บทความวิจัย

การแยกและการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียชอบร้อนที่ย่อยสลายพอลิคาร์โปรแลคโตน

พิชาภัค สมยูรทรัพย์[1*] ทายาท ศรียาภัย[2] สมใจ ศิริโภค[3] และ โกสุม จันทร์ศิริ[4]

บทคัดย่อ

สายพันธุ์แบคทีเรียชอบร้อนที่ย่อยสลายพอลิคาร์โปรแลคโตน (PCL) ถูกแยกจากกองขยะคอมโพสต์ในประเทศไทย และคัดเลือกเชื้อที่ย่อยสลายโดยการเกิดวงใสบนอาหารแข็ง PCL จากการศึกษาแผนภูมิวิวัฒนาการโดยใช้ลำดับเบสของยีน 16S rDNA พบว่า สายพันธุ์แบคทีเรียที่ย่อยสลาย PCL ถูกจัดจำแนกอยู่ในแฟมิลี Bacillaceae, Paenibacillaceae และ Actinomycete สายพันธุ์ S14 ถูกคัดเลือกเป็นสายพันธุ์ที่ดีสำหรับการย่อยสลาย PCL จากการศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์และจีโนไทป์พบว่าสายพันธุ์ S14 มีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Actinomadura keratinilytica* การศึกษาสีของเส้นใยพบว่าไม่มีสีเมื่อเลี้ยงบนอาหาร yeast malt extract agar (ISP2) และมีสีครีมเมื่อเลี้ยงบนอาหาร oat meal agar (ISP3), inorganic salt-starch agar (ISP4) และ glycerol-asparagine agar (ISP5) สายพันธุ์นี้เจริญได้ดีที่อุณหภูมิตั้งแต่ 40-60 องศาเซลเซียส และที่ความเข้มข้นของเกลือ 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ผนังเซลล์ของสายพันธุ์ S14 ประกอบด้วย *meso*-diaminopimelic acid น้ำตาลที่ถูกใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้แก่ กลูโคส อะราบิโนส ไซโลส อินโนซิทอล ฟรุกโตส แรมโนส และแมนนิทอล สำหรับซูโครส ราฟฟิโนส และซอร์บิทอล ไม่สามารถถูกนำไปใช้ได้ สายพันธุ์ S14 สร้างเอนไซม์ที่ย่อยสลาย PCL ได้สูงสุดที่ 6.25 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ค่าความเป็นกรดด่างและอุณหภูมิที่ใช้ในการทำงานของเอนไซม์อยู่ที่ 8 และ 55 องศาเซลเซียสตามลำดับ

คำสำคัญ: แอคติโนมัยสีทชอบร้อน *Actinomadura* sp. พอลิคาร์โปรแลคโตน การย่อยสลายทางชีวภาพ พอลิเอสเทอร์

[1] ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

[2] คณะวัฒนธรรมสิ่งแวดล้อมและการท่องเที่ยวเชิงนิเวศ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

[3] สำนักนวัตกรรมการเรียนรู้ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

[4] ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

[*] ผู้นิพนธ์ประสานงาน, e-mail: peechapack@swu.ac.th

Isolation and Selection of a Thermophilic Polycaprolactone Degrading Actinomycete, *Actinomadura* sp. Strain S14

Peechapack Somyoonsap[1*], Thayat Sriyapai[2], Somjai Siripoke[3] and Kosum Chansiri[4]

ABSTRACT

Thermophilic polycaprolactone (PCL)-degrading bacterial strains were isolated from compost of the rubbish in Thailand and screened for degradation by the clear-zone formation on PCL agar plate. According to phylogenetic tree of 16S rDNA sequence, these strains were classified to family Bacillaceae, Paenibacillaceae and Actinomycete. Strain S14 was selected as the best strain for PCL degrading. From its phenotypic and genotypic characterization, strain S14 was closely related to *Actinomadura keratinilytica.* The color of the aerial mycelium was colorless on yeast malt extract agar (ISP2) and cream on oat meal agar (ISP3), inorganic salt-starch agar (ISP4) and glycerol-asparagine agar (ISP5). This strain grew well at between 40-60°C and 2% (w/v) NaCl. The cell wall of strain S14 contained meso-diaminopimelic acid. Glucose, arabinose, xylose, inositol, fructose, rhamnose and mannitol could be utilized for carbon source, but sucrose, raffinose and sorbitol were not utilized. A PCL-degrading enzyme produced by this strain had high specific activity of 6.25 U/mg. The optimum pH and temperature for enzyme activity were 8 and 55°C, respectively.

Keywords: thermophilic actinomycete, *Actinomadura* sp., polycaprolactone, biodegradation, polyester

[1]Department of Biology, Faculty of Science, Srinakharinwirot University

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

[3]Innovative Learning Center, Srinakharinwirot University

[4]Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University

[*]Corresponding author, e-mail: peechapack@swu.ac.th

บทนำ

พลาสติกเข้ามามีบทบาทสำคัญอยู่ในชีวิตประจำวันของมนุษย์ โดยส่วนใหญ่ผลิตมาจากกระบวนการกลั่นน้ำมันปิโตรเลียม พลาสติกมีโครงสร้างทางเคมีที่ซับซ้อน และจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายได้จึงทำให้เกิดการตกค้างในสิ่งแวดล้อม และถ้ากำจัดโดยการเผาจะก่อให้เกิดก๊าซพิษในบรรยากาศและทำให้เกิดภาวะโลกร้อนจากการปล่อยก๊าซเรือนกระจก (greenhouse gases) ได้แก่ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์สู่สิ่งแวดล้อม [1, 2] ดังนั้นตั้งแต่ปี ค.ศ. 1980 นักวิทยาศาสตร์ได้ริเริ่มศึกษาและวิจัยเพื่อผลิตพลาสติกชนิดที่ย่อยสลายได้ (biodegradable plastic) ซึ่งผลิตจากวัสดุทางธรรมชาติ เช่น อ้อย ข้าวโพด มันสำปะหลัง แป้ง โปรตีนจากถั่ว เป็นต้น [2] มาใช้ เพื่อทดแทนพลาสติกที่ย่อยสลายได้ยาก

พอลิคาร์โปรแลคโตน (PCL) เป็นพลาสติกชีวภาพประเภทอะลิฟาติกพอลิเอสเทอร์ (aliphatic polyester) สังเคราะห์ได้จากกระบวนการ polymerization ของ ε-caprolactone (6-hexanolide) มีจุดหลอมเหลวที่ 60 องศาเซลเซียส ปัจจุบัน PCL นำมาผลิตเป็นพลาสติกชีวภาพเพราะราคาไม่แพง แต่เนื่องจากมีข้อจำกัดในการนำมาขึ้นรูป ดังนั้นจึงมีการพัฒนาโดยนำ PCL มาผสมพอลิเมอร์ประเภทที่มีส่วนผสมของแป้ง เช่น แป้งเทอร์โมพลาสติก (thermoplastic starch หรือ TPS) เพื่อผลิตเป็นวัสดุต่างๆ เช่น ถุงใส่ขยะ ซึ่งใช้กันอย่างแพร่หลายในแถบยุโรป [3] และสามารถย่อยสลายได้ [4]

กระบวนการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ (biodegradation) ที่มีองค์ประกอบเป็นพอลิเอสเทอร์ (polyester) เกิดขึ้นโดยอาศัยกิจกรรมของเอนไซม์จากจุลินทรีย์ในดิน เอนไซม์ที่มีบทบาทในกระบวนการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพมี 3 ชนิด ได้แก่ lipase เป็นเอนไซม์ที่เร่งการเกิดปฏิกิริยา hydrolysis ของพันธะเอสเทอร์ของไขมัน เพื่อเปลี่ยนให้เป็นแอลกอฮอล์และกรดไขมันที่เป็นโซ่คาร์บอนที่ยาวกว่า 10 อะตอม ประเภทที่ 2 คือ เอนไซม์ esterase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เร่งการเกิดปฏิกิริยา hydrolysis โดยการตัดพันธะเอสเทอร์ของไขมันที่เป็นโซ่คาร์บอนที่มีความยาวสั้นกว่า 10 อะตอม และประเภทสุดท้าย คือ เอนไซม์ depolymerase เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาเคมีโดยการตัดสายพอลิเมอร์เพื่อเปลี่ยนให้เป็นโมเลกุลเดี่ยว [5] มีรายงานพบว่าจุลินทรีย์ในดินที่ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพส่วนใหญ่เจริญที่อุณหภูมิมากกว่า 50 องศาเซลเซียส หรือเรียกว่าจุลินทรีย์ชอบร้อน (thermophilic microorganisms) ตัวอย่างในเชื้อรา ได้แก่ *Fusarium moniliforme, Penicillium* sp. และ *Aspergillus* sp. เป็นต้น [6-8] ในแบคทีเรีย ได้แก่ *Bacillus brevis, B. stearothermophilus, Geobacillus thermocatenulatus, Alcaligenes faecalis* เป็นต้น [9-12] ในปี ค.ศ. 1996 Murphy และคณะ [13] พบเชื้อราที่มีลักษณะเป็นพวก phytopathogens มีความสามารถในการย่อยสลาย PCL ซึ่งจะปล่อยเอนไซม์ cutinase (serine hydrolase) ที่ย่อย cutin ออกมา โดยได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบใน wild-type strain และ cutinase-negative gene replacement mutant strain ของ *Fusarium solani* f. sp. *pisi* พบว่า wild-type strain ของ *Fusarium moniliforme* มีเอนไซม์ *Fusarium* cutinase คือ PCL depolymerase ที่ย่อยสลายพวกพอลิเอสเทอร์ที่ไม่ละลายน้ำ (insoluble polyester) แล้วเปลี่ยนเป็นผลผลิตที่ละลายได้ในน้ำ ซึ่งนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานของจุลินทรีย์ ในปี ค.ศ. 1998 Tansengco และ Tokiwa [14] รายงานร้อยละของจุลินทรีย์ในดินที่สามารถย่อยสลาย PCL คิดเป็น 3-49 เปอร์เซ็นต์ (0.4-3.5 x 10^4 CFU/น้ำหนักดิน 1 กรัม) ของประชากรจุลินทรีย์ทั้งหมดที่เจริญบนอาหารแข็ง PCL ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ในปี ค.ศ. 2000

Sanchez และคณะ (2000) [15] ศึกษาการย่อยสลายแผ่นฟิล์มของ PCL, PHB และ PBSA ด้วย *Aspergillus* sp. strain ST-01 ซึ่งทนความร้อนที่ 50 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อราสามารถย่อยตัวอย่างฟิล์มได้มากถึง 90% ในปี ค.ศ. 2002 Gouda และคณะ [16] ศึกษาการสกัดเอนไซม์ไฮโดรเลสที่ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพจากเชื้อ *Thermomonospora fusca* ที่แยกจากคอมโพสต์ (compost) แสดงว่าคอมโพสต์เป็นแหล่งอาศัยของจุลินทรีย์ที่สำคัญ ดังนั้นเทคโนโลยีคอมโพสต์ (composting) จึงเป็นเทคโนโลยีหนึ่งที่นำมาใช้ในการบำบัดและการย่อยสลายทางชีวภาพ [17] ในปี ค.ศ. 2003 Teeraphatpornchai และคณะ [18] แยกเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ TB-13 ที่ย่อยสลายพอลิเอสเทอร์ที่ใช้ผลิตพลาสติกชีวภาพ เช่น polylactic acid (PLA), polybutylene succinate (PBS), polybutylene succinate-co-adipate (PBSA), polycaprolactone (PCL) และ polyethylenesuccinate (PES) และรายงานเป็นสายพันธุ์ *Paenibacillus amylolyticus* สำหรับแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยสีทชอบร้อน (thermophilic actinomycete) ที่มีรายงานว่าสามารถย่อยสลายพอลิเอสเทอร์ ได้แก่ Kleeberg และคณะ (1998) [19] แยกเชื้อ *Thermobifida fusca* จากคอมโพสต์ที่สามารถย่อยสลาย BTA-copolyester (copolyesters จาก 1,4-butanediol, terephthalic acid และ adipic acid) Tseng และคณะ (2009) [20] แยกเชื้อ *Actinomadura miaoliensis* strain BC 44T-5T ได้จากดินในประเทศไต้หวัน โดยสามารถย่อยสลาย poly(D-3-hydroxybutyrate (PHB) และ Sukkhum และคณะ [21] แยกเชื้อ *A. keratinilytica* strain T16-1 ได้จากดินในป่าของประเทศไทยที่สามารถย่อยสลาย PLA เป็นต้น

ถึงแม้ว่าจะมีรายงานการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพของแบคทีเรียชอบร้อนมาก่อนหน้านี้ แต่ปัจจุบันพบว่ายังไม่มีรายงานถึงแบคทีเรียชอบร้อนที่สามารถย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ PCL รวมถึงกิจกรรมของเอนไซม์ทนร้อนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการย่อยสลาย PCL ในประเทศไทย ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเป็นงานวิจัยแรกที่ทำการแยกเชื้อและจัดจำแนกแบคทีเรียชอบร้อนที่ย่อยสลาย PCL จากตัวอย่างดินจากกองขยะในประเทศไทย นอกจากนี้ยังได้คัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ดีที่สุด เพื่อศึกษาสัณฐานวิทยาและศึกษาการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกลไกการย่อยสลาย PCL

วิธีดำเนินการวิจัย

การเก็บตัวอย่างดินบริเวณต่างๆ ของประเทศไทย

ตัวอย่างดินเก็บได้จากบริเวณต่างๆ ของประเทศไทย โดยเก็บตั้งแต่เดือนตุลาคม 2551 ถึงมิถุนายน 2552 จากบริเวณทั้งหมด 7 จังหวัด คือ กรุงเทพมหานคร (2 ตัวอย่าง) อยุธยา (2 ตัวอย่าง) ปทุมธานี (3 ตัวอย่าง) สิงห์บุรี (1 ตัวอย่าง) นครปฐม (1 ตัวอย่าง) พิจิตร (3 ตัวอย่าง) และนครศรีธรรมราช (1 ตัวอย่าง) รวมทั้งสิ้น 13 ตัวอย่าง ซึ่งแต่ละตัวอย่างเก็บมาจากดินที่ความลึกลงไปประมาณ 5 เซนติเมตร จากบริเวณกองขยะที่มีการทับถมกัน ตัวอย่างดินทั้งหมดถูกเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส จนกระทั่งนำมาทดลองขั้นต่อไป

การคัดแยกแบคทีเรียที่ย่อยสลาย PCL

PCL เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับแบคทีเรียที่ใช้ในการเตรียมเป็นอาหารแข็งในการทดสอบการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพด้วยวิธีการเกิดวงใส (clear zone technique) โดยการประยุกต์ใช้วิธีการของ

Nishida และ Tokiwa (1993) [22] ซึ่งมีวิธีการเตรียมโดยชั่ง PCL 1 กรัม ละลายใน methylene chloride 20 มิลลิลิตร นำมาผสมรวมกับ 1 ลิตร basal medium โดยอาศัยเครื่องอัลตราโซนิคเคเตอร์ (ultrasonicator) โดย basal medium 1 ลิตร ประกอบด้วย yeast extract 200 มิลลิกรัม $(NH_4)_2SO_4$ 1 กรัม $MgSO_4.7H_2O$ 200 มิลลิกรัม NaCl 100 มิลลิกรัม $CaCl_2.2H_2O$ 20 มิลลิกรัม $FeSO_4.7H_2O$ 10 มิลลิกรัม $Na_2MoO_4.2H_2O$ 0.5 มิลลิกรัม $Na_2WO_42H_2O$ 0.5 มิลลิกรัม $MnSO_4$ 0.5 มิลลิกรัม K_2HPO_4 1.6 กรัม และ KH_2PO_4 200 มิลลิกรัม โดยปรับ pH ให้ได้ประมาณ 7.4 นำอาหารที่เตรียมบ่มไว้ที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้ methylene chloride ระเหย เติมวุ้น 20 กรัม และนำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เทใส่จานเพาะเชื้อ การเตรียมตัวอย่างดิน โดยนำตัวอย่างดินมาเจือจางจนถึง 10^4 เท่าด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ ดูดตัวอย่างดินที่ได้ทำการเจือจางแล้วมา 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารแข็งที่เตรียม และเกลี่ยบนผิวหน้าอาหาร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน โดยตรวจดูผลทุกวัน แบคทีเรียที่ย่อยสลาย PCL ได้นั้นจะสังเกตเห็นวงใสบนจานเพาะเชื้อ จากนั้นแยกเชื้อออกมาและทำการ streak เชื้อ จนได้เชื้อที่บริสุทธิ์

การจัดจำแนกแบคทีเรียด้วยยีน 16S rDNA

จีโนมิกดีเอ็นเอ (genomic DNA) ของเชื้อแต่ละไอโซเลท (isolate) ถูกสกัดโดยใช้วิธีการของ Kieser และคณะ (2000) [23] เพื่อนำมาเป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (template DNA) ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) ซึ่งออกแบบไพรเมอร์โดยใช้ส่วนของยีน 16S rDNA ที่ประยุกต์จากวิธีของ Lane (1991) [24] ได้แก่ 16sE8-F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) และ 16sE1509-R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT) ขั้นตอนการทำ PCR เริ่มจากผสม PCR reaction mixture ประกอบด้วย จีโนมิกดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้นประมาณ 50-100 นาโนกรัม 1X PCR buffer, 0.1 ไมโครโมลาร์ ของ 16sE8-F และ 16sE1509-R, 0.2 มิลลิโมลาร์ dNTP 1.5 มิลลิโมลาร์ $MgCl_2$ และ 0.03 ยูนิตของ *Taq* DNA polymerase สำหรับสภาวะในการทำ PCR เริ่มจากการทำให้สาย DNA แยกออกจากกันที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 5 นาที ในขั้นตอนของการเพิ่มจำนวน DNA (amplification) ตั้งโปรแกรมให้ดำเนินการ 30 รอบ (cycles) ซึ่งประกอบด้วย 3 ขั้นตอนดังนี้ คือ ขั้นตอน denaturing ใช้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ขั้นตอน annealing ใช้อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และขั้นตอน extension ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที เมื่อเครื่องดำเนินการครบ 30 รอบ เข้าสู่ขั้นตอน extension อีกครั้งที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที และทำให้เย็นลงที่ 4 องศาเซลเซียส PCR product ที่ได้ถูกนำมาทำให้บริสุทธ์โดยอาศัย NucleoSpin®Extract II Kit ตรวจสอบขนาดของ PCR product ที่มีขนาดประมาณ 1,500 เบส โดยการทำ electrophoresis การจัดจำแนกไอโซเลททำได้โดยนำ PCR product ที่ได้หาลำดับเบส โดยอาศัยการทำ ABI PRISM BigDye™ วิเคราะห์ลำดับเบสของแต่ละไอโซเลทโดยอาศัยโปรแกรม BLAST การทำ multiple aligment ของลำดับเบสใช้โปรแกรม Clustal X และการสร้าง phylogenetic tree อาศัยโปรแกรม MEGA 3 [25] ด้วยวิธี neighbor-joining ที่ค่า bootstrap 1,000 ครั้ง

ลักษณะสมบัติของแบคทีเรีย

การศึกษาสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียอาศัยวิธี Gram staining สำหรับเชื้อในกลุ่มแอคติโนมัยสีททำการศึกษาการเจริญเติบโตและลักษณะทางชีวเคมีดังนี้ ศึกษาลักษณะของเส้นใย การสร้างเม็ดสี (pigment) และสีโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อต่างชนิดกัน ได้แก่ yeast-malt extract agar (ISP 2), oatmeal agar (ISP 3), inorganic salt-starch agar (ISP 4) และ glycerol-asparagine agar (ISP 5) โดยประยุกต์ตามวิธี Shirling และ Gottlieb (1966) [26] การศึกษาความสามารถในการย่อยสลายสับสเตรทชนิดต่างๆ ได้แก่ PCL, cellulose และ tributyrin การศึกษาการเจริญที่ความเข้มข้นของ NaCl ต่างๆ กัน ตั้งแต่ 0-10% การศึกษาแหล่งน้ำตาลคาร์บอน (1% w/v) ที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อโดยใช้อาหาร carbon utilization medium (ISP 9) ซึ่งประยุกต์ตามวิธี Nonomura (1974) [27] และการศึกษาไอโซเมอร์ของ diaminopimelic acid (DAP) ในผนังเซลล์ โดยประยุกต์วิธี Staneck และ Robert (1994) [28]

การทำงานของเอนไซม์ที่ย่อยสลาย PCL

เพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร PCL basal medium จำนวน 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 200 rpm ทำการเก็บตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อมาทดสอบการทำงานของเอนไซม์ที่เวลาต่างๆ กันเป็นเวลา 7 วัน การวัดการทำงานของเอนไซม์ที่ย่อยสลาย PCL (PCL- degrading enzyme) ดูได้จากความขุ่นที่ลดลงของสารละลาย PCL โดยประยุกต์วิธีของ Oda และคณะ (2001) [29] ซึ่งประกอบด้วย สับสเตรท (PCL-Tris-HCl, pH 7.0-9.0) 2.25 มิลลิลิตร สารละลายเอนไซม์ 0.25 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที กำหนดให้ 1 ยูนิต (U) ของเอนไซม์ที่ย่อยสลาย PCL หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ที่ย่อย PCL ทำให้ค่า Optical Density (OD) ที่ 630 นาโนเมตร ลดลง 0.1 ในเวลา 30 นาที ภายใต้สภาวะที่ทำการทดสอบ

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

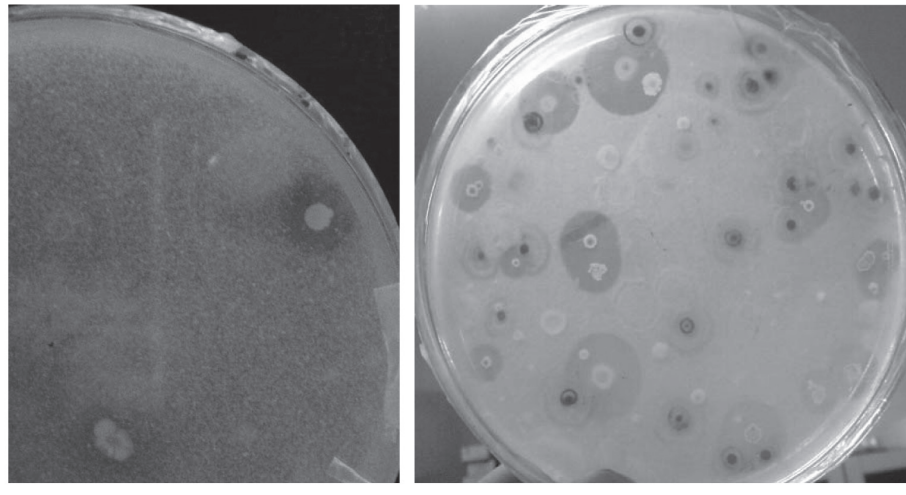
ตรวจวัดปริมาณโปรตีนในตัวอย่างเอนไซม์โดยวิธีของ Bradford (1976) [30] และใช้สารละลาย bovine serum albumin (Sigma-Aldrich Inc., Germany) เป็นสารมาตรฐาน

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

การคัดเลือกแบคทีเรียที่ย่อยสลาย PCL

จากตัวอย่างดินทั้งหมด 13 ตัวอย่าง พบว่าแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่ย่อยสลาย PCL ได้ทั้งหมด 40 ไอโซเลท โดยมีเพียง 8 ไอโซเลทที่สามารถเจริญเติบโตและย่อยสลาย PCL ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 20 ของแบคทีเรียทั้งหมดที่ย่อยสลาย PCL ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Tansengco และ Tokiwa (1998) [14] จากนั้นนำเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 8 ไอโซเลท มาทดสอบเพื่อเปรียบเทียบการเกิดวงใสที่อุณหภูมิ 37, 45 และ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน พบว่าเชื้อแต่ละไอโซเลทมีการเจริญและให้วงใสบนอาหารแข็ง PCL แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 1 สายพันธุ์ S21 และ S23 มีการเจริญอย่างรวดเร็ว และให้ขนาดวงใส 6 มิลลิเมตร สำหรับสายพันธุ์ S14 มีการเจริญ

ช้ากว่าไอโซเลทอื่นๆ แต่ให้ขนาดโซนใสประมาณ 8 มิลลิเมตร จากการศึกษาการย่อยสลาย PCL ด้วยเทคนิคการเกิดวงใสพบว่าเป็นวิธีที่ดีและง่ายต่อการศึกษาการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ [22] เนื่องจากอาหารแข็ง PCL มีลักษณะเป็นสีขาวขุ่น เมื่อเกิดวงใสรอบๆ โคโลนี ทำให้เห็นวงใสชัดเจน เป็นผลมาจาก PCL อิมัลซิฟายด์เข้าไปรวมอยู่ในชั้นวุ้น เมื่อแบคทีเรียปล่อยเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายออกมาภายนอกเซลล์ เอนไซม์แพร่เข้าไปยังวุ้นเพื่อย่อยสลาย PCL ทำให้ได้ผลผลิต เช่น ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ [2] นอกจากนี้ยังพบว่าโครงสร้างของ PCL ไม่ซับซ้อน จุลินทรีย์จึงสามารถย่อยสลายได้ง่ายเมื่อเปรียบเทียบกับพลาสติกชีวภาพชนิดอื่นๆ [31] ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Tseng และคณะ (2007) [32] ที่แยกเชื้อแบคทีเรีย 31 ไอโซเลทที่ย่อยสลาย PHB, PCL และ PES โดยจัดจำแนกอยู่ในจีนัส *Actinomadura, Microbispora, Streptomyces, Thermoactinomyces* และ *Saccharomonospora*



รูปที่ 1 การเกิดโคโลนีและวงใสบนอาหารแข็ง PCL บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน

การแยกและจัดจำแนกแบคทีเรีย

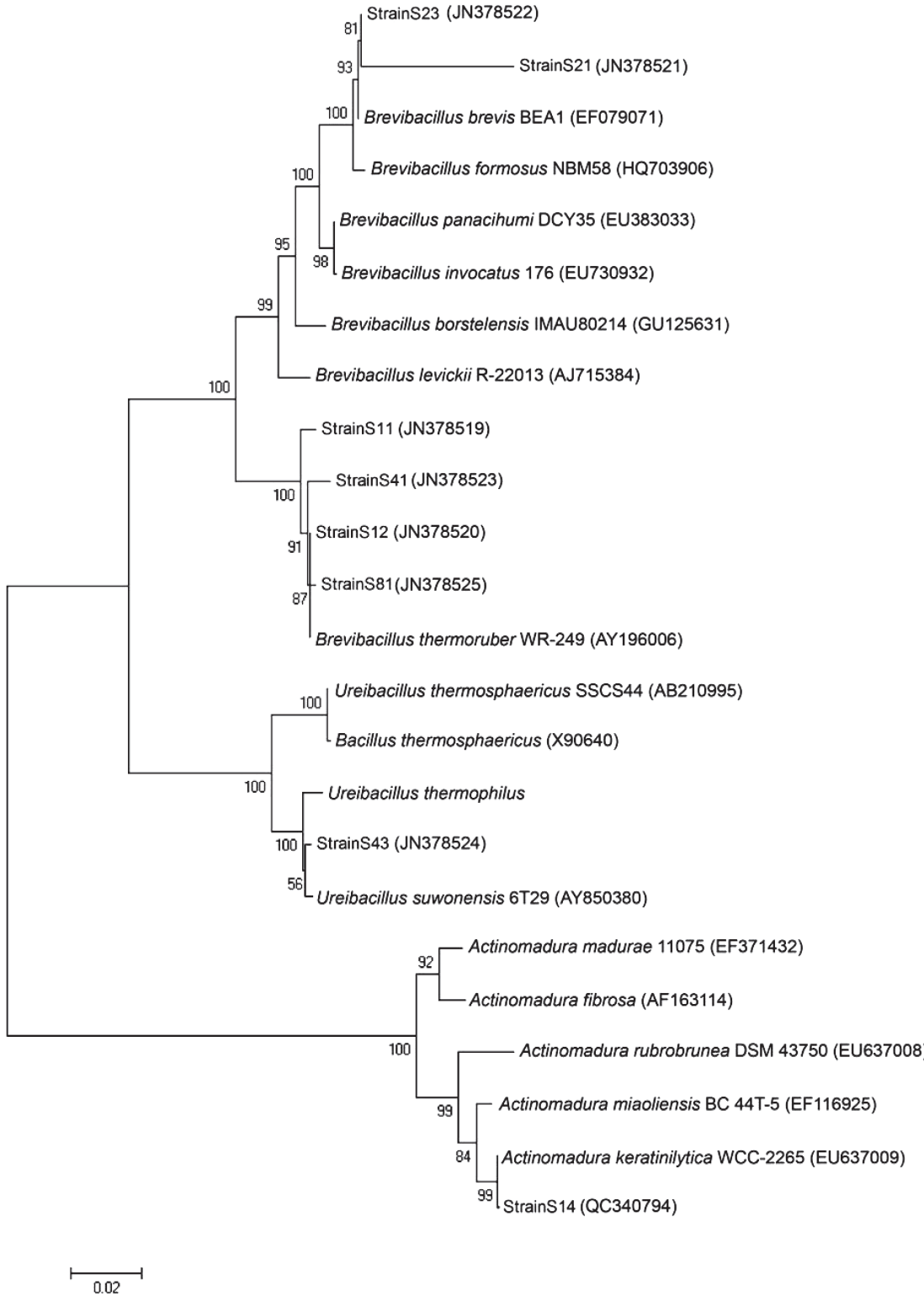
การจัดจำแนกเชื้อ 8 ไอโซเลทด้วยยีน 16S rDNA พบว่า PCR product มีขนาด 1,500 bp ลำดับเบสของยีน 16S rDNA ถูกนำมาวิเคราะห์ผลโดยการเปรียบเทียบกับเชื้อทั้งหมดที่มีอยู่ในฐานข้อมูลโดยโปรแกรม BLAST ดังแสดงในตารางที่ 1 การสร้าง phylogenetic tree จากลำดับเบส 16S rDNA ด้วยโปรแกรม MEGA 3 แสดงในรูปที่ 2 พบว่าแบคทีเรียทั้ง 8 ไอโซเลท กระจายอยู่ใน Family Bacillaceae, Paenibacillaceae, Actinomycete, และแสดงค่าความคล้ายคลึง (similarity) มากกว่า 98% โดยสายพันธุ์ S11 (98%), S12 (99%), S41 (99%) และ S81 (99%) จัดอยู่ในสายพันธุ์ *Brevibacillus thermoruber* (Family Paenibacillaceae) สายพันธุ์ S21 (99%) และ S23 (99%) จัดอยู่ในสายพันธุ์ *Brevibacillus brevis* (Family Paenibacillaceae) สายพันธุ์ S43 (99%) จัดอยู่ในสายพันธุ์ *Ureibacillus suwonensis* (Family Bacillaceae) มีเพียงสายพันธุ์ S14 (99%) สายพันธุ์เดียวที่จัดอยู่ในกลุ่ม

แอคติโนมัยสีท (Family Actinomycete) ที่คล้ายคลึงกับสายพันธุ์ *Actinomadura keratinilytica* จากรายงาน Tomita และคณะ (1999) [33] แยกเชื้อ *Brevibacillus* (formerly *Bacillus brevis*) จากตัวอย่างดินที่สามารถย่อยสลาย poly (L-lactic acid) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ในปี ค.ศ. 2008 Hu และคณะ [34] แยกเชื้อ *Ureibacillus thermosphaericus* strain BHK 25 มาจากคอมโพสต์ และย่อยสลายฟิล์ม terephthalate-containing Biomax ที่ใช้สำหรับทำบรรจุภัณฑ์ได้ที่อุณหภูมิ 55-60 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังพบว่าแอคติโนมัยสีทชอบร้อน (thermophilic actinomycetes) ได้แก่ *Actinomadura miaoliensis* sp. nov เป็นสายพันธุ์ใหม่ที่ย่อยสลาย PHB [20] และในปี ค.ศ. 2009 Sukkhum และคณะ [21] แยกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลาย L-PLA จากดินในป่าของประเทศไทย และพบว่าเชื้ออยู่ใน Family Thermomonosporaceae, Micromonosporaceae, Streptosporangiaceae, Bacillaceae และ Thermoactinomycetaceae โดยเชื้อ *Actinomadura* sp. strain T16-1 ย่อยสลาย L-PLA ได้สูงสุด แต่ไม่ย่อยสลาย PCL เมื่อจัดจำแนกด้วยลำดับเบส 16S rDNA พบว่ามีความใกล้เคียงกับสายพันธุ์ *Actinomadura keratinilytica* (99%) เป็นไปได้ว่าเชื้อสายพันธุ์นี้มีเอนไซม์ที่สำคัญในการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ ดังนั้นการที่สายพันธุ์ S14 สามารถย่อยสลาย PCL ได้ อาจเกิดจากกระบวนการทางจุลินทรีย์ (microbial process) ที่มีการปล่อยเอนไซม์ที่เรียกว่า hydrolytic enzymes ออกมาเพื่อย่อยสลาย PCL

ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบการย่อยสลาย PCL จากแบคทีเรีย 8 ไอโซเลท

Strain	Identification based on 16S rDNA analysis (identity)	Genbank accession number	Clear zone formation on PCL agar at[a]		
			37°C	45°C	55°C
S11	*Brevibacillus thermoruber* (98%)	JN378519	+	++	++
S12	*Brevibacillus thermoruber* (99%)	JN378520	+	++	++
S14	*Actinomadura keratinilytica* (99%)	QC340794	+	+++	+++
S21	*Brevibacillus brevis* (99%)	JN378521	+	++	+++
S23	*Brevibacillus brevis* (99%)	JN378522	+	++	+++
S41	*Brevibacillus thermoruber* (99%)	JN378523	+	++	++
S43	*Ureibacillus suwonensis* (99%)	JN378524	+	++	++
S81	*Brevibacillus thermoruber* (99%)	JN378525	+	++	++

หมายเหตุ: อาหารแข็ง PCL บ่มที่อุณหภูมิ 37, 45 และ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน
[a]ขนาดโซนใสวัดจากขอบของโคโลนีในวันที่ 10 +++ ขนาดมากกว่า 5 มิลลิเมตร; ++ ขนาด 3-5 มิลลิเมตร; + ขนาดน้อยกว่า 3 มิลลิเมตร



รูปที่ 2 Phylogenetic tree ของยีน 16S rDNA จากแบคทีเรีย 24 สายพันธุ์

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

การทดลองใช้เชื้อสายพันธุ์ S14 สำหรับศึกษาทางสัณฐานวิทยาเนื่องจากจัดอยู่ในกลุ่มแอคติโนมัยสีทชอบร้อนที่ย่อยสลาย PCL ได้ดี เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารชนิดต่างๆ พบว่าสีที่เกิดขึ้นบริเวณ aerial mycelium ให้สีครีม เมื่อเลี้ยงในอาหาร ISP3, 4 และ 5 สำหรับ ISP2 ไม่เกิดสี เชื้อเจริญในช่วงอุณหภูมิ 40-60 องศาเซลเซียส และเจริญได้ดีที่ความเข้มข้น NaCl 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เชื้อสามารถใช้น้ำตาล glucose, arabinose, xylose, inositol, fructose, rhamnose และ mannitol แต่ไม่สามารถใช้น้ำตาล sucrose, raffinose และ sorbitol การศึกษาคุณสมบัติการย่อยสลายพบว่าเชื้อย่อยสลาย PCL และ tributyrin แต่ไม่สามารถย่อยสลาย cellulose สายพันธุ์ S14 มีเปบติโดไกแคน (peptidoglycan) ของผนังเซลล์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน meso- DAP ซึ่งเป็นกรดอะมิโนชนิดหนึ่งที่พบได้ในแบคทีเรีย ดังแสดงผลในตารางที่ 2 เมื่อเปรียบเทียบสัณฐานวิทยาระหว่างเชื้อ *Actinomadura* sp. strain S14 และ *Actinomadura* sp. strain T16-1 [21] พบว่าสายพันธุ์ T16-1 เมื่อเลี้ยงในอาหาร ISP2, ISP3 และ ISP4 สีที่เกิดขึ้นบริเวณ aerial mycelium ให้สีเขียว สีขาว และสีครีม ตามลำดับ เชื้อเจริญในช่วงอุณหภูมิ 30-60 องศาเซลเซียส และเชื้อสามารถใช้น้ำตาล inositol, mannitol, sorbitol, raffinose, rhamnose และ galactose แสดงว่าเชื้อสายพันธุ์ S14 มีสัณฐานวิทยาที่แตกต่างจากเชื้อสายพันธุ์ T16-1 นอกจากนี้ยังพบว่าสายพันธุ์ T16-1 สามารถย่อยสลาย L-PLA แต่ไม่สามารถย่อยสลาย PCL ดังนั้นการค้นพบเชื้อสายพันธุ์ S14 ที่คล้ายคลึงกับสายพันธุ์ *A. keratinilyticba* จึงเป็นรายงานแรกที่ศึกษาความสามารถในการย่อยสลาย PCL

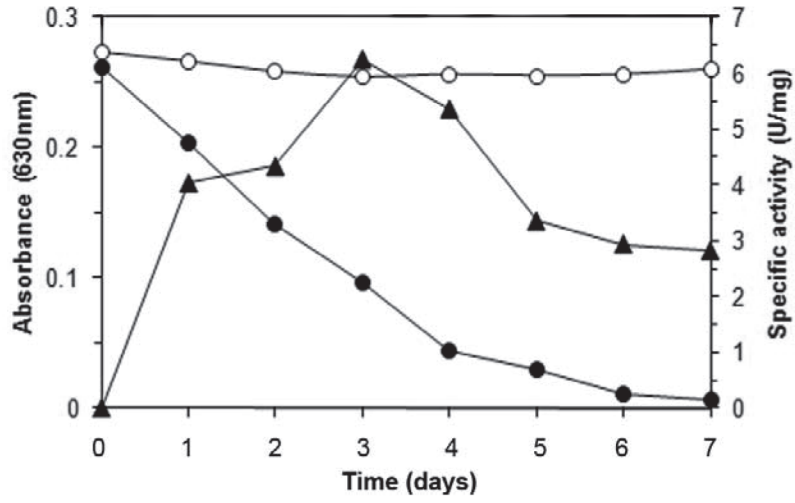
การวัด PCL-degrading enzyme

เมื่อเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ S14 ในอาหาร PCL basal medium เพื่อวัดค่าความขุ่นและการทำงานของเอนไซม์ที่ย่อยสลาย PCL พบว่าสารละลาย PCL มีความขุ่นลดลงที่ OD 630 nm เมื่อเปรียบเทียบกับสารละลาย PCL ที่ไม่ใส่เชื้อ (ฟลาสก์ควบคุม) การวัดการทำงานของเอนไซม์เมื่อเปรียบเทียบค่าความเป็นกรดด่างพบว่าเมื่อนำเอนไซม์มาบ่มกับสับสเตรท (PCL-Tris-HCl) ที่ค่า pH 7, 8 และ 9 ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส พบว่าให้ค่าการทำงานของเอนไซม์จำเพาะ (specific activity) เท่ากับ 1.45, 5.98 และ 0.98 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ ดังนั้นเอนไซม์ทำงานได้ดีที่ pH 8 และเมื่อวัดการทำงานของเอนไซม์กับสับสเตรท pH 8 ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ในแต่ละวัน พบว่าวันที่ 3 ให้ค่าสูงสุดเท่ากับ 6.25 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ดังแสดงในรูปที่ 3 การศึกษาเอนไซม์ที่ย่อยสลาย PCL พบได้ทั้งในแบคทีเรียและเชื้อรา เนื่องจาก PCL เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนที่จุลินทรีย์นำมาใช้ในการเจริญ [12, 35] เอนไซม์ที่พบส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มลิโพไลติกเอนไซม์ (lipolytic enzyme) ได้แก่ lipase, esterase และ depolymerase [8, 15] นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์ cutinase จากเชื้อรา *Fusarium moniliforme* สามารถย่อยสลาย PCL ได้เช่นกัน [13]

ตารางที่ 2 การเจริญและลักษณะทางชีวเคมีของ *Actinomadura* sp. strain S14

Properties	***Actinomadura* sp. strain S14**		
Growth characteristic on	**Growth**	**Aerial mycelium**	**Pigment**
Yeast malt extract agar (ISP2)	Moderate	Colorless	-
Oat meal agar (ISP3)	Moderate	Cream	-
Inorganic salt-starch agar (ISP4)	Moderate	Cream	-
Glycerol-asparagine agar (ISP5)	Moderate	Cream	-
Growth at	**Positive/Negative**		
30°C	-		
40°C	+		
50°C	+		
60°C	+		
Growth at	**Positive/Negative**		
0% NaCl	+		
2% NaCl	+		
4% NaCl	-		
6% NaCl	-		
10% NaCl	-		
Carbon source utilization	**Positive/Negative**		
D-Glucose	+		
L-Arabinose	+		
Sucrose	-		
D-Xylose	+		
Inositol	+		
D-Fructose	+		
Raffinose	-		
Rhamnose	+		
Mannitol	+		
Sorbitol	-		
Degradation	**Positive/Negative**		
PCL	+		
Cellulose	-		
Tributyrin	+		
DAP type	meso		

หมายเหตุ: + เชื้อเจริญได้; - เชื้อไม่เจริญ



รูปที่ 3 การวัดเอนไซม์ที่ย่อยสลาย PCL ใน PCL basal medium ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส pH 8 เป็นเวลา 7 วัน โดย ● แสดงค่า OD 630 ของฟลาสก์ที่ใส่เชื้อสายพันธุ์ S14; ○ แสดงค่า OD 630 ของฟลาสก์ที่ไม่ใส่เชื้อ; ▲ แสดงค่าการทำงานของเอนไซม์จำเพาะของฟลาสก์ที่ใส่เชื้อสายพันธุ์ S14

สรุปผลการวิจัย

จากการแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่ย่อยสลาย PCL จากดินบริเวณกองขยะพบว่าแยกเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งหมด 8 สายพันธุ์ ในการทดลองนี้มีความสนใจในแบคทีเรียสายพันธุ์ S14 ซึ่งเป็นสายพันธุ์เดียวที่จัดอยู่ในกลุ่มแอคติโนมัยสีท ชอบร้อน โดยเจริญได้ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และเป็นการรายงานครั้งแรกของเชื้อ *Actinomadura* sp. สายพันธุ์ S14 ที่ย่อยสลาย PCL ที่แยกได้จากประเทศไทย ดังนั้นจึงเป็นจุลินทรีย์ที่มีความเหมาะสมที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ในอนาคตที่เกี่ยวกับการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพประเภท PCL นอกจากนี้ผู้ทดลองยังมีความสนใจในการศึกษาถึงชนิดของเอนไซม์และสภาวะที่เหมาะสมที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการย่อยสลายจากเชื้อสายพันธุ์นี้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2554 มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ (สัญญาวิจัยเลขที่ 061/2554) และ Asian Core Program, JSPS-NRCT ประจำปี 2554 ขอขอบคุณ อาจารย์ ดร.สุขุมาภรณ์ สุขขุม ที่ให้คำปรึกษาในงานวิจัยเป็นอย่างดี และขอขอบคุณนิสิตในที่ปรึกษาปัญหาพิเศษทุกคนที่ช่วยให้งานวิจัยสำเร็จไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. Huang, S. J. 1995. Polymer Waste Management-Biodegradation, Incineration, and Recycling. *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry* 32: 593-597.
2. Somyoonsap, P. 2010. Bioplastics: Innovation of Green Products. *Srinakharinwirot Science Journal* 26(2): 177-195. (in Thai).
3. Bastioli, C., Cerutti, A., Guanella, I. Romano, G. C., and Tosin, M. 1995. Physical State and Biodegradation Behavior of Starch-Polycaprolactone Systems. *Journal of Environmental Polymer Degradation* 3: 81-95.
4. Goldberg, D. 1995. A Review of the Biodegradability and Utility of Poly (caprolactone). *Journal of Environmental Polymer Degradation* 3: 61-67.
5. Rhee, J. K., Ahn, D. G., Kim, Y. G., and Oh, J. W. 2005. New Thermophilic and Thermostable Esterase with Sequence Similarity to the Hormone-Sensitive Lipase Family, Cloned from a metagenomic library. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 817-825.
6. Benedict, C. V., Cameron, J. A., and Huang, S. J. 1983. Poly-Caprolactone Degradation by Mixed and Pure Cultures of Bacteria and Yeast. *Journal of Applied Polymer Science* 28: 335-342.
7. Tokiwa, Y., and Suzuki, T. 1977. Hydrolysis of Polyesters by Lipase. *Nature* 270: 76-78.
8. Maeda, H., Youhei, Y., Keietsu, A., Fumihiko, H., Masayuki, M., Ryoji, I., Katsuya, G., and Tasuku, N. 2005. Purification and Characterization of a Biodegradable Plastic-Degrading Enzyme from *Aspergillus oryzae. Applied Microbiology and Biotechnology* 67: 778-788.
9. Tomita, K., Kuroki, Y., and Nagai, K. 1999. Isolation of Thermophiles Degrading Poly (L-lactic acid). *Journal of Bioscience and Bioengineering* 87: 752-755.
10. Tomita, K., Tsuji, H., Nakajima, T., Kikuchi, Y., Ikarashi, K., and Ikeda, N. 2003. Degradation of Poly (D-lactic acid) by a Thermophile. *Polymer Degradation and Stability* 81: 167-171.
11. Tomita, K., Nakajima, T., Kikuchi, Y., and Miwa, N. 2004. Degradation of Poly (L-lactic acid) by a Newly Isolated Thermophile. *Polymer Degradation and Stability* 84: 433-438.
12. Oda, Y., Naoya, O., Teizi, U., and Kenzo, T. 1997. Polycaprolactone Depolymerase Produced by the Bacterium *Alcaligenes faeaclis. FEMS Microbiology Letters* 152: 339-343.
13. 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.
14. Tansengco, M. L., and Tokiwa, Y. 1998. Thermophilic Microbial Degradation of Polyethylene Succinate. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 14: 133-138.

15. Sanchez, J., Akio, T, and Yutaka, T. 2000. Degradation of polycaprolactone at 50°C by a thermotolerant *Aspergillus* sp.. *Biotechnology Letters* 22: 849-853.
16. Gouda, M. K., Kleeberg, I., Vanden Heuvel, J., Müller, R-J., and Deckwer, W-D. 2002. Production of a Polyester Degrading Extracellular Hydrolase from *Thermomonospora fusca. Biotechnology Progress* 18(5): 927-934.
17. Tokiwa, Y., Iwamoto, A., Koyama, M., Kataoka, N., and Nishida, H. 1992. Biological Recycling of Plastics Containing Ester Bonds. *Makromolekulare Chemie-Makromolecular Symposia* 57: 273-279.
18. Teeraphatpornchai, T., Nakajima-Kambe, T., Shigeno-Akutsu, Y., Nakayama, M., Nomura, N., Nakahara, T., and Uchiyama, H. 2003. Isolation and Characterization of a Bacterium that Degrades Various Polyester-based Biodegradable Plastics. *Biotechnology Letters* 25: 23-28.
19. Kleeberg, I., Hetz, C., Kroppenstedt, R. M., Müller, R.-J., and Deckwer, W.-D. 1998. Biodegradation of Aliphatic Aromatic Copolyesters by *Thermomonospora fusca* and Other Thermophilic Compost Isolates. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 1731-1735.
20. Tseng, M., Yang, S. F., Hoang, K. C., Liao, H. C., Yuan, G. F., and Liao, C. C. 2009. *Actinomadura miaoliensis* sp. nov., a Thermotolerant Polyester-Degrading Actinomycete. *International Journal of Systematic and Microbiology* 59: 517-520.
21. Sukkhum, S., Tokuyama, S., Tamura, T., and Kitpreechavanich, V. 2009. A Novel Poly (L-lactide) Degrading Actinomycetes Isolated from Thai Forest Soil, Phylogenic Relationship and the Enzyme Characterization. *The Journal of General and Applied Microbiology* 55: 459-467.
22. Nishida, H., and 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.
23. Kieser, T., Chater, K.F., Bibb, M. J., Buttner, M. J., and Hopwood, D. A. 2000. Practical *Streptomyces* Genetic. England. John Innes Centre.
24. Lane, D. J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt, E., and Goodfellow, M., Editors. Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics. John Wiley and Sons. Chichester. p. 371-375.
25. Kumar, S., Tamura, K., and Nei, M. 2004. MEGA 3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5: 150-163.
26. Shirling, E. B., and Gottlieb, D. 1966. Methods for Characterization of *Streptomyces* Species. *International Journal of Systematic Bacteriology* 16: 313-340.

27. Nonomura, H. 1974. Key for Classification and Identification of 458 Species of the *Streptomyces* Included in ISP. *Journal of Fermentation Technology* 52: 78-92.
28. Staneck, J. L., and Roberts, G. D. 1974. Simplified Approach to Identification of Aerobic Actinomycetes by Thin-Layer Chromatography. *Applied Microbiology* 28: 226-231.
29. Oda, Y., Asari, H., Urakami, T., and Tonomura, K. 1995. Microbial Degradation of Poly (3-Hydroxybutyrate) and Polycaprolactone by Filamentous Fungi. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 80: 265-269.
30. Bradford, M. M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
31. Fields, R. D., Rodriquez, F., and Finn, R. K. 1974. Microbial Degradation of Polyesters: Polycaprolactone Degraded by *P. pullulans. Journal of Applied Polymer Science* 18: 3571-3579.
32. Tseng, M., Hoang, K.-C., Yang, M.-K., Yang, S.-F., Chu, W. S. 2007. Polyester-Degrading Thermophilic Actinomycetes Isolated from Different Environment in Taiwan. *Biodegradation* 18: 579-583.
33. Tomita, K., Kuroki, Y., and Nagai, K. 1999. Isolation of Thermophiles Degrading Poly (L-lactic acid). *Journal of Bioscience and Bioengineering* 87: 752-755.
34. Hu, X., Satoshi, O., Hayashi, M., Kaku, M., Katuen, S., Kobayashi, H., and Kawai, F. 2008. Degradation of a Terephthalate-Containing Polyester by Thermophilic Actinomycetes and *Bacillus* Species Derived from Composts. *Journal of Polymers and the Environment* 16: 103-108.
35. Jun, H. S., Kim, B. O., Kim, Y. C., Chang, H. N., and Woo, S. I. 1994. Synthesis of Copolyesters Containing Poly(ethylene terephthalate) and Poly(ε-caprolactone) Units and their Susceptibility to *Pseudomonas* sp. Lipase. *Journal of Environmental Polymer Degradation* 2: 9-18.

ได้รับบทความวันที่ 3 มิถุนายน 2554
ยอมรับตีพิมพ์วันที่ 21 กันยายน 2554