การคัดกรองหาเอนไซม์เอสเทอร์เรสจากเชื้อแอคติโนมัยซีท ที่แยกได้จากตะกอนดินบริเวณป่าชายเลน

จันทร์จรัส วัฒนะโชติ[1*], จีรวรรณ แพงอ่อน[2], รวิวรรณ วัฒนดิลก[1] และสมชาติ แม่นปืน[2]

Screening of esterase activity of actinomycetes isolated from mangrove sediment

Janjarus Watanachote[1], Jeerawan Pang-On[2], Rawiwan Watanadilok[1] and Somchart Maenpuen[2]

[1] สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา อ. เมือง จังหวัดชลบุรี 20131

[2] ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา อ. เมือง จังหวัดชลบุรี 20131

[1] Institute of Marine Science, Burapha University, Muang, Chonburi, 20131

[2] Department of Biochemistry, Faculty of Science, Burapha University, Muang, Chonburi, 20131

*Corresponding author. E-mail : janjarus@buu.ac.th

บทคัดย่อ

จากการนำเชื้อแอคติโนมัยซีททะเลจำนวน 10 ไอโซเลท ที่แยกได้จากตะกอนดินบริเวณป่าชายเลนจากจังหวัดชุมพร นครศรีธรรมราช ชลบุรี และระยอง เพื่อคัดกรองเชื้อที่ให้กิจกรรมเอสเทอร์เรสที่ดี โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร OYC (oatmeal yeast extract และ carboxy methyl celluose) ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.2 ความเค็มของน้ำทะเลธรรมชาติ 17 พีพีที บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นนำส่วนของน้ำสารละลายตัวอย่างตรวจหากิจกรรมของเอนไซม์ พบว่า แอคติโนมัยซีทไอโซเลท NS56-4-6 มีค่าการทำงานของเอนไซม์จำเพาะสูงที่สุด 124.0 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน จึงได้นำเชื้อ NS56-4-6 ศึกษาผลของอาหาร 3 ชนิด ได้แก่ ISP2 (yeast extract, malt extract และ dextrose), OYC, CMC (carboxy methyl cellulose) พบว่า อาหารชนิด OYC ซึ่งมีข้าวโอ๊ตเป็นองค์ประกอบหลักให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เอสเทอร์เรสมากที่สุด อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อยู่ที่ 40 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7

คำสำคัญ: แอคติโนมัยซีท เอสเทอร์เรส ดินตะกอน ป่าชายเลน

Abstract

Ten isolates of marine actinomycetes were separated from sediment which collected form mangrove areas of Chumporn Nakhon Si Thammarat Chonburi and Rayong Provinces. These isolates were then screened for esterase activity. The actinomycetes were cultured in OYC (oatmeal, yeast extract and carboxy methyl celluose) medium on condition at pH 6.2 natural sea water 17 ppt and incubated at 30 °C for 4 days. Then sample solutions were assayed for esterase activity. The results shown that isolate NS56-4-6 gave highest esterase specific activity at 124.0 unit/mg protein. The enrichment of an actinomycete NS56-4-6 isolate under different types of culture media, ISP2 (yeast extract, malt extract and dextrose), OYC, CMC (carboxy methyl cellulose) temperatures and pH condition was further investigated for esterase activity. The result indicated that the most suitable media for esterase production is OYC medium in which oatmeal is major component. The optimum temperature and pH for esterase were found to be 40° C and 7 respectively.

Keywords: actinomycetes, esterase, sediment, mangrove area

บทนำ

แอคติโนมัยซีทเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีลักษณะสัณฐานคล้ายกับเชื้อรา แต่ขนาดของเส้นใยจะเล็กกว่าเชื้อรา โดยมีขนาดประมาณ 0.5-1 μm สามารถสร้างเส้นใยเป็นสายยาวได้ ซึ่งส่วนใหญ่สามารถสร้างได้ทั้งเส้นใยใต้ผิวอาหาร และเส้นใยเหนือผิวอาหาร หรืออาจพบเฉพาะเส้นใยใต้ผิวอาหาร มีปริมาณร้อยละของเบสกวานีนและไซโตซีนประมาณ 55-78 ซึ่งสูงกว่าแบคทีเรียแกรมบวกทั่วไป (รัตนาภรณ์ ศรีวิบูลย์, 2549) แอคติโนมัยซีทพบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม มีการแพร่กระจายในพืช ดิน มูลสัตว์ รวมทั้งในทะเล บริเวณชายฝั่งน้ำตื้น ในตะกอนดินชายฝั่ง หรือในฟองน้ำ เป็นต้น (Pattanapipitpaisal and Kamlandharn , 2012; รัตนาภรณ์ และ จันทร์จรัส, 2558) ปัจจุบันแอคติโนมัยซีทเป็นแบคทีเรียที่กำลังได้รับความสนใจในด้านต่างๆ เช่น ด้านเทคโนโลยีชีวภาพ ด้านพันธุศาสตร์ ด้านนิเวศวิทยา รวมถึงด้านสิ่งแวดล้อมที่มีการนำแอคติโนมัยซีทไปใช้ในการบำบัดสารมลพิษทางชีวภาพ ได้แก่ สังกะสี ตะกั่ว หรือเหล็ก เป็นต้น (Daboor et al., 2014; Schütze et al., 2014) นอกจากนี้แอคติโนมัยซีทสามารถทนอุณหภูมิสูงได้ดีกว่าแบคทีเรียทั่วไป สามารถสร้างสารเมตาโบไลท์ที่สำคัญหลายชนิด อีกทั้งแอคติโนมัยซีทสามารถสร้างเอนไซม์ได้หลายชนิด เช่น เซลลูเลส (cellulase) ไคติเนส (chitinase) และอะไมเลส (amylase) เป็นต้น เพื่อใช้ในขบวนการย่อยสลายสายซากพืช ซากสัตว์ เชื้อราที่ตายแล้ว หรือย่อยสลายวัสดุทางการเกษตร (จามจุรี และคณะ, 2555) แอคติโนมัยซีทจึงมีบทบาทเป็นผู้ย่อยสลายทางชีวภาพ ซึ่งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งคือ เอนไซม์เอสเทอร์เรส (esterases, EC 3.1.1.X)

เอนไซม์เอสเทอร์เรส เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่ทำหน้าที่หลักในการตัดพันธะเอสเทอร์ สามารถแบ่งออกได้สองกลุ่ม คือ กลุ่มไฮโดรเลส (hydrolase) และกลุ่มแคทตาเลส (catalyze) สามารถพบได้ทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ (Lopes et al., 2011) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีความสนใจศึกษาเอนไซม์เอสเทอร์เรสจากเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากตะกอนดินบริเวณป่าชายเลน เนื่องจากบริเวณป่าชายเลนเป็นเขตน้ำขึ้นน้ำลง เชื้อแบคทีเรียที่สามารถเจริญอยู่ได้ในบริเวณนี้จะมีความทนต่อสภาวะที่มีการเปลี่ยนแปลง โอกาสที่จะนำเชื้อแอคติโนมัยซีทไปประยุกต์ใช้ในสภาวะรุนแรงจึงน่าจะมีความเป็นไปได้สูง ซึ่งข้อมูลพื้นฐานที่ได้จากการวิจัยจะได้นำไปประยุกต์ใช้ในการย่อยสลายพลาสติกที่มีพันธะเอสเทอร์เป็นองค์ประกอบต่อไป

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียม**เชื้อแอคติโนมัยซีท**

นำตัวอย่างเชื้อแอคติโนมัยซีทที่ได้จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา จำนวน 10 ไอโซเลท ได้แก่ CP15-9-6, CP10-9-5, A1-3, A3-3, CP58-4-26, CP58-4-23, CP58-6-5, SK08-5, NS56-4-6 และ RY3-37 ที่แยกได้จากตะกอนดินบริเวณป่าชายเลน จังหวัดชุมพร (รหัส CP) จังหวัดนครศรีธรรมราช (รหัส NS) จังหวัดชลบุรี (รหัส A และ SK) และจังหวัดระยอง (รหัส RY) ซึ่งเก็บไว้ในอาหารแข็งเอียงชนิด ISP2 (yeast extract, malt extract และ dextrose) นำมากระตุ้นให้เชื้อแข็งแรงโดยเลี้ยงในอาหารเหลว ISP2 จากนั้นนำเชื้อมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-7 วัน เมื่อเชื้อเจริญดี คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวที่แยกได้ใส่ในอาหารแข็งเอียง ISP2 เก็บไว้สำหรับใช้ในการทดลองต่อไป (รัตนาภรณ์ และจันทร์จรัส, 2558)

การคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทที่ผลิตเอนไซม์เอสเทอร์เรส

นำเชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 10 ไอโซเลท เลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน เมื่อเชื้อเจริญให้เจาะชิ้นวุ้นที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 มิลลิเมตร จำนวน 1 ชิ้น ใส่ในอาหารเหลว OYC ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยอัตราเร็ว 110 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน แยกส่วนสารละลายตัวอย่างออกจากตะกอนเซลล์ด้วยวิธีปั่นเหวี่ยงที่ 10000 xg เก็บส่วนน้ำสารละลายตัวอย่างวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธีของแบรดฟอร์ด (Bradfoard, 1976) และวัดกิจกรรมของเอนไซม์เอสเทอร์เรส (Oeser et al., 2010) โดยนำน้ำสารละลายตัวอย่างปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมกับซับสเตรท 4-Nitrophenyl butyrate ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซไลน์ 0.01 โมลาร์ ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.0 ปริมาตร 940 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยาที่

อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นปิเปตสารละลาย 200 ไมโครลิตร ใส่ในแผ่นไมโครเพลท (96-well plate) แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate Reader นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้คำนวณหาปริมาณผลิตภัณฑ์ (p-nitrophenol) ที่เกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์เอสเทอร์เรสโดยใช้สมการจากกราฟมาตรฐาน ที่กำหนดให้หนึ่งหน่วยเอนไซม์ คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้เร่งปฏิกิริยาแล้วทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ 1 ไมโคร-โมลของ p-nitrophenol ภายในเวลา 1 นาที ในสภาวะเดียวกัน

ผลของชนิดอาหารต่อการผลิตเอนไซม์เอสเทอร์เรสของแอคติมัยซีทไอโซเลท NS56-4-6

นำเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 เลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน 3 ชนิด ได้แก่ ISP2, OYC และ CMC ด้วยน้ำทะเลธรรมชาติความเค็ม 17 ppt มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.2 เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยอัตราเร็ว 110 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นนำไปตรวจวัดปริมาณโปรตีนและกิจกรรมของเอนไซม์เอสเทอร์เรส (จีรวรรณ, 2559)

ผลของระยะเวลาต่อการผลิตเอนไซม์เอสเทอร์เรส

นำเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 เลี้ยงในอาหารเหลว OYC ที่มีความเค็ม 17 ppt มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.2 เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยอัตราเร็ว 110 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 9 วัน เก็บสารละลายตัวอย่างตรวจวัดปริมาณโปรตีนและกิจกรรมของเอนไซม์เอสเทอร์เรสทุกวัน

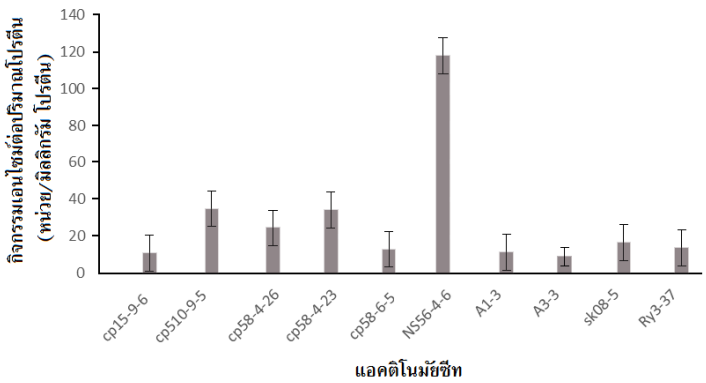
ผลของความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์เอสเทอร์เรส

นำสารละลายตัวอย่างเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 ที่เลี้ยงในอาหาร OYC ความเค็ม 17 ppt มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.2 เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์เอสเทอร์เรส โดยปิเปตสารละลายตัวอย่างปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมกับซับสเตรท 4-nitrophenyl butyrate ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างต่างกัน 3 ระดับ คือ 4, 7 และ 8 ปริมาตร 940 ไมโครลิตร และการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์ ปิเปตสารละลายตัวอย่างปริมาตร 1000 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิแตกต่างกัน คือ 4, 25, 40, 50, 60, 70, 80 และ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างไปตรวจวัดปริมาณโปรตีนและกิจกรรมของเอนไซม์เอสเทอร์เรส

ผลการศึกษา

การคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทที่ผลิตเอนไซม์เอสเทอร์เรส

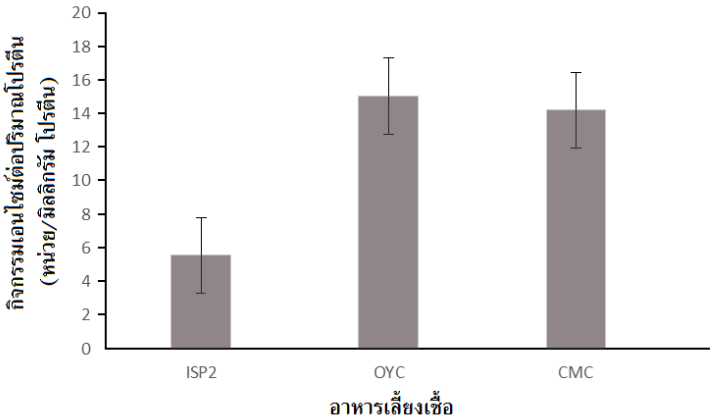
จากการนำเชื้อแอคติโนมัยซีท 10 ไอโซเลทมาศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เอสเทอร์เรส พบว่า เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท NS56-4-6 ที่แยกได้จากจังหวัดนครศรีธรรมราช มีค่าการทำงานของเอนไซม์จำเพาะสูงที่สุด 124.0 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งมากกว่าไอโซเลท CP10-9-5 และ CP58-4-23 ที่แยกได้จากจังหวัดชุมพร ประมาณ 3 เท่า ดังแสดงในรูปที่ 1 ดังนั้นจึงได้นำเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท NS56-4-6 ไปศึกษาผลของปัจจัยทางกายภาพที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยงเชื้อให้ได้กิจกรรมเอนไซม์มากที่สุด



รูปที่ 1 กิจกรรมเอนไซม์เอสเทอร์เรสของเชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 10 ไอโซเลท

ชนิดของอาหารต่อการผลิตเอนไซม์เอสเทอร์เรส

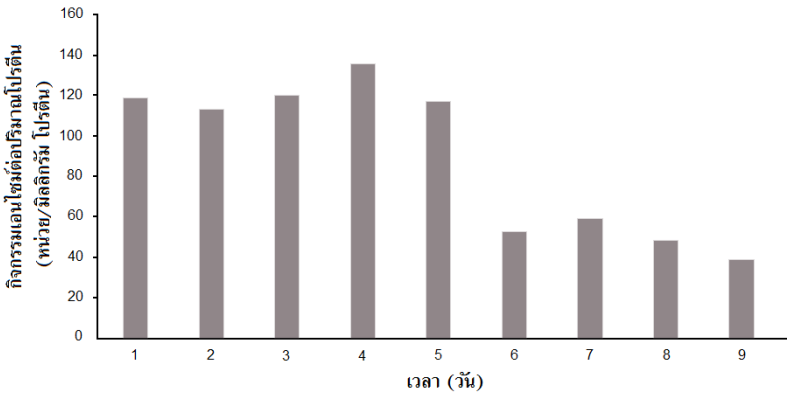
เมื่อนำเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท NS56-4-6 เลี้ยงในอาหารเหลว ที่มีแหล่งคาร์บอนหรือไนโตรเจนแตกต่างกัน คือ ISP2 OYC และ CMC เป็นเวลา 4 วัน พบว่า เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท NS56-4-6 สามารถเจริญและผลิตเอนไซม์เอสเทอร์เรสได้ดีในอาหารชนิด OYC และ CMC โดยมีค่าการทำงานของเอนไซม์จำเพาะ คือ 15.44 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน และ 14.33 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ ในขณะที่อาหาร ISP2 ให้ค่าการทำงานของเอนไซม์จำเพาะ 5.36 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน (รูปที่ 2) ดังนั้นอาหารที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท NS56-4-6 เพื่อศึกษาปัจจัยทางกายภาพที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์เอสเทอร์เรส คืออาหาร OY



รูปที่ 2 ผลของอาหารต่อการทำงานของเอนไซม์เอสเทอร์เรส

ผลของระยะเวลาต่อการทำงานเอนไซม์เอสเทอร์เรส

จากการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 ในอาหารเหลว OYC เป็นเวลา 9 วัน เพื่อตรวจวัดกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ต่อปริมาณโปรตีน พบว่า มีค่าสูงสุดในวันที่ 4 คือ 136.67 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน และกิจกรรมของเอนไซม์มีค่าลดลงเมื่อเพิ่มจำนวนวันในการเพาะเลี้ยง ดังแสดงในรูปที่ 3

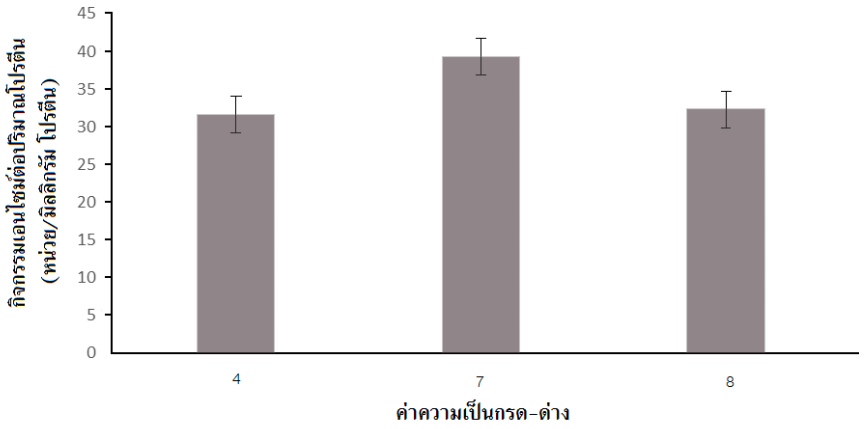


รูปที่ 3 ผลของระยะเวลาต่อการผลิตเอนไซม์เอสเทอร์เรส

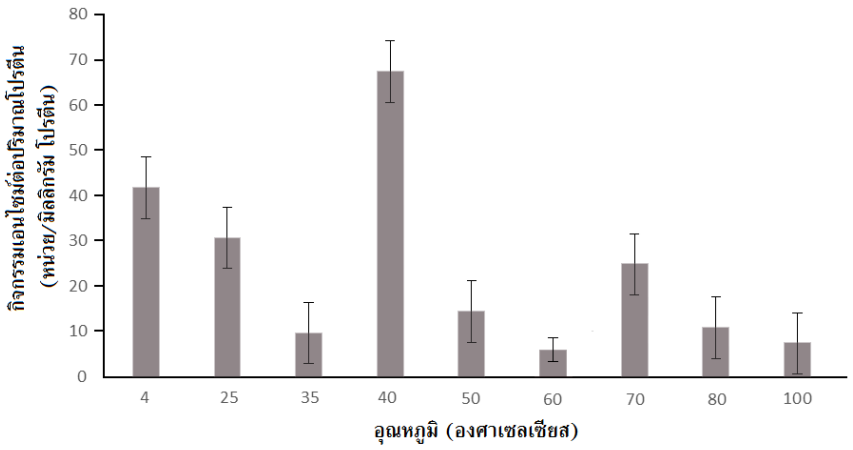
ผลของความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์เอสเทอร์เรส

จากการตรวจวัดความสามารถของเอนไซม์เอสเทอร์เรสจากเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท NS56-4-6 ในการย่อยสลายสับสเตรทให้เป็น p-nitrophenol ในสารละลายที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่แตกต่างกัน พบว่า เอนไซม์สามารถ

ทำงานได้ดีที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 ดังแสดงในรูปที่ 4 และเมื่อนำน้ำสารละลายตัวอย่างตั้งไว้ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน พบว่า เอนไซม์เอสเทอร์เรส สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นการทำงานของเอนไซม์ลดลง ดังแสดงในรูปที่ 5



รูปที่ 4 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างต่อการทำงานเอนไซม์เอสเทอร์เรส



รูปที่ 5 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานเอนไซม์เอสเทอร์เรส

อภิปรายผลการศึกษา

จากการศึกษาตัวอย่างเชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 10 ไอโซเลท ที่แยกได้จากดินตะกอนบริเวณป่าชายเลน โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวชนิดต่าง ๆ แล้วนำส่วนน้ำสารละลายตัวอย่างทำปฏิกิริยากับ4-Nitrophenyl butyrate ซึ่งใช้เป็นสับสเตรท จากนั้นวัดผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น คือ 4-nitrophenol ซึ่งมีสีเหลือง (Oeser et al., 2010) ผลการศึกษาพบว่า เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท NS56-4-6 ให้กิจกรรมเอนไซม์เอสเทอร์เรสที่ดีเมื่อเลี้ยงในอาหาร OYC ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากอาหาร OYC มีข้าวโอ๊ตเป็นองค์ประกอบที่มีวิตามินและแร่ธาตุซึ่งช่วยให้เอนไซม์เอสเทอร์เรสทำงานได้ดี สภาวะการเลี้ยงที่เหมาะสมมีค่าความเป็นกรด-ด่าง 7 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน เชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 จึงมีศักยภาพที่จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการย่อยสลายพลาสติกที่มีพันธะเอสเทอร์ได้ อย่างไรก็ตามการศึกษาสภาวะในการเลี้ยงที่สามารถให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ใกล้เคียงกันในแต่ละชุดการทดลองมีความสำคัญอย่างมาก เนื่องจากใน

งานวิจัยนี้ในแต่ละชุดของการเลี้ยงเชื้อกิจกรรมของเอนไซม์ที่ตรวจวัดได้มีความแตกต่างกัน ซึ่งผู้วิจัยจะได้ทำการวิจัยเพื่อพัฒนากระบวนการเลี้ยงเชื้อต่อไป รวมทั้งยังคงต้องมีการค้นหาเอนไซม์จากเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สามารถทำงานได้ที่อุณหภูมิสูง เนื่องจากในกระบวนการย่อยสลายพลาสติกมีปัจจัยที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณออกซิเจน อาหาร ตำแหน่งที่เอนไซม์ตัดพันธะ ผิวหน้าของพลาสติก และอุณหภูมิหลอมละลายของพลาสติก เป็นต้น (Tokiwa et al., 2009) ในงานวิจัยต่อไปจะได้ทดลองเลี้ยงเชื้อ แอคติโนมัยซีท NS56-4-6 ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งหรือแบบเหลวที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นพลาสติกชีวภาพและพันธะเอสเทอร์ในโมเลกุล แหล่งไนโตรเจนเป็นสารสกัดจากยีสต์ พลาสติกที่ใช้ทดลองมีทั้งในรูปแบบของเม็ดพลาสติก เช่น พอลิคาร์โปรแลคโตน (PCL) หรือแบบแผ่น เช่น พอลิเอทิลีน เทเรฟทาเลต (polyethylene terephthalate) (PET) ซึ่งมีรายงานการวิจัยที่มีการคัดแยกจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพจากการทับถมกันของกองขยะหรือปุ๋ยหมัก ด้วยวิธีการเกิดบริเวณใส (Clear zone) บนอาหารแข็งที่มีพอลิคาร์โปรแลคโตน, พอลิแลคไทด์ (PLA), พอลิบิวธิลีนซัคซิเนต (PBS) หรือพอลิบิวธิลีนซัคซิเนตโคอะพิเพท (PBSA) พบว่า เชื้อ *Saccharothrix* sp. สามารถทำให้เกิดบริเวณใสบนอาหารแข็งพลาสติกชีวภาพทั้ง 4 ชนิดได้ และมียีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยพลาสติกโดยพบลำดับเบสบางส่วนของเอนไซม์ไลเปส (ลักษมี ศุกระกาญจนะ, 2556) ข้อมูลที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีพลาสสติก จะทำให้สามารถเลือกชนิดของพลาสติก คุณสมบัติของเอนไซม์ และสภาวะที่ใช้ในการย่อยพลาสติกได้ นอกจากการตรวจสอบบริเวณใสที่เกิดจากความสามารถของเอนไซม์ในการย่อยพลาสติกแล้ว ยังมีการทดลองเพื่อประเมินการย่อยสลายพลาสติก โดยนำแผ่นพลาสติกใส่ในหลอดทดลองที่มีอาหารเหลวและเชื้อแบคทีเรีย ติดตามการย่อยพลาสติกโดยนำแผ่นพลาสติกไปตรวจผิวหน้าและผิวด้านรอยตัดด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ซึ่งวราภรณ์ได้ทดลองเทคนิคนี้ในการย่อยสลายพลาสติกชนิด PBS (วราภรณ์ และคณะ, 2556) อย่างไรก็ตามการที่จะอธิบายกลไกการทำงานของเอนไซม์ที่ย่อยพลาสติกหรือระบุชนิดของเอนไซม์ได้ว่าเป็นเอสเทอร์เรส ไลเปส หรือคิวติเนส จะต้องมีการตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์โดยการใช้สับสเตรตที่นักวิจัยได้ออกแบบมาเพื่อใช้ตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ เช่น การวัดกิจกรรมเอนไซม์เอสเทอร์เรสโดยใช้ 4-nitrophenyl butyrate เป็นสับสเตรต กิจกรรมเอนไซม์โปรตีเอสใช้ azocasein เป็นสับสเตรต และกิจกรรมอะมิเดสใช้ hexan amide เป็นสับสเตรต เป็นต้น (Heumann et al., 2006)

เอนไซม์เอสเทอร์เรสเป็นเอนไซม์ที่ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมกันอย่างแพร่หลาย โดยแหล่งผลิตเอนไซม์ดังกล่าวที่สำคัญคือจุลินทรีย์ ดังนั้นการค้นหาจุลินทรีย์กลุ่มแอคติโนมัยซีทที่สามารถผลิตเอนไซม์ที่ให้กิจกรรมสูงในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูง และกิจกรรมของเอนไซม์ที่วัดได้จากการเลี้ยงเชื้อในแต่ครั้งไม่แตกต่างกันมากนักยังคงมีความจำเป็นและน่าสนใจในการทำวิจัย

สรุปผลการศึกษา

จากการตรวจวัดกิจกรรมเอนไซม์เอสเทอร์จากแบคทีเรียแอคติโนมัยซีทจำนวน 10 ไอโซเลต พบว่า แอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากป่าชายเลนจังหวัดนครศรีธรรมราช NS56-4-6 สร้างเอนไซม์เอสเทอร์เรสที่ให้กิจกรรมสูง เมื่อเลี้ยงในอาหาร OYC ที่มีความเค็มน้ำทะเล 17 พีพีที ความเร็วรอบ 110 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน เอนไซม์สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และมีค่าความเป็นกรด-ด่าง 7

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยภายใต้แผนงานวิจัยเรื่อง จุลินทรีย์ทะเล: แหล่งใหม่ของสารตัวยาและผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ งบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2558 สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

เอกสารอ้างอิง

จามจุรี เกตุบัวขาว และคณะ. (2555). *การคัดแยกแอคติโนมัยซีทจากมูลสัตว์เพื่อใช้ในการย่อยสลายวัสดุทางการเกษตรเบื้องต้น*. ปทุมธานี : รายงานปัญหาพิเศษหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี.

จีรวรรณ แพงอ่อน. (2559). *การคัดกรองหาเอนไซม์เอสเทอร์เรสและการตรวจวัดน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ไกลโคซิเดสจากเชื้อแอคติโนมัยซีททะเลที่แยกจากตะกอนดินบริเวณป่าชายเลน.* ชลบุรี : โครงงานวิจัยสาขาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.

รัตนาภรณ์ ศรีวิบูลย์. (2549). *แอคติโนมัยซีท*. ชลบุรี : สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา. Success Advertising Design Partnership.

รัตนาภรณ์ ศรีวิบูลย์ และจันทร์จรัส วัฒนะโชติ. (2558). *การพัฒนาการผลิตสารออกฤทธิ์ชีวภาพจากแอคติโนมัยซีทและการผลิตเซลล์ปริมาณมาก.* ชลบุรี : สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา.

ลักษมี ศุกระกาญจนะ. (2556). *การคัดแยกและศึกษาคุณสมบัติเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ*. กรุงเทพฯ : ปริญญานิพนธ์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

วราภรณ์ จันทาสี และคณะ. (2556). *ประสิทธิภาพการย่อยสลายพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพของจุลินทรีย์.* กรุงเทพฯ : วิทยานิพนธ์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

Bradford, M. M. (1976). A dye binding assay for protein. *Analytical Biochemistry*. 72, 248-254.

Daboor, S. M., Haroon, A. M., Elfatah, N. A. and Hanona, S. I. (2014). Heavy metal adsorption of Streptomyces chromofuscus K101. *Journal of Coastal Life Medicine*. 2(6), 431-437.

Heumann, S., Eberl, A., Pobeheim, H., liebminger, Fischer-Colbrie, G., Almansa, E., et al. (2006). New model substrates for enzymes hydrolysing polyethyleneterephthalate and polyamide fibres. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods.* 39, 89-99.

Lopes, D. B., Fraga, L. P., Fleurt, L. F. and Macedo, G. A. (2011) Lipase and esterase to what extent can this classification be applied accurately. *Cienc. Tecnol. Aliment., Campinas*, 31(3), 608-613.

Oeser, T., Wei, R., Baumgarten, T., Billig, S., Follner, C., & Zimmermann, W. (2010). High level expression of a hydrophobic poly(ethylene terephthalate)-hydrolyzing carboxylesterase from *Thermobifida fusca* KW3 in *Escherichia coli* BL21(DE3). *Journal of Biotechnology*. 126, 100-104.

Pattanapipitpaisal, P. and Kamlandharn, R. (2012). Screening of chitinolytic actinomycetes for biological control of Sclerotium rolfsii stem rot disease of chilli. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 34(4), 387-393.

Schütze, E, Klose, M., Merten, D., Nietzsche, Senftleben, D., Roth, M. and Kothe, E. (2014). Growth of streptomycetes in soil and their impact on bioremeditation. *Journal of Hazardous Materials*. 267, 128-135.

Tokiwa, Y., Calabia, B. P., Ugwu, C. U. & Aiba, S. (2009). Biodegradability of plastics. *International Journal of Molecular Sciences.* 10, 3722-3742.