บทสรุปผู้บริหาร

ชุดโครงการวิจัย เรื่อง การศึกษาเอนไซม์ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพโดยแบคทีเรียชอบร้อน

โครงการวิจัยย่อยที่ 1

(ภาษาไทย) การทำให้บริสุทธิ์และการศึกษาลักษณะของเอนไซม์เอสเทอเรสจาก แบคทีเรียชอบร้อน *Actinomadura* sp. S14 ที่ย่อยสลายพอลิคาร์โปรแลคโตน

(ภาษาอังกฤษ) Purification and characterization of bacterial esterase from polycarpolactone (PCL)- degrading thermophilic *Actinomadura* sp. S14

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาการแสดงออกของเอนไซม์ esterase ที่ได้จากเชื้อ *Actinomadura* sp. S14
2. เพื่อศึกษาการทำบริสุทธิ์ของเอนไซม์ esterase
3. เพื่อศึกษาคุณสมบัติต่างๆ ของเอนไซม์ เช่น อุณหภูมิและpH ที่เหมาะสม, ความเสถียรของเอนไซม์ที่อุณหภูมิและ pH ต่างๆ, ความจำเพาะของสับสเตรทและสารที่มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

ที่มาของการวิจัย

พอลีคาร์โปรแลคโตน (PCL) เป็นพลาสติกชีวภาพที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นด้วยวิธีทางเคมีโดยอาศัยปฏิกิริยาพอลีเมอไรเซชัน (polymerization) ของ ε-caprolactone (6-hexanolide) มีจุดหลอมเหลวที่ 60 $^{\circ}$C (Mayer and Kaplan, 1994) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบราคาพลาสติกชีวภาพชนิดนี้กับชนิดอื่นๆ เช่น polyhydroxybutyrate (PHB) จะพบว่ามีราคาต่ำกว่า 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 ที่ผลิตจาก

แบคทีเรีย *Alcaligenes faecalis* จะเห็นได้ว่าจุลินทรีย์หลายชนิดไม่ว่าจะเป็น รา และ แบคทีเรียจะมียีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพ

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

จะเห็นได้ว่ากลุ่มเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพจะอยู่ในกลุ่มลิโพไลติกเอนไซม์ (lipolytic enzyme) ซึ่งเชื้อที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ได้แก่เชื้อ *Actinomadura* sp. S14 ที่แยกได้จากดินและพบว่าสามารถย่อยสลาย PCL ได้ นอกจากนี้ยังพบว่าเป็นเชื้อในกลุ่ม แอคติโนมัยสีทชอบร้อน (thermophilic actinomycete) โดยสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 60°C จากการทดลองก่อนหน้านี้พบว่าเชื้อมีการผลิตเอนไซม์ esterase จึงได้ต่อยอดในงานวิจัยที่จะทำการศึกษาการทำบริสุทธิ์และศึกษาลักษณะของเอนไซม์ชนิดนี้ว่าเกี่ยวข้องกับกระบวนการย่อยสลาย PCL หรือไม่ และยังพบว่าการรายงานของเอนไซม์ชนิดนี้ในเชื้อนี้ยังไม่มีรายงาน ดังนั้นในงานวิจัยจึงถือเป็นรายงานแรกในการศึกษาเอนไซม์ esterase จาก *Actinomadura* sp. S14

การดำเนินงานและผลงานที่ได้รับจากการวิจัย (โดยสังเขป) พร้อมภาพประกอบ

วิธีดำเนินงานวิจัย

1. สายพันธุ์แบคทีเรีย, พลาสมิด และสภาวะที่เลี้ยงเชื้อ

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

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

Tributyrin agar plate ใช้สำหรับคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียทนร้อนที่ย่อยสลาย tributyrin เพื่อคัดเลือกเอนไซม์ esterase

2. การแสดงออกของยีนและการทำบริสุทธิ์ของเอนไซม์ esterase

2.1 การสังเคราะห์และเพิ่มจำนวนชิ้น DNA ของยีน esterase โดยวิธี PCR

ทำการเพิ่มจำนวนชิ้น DNA ของยีน esterase โดยวิธี PCR ส่วนผสมของ PCR ทั้งหมด (PCR mixtures 25 μl) ประกอบด้วย 10 pmol ของแต่ละ primer Hydo-Bam 5'GGATCCAGCAGGTTCGCGCGCACGGT3' และ Hydo-Pst 5'CTGCAGCTATGCGG CGGTCTCGTCGA3' 0.25U ของ KOD-Plus DNA polymerase, 1x KOD-Plus DNA polymerase buffer, 2mM $MgCl_2$, 0.2 mM ของ dNTP and 1 μl 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

2.2 การแสดงออกของยีน esterase

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

2.3 การทำให้เอนไซม์ บริสุทธิ์

โดยมีวิธีการดังนี้ เลี้ยงเชื้อ *E. coli* Rosetta-gami (pQE80L-*est14*) ใน 5 ml LB $_{amp}$ medium เขย่าที่ 180 rpm ที่อุณหภูมิ 37°C ตลอดคืนเพื่อเตรียมเป็น stock culture จากนั้นนำ stock culture 1 ml ถ่ายใส่ 100 ml ของอาหาร LB $_{amp}$ mediumใหม่ที่อยู่ใน flask ขนาด 500 ml นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ 180 rpm ที่ 37°C และวัดค่าOD_{600} 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 NaH_2PO_4, 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

3. การวัดการทำงานของเอนไซม์ esterase

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

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

4. การศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆของเอนไซม์ 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) ทำได้โดยใช้สับสเตรทที่มีสายคาร์บอนต่างๆกัน 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

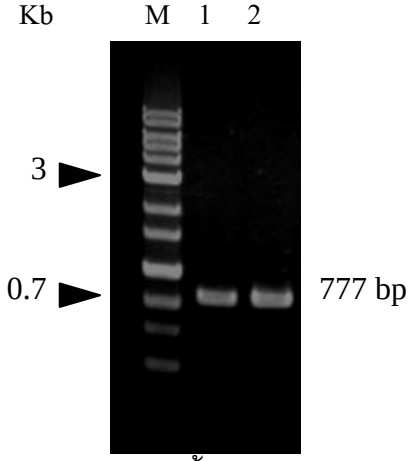
การหาความคงทนต่ออุณหภูมิในการทำงานของเอนไซม์ (thermostability) นำเอนไซม์ บ่มที่อุณหภูมิในช่วง 30-90°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำให้เย็นทันที และนำเอนไซม์ไปวิเคราะห์กิจกรรมโดยวิธีข้างต้น การหาความคงทนของเอนไซม์ต่อค่าพีเอช (pH stability) นำเอนไซม์ไปบ่มที่ พีเอชต่างๆ เป็นเวลา 12 ชั่วโมงที่ 4°C จากนั้นนำเอนไซม์ที่ได้มาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

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

ผลการทดลอง

1. การโคลนนิ่ง การแสดงออกของเอนไซม์ esterase (EstS14)

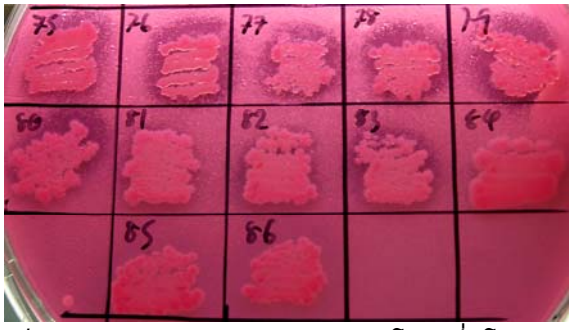
การโคลนนิ่งยีน esterase (*estS14*) เริ่มจากการสกัด chromosomal DNA ของ *Actinomadura* sp. strain S14 สำหรับใช้เป็น DNA template สำหรับการทำ PCR ของยีน esterase ผลการทดลองพบว่า PCR product ที่ได้มีขนาดประมาณ 777 bp ดังแสดงในภาพที่ 1



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 ผล

การทดลองพบว่า โคลนที่มีการทำงานของเอนไซม์ EstS14 จะให้ clear zone รอบๆ โคโลนีบน LB $_{amp\text{-}tributyrin}$ agar plate ดังแสดงในภาพที่ 2

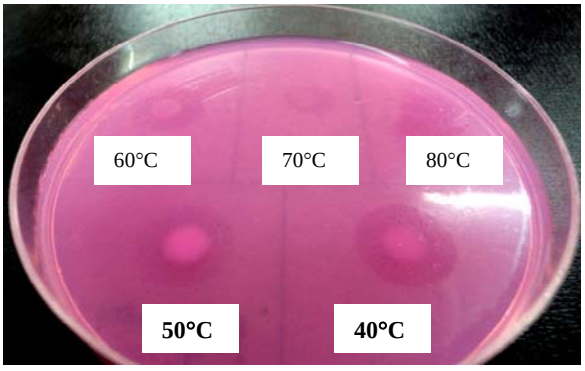


ภาพที่ 2 โคลนรีคอมบิแนนท์ (recombinant) ของ esterase โดยเขี่ยโคลนบน LB $_{amp\text{-}tributyrin}$ agar ซึ่งบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 1-2 วัน

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

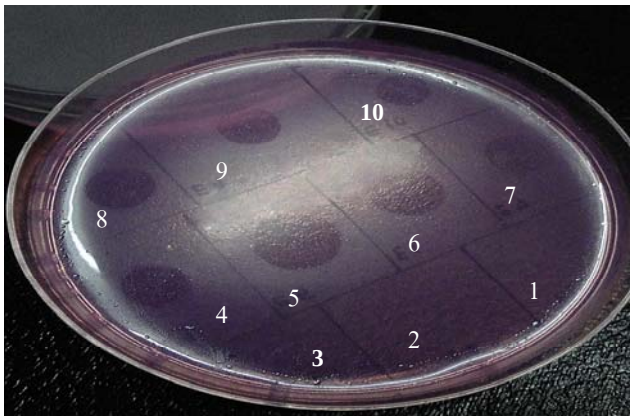
2. การทำเอนไซม์ EstS14 ให้บริสุทธิ์โดยวิธี heat treatment และวิธี Ni^{+} column

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

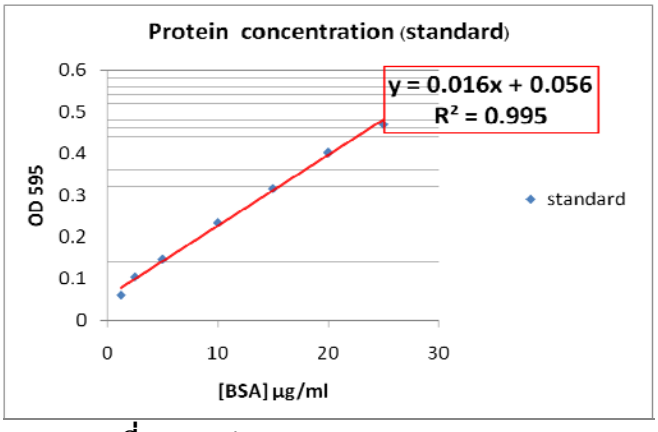
ในการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ในขั้นที่ 2 โดยเลือก supernatant ที่ผ่านการ treat ด้วยความร้อนที่ 60 °C เป็นเวลา 10 นาทีมาทำให้บริสุทธิ์ต่ออีกครั้งด้วยการ load ลงใน Ni^{+} column เมื่อเก็บ elution buffer fraction ตั้งแต่ fraction number 1-10 พบว่า ตั้งแต่ no. 4 – no. 10 พบการทำงานของเอนไซม์ esterase โดยสังเกตได้จากการเกิด 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



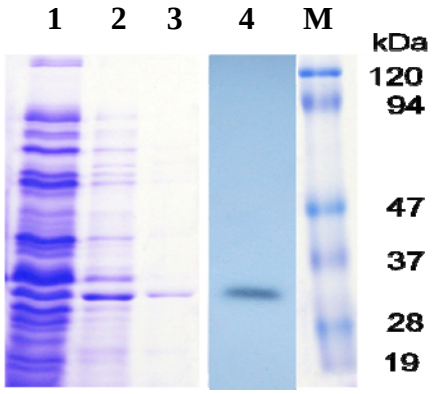
ภาพที่ 5 กราฟแสดง protein standard curve

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

ตารางที่ 1 แสดงผลการทำเอนไซม์ EstS14ให้บริสุทธิ์

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

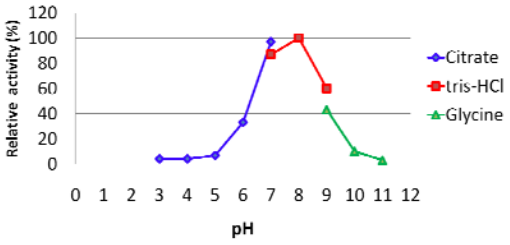
การตรวจสอบถึงความบริสุทธิ์และขนาดของเอนไซม์ด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่าเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มีขนาดประมาณ 30 KDa เมื่อเปรียบเทียบกับ protein marker ดังแสดงในภาพที่ 6 นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์ยังมีการทำงานของ ersterase เนื่องจากตรวจสอบโดยการทำ zymogram ซึ่งมีการเกิดเป็น band ขึ้นบนแผ่น gel SDS-PAGE



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.

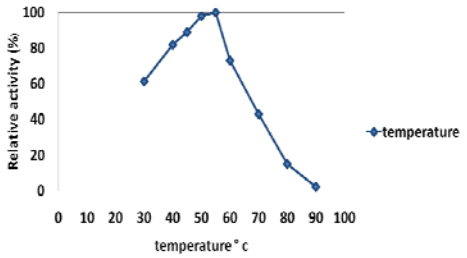
4. การศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆของเอนไซม์ EstS14

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



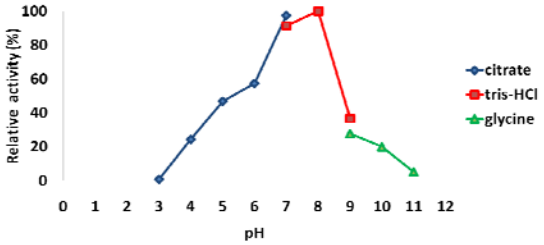
ภาพที่ 7 Optimal pH ของเอนไซม์ EstS14

การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมของเอนไซม์ พบว่า EstS14 ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 55°C ดังแสดงในภาพที่ 8



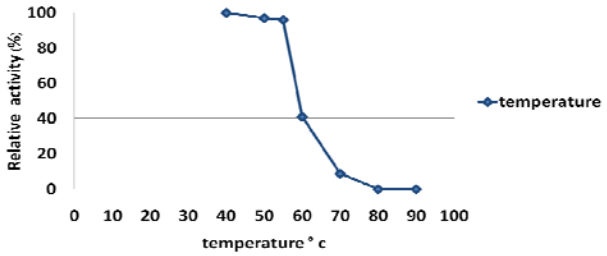
ภาพที่ 8 Optimal temperature ของเอนไซม์ EstS14

การศึกษาความคงทนของค่าความเป็นกรด-เบส โดยบ่มเอนไซม์กับ buffer ที่มีค่า pH ต่างๆ ที่อุณหภูมิ 55°C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาวัดการทำงานของเอนไซม์ ผลการทดลองพบว่าเอนไซม์ทำงานได้ดีที่ช่วง pH 7-8 ดังแสดงในภาพที่ 9



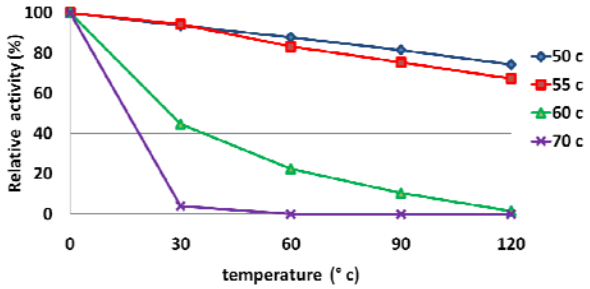
ภาพที่ 9 pH stability ของเอนไซม์ EstS14

การศึกษาความคงทนของเอนไซม์เมื่อบ่มไว้ที่อุณหภูมิต่างๆกัน โดยบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 40°C-90°C เป็นเวลา 30 นาที และนำมาวัดการทำงานของเอนไซม์ ผลการทดลองพบว่าเอนไซม์ทำงานได้ตั้งแต่อุณหภูมิ 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) โดยใช้สับสเตรทที่มีสายคาร์บอนต่างๆกัน พบว่า เอนไซม์ทำงานได้ดีต่อสับสเตรท pNp-butyrate (C4) ดังแสดงค่าในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงค่า substrate specificity โดยเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์ของค่า relative activity

Substrates	Relative activity (%)
pNp-acylesters	
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 แสดงผลของสารละลายโละ (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

การนำผลงานวิจัยไปประยุกต์ใช้

1. ได้เอนไซม์ esterase ที่บริสุทธิ์ที่อาจนำไปใช้ได้ในอนาคต
2. ทราบคุณสมบัติต่างๆของเอนไซม์ esterase ซึ่งเอนไซม์อาจเป็น thermostable esterase
3. ต้นฉบับการตีพิมพ์เพื่อนำเสนอในงานประชุมวิชาการ

ผลงานวิจัย/ผลผลิต สิ่งประดิษฐ์ นวัตกรรม หรืออื่น ๆ ที่ได้จากการทำวิจัย
และมี Impact ต่อสังคม, ประเทศชาติได้รับประโยชน์อะไร

ได้ข้อมูลยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์ esterase จากเชื้อ *Actinomadura* sp. S14 ซึ่งข้อมูลทั้งหมดที่ได้นี้เป็นการรายงานครั้งแรกสำหรับการหายีน esterase ในเชื้อ *Actinomadura* ที่แยกได้จากดินในประเทศไทย

ปัญหาและอุปสรรคที่เกิดขึ้นจากการทำวิจัย

-

ความคิดเห็นและข้อเสนอแนะ

โครงการวิจัยนี้ได้ผ่านการพิจารณาเห็นชอบจากสำนักงานคณะกรรมการข้าราชการพลเรือน (ก.พ.) ภายใต้ทุนสร้างสรรค์นวัตกรรมภาครัฐ งบประมาณปี 2550

งานวิจัยที่คาดว่าจะดำเนินการต่อไป

ศึกษายีนที่ควบคุมการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ

คณะผู้ทำวิจัย

1. ชื่อสกุล นางสาว พิชาภัค สมยูรทรัพย์ **หัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน**
สังกัด คณะวิทยาศาสตร์ ภาควิชาชีววิทยา
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ที่ตั้ง 114 สุขุมวิท 23
โทรศัพท์ที่ทำงาน 02-664-5000 ต่อ 8507 โทรสาร 02-260-0127
อีเมลล์ peechapack@swu.ac.th

2. ชื่อสกุล นาง สมใจ ศิริโภค
สังกัด สำนักนวัตกรรมการเรียนรู้
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ที่ตั้ง 114 สุขุมวิท 23
โทรศัพท์ที่ทำงาน 02-664-5000 ต่อ 5452 โทรสาร 02-240-2709
อีเมลล์ somjaisi@swu.ac.th

ทุนสนับสนุน

ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินงบประมาณ เงินรายได้คณะวิทยาศาสตร์
ประจำปีงบประมาณ 2554
เริ่มงานวิจัย ปี มีนาคม 2554
สิ้นสุดงานวิจัย ปี กุมภาพันธ์ 2555