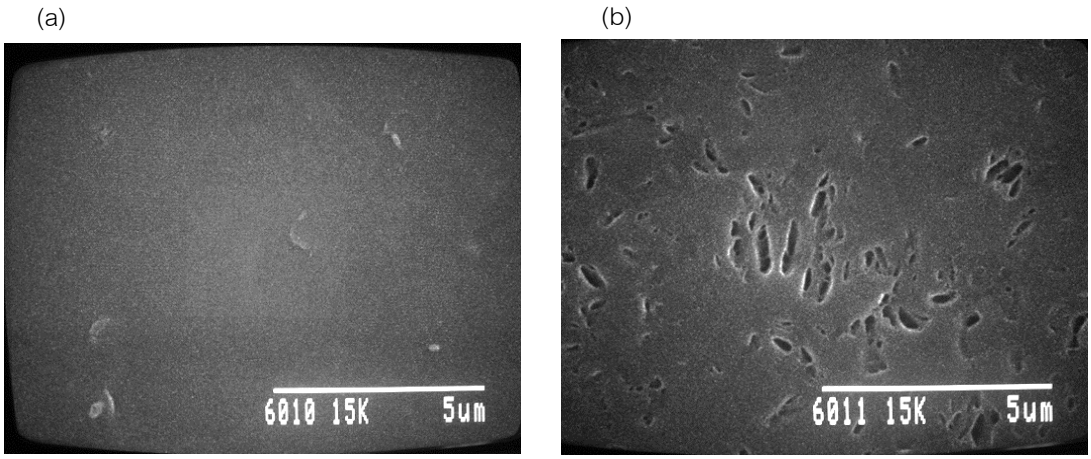
ภาพที่ 2 สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ PBS depolymerase ของ APL5 ในอาหารเหลว (a) ชนิดแหล่งคาร์บอน (b) ความเข้มข้นของ PBS (c) ชนิดแหล่งไนโตรเจน และ (d) ระยะเวลาของการเลี้ยงเชื้อ

3. การศึกษาการย่อยสลายแผ่นฟิล์มพลาสติก PBS ในอาหารเหลว

การย่อยสลายแผ่นฟิล์มพลาสติก PBS ของ APL5 เป็นเวลา 56 วัน โดยเปรียบเทียบน้ำหนักที่หายไปของแผ่นพลาสติกในฟลาสก์ควบคุมที่ไม่ได้เติมเชื้อและฟลาสก์ที่มีการเติมเชื้อ พบว่าน้ำหนักแผ่นฟิล์มเริ่มลดลงตั้งแต่วันที่ 14 และลดลงมากที่สุดในวันที่ 56 คิดเป็น 74 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแผ่นฟิล์มในฟลาสก์ควบคุม (ภาพที่ 3) เมื่อสังเกตลักษณะภายนอกของแผ่นฟิล์มในฟลาสก์ของวันที่ 56 พบว่าแผ่นฟิล์มมีลักษณะบางลง ขนาดเล็กลง และแตกเป็นชิ้นเล็กๆ อยู่ภายในฟลาสก์ และนำไปศึกษาลักษณะบนพื้นผิวด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่ามีลักษณะขรุขระ มีรูพรุนเกิดขึ้นจำนวนมาก และรูพรุนมีทั้งขนาดเล็กและขนาดใหญ่ (ภาพที่ 4)

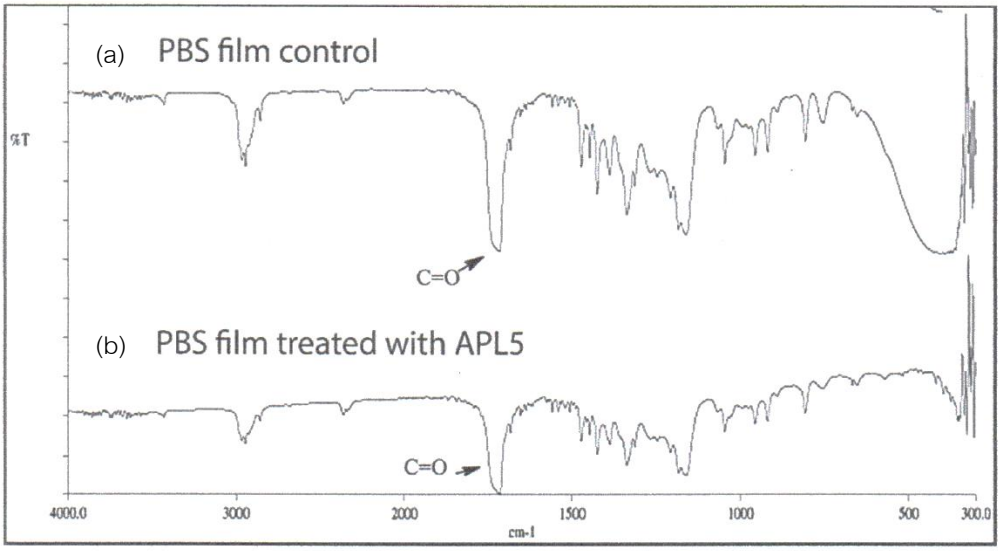


ภาพที่ 3 การย่อยสลายแผ่นฟิล์มพลาสติก PBS ของ APL5 ในฟลาสก์ (a) ฟลาสก์ควบคุมที่ไม่เติมเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (b) ฟลาสก์ที่มีการเติมเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 56 วันที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 4 ลักษณะแผ่นฟิล์ม PBS ที่เลี้ยงในฟลาสก์เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (a) แผ่นฟิล์ม PBS ในฟลาสก์ที่ไม่เติมเชื้อ (b) แผ่นฟิล์ม PBS ในฟลาสก์ที่เติมเชื้อ โดยเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 56 วันที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

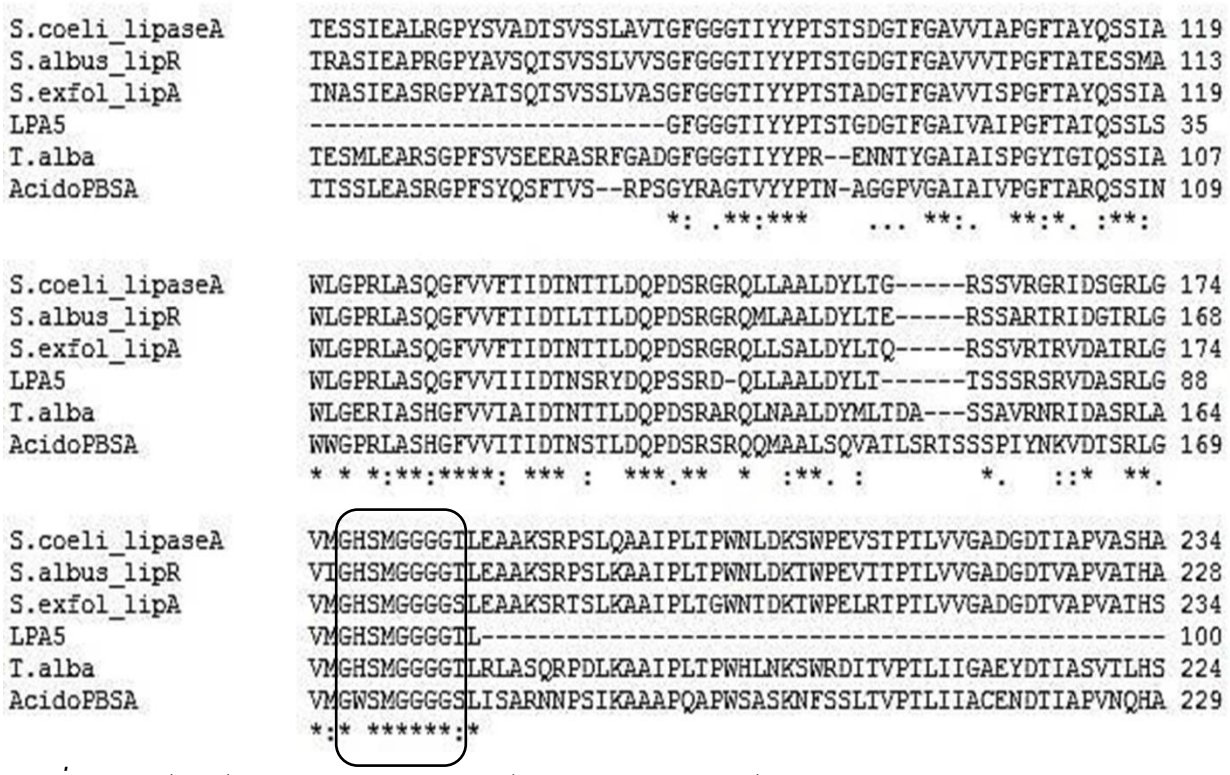
เมื่อนำแผ่นฟิล์มจากฟลาสก์ที่ไม่เติมเชื้อและเติมเชื้อมาละลายด้วย dichloromethane เพื่อวิเคราะห์โครงสร้างของแผ่นฟิล์มด้วยเครื่อง FTIR พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของหมู่ฟังชันก์ของแผ่นฟิล์ม โดย IR spectra ของสารละลายตัวอย่างแผ่นฟิล์มที่ไม่เติมเชื้อและเติมเชื้อแสดง broad absorption band ในช่วง 3400-3000 cm^{-1}(OH stretch) และช่วง 1740 cm^{-1}(C=O stretch) ตัวอย่างสารละลายแผ่นฟิล์มที่ไม่มีการเติมเชื้อ (ภาพที่ 5a) จะสังเกต broad absorption band ช่วง 1740 cm^{-1} ชัดเจนแต่ในตัวอย่างสารละลายแผ่นฟิล์มที่เติมเชื้อจะมีขนาด peak เล็กลง (ภาพที่ 5b)



ภาพที่ 5 การวิเคราะห์โครงสร้างของแผ่นฟิล์ม PBS ด้วยเครื่อง FTIR (a) ตัวอย่างสารละลายแผ่นฟิล์มที่ไม่มีการเติมเชื้อของ APL5 และ(b) ตัวอย่างสารละลายแผ่นฟิล์มที่มีการเติมเชื้อลงไป

4. ยีนบางส่วนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PBS

การศึกษายีนบางส่วนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PBS พบว่า PCR product มีขนาดประมาณ 300 คู่เบสและได้ตั้งชื่อยีน คือ *lpa5* (ภาพที่ 6) จากนั้นทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน Lpa5 กับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ที่เคยมีรายงานมาแล้วว่าย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ ได้แก่ *Streptomyces coelicolor* สายพันธุ์ A3(2), *Streptomyces albus*, *Streptomyces exfoliates* สายพันธุ์ M11, *Acidovorax delafieldii* สายพันธุ์ BS-3 และ *Thermobifida alba* สายพันธุ์ AHK119 พบว่ามีลำดับกรดอะมิโนจำเพาะ Gly-His-Ser-Met-Gly (GHSMG) ที่คล้ายกับบริเวณ esterase/lipase superfamily



ภาพที่ 6 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพระหว่าง Lpa5 และลำดับกรดอะมิโนเอนไซม์ไลเปส *Streptomyces coelicolor* (S. coeli_lipaseA), *Streptomyces albus* (S. albus_lipR), *Streptomyces exfoliates* สายพันธุ์ M11 (S. exfol_lipA), กรดอะมิโนของเอนไซม์เอสเทอเรสจาก *Thermobifida alba* สายพันธุ์ AHK119 (T. alba) และกรดอะมิโนของเอนไซม์ PBS depolymerase จาก *Acidovorax delafieldii* สายพันธุ์ BS-3 (AcidoPBSA) วงกลมสีดำแสดงบริเวณ กรดอะมิโนจำเพาะ Gly-His-Ser-Met-Gly (GHSMG)

วิจารณ์ผลการวิจัย

Saccharothrix sp. APL5 แยกได้จากดินกองขยะในจังหวัดกรุงเทพมหานคร มีผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rDNA และลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายจีนัส *Saccharothrix* sp.(Sukrakanchana *et al.,* 2011) *Saccharothrix* พบครั้งแรกโดย Labeda และคณะ (1984) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ต้องการอากาศในการเจริญ มีผนังเซลล์แบบ type III (*meso*-diaminopimelic acid without glycine) และมีน้ำตาล rhamnose, galactose และ mannose อยู่ภายในเซลล์ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของสายพันธุ์ APL5 ที่มีผนังเซลล์แบบ *meso*-isomer และพบน้ำตาล galactose, mannose, glucose และxylose ภายในเซลล์ นอกจากนี้ยังพบการรายงานลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Saccharothrix* ชนิดต่างๆ ได้แก่ *Saccharothrix yanglingensis* สายพันธุ์ Hhs.015^{T} ผนังเซลล์ประกอบด้วยกรดอะมิโน *meso*-diaminopimelic acid พบน้ำตาล galactose และ mannose ภายในเซลล์ และphospholipid ประกอบด้วย phosphatidylethanolamine (PE) และ diphosphatidylglycerol (DPG) ซึ่งสายพันธุ์นี้สามารถใช้น้ำตาล fructose, glucose, sucrose, glycerol, maltose เจริญได้ ช่วงอุณหภูมิและ pH เท่ากับ 15-35 องศาเซลเซียสและ 4.5-9.5 ตามลำดับ อุณหภูมิและpH ที่เจริญได้ดีที่สุดเท่ากับ 25-28

องศาเซลเซียส และ 7-7.5 ตามลำดับ แต่ไม่สามารถเจริญได้เมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 37 องศาเซลเซียสและที่ความเข้มข้นของ NaCl 4 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร (Yan *et al.,* 2012) *Saccharothrix australiensis* สายพันธุ์ LL-BM782Ce82 สามารถใช้น้ำตาล cellobiose, dextrin, erythritol, fructose, maltose, mannose, sorbitol และ trehalose เจริญได้ช่วงอุณหภูมิ 10-45 องศาเซลเซียส (Labeda *et al*., 1984) *Saccharothrix violacea* สายพันธุ์ LM036^{T} สามารถใช้น้ำตาล arabinose, cellobiose, fructose, galactose, glucose, lactose, maltose, mannose, melibiose, rhamnose, salicin, sucrose, trehalose, xylose, adonitol, inositol, mannitol, acetate, fumarate, α-ketoglutarate, lactate, malonate, propionate, pyruvate และ succinate เจริญได้ช่วงอุณหภูมิ 10-37 องศาเซลเซียส ไม่สามารถเจริญได้ที่ 42 องศาเซลเซียส และเจริญได้ที่ความเข้มข้นของ NaCl 4 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร และ 0.01 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร lysozyme (Lee *et al.,* 2000) และ *Saccharothrix albidocapillata* สายพันธุ์ DSM 44073^{T} สามารถใช้น้ำตาล arabinose, cellobiose, fructose, galactose, glucose, lactose, maltose, mannose, melibiose, rhamnose, sucrose, trehalose, xylose, adonitol, inositol, mannitol, acetate, fumarate, gluconate, α-ketoglutarate, malate, malonate, oxalate, propionate, pyruvate, succinate, iso-amylalcohol และ paraffin เจริญได้ช่วงอุณหภูมิ 20-37 องศาเซลเซียสไม่สามารถเจริญได้ที่ 42 องศาเซลเซียส และเจริญได้ที่ความเข้มข้นของ NaCl 4 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร 0.01 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร thallium acetate และ 0.01 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร lysozyme (Yassin *et al.,* 1995; Lee *et al.,* 2000) เมื่อศึกษาความสามารถในการย่อยสลายซับสเตรท CMC, xylan, starch และ skim milk พบว่า APL5 ย่อยสลายได้ทุกชนิดแสดงว่าเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ cellulase, xylanase, amylase และ protease ตามลำดับซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญทางอุตสาหกรรม จากการรายงานก่อนหน้านี้พบว่าสายพันธุ์ Hhs.015^{T} สามารถย่อยสลาย casein, cellulose และ starch แต่ไม่สามารถย่อยสลาย adenine, hypoxanthine, chitin, urea, gelatin และ tyrosine (Yan *et al.,* 2012) สายพันธุ์ Hhs.015^{T} มีสปอร์ผิวเรียบรูปไข่ ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ไม่พบ endospore, sporangia, sclerotia และ synnemata เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Yan *et al.,* 2012)

APL5 สามารถผลิตเอนไซม์เพื่อย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ PBS จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า APL5 ยังสามารถย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ PCL, PLA และPBSA (Sukrakanchana *et al*.,2011) ซึ่งโดยทั่วไปเอนไซม์ที่ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพได้นั้นจัดว่าเป็น inducible enzyme สามารถผลิตเอนไซม์ได้เมื่อมีการเติมสารชักนำให้เกิดการสร้างเอนไซม์ (Sriyapai *et al.,* 2018; Sriyapai *et al.,* 2014) และพบว่าเอนไซม์ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพนั้นสามารถย่อยสลายพลาสติกชีวภาพได้มากกว่า 1 ชนิด (co-degradation) (Teeraphatpornchai *et al.,* 2003; Sriyapai *et al.,* 2018) แบคทีเรียที่ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพได้จะถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ เช่น แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน อุณหภูมิ pH อัตราการเขย่า และระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อเพื่อช่วยให้ผลิตเอนไซม์ได้ปริมาณสูง การขาดแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อส่งผลให้เชื้อไม่สามารถเจริญหรือเจริญได้น้อยลง และพบว่า yeast extract และammonium sulfate เป็นแหล่งไนโตรเจนในการเหนี่ยวนำการทำงานของเอนไซม์ depolymerase ในกลุ่ม polyester-degrading thermophilic bacteria (Sriyapai *et al.,* 2018) สำหรับระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ APL5 เพื่อผลิตเอนไซม์ PBS depolymerase จะเริ่มลดลงหลังจาก 96 ชั่วโมงอาจเนื่องจากเชื้อเริ่มขาดสารอาหารและเริ่มผลิตสาร metabolites ที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของแบคทีเรีย การผลิตเอนไซม์เพื่อย่อยสลายพลาสติกชีวภาพจากแบคทีเรียแต่ละชนิดจะมีความแตกต่างกันของชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อ และปริมาณสารอาหารที่แบคทีเรียแต่ละชนิดต้องการ (Abou-Aeid *et al.,* 2001) การย่อยสลายพลาสติกชีวภาพอาศัยเอนไซม์จากจุลินทรีย์ทั้งแบบ extracellular และ intracellular depolymerases ที่หลั่งออกมาย่อยสลาย เนื่องจากพลาสติก

ชีวภาพเป็นพอลิเมอร์ขนาดใหญ่ ไม่ละลายน้ำและไม่สามารถผ่านเข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์ได้ เมื่อถูกย่อยด้วยเอนไซม์ extracellular depolymerases ทำให้พอลิเมอร์มีขนาดสายเล็กลงเป็น monomers, oligomers และ dimers ซึ่งสามารถย่อยสลายได้ง่ายขึ้น และผ่านเข้าไปในเซลล์เพื่อให้แบคทีเรียใช้เป็นแหล่งคาร์บอน แหล่งพลังงาน และให้ผลผลิตสุดท้ายเกิดขึ้น จุลินทรีย์ที่อาศัยออกซิเจนในการเจริญจะให้ผลผลิตสุดท้าย เช่น ก๊าซ CO_2, H_2O, และสารชีวมวล จุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญจะให้ผลผลิตสุดท้าย เช่น ก๊าซ CO_2, H_2O, และ CH_4 ที่ไม่ส่งผลกระทบทางสิ่งแวดล้อม (Mueller, 2003) เอนไซม์ proteinase K, bromelain และ pronase เป็นเอนไซม์แรกๆ ที่รายงานถึงสามารถในการย่อยสลาย PLA (Williams, 1981) เอนไซม์ proteases เช่น trypsin, elastase และ subtilisin สามารถย่อยสลาย L-PLA (Lim *et al.,* 2005) เอนไซม์กลุ่ม lipases และ esterases เป็นกลุ่มที่สำคัญที่สามารถย่อยสลาย aliphatic polyesters โดยเอนไซม์จะไปตัดบริเวณ ester bond แบบสุ่มของสายพอลิเมอร์ของ PCL, PBS หรือกลุ่มพอลิเอสเทอร์ที่ประกอบด้วย methylene groups อยู่ในโมเลกุล (Tokiwa & Suzuki, 1977; Penkhrue *et al.,* 2015) นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์กลุ่ม cutinase จาก *Aspergillus oryzae* สามารถย่อยสลาย PBS และPBSA (Maeda et al., 2005) การที่ APL5 ผลิตเอนไซม์ PBS depolymerase เพื่อย่อยสลาย PBS ได้นั้นเนื่องจากโครงสร้าง PBS เมื่อถูกย่อยสลายจะได้ผลิตภัณฑ์หลักของ 4-hydroxybutyl succinate (4HBS) และปลายสายพอลิเมอร์ PBS มีโครงสร้างคล้าย tri- และ diglycerides ซึ่งเป็นซับสเตรทที่สำคัญของเอนไซม์ lipase ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Lee (2008) พบว่าพอลิเมอร์ PBS, poly(butylene succinate-*co*-L-lactate (PBSL) และ poly(butylene succinate-*co*-6-hydroxycaproate (PBSCL) ถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ lipasePS® จาก *Pseudomonas cepacia* ที่ย่อยสลาย PBS และโคพอลิเมอร์ (Lee, 2008) ดังนั้นเอนไซม์ PBS depolymerase จากสายพันธุ์ APL5 จึงมีลักษณะการทำงานคล้ายเอนไซม์กลุ่ม lipase เพื่อย่อยสลายสายพอลิเมอร์

APL5 ย่อยสลายแผ่นฟิล์ม PBS แสดงว่าสายพันธุ์นี้ผลิตเอนไซม์ PBS depolymerase ออกมาย่อยสลายแผ่นฟิล์ม ทำให้แผ่นฟิล์มมีน้ำหนักลดลง พื้นผิวมีลักษณะเป็นรูพรุน และหมู่ฟังชันก์ของโครงสร้าง PBS เปลี่ยนแปลงไปจากเดิมซึ่งมีลักษณะคล้ายกับงานวิจัยที่เคยมีรายงานก่อนหน้านี้ (Sriyapai *et al*., 2014) แอคติโนมัยสีทชอบร้อน *Actinomadura* sp. สายพันธุ์ TF1 ย่อยสลายแผ่นฟิล์ม PBS ได้ภายในระยะเวลา 90 วัน และบริเวณพื้นผิวของแผ่นฟิล์มมีลักษณะเป็นรูพรุนภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน การย่อยสลาย PBS มีหลายกลไก ได้แก่ ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolytic degradation) การย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (enzymatic degradation) และการย่อยสลายทางชีวภาพ (biodegradation) ในสิ่งแวดล้อมที่สภาวะต่างๆ เช่น การฝังดิน (soil burial) และการทำปุ๋ยหมัก อัตราการย่อยสลาย PBS จะสูงหรือต่ำนั้นขึ้นกับโครงสร้างทางเคมีของพลาสติก (เช่น องค์ประกอบของโคพอลิเมอร์ และน้ำหนักมวลโมเลกุล) ความหนาของแผ่นพลาสติก ดีกรีของความเป็นผลึกของพอลิเมอร์ (degree of crystallinity) และสภาวะของการย่อยสลาย (เช่น ชนิดของจุลินทรีย์, อุณหภูมิ, pH, ความชื้น และความต้องการหรือไม่ต้องการออกซิเจน) การที่น้ำหนักโมเลกุลของ PBS ลดลงเนื่องจากเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่พันธะ ester โดยตัดพันธะแบบสุ่ม (Xu & Guo, 2010) การย่อยสลายด้วยเอนไซม์จะเกิดขึ้นบริเวณพื้นผิวของ solid substrate ทำให้บริเวณนี้เกิดการสึกกร่อนและน้ำหนักลดลง เอนไซม์ไม่สามารถแทรกซึมเข้าไปภายในพอลิเมอร์ของ solid substrate แต่สามารถย่อยสลายซับสเตรทได้ในกรณีที่ซับสเตรทมีลักษณะรูปร่างไม่แน่นอน (amorphous) ในกระบวนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์จะไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักโมเลกุลของ aliphatic polyesters ถึงแม้น้ำหนักโมเลกุลของ PSB ต่ำ (M_w 6,300) หรือน้ำหนักโมเลกุลสูง (M_w 29,000) ก็ตาม (Song & Sung 1995)

ดังนั้นเอนไซม์ PBS depolymerase ของ APL5 อาจเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม serine hydrolase superfamily ที่ประกอบด้วย GxSxG motif เอนไซม์ esterase และlipase จัดอยู่ในกลุ่ม hydrolase super-family ที่มีรายงานถึงการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ และมี GxSxG motif เช่นเดียวกัน ได้แก่ *Streptomyces flavogrieus* ATCC 33331 (YP_004925694), *Amycolatopsis orientalis* (YP_008014213), *Thermobifida alba* สายพันธุ์ AHK119 (BAK48590), *Actinomadura* sp. S14, *Actinomadura* sp. TF1 และ *Streptomyces* sp. APL3 (Sriyapai *et al.,* 2018)

สรุปผลการวิจัย

PBS เป็นพลาสติกชีวภาพที่ย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ เนื่องจากผลิตจากวัตถุดิบทางธรรมชาติ เช่น อ้อย และแป้งมันสำปะหลัง สามารถนำมาขึ้นรูปเพื่อผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น ถุงเพาะชำต้นกล้า แผ่นคลุมดิน ช้อน ส้อม แก้วน้ำ และกล่องบรรจุภัณฑ์ มีคุณสมบัติในการทนความร้อนสูงถึง 200 องศาเซลเซียส ต้นทุนในการผลิตยังต่ำกว่า PLA มีความแข็งแรงและย่อยสลายได้ดีกว่า PLA การศึกษากลไกการย่อยสลาย PBS ยังมีรายงานเกี่ยวกับเชื้อและยีนที่เกี่ยวข้องไม่มากนัก โดยเฉพาะ *Saccharothrix* sp. งานวิจัยนี้เป็นรายงานแรกที่ศึกษาเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PBS (PBS depolymerase) จาก *Saccharothrix* sp. APL5 โดยพบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด 35.6±2.31 ยูนิตต่อมิลลิกรัม เมื่อศึกษาการย่อยสลายแผ่นฟิล์ม PBS พบว่าหลังจากบ่มเป็นเวลา 56 วัน แผ่นฟิล์มมีลักษณะถูกกัดกร่อนเป็นรูพรุน เมื่อศึกษายีนบางส่วนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายพบว่าอยู่ในกลุ่ม esterase/lipase superfamily จากผลการทดลองนี้สามารถต่อยอดงานวิจัยเพื่อศึกษายีนทั้งหมดที่เกี่ยวข้องกับกลไกการย่อยสลาย PBS การโคลนยีนและคุณสมบัติของเอนไซม์ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2561 มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ (สัญญาวิจัยเลขที่ 033/2561) ขอขอบคุณ รศ.ดร.สิริธร สโมสร ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่อนุเคราะห์ในการใช้เครื่อง FTIR และขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ให้การสนับสนุนสถานที่การทำวิจัยให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

Abou-eid, D.M., Müller, R.J., & Deckwer, W.D. (2001). Degradation of natural and synthetic polyesters under anaerobic conditions. *Journal of Biotechnology, 86*, 113-126.

Bradford, M.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.

Department of Environmental Quality Promotion. (2018). *The Journal of the Network NEVT Conservator*. Retrieved April 30, 2019, from https://www.deqp.go.th/service-portal/environmental-media-system/electronics-detail/?id=100697 (in Thai)

Fujimaki, T. (1998). Processability and properties of aliphatic polyester BIONOLLE synthesized by polycondensation reaction. *Polymer Degradation and Stability, 59*, 209-214.

Ghosh, S.K., Pal, S., & Ray, S. (2013). Study of microbes having potentiality for biodegradation of plastics. *Environmental Science and Pollution Research, 20*, 4339-4355.

Hu, X., Thumarat, U., Zhang, X., Tang, M., & Kawai, F. (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.

Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F., & Hopwood, D.A. (2000). *Practical Streptomyces Genetics.* Norwich: The John Innes Foundation.

Labeda, D.P., Testa, R.T., Lechevalier, M., & Pand, H.A. (1984). *Saccharothrix*: a new genus of the actinomycetales related to *Nocardiopsis*. *International Journal of Systematic Bacteriology, 34*, 426-431.

Lee, C.W., Kimura, Y., & Chung, J-D. (2008). Mechanism of enzymatic degradation of poly(butylene succinate). *Macromolecular Research, 16*, 651-658.

Lee, S.D., Kim, E.S., Roe, J-H, Kim, J., Kang, S-O, & Hah, Y.C. (2000). *Saccharothrix violacea* sp. nov., isolated from a gold mine cave, and *Saccharothrix albidocapillata* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 50*, 1315-1323.

Lim, H.A., Raku, T., & Tokiwa,Y. (2005). Hydrolysis of polyesters by serine proteases. *Biotechnology Letters, 27*, 459-464.

Maeda, H., Yamagata, Y., Abe, K., Hasegawa, F., Machida, M., Ishioka, R., Gomi, K., & Nakajima, T. (2005). Purification and characterization of a biodegradable plastic-degrading enzyme from *Aspergillus oryzae*. *Applied Microbiology and Biotechnology, 67*, 778-788.

Mueller, R.J. (2003). Biodegradability of polymers: regulations and methods for testing. In: A. Steinbüchel. (Ed.), *Biopolymers*. (pp. 365-374). Weinheim: Wiley-VCH.

Nishida, H., & Tokiwa, Y. (1993). Distribution of poly(β-hydroxybutyrate) and poly(ε-caprolactone) aerobic degrading microorganisms in different environments. *Journal of Environmental Polymer Degradation, 1*, 227-233.

Oda, Y., Naoya, O., Teizi, U., & Kenzo, T. (1997). Polycaprolactone depolymerase produced by the bacterium *Alcaligenes faeaclis*. *FEMS Microbiology Letters, 152*, 339-343.

Penkhrue, W., Khanongnuch, C., Masaki, K., Pathom-aree, W., Punyodom, W., & Lumyong, S. (2015). Isolation and screening of biopolymer-degrading microorganisms from northern Thailand. *World Journal of Microbiology and Biotechnology, 31*, 1431-1442.

Pranamuda, H., Tokiwa, Y., & Tanaka, H. (1995). Microbial degradation of an aliphatic polyester with a high melting point, poly(tetramethylene succinate). *Applied and Environmental Microbiology, 61*, 1828-1832.

Shirling, E.B., & Gottlieb, D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology, 16*, 313-340.

Simachaya, W. (2018). *Plastic waste management guidelines to promote sustainable use of plastics in Thailand for the future*. Retrieved Jan 15, 2019, from http://www.tei.or.th/tbcsd/event /180911-tbcsd-VS.pdf (in Thai)

Song D.K., & Sung, Y.K. (1995). Synthesis and characterization of biodegradable poly(1,4-butanediol succinate). *Journal of Applied Polymer Science, 56*, 1381-1395.

Sriyapai, P., Chansiri, K., & Sriyapai, T. (2018). Isolation and characterization of polyester-based plastics-degrading bacteria from compost soils. *Microbiology, 87*, 290-300.

Sriyapai, T., Siripoke, S., Chansiri, K., Petchwattana, N., & Sriyapai, P. (2014). Optimization for production of aliphatic polyester-degrading enzyme from *Actinomadura* sp. strain TF1. *Srinakharinwirot Science Journal, 30(2)*, 103-118.

Staneck, J.L., & Roberts, G.D. (1974). Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin-layer chromatography. *Applied Microbiology, 28*, 226-231.

Sukrakanchana, L., Sukkhum, S., & Somyoonsap, P. (2011). Isolation of bioplastics-degrading bacteria from compost soil in Thailand. In *The 23rd Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology "Systems Biotechnology: Quality & Success" (TSB 2011)*. (pp. 252-253). Bangkok, Thailand.

Teeraphatpornchai, T., Nakajima-Kambe, T., Shigeno-Akutsu, Y., Nakayama, M., Nomura, N., Nakahara, T., & Uchiyama, H. (2003). Isolation and characterization of a bacterium that degrades various polyester-based biodegradable plastics. *Biotechnology Letters, 25*, 23-25.

Tokiwa, Y., & Suzuki, T. (1977). Hydrolysis of polyesters by lipases. *Nature, 270*, 76-78.

Uchida, H., Nakajima-Kambe, T., Shigeno-Akutsu, Y., Nomura, N., Tokiwa, Y., & Nakahara, T. (2000). Properties of a bacterium which degrades solid poly(tetramethylene succinate)-*co*-adipate, a biodegradableplastic. *FEMS Microbiology Letters, 189*, 25-29.

Williams, D.F. (1981). Enzymic hydrolysis of polylactic acid. *Engineering in Medicine, 10*, 5-7.

Xu, J., & Guo, B-H. (2010). Microbial succinic acid, its polymer poly(butylene succinate), and applications. In G-Q. Chen. (Ed.), *Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications*. (pp.347-388). Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg

Yan, X., Huang, L-L., Tu, X., Gao, X-N., & Kang, Z-S. (2012). *Saccharothrix yanglingensis* sp. nov., an antagonistic endophytic actinomycete isolated from cucumber plant. *Antonie van Leeuwenhoek, 101*, 141-146.

Yassin, A.F., Rainey, F.A., Brzezinka, H., Jahnke, K-D, Weissbrodt, H., Budzikiewicz, H., Stackebrandt, E., & Schaal, K.P. (1995). *Lentzea* gen. nov., a new genus of the order *Actinomyceytales*. *International Journal of Systematic Bacteriology, 45*, 357-363.