



โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การระบุลักษณะคุณสมบัติของแบคทีเรียที่ผลิตพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต และยีนชีวสังเคราะห์ PHAs
Characterization of polyhydroxyalkanoates (PHAs) producing bacteria and their PHA biosynthesis gene

ชื่อนิสิต นายธีรภูมิ เจริญสุข

ภาควิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2562

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



โครงการ
การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การระบุลักษณะคุณสมบัติของแบคทีเรียที่ผลิตพอลิไฮดรอกซีแอลคานอยด์และ
ยีนชีวสังเคราะห์ PHAs
Characterization of polyhydroxyalkanoates (PHAs) producing bacteria
and their PHA biosynthesis gene

ชื่อนิสิต นายธีรวุฒิ เจริญสุข เลขประจำตัว 593 23249 23

ภาควิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2562

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อโครงการ การระบุลักษณะคุณสมบัติของแบคทีเรียที่ผลิตพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต
และยีนชีวสังเคราะห์ PHAs
โดย นายธีรวุฒิ เจริญสุข เลขประจำตัว 593 23249 23
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ รองศาสตราจารย์ ดร.สุชาดา จันทร์ประทีป นภทร
ปีการศึกษา 2562

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับโครงการฉบับนี้
เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต ในรายวิชา 2312499 โครงการวิทยาศาสตร์

..... หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิช)

คณะกรรมการสอบโครงการ

..... อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุชาดา จันทร์ประทีป นภทร)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.รุ่งอรุณ วาติถิ สิริศรัทธา)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.วันชัย อัครวลาภสกุล)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร.ชมพูนิกข์ กาญจนพังคะ)

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

เรื่อง

การระบุลักษณะคุณสมบัติของแบคทีเรียที่ผลิตพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต
และยีนชีวสังเคราะห์ PHAs

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร.สุชาดา จันทร์ประทีป นภทร

นิสิตหัวหน้าโครงการ

นายธีรภูมิ เจริญสุข เลขประจำตัว 593 23249 23

โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการ	การระบุลักษณะคุณสมบัติของแบคทีเรียที่ผลิตพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต และยีนชีวสังเคราะห์ PHAs
นิสิตเสนอโครงการ	นายธีรวิทย์ เจริญสุข เลขประจำตัว 593 23249 23
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ	รองศาสตราจารย์ ดร.สุชาดา จันทร์ประทีป นภาธร
ภาควิชา	จุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2562

บทคัดย่อ

มลภาวะที่เกิดจากขยะพลาสติกยังคงเป็นปัญหาด้านสิ่งแวดล้อมในหลายๆ ประเทศ ทำให้ทั่วโลกเริ่มสนใจพลาสติกชีวภาพทดแทนพลาสติกจากแหล่งปิโตรเลียม พลาสติกชีวภาพจึงมีบทบาทในชีวิตประจำวันมากขึ้น เนื่องจากพลาสติกชีวภาพสามารถย่อยสลายได้เร็ว ในขณะที่พลาสติกจากปิโตรเคมีใช้เวลามากกว่า 500 ปีในการย่อยสลายตามธรรมชาติ พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต (polyhydroxyalkanoates, PHAs) เป็นพลาสติกชีวภาพทางเลือกชนิดหนึ่งที่มีแนวโน้มความสนใจมากขึ้น มีคุณสมบัติเป็นเทอร์โมพลาสติก สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ และมีความเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อในร่างกาย PHAs สามารถผลิตได้จากแบคทีเรียหลายชนิดที่มียีนชีวสังเคราะห์ PHAs และสามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติจากแบคทีเรียที่มียีนย่อยสลาย PHAs ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นน้ำและแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อระบุลักษณะคุณสมบัติของแบคทีเรียที่ผลิต PHAs และยีนชีวสังเคราะห์ PHAs จากแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในงานวิจัยก่อนหน้านี้ เมื่อระบุชนิดของแบคทีเรียด้วยวิธีวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16s rDNA แสดงให้เห็นว่าไอโซเลทที่ 1 ถึง 8 มีความคล้ายคลึงกับ *Chryseobacterium daecheongense* SNA 43^T 98.63 เปอร์เซ็นต์ *Pseudomonas chengduensis* L02^T 99.35 เปอร์เซ็นต์ *Lysinibacillus mecroides* KPB6^T 98.87 เปอร์เซ็นต์ *Enterobacter hormaechei* IPBCC 19.1426^T 100 เปอร์เซ็นต์ *Sphingopyxis indica* DS15^T 99.78 เปอร์เซ็นต์ *Gordonia bronchialis* A5-8^T 98.25 เปอร์เซ็นต์ *Pseudomonas denitrificans* H38A^T 99.93 เปอร์เซ็นต์ และ *Lysinibacillus fusiformis* L13^T 99.93 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากนั้นวิเคราะห์กลุ่มยีนชีวสังเคราะห์ PHAs ในฐานข้อมูลจีโนมโดยใช้โปรตีนอ้างอิงในฐานข้อมูลโปรตีน พบว่าไอโซเลททั้งหมดมียีน *phaJ* และ *fabG* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับสารตัวกลางส่วนต้นและส่วนปลายในวิถีบีตาออกซิเดชัน พบ *phaA* และ *phaC* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับส่วนต้นและส่วนปลายในวิถีสังเคราะห์ PHAs โดยใช้ acetyl-coA ที่ได้จากเมแทบอลิซึมของกลูโคสเป็นสารตั้งต้น นอกจากนี้ยังพบ *phaZ* ซึ่งถูกถอดรหัสได้เอนไซม์ PHA depolymerase ผลการทดลองทั้งหมดนี้จึงสรุปได้ว่า ไอโซเลททั้งหมดสามารถนำกลูโคสและกรดไขมันมาผลิต PHAs โดยใช้กลุ่มยีนชีวสังเคราะห์ PHAs ได้แก่ *phaA phaC phaB phaJ* และ *fabG* และสามารถย่อยสลาย PHAs โดยใช้ PHA depolymerase จากยีน *phaZ* ได้ อย่างไรก็ตาม การศึกษาในอนาคตควรออกแบบไพรเมอร์เพื่อนำมาทดสอบกับเชื้อบริสุทธิ์เพื่อยืนยันยีนชีวสังเคราะห์ PHAs และชนิดของ PhaC ของไอโซเลททั้งหมดนี้

Project title	Characterization of polyhydroxyalkanoates (PHAs) producing bacteria and their PHA biosynthesis gene
Name of student	Mr. Teerawut Charoensuk ID No. 593 23249 23
Advisor	Assoc. Prof. Suchada Chanprateep Napathorn, Ph.D.
Department	Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University

Abstract

Plastic pollution is a serious global problem in many countries. Recently, people are interested in using biodegradable plastic instead of petroleum-based plastics. Bioplastics play an important role in daily life because biodegradable plastics can be decomposed whereas petrochemical based plastics take more than 500 years to be degraded in nature. Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are one of the most recognized bioplastics having thermoplastic, biodegradable and biocompatible properties. PHAs can be produced from many bacteria possessing PHA biosynthesis genes and can be naturally decomposed from bacteria possessing PHA biodegrading genes. The final products are water and carbon dioxide. The aim of this study is to characterize PHAs producing bacteria and their PHA biosynthesis genes using the isolated bacteria from the previous study. Based on 16S rDNA gene analysis. The isolates were identified as species belonging to *Chryseobacterium daecheongense* SNA 43^T (98.63%), *Pseudomonas chengduensis* L02^T (99.35%), *Lysinibacillus mecroides* KPB6^T (98.87%), *Enterobacter hormaechei* IPBCC 19.1426^T (100.00%), *Sphingopyxis indica* DS15^T (99.78%), *Gordonia bronchialis* A5-8^T (98.25%), *Pseudomonas denitrificans* H38A^T (99.93%), and *Lysinibacillus fusiformis* L13^T (99.93%), respectively. Based on genome database analysis by using references protein from protein database revealed that all isolates contained *phaJ* and *fabG* genes which are related to the upper and lower PHAs substrates in the beta oxidation pathway. The *phaA*, *phaC*, and *phaZ* genes were determined in this analysis and found that all 8 isolates contained *phaA* and *phaC* genes related to the upper and lower parts in the PHAs biosynthesis pathway by using acetyl-coA derived from glucose metabolism. In addition, the *phaZ* gene, encoded for PHA depolymerase enzyme, was also found. In conclusion, all of these isolates are able to use glucose and fatty acids to produce PHAs by their *phaA*, *phaC*, *phaB*, *phaJ*, and *fabG* genes and can degrade PHAs by their *phaZ* genes. However, specific primer should be designed to confirm the existing of these genes and identify the class of *phaC* in the future.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์เรื่องนี้สำเร็จด้วยความกรุณาของ รองศาสตราจารย์ ดร.สุชาดา จันทรประทีป นภاطر อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ซึ่งให้คำปรึกษาและคำแนะนำอันเป็นประโยชน์ในการวิจัย ทั้งยังช่วยแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยความเมตตาเสมอมา ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.รุ่งอรุณ วาติลี สิริศรีธธา รองศาสตราจารย์ ดร.วันชัย อัครลาภ สกกุล อาจารย์ ดร.ชมพูนิกข์ กาญจนพังคะ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิช และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา คณะกรรมการสอบโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ที่กรุณาตรวจแก้ไขและให้คำแนะนำต่างๆ จนโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์เรื่องนี้มีความสมบูรณ์ถูกต้องมากขึ้น

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยา และคณาจารย์คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ที่เมตตาอบรมสั่งสอนและให้วิชาความรู้ที่เป็นประโยชน์แก่การวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ เจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่านที่ช่วยเหลือ เอกสาร อุปกรณ์ และการติดต่อต่างๆ ให้เป็นไปด้วยดีและมีความถูกต้องเสมอมา

ขอบพระคุณ นายธนวัฒน์ บุญทิพย์ นางสาวจิตตกานต์ ปัจฉิมสวัสดิ์ และนายศิริราชย์ นันทะชัย ที่คอยช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ และสอนขั้นตอนวิธีการทดลองต่างๆ ในห้องปฏิบัติการ 1904/16

ขอบคุณ นายไพรัช จินดาเพชร นายพีรวิชญ์ พลอยประดับ นางสาวณัฐพร ประทีปวิทยานิช นางสาวสามินี มีผิวหอม นายปิยนนท์ ผิวสะอาด ที่สละเวลาช่วยเหลือและตรวจทานข้อมูล และเพื่อนๆ ภาควิชาจุลชีววิทยาที่คอยให้กำลังใจและช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ

อนึ่งโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์นี้จะสำเร็จไม่ได้หากปราศจากความกรุณาของ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่สนับสนุนทุนวิจัยในครั้งนี้

เหนือสิ่งอื่นใดคือพระคุณของบิดามารดาที่เกื้อหนุนการศึกษาของข้าพเจ้าตลอดมา ความสำเร็จทั้งหลายทั้งปวงนี้ ขอนอบน้อมเป็นเครื่องแสดงความกตัญญูตเวทิตาแด่บุพการีทั้งสองท่าน ผู้มีพระคุณสูงล้ำที่ไม่อาจประเมินค่าได้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูป	ฉ
สารบัญแผนภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	9
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	9
บทที่ 2 อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย	
2.1 อุปกรณ์	10
2.2 เคมีภัณฑ์	11
2.3 แบคทีเรีย การเจริญ และการเก็บรักษา	
2.3.1 แบคทีเรีย	11
2.3.2 การเจริญ	11
2.3.3 การเก็บรักษาแบคทีเรีย	11
2.4 การจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียด้วยวิธีวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16s rDNA	
2.4.1 การสกัด DNA จากแบคทีเรียด้วยวิธี Colony PCR	11
2.4.2 การเพิ่มจำนวน DNA บริเวณ 16S rDNA	12
2.4.3 อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis)	13
2.4.4 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA	13
2.4.5 วิเคราะห์ต้นไม้วิวัฒนาการ phylogenetic tree	13
2.5 ตรวจสอบยีนในกระบวนการชีวสังเคราะห์ PHAs จากฐานข้อมูลจีโนม	
2.5.1 จีโนมของแบคทีเรียที่ระบุชนิดได้	13
2.5.2 กลุ่มยีนชีวสังเคราะห์ PHAs	14
2.5.3 ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับกลุ่มยีนชีวสังเคราะห์ PHAs	15
2.5.4 ตรวจสอบกลุ่มยีนชีวสังเคราะห์ PHAs ของแบคทีเรียแต่ละชนิด	15

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.5.5 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนชีวสังเคราะห์ PHAs	14
2.6 ตรวจสอบยีนในกระบวนการชีวสังเคราะห์ PHAs จากโคลนบริสุทธิ์	
2.6.1 การเพิ่มจำนวน DNA บริเวณยีนชีวสังเคราะห์ PHAs	15
2.6.2 ตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR	15
2.6.3 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีนชีวสังเคราะห์ PHAs	16
บทที่ 3 ผลการทดลอง	
3.1 แบคทีเรีย การเจริญ และลักษณะโคโลนี	17
3.2 การจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียด้วยวิธีวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16s rDNA	19
3.3 ต้นไม้วิวัฒนาการ (phylogenetic tree)	21
3.4 ฐานข้อมูลจีโนมของแบคทีเรียที่ระบุชนิด	26
3.5 ยีนและโปรตีนในกระบวนการชีวสังเคราะห์ PHAs จากฐานข้อมูลจีโนม	26
3.6 บริเวณอนุรักษ์ของโปรตีน PHAs	27
3.7 การผลิต PHAs จากกลูโคสและกรดไขมัน	37
3.8 การย่อยสลาย PHAs	38
บทที่ 4 สรุป วิจัยผลการทดลอง และแผนดำเนินงานวิจัยในอนาคต	
4.1 สรุปและวิจัยผลการทดลอง	39
เอกสารอ้างอิง	
เอกสารอ้างอิงภาษาไทย	41
เอกสารอ้างอิงภาษาอังกฤษ	41
เอกสารอ้างอิงออนไลน์	43
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ	44
ภาคผนวก ข สารเคมีและวิธีการเตรียมสารที่ใช้ในการทดลอง	45
ภาคผนวก ค ผลการทดลองเพิ่มเติม	46

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1.1 การจำแนกชนิด PHAs ตามจำนวนคาร์บอนอะตอมในหน่วยมอนอเมอร์	5
ตารางที่ 1.2 การจัดจำแนกคุณสมบัติของ PHA synthase อันดับต่างๆ	8
ตารางที่ 2.1 ไพรมอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16s rDNA	12
ตารางที่ 2.2 องค์ประกอบของสารในปฏิกิริยาลูกลูโซพอลิเมอเรส	12
ตารางที่ 2.3 สภาวะที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกลูโซพอลิเมอเรส	12
ตารางที่ 2.4 ยีนและโปรตีนที่ใช้ค้นหาในฐานข้อมูลจีโนม	14
ตารางที่ 3.1 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียทั้ง 8 ไอโซเลท	17
ตารางที่ 3.2 การจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16s rDNA	20
ตารางที่ 3.3 ความแตกต่างระหว่างแบคทีเรียกลุ่ม TSG และกลุ่ม SG	21
ตารางที่ 3.4 ฐานข้อมูลจีโนมของแบคทีเรียที่ระบุชนิด	26
ตารางที่ 3.5 โปรตีนในกระบวนการชีวสังเคราะห์ PHAs จากฐานข้อมูลโปรตีน	28

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1.1 PHA granule จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน	4
รูปที่ 1.2 โครงสร้างทั่วไปและโครงสร้างที่แตกต่างกันตามชนิดของหมู่ R	4
รูปที่ 1.3 การจำแนกชนิดของ PHAs ตามองค์ประกอบทางเคมีของมอนอเมอร์	5
รูปที่ 1.4 แสดงวิถีการสังเคราะห์ SCH/MCH PHA จากกลูโคสและกรดไขมัน	6
รูปที่ 1.5 PHA synthase และ PHA operon organization	7
รูปที่ 1.6 Primary degradation และ Ultimate degradation	8
ของแบคทีเรียในการย่อยสลาย PHAs ด้วยเอนไซม์ PHA depolymerase	
รูปที่ 3.1 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของปฏิกิริยาลูโกโซพอลิเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ 27F และ 1492R	19
รูปที่ 3.2 บริเวณอนุรักษ์ของ PhaB เมื่อเปรียบเทียบกับ FabG	30
รูปที่ 3.3 บริเวณอนุรักษ์ของ PhaA	31
รูปที่ 3.4 บริเวณอนุรักษ์ของ FabG	32
รูปที่ 3.5 บริเวณอนุรักษ์ของ PhaJ	33
รูปที่ 3.6 บริเวณอนุรักษ์ของ PhaC class II	34
รูปที่ 3.7 บริเวณอนุรักษ์ของ PhaC class I	34
รูปที่ 3.8 บริเวณอนุรักษ์ของ PhaC ที่คาดว่าเป็น PhaC class III	34
รูปที่ 3.9 บริเวณอนุรักษ์ของ PhaC ใน <i>C. daecheongense</i> (ก) และ <i>L. fusiformis</i> (ข)	35
รูปที่ 3.10 บริเวณอนุรักษ์ของ PhaZ	35
รูปที่ 3.11 บริเวณอนุรักษ์ของ PhaZ ของ <i>P. chengduensis</i> (ก) และ <i>P. denitrificans</i>	36
รูปที่ 3.12 การผลิต PHAs จากกลูโคสและกรดไขมัน	37
รูปที่ 3.13 การย่อยสลาย PHAs ภายในเซลล์และภายนอกเซลล์	- 38

สารบัญแผนภูมิ

	หน้า
แผนภูมิที่ 3.1 ต้นไม้วิวัฒนาการของ 16S rDNA ของ TSG1	22
แผนภูมิที่ 3.2 ต้นไม้วิวัฒนาการของ 16S rDNA ของ TSG2	22
แผนภูมิที่ 3.3 ต้นไม้วิวัฒนาการของ 16S rDNA ของ TSG3	23
แผนภูมิที่ 3.4 ต้นไม้วิวัฒนาการของ 16S rDNA ของ TSG4	23
แผนภูมิที่ 3.5 ต้นไม้วิวัฒนาการของ 16S rDNA ของ TSG5	24
แผนภูมิที่ 3.6 ต้นไม้วิวัฒนาการของ 16S rDNA ของ TSG6	24
แผนภูมิที่ 3.7 ต้นไม้วิวัฒนาการของ 16S rDNA ของ TSG7	25
แผนภูมิที่ 3.8 ต้นไม้วิวัฒนาการของ 16S rDNA ของ TSG8	25

สารบัญแผนภูมิ

	หน้า
แผนภูมิที่ 3.1 ต้นไม้วิวัฒนาการของ 16S rDNA ของ TSG1	21
แผนภูมิที่ 3.2 ต้นไม้วิวัฒนาการของ 16S rDNA ของ TSG2	21
แผนภูมิที่ 3.3 ต้นไม้วิวัฒนาการของ 16S rDNA ของ TSG3	22
แผนภูมิที่ 3.4 ต้นไม้วิวัฒนาการของ 16S rDNA ของ TSG4	22
แผนภูมิที่ 3.5 ต้นไม้วิวัฒนาการของ 16S rDNA ของ TSG5	23
แผนภูมิที่ 3.6 ต้นไม้วิวัฒนาการของ 16S rDNA ของ TSG6	23
แผนภูมิที่ 3.7 ต้นไม้วิวัฒนาการของ 16S rDNA ของ TSG7	24
แผนภูมิที่ 3.8 ต้นไม้วิวัฒนาการของ 16S rDNA ของ TSG8	24

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

ในปัจจุบันรัฐบาลไทยมีนโยบายลดการใช้ถุงพลาสติก และรณรงค์ให้นำวัสดุอื่นมาใช้แทนถุงพลาสติก เช่น รณรงค์ให้ใช้ถุงผ้าแทนถุงพลาสติก รณรงค์ให้ร้านสะดวกซื้อและห้างสรรพสินค้าต่าง ๆ งดแจกถุงพลาสติก โดยเปลี่ยนไปใช้ถุงผ้า หรือ ถุงกระดาษแทน (กรมควบคุมมลพิษ, 2019) แต่อย่างไรก็ตาม ด้วยคุณสมบัติของพลาสติกที่ผลิตจากแหล่งปิโตรเลียมมีความทนทาน มีความยืดหยุ่นสูง และมีอายุการใช้งานได้นาน เราจึงไม่สามารถหลีกเลี่ยงพลาสติกได้ทั้งหมด เนื่องจากยังมีความจำเป็นและความต้องการพลาสติกจำนวนมากทั้งในชีวิตประจำวันและทางอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น อุตสาหกรรมการเกษตร อุตสาหกรรมการขนส่ง อุตสาหกรรมการอาหาร และอุตสาหกรรมยานยนต์ (Uchida และคณะ, 2000) แต่อย่างไรก็ตาม ถึงแม้พลาสติกจะมีข้อดีและมีแนวโน้มการใช้พลาสติกที่สูงขึ้นมาตลอด แต่มักจะแปรผันตรงกับปัญหาภาวะที่เกิดจากขยะพลาสติกเพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน เพื่อสอดคล้องกับนโยบายของรัฐบาลและแนวคิดรักษ์โลกที่หลาย ๆ ประเทศทั่วโลกกำลังผลักดันอยู่ในขณะนี้ จึงส่งผลให้ระบบอุตสาหกรรมและประชาชนสนใจที่จะใช้พลาสติกชีวภาพทดแทนพลาสติกที่ผลิตจากแหล่งปิโตรเลียม

พลาสติกชีวภาพ หมายถึง พลาสติกที่ผลิตขึ้นจากวัสดุธรรมชาติซึ่งส่วนใหญ่เป็นวัตถุดิบทางการเกษตร เช่น มันสำปะหลัง ข้าวโพด และ อ้อย เป็นต้น พลาสติกชีวภาพมี 2 ประเภท ประเภทแรกคือ พลาสติกที่ย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ (biodegradable plastic) พลาสติกชนิดนี้สามารถย่อยสลายทางชีวภาพเป็นสารอินทรีย์ จึงเหมาะกับการใช้เป็นบรรจุภัณฑ์อาหาร หรือเป็นถุงทิ้งเศษอาหาร เนื่องจากจะย่อยสลายไปพร้อมขยะเศษอาหารและกลับคืนสู่ธรรมชาติ จึงมีความแตกต่างกับพลาสติกดั้งเดิมที่ยากต่อการนำไปใช้ใหม่ นอกจากนี้ยังสามารถประยุกต์ทำเป็นทำเป็นแผ่นฟิล์ม เช่น ฟิล์มยืด และฟิล์มขึ้นรูป ประยุกต์ใช้กับวัสดุสิ่งทอ เช่น เชือก ผ้า และ ตาข่ายคลุมดิน เป็นต้น เมื่อนำไปประยุกต์ใช้ทางการเกษตร พลาสติกเหล่านี้จะย่อยสลายเป็นสารอินทรีย์ในดินและไม่มีสารพิษตกค้างในสิ่งแวดล้อม ยกตัวอย่างพลาสติกประเภทนี้ เช่น พอลิไฮดรอกซีแอลคานอเอต (polyhydroxyalkanoate, PHAs) พอลิแลคติก แอซิด (polylactic acid, PLAs) และ พอลิบิวทิลีน ซักซิเนต (polybutylene Succinate, PBS) พลาสติกอีกประเภทคือ พลาสติกที่ผลิตจากชีวมวล (Biomass plastic) คือพลาสติกชีวที่สังเคราะห์จากทรัพยากรธรรมชาติโดยใช้กระบวนการทางเคมีและชีววิทยา ยกตัวอย่างเช่น ไบโอบอลิโพรพิลีน (bio-polypropylene, bio-PP) และ ไบโอบอลิเอทิลีน (bio-polyethylene, bio-PE)

พลาสติกชีวภาพทั้งสองประเภทมีความคงทนเหมือนพลาสติกทั่วไป สามารถย่อยสลายได้โดยธรรมชาติซึ่งจะช่วยลดปัญหาการกำจัดขยะพลาสติกและสารพิษตกค้างในสิ่งแวดล้อม คุณสมบัติดังกล่าวล้วนแล้วแต่เป็นปัจจัยที่สำคัญในการผลักดันให้ประชากรทั่วโลกสนใจใช้พลาสติกชนิดชีวภาพมากขึ้น ในหลายปีที่ผ่านมา หลายประเทศเผชิญปัญหาการจัดการขยะพลาสติก ด้านพื้นที่จัดเก็บและทำลายขยะ ภาครัฐภาคเอกชน และหน่วยครัวเรือนในประเทศที่พัฒนาแล้ว เช่น ประเทศในแถบยุโรป สหรัฐอเมริกา และญี่ปุ่นจะให้ความสำคัญและตระหนักถึงปัญหาดังกล่าว จึงหันมาร่วมมือในการใช้พลาสติกชีวภาพเพิ่มขึ้น และจะมี

มาตรการต่าง ๆ เพื่อรองรับการแก้ปัญหาขยะพลาสติก เช่น ประเทศญี่ปุ่นได้ให้สัตยาบันพิธีสารเกียวโตในปี 2002 เพื่อต่อต้านภาวะโลกร้อน (global warming) และได้ประกาศ 2 แนวทางสำคัญคือ biotechnology strategic scheme และ biomass nippon strategy โดยมีเป้าหมายในการส่งเสริมชีวมวลเป็นทรัพยากรที่หมุนเวียนได้ โดยมุ่งเน้นให้อุตสาหกรรมภายในประเทศใช้ชีวมวลในการผลิตพลาสติก และตั้งหมายเพื่อใช้พลาสติกชีวภาพทดแทนการใช้พลาสติกประเภทเดิม เช่น พอลิโพรพิลีน พอลิเอทิลีน และ พอลิเอทิลีน เทเรพทาเลต ต่อมารัฐบาลญี่ปุ่นได้เข้าร่วม ความตกลงปารีส (Paris agreement) ในปี 2015 และได้กำหนดเป้าหมายให้ลดการปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 26 ภายในปี 2030 และมีแผนรับมือภาวะโลกร้อนโดยระบุให้ใช้พลาสติกจากชีวมวลเพิ่มขึ้น ในปัจจุบันประเทศญี่ปุ่นได้กำหนดเป้าหมายเพื่อลดปริมาณขยะพลาสติกลงร้อยละ 25 ภายในปี 2030 กำหนดให้ร้อยละ 60 ของภาชนะบรรจุภัณฑ์ต้องสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ และต้องนำขยะพลาสติกกลับมาใช้ใหม่ได้ 100% ภายในปี 2035 รวมทั้งพัฒนาและส่งเสริมการใช้พลาสติกชีวภาพทดแทนพลาสติกที่ผลิตจากปิโตรเลียม และยกเลิกการแจกถุงพลาสติกในห้างสรรพสินค้า (ที่มา กระทรวงสิ่งแวดล้อมญี่ปุ่น, <http://www.env.go.jp/en/index.html>, accessed on April 20, 2020)

แนวโน้มการใช้พลาสติกชีวภาพในปัจจุบันมีแนวโน้มสูงขึ้นทุกปี โดยตลาดพลาสติกชีวภาพในญี่ปุ่นขยายตัวอย่างก้าวกระโดดและมีแนวโน้มขยายตัวอย่างต่อเนื่อง (กรมส่งเสริมการค้าระหว่างประเทศ., 2018) จากข้อมูลทางสถิติของสมาคมพลาสติกชีวภาพญี่ปุ่น (Japan bio plastics association, JBPA) แสดงให้เห็นว่าพลาสติกที่ย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ (biodegradable plastic) มีปริมาณในท้องตลาดราว 2,300 ตัน ประกอบไปด้วยพลาสติกจาก PHAs และ PBS เช่นเดียวกับ พลาสติกจากชีวมวลที่มีปริมาณในท้องตลาดสูงถึง 35,000 ตันในปี 2017 ในช่วงเดียวกันนี้ทั่วโลกเริ่มให้ความสำคัญกับการแก้ไขปัญหามลพิษทางอากาศที่เกิดจากพลาสติกใช้แล้วทิ้งลงทะเล ซึ่งมีปริมาณขยะพลาสติกที่ทิ้งลงทะเลมากถึง 8 ล้านตันต่อปี ก่อให้เกิดกระแสเรียกร้องการควบคุมพลาสติกที่ใช้แล้วทิ้งมากขึ้นทั่วโลก พลาสติกชีวภาพจึงมีบทบาทในปัจจุบันมากขึ้น (ที่มา National geographic, <https://www.nationalgeographic.com>, accessed on February 13, 2015)

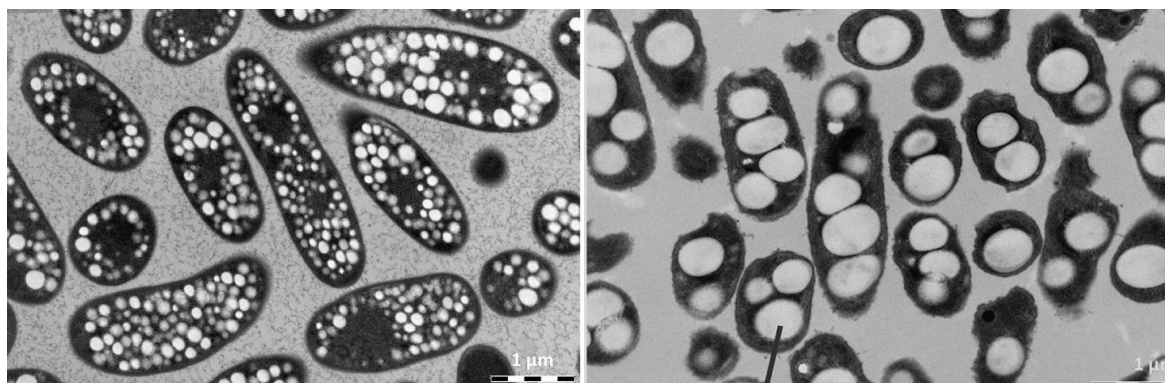
พลาสติกชีวภาพสามารถย่อยสลายได้จากกระบวนการต่าง ๆ สามารถแบ่งได้เป็น 5 ประเภทได้แก่ การย่อยสลายโดยใช้แสง (photodegradation) การย่อยสลายทางกล (mechanical degradation) การย่อยสลายผ่านปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidative degradation) การย่อยสลายผ่านปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolytic degradation) และการย่อยสลายทางชีวภาพ (biodegradation) ซึ่งเป็นกระบวนการที่มีความสำคัญมากที่สุดในการพัฒนาอุตสาหกรรมพลาสติกชีวภาพ

การย่อยสลายทางชีวภาพถือว่าเป็นกระบวนการที่มีความสำคัญ เป็นกระบวนการย่อยสลายของพอลิเมอร์ต่าง ๆ จากการทำงานของเอนไซม์ในจุลินทรีย์ที่ประกอบไปด้วย 2 ขั้นตอนหลัก ซึ่งขึ้นอยู่กับขนาดของพอลิเมอร์ โดยทั่วไปแล้วพอลิเมอร์มักมีขนาดใหญ่และไม่ละลายน้ำ ในขั้นตอนแรกของการย่อยสลายจึงเกิดขึ้นภายนอกเซลล์ (extracellular biodegradation) จุลินทรีย์จะปล่อยเอนไซม์ 2 ชนิด ได้แก่ เอนไซม์ที่ทำให้เกิดการแตกหักของพันธะในสายพอลิเมอร์อย่างไม่เป็นระเบียบ (endo-enzyme) และ เอนไซม์ที่ทำให้เกิดการแตกหักของพันธะที่ละลายจากหน่วยซ้ำที่เล็กที่สุดที่อยู่บริเวณปลายพอลิเมอร์ (exo-enzyme) หลังจาก

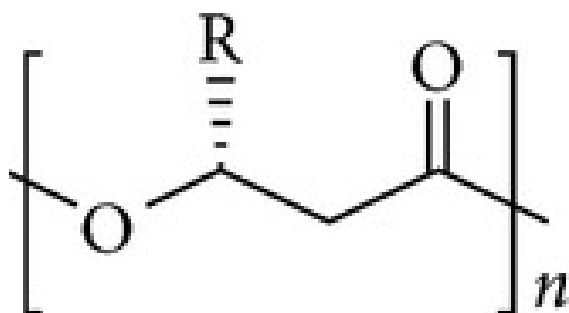
กระบวนการย่อยสลายโดยเอนไซม์ทั้งสองชนิด พอลิเมอร์จะแตกตัวจนมีขนาดเล็กพอที่จะแพร่ผ่านเข้าไปในเซลล์ของจุลินทรีย์ หลังจากนั้นจะเกิดการย่อยสลายภายในเซลล์ (intracellular biodegradation) ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายคือ พลังงานและสารประกอบขนาดเล็กที่เสถียรในธรรมชาติ เช่น น้ำ เกลือ แร่ธาตุต่าง ๆ แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ และชีวมวล (ที่มา national metal and materials technology center, https://www2.mtec.or.th/th/special/biodegradable_plastic/type_de_plas.html, accessed on, April 20, 2020)

พลาสติกชีวภาพชนิดพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต (polyhydroxyalkanoate, PHAs) นับเป็นพลาสติกชีวภาพชนิดหนึ่งที่มีกระบวนการผลิตและย่อยสลายที่ไม่ก่อสารพิษต่อสิ่งแวดล้อม สามารถสังเคราะห์ได้โดยจุลินทรีย์ในสภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนมากเกินไปในขณะที่สารอาหารชนิดอื่นเช่น ไนโตรเจน (N) ฟอสฟอรัส (P) แมกนีเซียม (Mg) หรือ ซัลเฟอร์ (S) มีปริมาณจำกัด จุลินทรีย์สามารถสะสม PHAs ไว้ภายในเซลล์เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานและคาร์บอนได้ในภาวะเครียดหรือภาวะที่เซลล์ขาดสารอาหารในรูปของพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอตแกรนูล (PHAs granule) (Chanprateep, 2010) จำนวนและขนาดของ PHAs แกรนูลในหนึ่งเซลล์จะมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ สามารถตรวจสอบ PHA granule ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscopes) ลักษณะที่แตกต่างกันนี้มีผลมาจากชนิดของยีนชีวสังเคราะห์ PHAs (Stanislav และคณะ, 2020) จุลินทรีย์จึงสามารถสังเคราะห์ PHAs แกรนูล ที่มีขนาดต่างกัน เช่น ขนาด PHAs แกรนูล ของ *Halomonas hydrothermalis* มีขนาดเล็กกว่า PHAs แกรนูล ของ *Cupriavidus necator* H16 แสดงดังรูปที่ 1.1

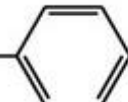
โครงสร้างของ PHAs จัดเป็นพอลิเอสเทอร์สายตรง ประกอบด้วยอะตอมคาร์บอน (C) ออกซิเจน (O) และ ไฮโดรเจน (H) โดยมีสูตรโครงสร้างทั่วไปและโครงสร้างที่แตกต่างกันออกไปตามชนิดของหมู่ R (Anupama และคณะ, 2013) แสดงดังรูปที่ 1.2 PHAs เป็นสายพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยมอนอเมอร์ชนิดเดียวกันต่อกันแบบหัวต่อหางและเชื่อมกันด้วยพันธะเอสเทอร์ระหว่างหมู่คาร์บอกซิลิกของมอนอเมอร์ตัวที่หนึ่งกับหมู่ไฮดรอกซีของมอนอเมอร์ตัวถัดไป การจำแนกชนิดของ PHAs ตามองค์ประกอบทางเคมีของมอนอเมอร์ (Luengo และคณะ, 2003) มี 3 ประเภทได้แก่ พอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยมอนอเมอร์ที่มีอนุพันธ์ของกรดไขมันอะโรมาติก พอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยมอนอเมอร์ที่มีอนุพันธ์ของกรดไขมันแบบอะลิฟาติกและแบบอะโรมาติก และ พอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยมอนอเมอร์ที่มีสารประกอบอื่น เช่น พอลิแกมมากลูตามิก แอซิด (poly- γ -glutamic-acid) แสดงดังรูปที่ 1.3 นอกจากนี้ยังสามารถจำแนกชนิด PHAs ตามจำนวนคาร์บอนอะตอมในหน่วยมอนอเมอร์ (Lee และคณะ, 1996) ซึ่งวิธีนี้เป็นที่นิยมมากที่สุดในการเรียกชนิด PHAs สามารถจำแนกได้ 3 ชนิด ได้แก่ PHAs สายสั้น (short-chain-length PHA, scl-PHA) PHAs สายปานกลาง (medium-chain-length PHA, mcl-PHA) และ PHAs สายยาว (long-chain-length PHA, lcl-PHA) โดยมีจำนวนหน่วยมอนอเมอร์ที่ประกอบด้วยคาร์บอน 3-5 อะตอม 6-14 อะตอม และ มากกว่า 14 อะตอม ตามลำดับแสดงดังตารางที่ 1.1

(ก) *H. hydrothermalis*(ข) *C. necator* H16

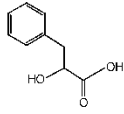
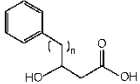
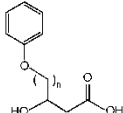
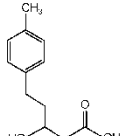
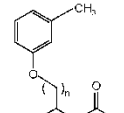
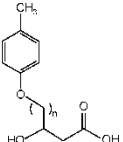
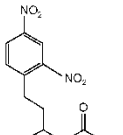
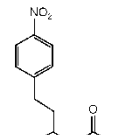
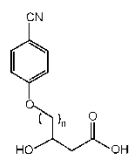
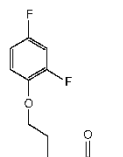
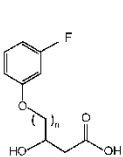
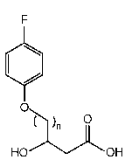
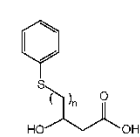
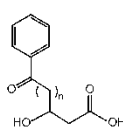
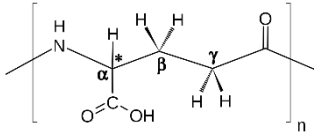
รูปที่ 1.1 เปรียบเทียบ PHAs แกรนูล เมื่อตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ของ *H. hydrothermalis* (ก) *C. necator* H16 (ข) (Stanislav และคณะ, 2020)



โครงสร้างทั่วไปของพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต

R group		
$-\text{CH}_3$	Poly(3-hydroxyalkanoates)	PHA
$-\text{CH}_2-\text{CH}_3$	Poly(3-hydroxyvalerate)	PHV
$-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}_3$	Poly(3-hydroxyhexanoate)	PHHex
$-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}_3$	Poly(3-hydroxyoctanoate)	PHO
$-(\text{CH}_2)_6-\text{CH}_3$	Poly(3-hydroxydecanoate)	PHD
$-\text{CH}_2-$ 	Poly(3-hydroxy-5-phenylvalerate)	PHPV

รูปที่ 1.2 โครงสร้างทางเคมีของ PHA (Anupama และคณะ, 2013)

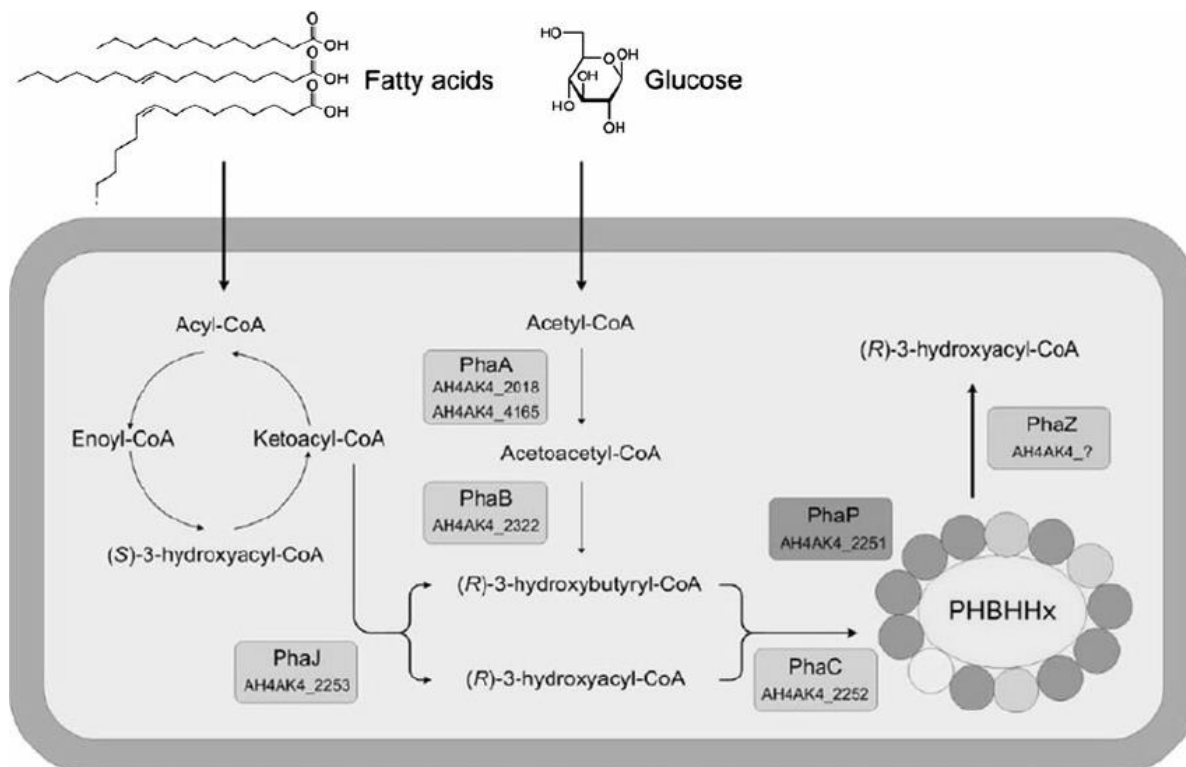
<p>1. Phenyl group</p>  <p>2-hydroxy-3-phenylpropionate (2H3PhP)</p>  <p>n=0; 3-hydroxy-3-phenylpropionate (3H3PhP) n=1; 3-hydroxy-4-phenylbutyrate (3H4PhB) n=2; 3-hydroxy-5-phenylvalerate (3H5PhV) n=3; 3-hydroxy-6-phenylhexanoate (3H6PhHx) n=4; 3-hydroxy-7-phenylheptanoate (3H7PhHp) n=5; 3-hydroxy-8-phenyloctanoate (3H8PhO) n=7; 3-hydroxy-10-phenyldecanoate (3H10PhD)</p>	<p>2. Phenoxy group</p>  <p>n=1; 3-hydroxy-4-phenoxybutyrate (3H4PxB) n=2; 3-hydroxy-5-phenoxyvalerate (3H5PxV) n=3; 3-hydroxy-6-phenoxyhexanoate (3H6PxHx) n=4; 3-hydroxy-7-phenoxyheptanoate (3H7PxHp) n=5; 3-hydroxy-8-phenoxyoctanoate (3H8PxO) n=6; 3-hydroxy-9-phenoxynonanoate (3H9PxN)</p>	<p>3. Methylphenyl group</p>  <p>3-hydroxy-5-(<i>para</i>-methylphenyl)valerate (3H5pMPxV)</p>
<p>4. Methylphenoxy group</p>  <p>n=1; 3-hydroxy-4-(<i>meta</i>-methylphenoxy)butyrate (3H4mMPxB) n=3; 3-hydroxy-6-(<i>meta</i>-methylphenoxy)hexanoate (3H6mMPxHx)</p>  <p>n=1; 3-hydroxy-4-(<i>para</i>-methylphenoxy)butyrate (3H4pMPxB) n=3; 3-hydroxy-6-(<i>para</i>-methylphenoxy)hexanoate (3H6pMPxHx) n=5; 3-hydroxy-8-(<i>para</i>-methylphenoxy)octanoate (3H8pMPxO)</p>	<p>5. Nitrophenyl group</p>  <p>3-hydroxy-5-(<i>ortho,para</i>-dinitrophenyl)valerate (3H5opNPxV)</p>  <p>3-hydroxy-5-(<i>para</i>-nitrophenyl)valerate (3H5pNPxV)</p>	
<p>6. Cyanophenoxy group</p>  <p>n=2; 3-hydroxy-5-(<i>para</i>-cyanophenoxy)valerate (3H5pCPxV) n=3; 3-hydroxy-6-(<i>para</i>-cyanophenoxy)hexanoate (3H6pCPxHx)</p>	<p>7. Fluorophenoxy group</p>  <p>3-hydroxy-5-(<i>ortho,para</i>-difluorophenoxy)valerate (3H5opFPxV)</p>  <p>n=2; 3-hydroxy-5-(<i>meta</i>-fluorophenoxy)valerate (3H5mFPxV) n=4; 3-hydroxy-7-(<i>meta</i>-fluorophenoxy)heptanoate (3H7mFPxHp)</p>  <p>n=2; 3-hydroxy-5-(<i>para</i>-fluorophenoxy)valerate (3H5pFPxV) n=4; 3-hydroxy-7-(<i>para</i>-fluorophenoxy)heptanoate (3H7pFPxHp)</p>	
<p>8. Thiophenoxy group</p>  <p>n=2; 3-hydroxy-5-(thiophenoxy)valerate (3H5TPxV) n=4; 3-hydroxy-7-(thiophenoxy)heptanoate (3H7TPxHp)</p>	<p>9. Benzoyl group</p>  <p>n=1; 3-hydroxy-4-benzoylbutyrate (3H4BzB) n=2; 3-hydroxy-5-benzoylvalerate (3H5BzV) n=3; 3-hydroxy-6-benzoylhexanoate (3H6BzHx) n=4; 3-hydroxy-7-benzoylheptanoate (3H7BzHp) n=5; 3-hydroxy-8-benzoyloctanoate (3H8BzO)</p>	<p>10. Others</p>  <p>poly-γ-glutamic acid</p>

รูปที่ 1.3 การจำแนกชนิดของ PHAs ตามองค์ประกอบทางเคมีของมอนอเมอร์ (Luengso และคณะ, 2003)
PHAs ที่ประกอบด้วยมอนอเมอร์ที่มีอนุพันธ์ของกรดไขมันแบบเบบอะลิฟาติกและอะโรมาติก (1-9)
(Manami และคณะ, 2018) และ PHAs ที่ประกอบด้วยมอนอเมอร์ที่มีสารประกอบอื่น (10)

ตารางที่ 1.1 การจำแนกชนิด PHAs ตามจำนวนคาร์บอนอะตอมในหน่วยมอนอเมอร์ (Lee และคณะ, 1996)

ชนิด PHAs	จำนวนคาร์บอนอะตอม(C)	ตัวอย่าง PHAs
short-chain-length PHA	3-5C	PHB, PHV
medium-chain-length PHA	6-14C	PHHex, PHO, PHD
long-chain-length PHA	มากกว่า 14C	Poly(3-hydroxyhexadecanoate)

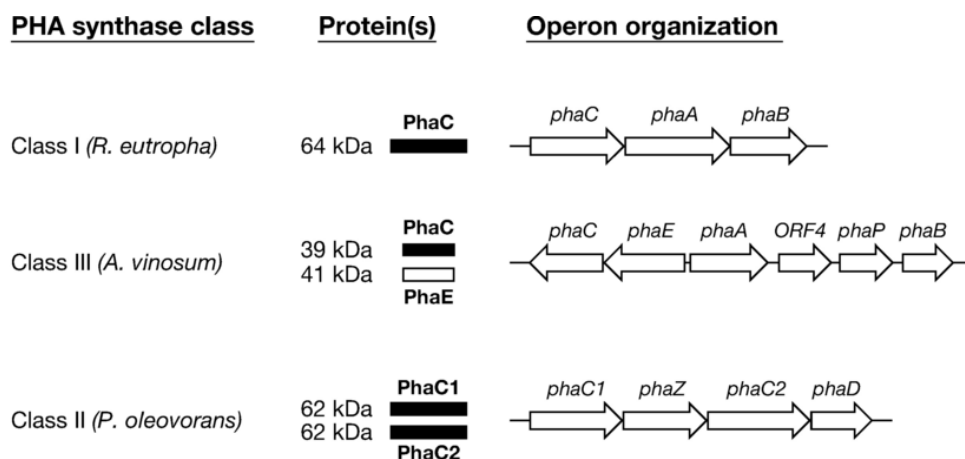
การผลิต PHAs ของแบคทีเรียผ่านวิถี PHA synthesis ประกอบไปด้วยเอนไซม์หลัก 3 ชนิดทำหน้าที่เปลี่ยน acetyl-coA เป็น acetoacetyl-coA จากนั้นเปลี่ยนเป็น 3-hydroxybutyryl-coA และได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายคือ PHAs ได้แก่ β -ketothiolase, acetoacetyl-coA reductase และ PHA synthase จากการยีน *phaA phaB* และ *phaC* ตามลำดับ (Keiji และคณะ, 2013) ส่วนการย่อยสลาย PHAs ของแบคทีเรียจะใช้เอนไซม์ PHA depolymerase จากการยีน *phaZ* (Doh และคณะ, 2007) แสดงดังรูปที่ 1.4



รูปที่ 1.4 แสดงวิถีการสังเคราะห์ scl/mcl PHA จากกลูโคสและกรดไขมัน (Xue และคณะ, 2013)

(*PhaA*, β -ketothiolase; *PhaB*, acetoacetyl-coenzyme A reductase; *PhaC*, PHA synthase; *FabG*, 3-ketoacyl acyl carrier protein (ACP) reductase; *PhaJ*, enoyl-coenzyme A hydratase)

กลุ่มยีนชีวสังเคราะห์ PHAs มักอยู่รวมกันเป็นกลุ่มยีนหรือที่เรียกว่า PHA operon organization (Joanne Stubbe และคณะ, 2005) ประกอบไปด้วย *phaA phaB* และ *phaC* เป็นยีนหลักในวิถีสังเคราะห์ PHAs โดยมี acetyl-CoA เป็นสารตัวกลางที่ได้จากวิถีสร้างพลังงานของเซลล์ผ่านกระบวนการ glycolysis และ pyruvate decarboxylation แบคทีเรียแต่ละชนิดจะมีการจัดเรียงกันและทิศทางการแสดงออกของยีนทั้งสามแตกต่างกัน ยกตัวอย่างเช่น *R. eutropha* มียีนทั้งสามเรียงกันโดยเริ่มจาก *phaC phaA* และ *phaB* ตามลำดับ มีทิศทางแสดงออกในทิศทางเดียวกัน *A. vinosum* มียีนเรียงกันโดยเริ่มจาก *phaC phaE phaA phaP* และ *phaB* ตามลำดับโดยมีทิศทางแสดงออกที่แตกต่างกันแสดงดังรูปที่ 1.5



รูปที่ 1.5 PHA synthase และ PHA operon organization (Joanne. และคณะ, 2005)

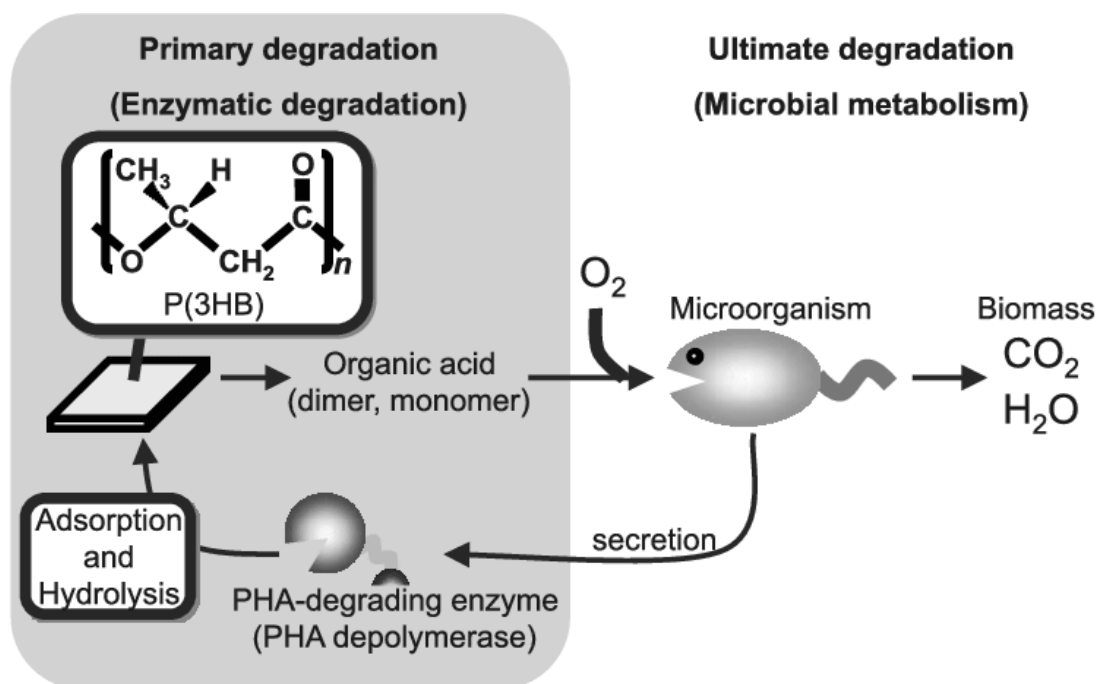
PHA synthase (PhaC) จากยีน *phaC* ทำหน้าที่ผลิต PHAs โดยมีทั้งหมด 4 ชนิด (Rehm, 2003) แบคทีเรียแต่ละชนิดจะมี PHA synthase ที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับการจัดเรียงกันของยีนและลำดับเบสบนยีน *phaC* ยกตัวอย่างเช่น PHA synthase class I (PhaC I) พบได้ใน *R. eutropha* ถูกถอดรหัสจากยีน *phaC* มีขนาดประมาณ 61-73 kDa สามารถผลิต scl-PHA ความยาวคาร์บอน 3-5 อะตอม PHA synthase class II (PhaC II) พบได้ใน *P. aeruginosa* ถูกถอดรหัสจากยีน *phaC* ขนาดประมาณ 60-65 kDa สามารถผลิต mcl-PHA ความยาวคาร์บอน 6-14 อะตอม PHA synthase class III (PhaC III) พบได้ใน *A. vinosum* ถูกถอดรหัสจากยีน *phaC* และ *phaE* ขนาดประมาณ 40 kDa สามารถผลิต scl-PHA ความยาวคาร์บอน 3-5 อะตอม ในขณะที่ PHA synthase class IV (PhaC IV) พบได้ในกลุ่ม *Bacillus* sp. เป็นส่วนใหญ่ ถูกถอดรหัสจากยีน *phaC* และ *phaR* ขนาดประมาณ 40 kDa และ 22 kDa ตามลำดับ สามารถผลิต scl-PHA ความยาวคาร์บอน 3-5 อะตอม รูปแบบที่ต่างกันของ PHA synthase แต่ละชนิดนี้ทำให้คุณสมบัติในการสังเคราะห์ PHAs แตกต่างกันไปเช่น ขนาด ความยาว และชนิดมอนอเมอร์ในการสังเคราะห์ PHAs (Quillaguamán และคณะ, 2010) แสดงดังตารางที่ 1.2

การย่อยสลาย PHAs ของจุลินทรีย์โดยใช้เอนไซม์ PHA depolymerase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ถูกถอดรหัสจากยีน *phaZ* ยีนชนิดนี้จะจัดอยู่ใน PHA operon organization จึงทำให้ในแต่ละแบคทีเรียมียีนชนิดนี้ในบริเวณที่ต่างกัน นอกจากนี้ยังสามารถจัด PHA depolymerase เป็นเอนไซม์ชนิดที่ใช้ภายในเซลล์ และภายนอกเซลล์ (Keiji และคณะ, 2008) โดยขึ้นอยู่กับรูปแบบของปฏิกิริยาต่อ PHAs แบคทีเรียจะย่อยสลาย PHAs ที่สะสมภายในเซลล์เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานแก่แบคทีเรียในการเจริญเติบโต โดยมีความสัมพันธ์กับการสังเคราะห์ PHAs ของเอนไซม์ PHA synthase ที่ทำหน้าที่สร้าง PHAs granule จากนั้น PHA depolymerase จะทำหน้าที่สลาย PHAs ที่สะสมไว้เพื่อเป็นพลังงานแก่เซลล์ การทำงานของ PHA depolymerase จะไฮโดรไลซ์ในส่วนของ amorphous ก่อน จากนั้นจึงเข้าจับ crystalline (Organ และ Barham, 1988) โดยทำหน้าที่สลายพันธะเอสเทอร์ของ PHAs นอกจากนี้ยังสามารถหลั่งเอนไซม์ PHA depolymerase ออกสู่ภายนอกเซลล์เพื่อย่อยสลาย PHAs และดูดซึมผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการสร้างพลังงานและชีวมวลของเซลล์แสดงดังรูปที่ 1.6

ตารางที่ 1.2 การจัดจำแนกคุณสมบัติของ PHA synthase ชั้นต่าง ๆ (Quillaguamán และคณะ, 2010)

Class	Subunits	Molecular weight	Example	Substrate	Properties of PHA
I	PhaC	61-73 kDa	<i>R. eutropha</i>	3/4/5HA 3-5C	500-5,000 kDa
II	PhaC	60-65 kDa	<i>P. aeruginosa</i>	4/5HA + 3HA + 3HB 6-14C	50-500 kDa
III	PhaC PhaE	40 kDa 40 kDa	<i>Allochromatum violosum</i>	3/4/5HA 3-5C + 3HA 6-8C	molecular mass lies between I and II
IV	PhaC PhaR	40 kDa 22 kDa	<i>B. megaterium</i>	3HA 3-5C	no data available

3/4/5HA 3-, 4- or 5-hydroxyalkanoate respectively; #C describes the chain length of the monomers (number of C atoms)



รูปที่ 1.6 Primary degradation และ Ultimate degradation ของแบคทีเรียในการย่อยสลาย PHAs ด้วยเอนไซม์ PHA depolymerase (Keiji และคณะ, 2008)

ดินเป็นแหล่งธรรมชาติที่มีความอุดมสมบูรณ์และมีความสำคัญในการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการสังเคราะห์ PHAs (Boyandin และคณะ, 2012) โดยปกติแล้วแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสลาย PHAs ได้มักจะผลิต PHAs ได้เช่นกัน และงานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยต่อเนื่องจากการคัดแยกเชื้อที่มีคุณสมบัติในการย่อยสลาย PHAs จากดิน (ปวันรัตน์ ชัยศรี, 2018) ที่ได้นำแผ่น PHB ฝังลงในดินและเมื่อเวลาผ่านไป น้ำหนักของแผ่น PHB มีน้ำหนักลดลง จึงคาดว่าจุลินทรีย์ในดินมีความสามารถในการย่อยสลาย PHB ซึ่งเป็นมอนอเมอร์ของ PHAs และระบุชนิดของเชื้อแบคทีเรียตัวอย่าง งานวิจัยนี้จึงนำความเกี่ยวข้องของการผลิตและย่อยสลาย PHAs มาตรวจสอบด้วยวิธีการทางจุลชีววิทยาและอณูพันธุศาสตร์ ในการตรวจสอบการมีอยู่ของกลุ่มยีนและโปรตีนชีวสังเคราะห์ PHAs ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ

งานวิจัยชิ้นนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อระบุลักษณะคุณสมบัติของแบคทีเรียที่ผลิตพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอตและยีนชีวสังเคราะห์ PHAs

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ก. ในด้านความรู้และประสบการณ์

ทราบถึงขั้นตอนในการระบุชนิดของแบคทีเรียและตรวจสอบการการมีอยู่ของกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต โดยใช้เทคนิคทางจุลชีววิทยาและอณูพันธุศาสตร์ เข้าใจกลไกในการสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต มีความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับพลาสติกชีวภาพ ฝึกคิด และ วิเคราะห์ปัญหาโดยอาศัยกระบวนการทางวิทยาศาสตร์ เสริมประสบการณ์ในการทำงานในห้องปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์ ตลอดจนการเข้าถึงและวิเคราะห์ชุดข้อมูลทางชีวภาพอย่างเป็นระบบ และสามารถนำไปต่อยอดได้ในอนาคต

ข. ความรู้ ความเข้าใจที่นำไปสู่การแก้ปัญหาของสังคมหรือสภาพแวดล้อม

สามารถนำความรู้ที่ได้จากการระบุชนิดของแบคทีเรียและวิเคราะห์คุณสมบัติของจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต มาเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตพลาสติกชีวภาพ ทำให้ต้นทุนการผลิตต่ำลง และนำพลาสติกชีวภาพมาใช้ในอนาคตมากขึ้น

บทที่ 2

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย

2.1 อุปกรณ์

1. เครื่องผสมสาร (vortex mixer) รุ่น G-560E ของบริษัท Science Industries, Inc, New York, USA
2. ขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask) ของบริษัท Pyrex, New York, USA
3. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น SS-325 และรุ่น ES-215 ของบริษัท Tomy Seiko, Ltd., Tokyo, Japan
4. กระบอกตวง (cylinder) ของบริษัท Pyrex, New York, USA
5. เครื่องชั่งหยาบ (laboratory balance) รุ่น PG 2002-S และรุ่น PG 6002-S ของบริษัท Mettler Toledo Co. Ltd., Switzerland
6. เครื่องชั่งละเอียด (analytical balance) รุ่น AG 204 และรุ่น PG 285 ของบริษัท Mettler Toledo Co. Ltd., Switzerland
7. เครื่อง Thermal cycler รุ่น T100 ของบริษัท Bio-Rad Laboratories, Inc., California, USA
8. เครื่องให้กำเนิดแสง (BluPAD Dual LED Blue/White Light Transilluminator) ของบริษัท bio-helix Co., Ltd, Keelung, Taiwan
9. จานเลี้ยงเพาะเชื้อ (petri dish) ของบริษัท Pyrex, New York, USA
10. ชุดเครื่องมืออะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis)
 - 10.1. Mini gel electrophoresis system ของบริษัท Bio-Rad Laboratories, Inc., California, USA
 - 10.2. Electrophoresis complete system ของบริษัท Bio-Rad Laboratories, Inc., California, USA
11. ตู้ถ่ายเชื้อแบบ laminar flow ISSO รุ่น BV-124 ของบริษัท International Scientific Supply Co. Ltd., Bangkok, Thailand
12. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) -20 องศาเซลเซียส ของบริษัท SANYO Electric Co., Ltd. Osaka, Japan
13. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ของบริษัท Thermo Fisher Scientific, Inc., Massachusetts, USA
14. ตู้บ่มเชื้อแบบควบคุมอุณหภูมิ (incubator) รุ่น D06062 ของบริษัท Kubota Co., Osaka, Japan
15. ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ของบริษัท Mitsubishi Electric Co., Tokyo, Japan
16. ตู้อบแห้ง (hot air oven) ของบริษัท Memmert GmbH + Co.KG, Schwabach, Germany
17. ปีกเกอร์ (beaker) ของบริษัท Pyrex, New York, USA
18. ไมโครปิเปต (micropipette) รุ่น P2, P20, P200 และ P1000 ของบริษัท Gilson, Inc., Wisconsin, USA
19. หลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ (microcentrifuge tube) ของบริษัท Sigma-Aldrich, Inc., Missouri, USA
20. หลอดทดลอง (tube) ของบริษัท Pyrex, New York, USA
21. หลอดเก็บเชื้อแช่แข็ง (cryotube) ของบริษัท Thermo Fisher Scientific, Inc., Massachusetts, USA

2.2 เคมีภัณฑ์

1. กลูโคส (glucose; $C_6H_{12}O_6$) ของบริษัท Sigma Chemical Co., USA
2. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท Merck KGaA, Darmstadt, Germany
3. กลีเซอรอล ($C_3H_8O_3$) ของบริษัท Merck KGaA, Darmstadt, Germany
4. ทริปโทน (tryptone) ของบริษัท Merck KGaA, Darmstadt, Germany
5. วุ้นผง (agar) ของบริษัท Productora de agar S.A., Llanquihue, Chile
6. สารสกัดจากเนื้อ (beef extract) ของบริษัท Labscan Asia Co., Ltd., Ireland
7. สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท BioSpringer, Wisconsin, USA
8. อะกาโรสเจล (agarose gel) ของบริษัท ABgene, Inc, Cheshire, UK
9. แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)SO_4$) ของบริษัท Merck, Darmstadt, Germany
10. Kod One™ taq polymerase ของบริษัท Toyobo Co., Ltd., Osaka, Japan

2.3 แบคทีเรีย การเจริญ และการเก็บรักษา

2.3.1 แบคทีเรีย

แบคทีเรียทั้งหมดที่ใช้ในงานวิจัยนี้ถูกคัดแยกจากงานวิจัย การคัดแยกเชื้อที่มีคุณสมบัติในการย่อยสลาย PHAs จากดิน (ปวันรัตน์ ชัยศรี, 2019) ได้แก่ SG1 SG2 SG3 SG4 SG5 SG6 SG7 และ SG8

2.3.2 การเจริญ

นำเชื้อแบคทีเรีย SG1 ถึง SG8 ที่เก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสในครั้งแรก มาชิตบนอาหารแข็ง Luria-Bertani (LB) (ภาคผนวก ก1) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นตั้งชื่อใหม่เป็น TSG1 TSG2 TSG3 TSG4 TSG5 TSG6 TSG7 และ TSG8

2.3.3 การเก็บรักษาแบคทีเรีย

เสียบเชื้อไอโซเลทที่บริสุทธิ์ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Luria-Bertani (LB) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส $1-2$ วัน จากนั้นนำมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และนำโคโลนีเดี่ยวเขี่ยลงอาหาร ใหม่ทุก ๆ $1-2$ สัปดาห์

2.4 การจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียด้วยวิธีวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16s rDNA

นำโคโลนีบริสุทธิ์ที่ได้จากข้อ 2.3 มาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน 16s rDNA โดยใช้วิธี colony-PCR และใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับบริเวณ 16s rDNA แล้วตรวจสอบผลด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส และส่งตัวอย่างวิเคราะห์หาลำดับเบส

2.4.1 การสกัด DNA จากแบคทีเรียด้วยวิธี Colony PCR

นำโคลนที่บริสุทธิ์จำนวน 1 ลูกของแบคทีเรียทั้ง 8 ตัวอย่างใส่ลงในแต่ละหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ที่มี Tris-EDTA (TE) buffer 20 ไมโครลิตร จำนวน 8 หลอด กระจายตะกอนเซลล์ให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำไปต้มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 10 นาที

2.4.2 การเพิ่มจำนวน DNA บริเวณ 16S rDNA

เพิ่มจำนวน DNA บริเวณ 16S rDNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส (polymerase chain reaction, PCR) ในหลอดปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส โดยใช้ไพรเมอร์ 27F และ 1492R ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์แสดงในตารางที่ 2.1 เกิดผลิตภัณฑ์ PCR ขนาดประมาณ 1,500 bp องค์ประกอบของสารต่าง ๆ ในปฏิกิริยาแสดงในตารางที่ 2.2 ดำเนินปฏิกิริยาด้วยเครื่อง Thermal cycler ตามสถานะแสดงในตารางที่ 2.3 จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR เกิดขึ้นด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้ความเข้มข้นเจลร้อยละ 0.5 และผลิตภัณฑ์ PCR 2 ไมโครลิตรผสมกับสีติดตาม 1 ไมโครลิตร เปรียบเทียบกับสารละลาย DNA มาตรฐาน VC 1kb DNA Ladder

ตารางที่ 2.1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16s rDNA

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')	ขนาดผลิตภัณฑ์ PCR (bp)	อ้างอิง
ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA			
27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	~1,500	Lane, 1991
1492R	GGTTACCTGTTACGACTT		

ตารางที่ 2.2 องค์ประกอบของสารในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส (ปริมาตรสุดท้าย 20 ไมโครลิตร)

สาร	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้ายของสาร
น้ำปราศจากเชื้อ (DI Type I)	9.54	
KOD One™ PCR Master Mix	10	1 เท่า
10 ไมโครโมลาร์ ไพรเมอร์	0.4	ชนิดละ 0.2 ไมโครโมลาร์
DNA แม่แบบ	0.06	

ตารางที่ 2.3 สถานะที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (วินาที)	จำนวนรอบ
Initial activation	98	300	1
Denaturation	98	10	
Annealing	52	30	35
Extension	68	12	
Final Extension	72	180	1

2.4.3 อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis)

เตรียมอะกาโรสเจลโดยชั่งผงอะกาโรส 0.5 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตร สำหรับเตรียมเจล เดิมบัฟเฟอร์ 1X TAE ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ละลายเจลด้วยไมโครเวฟจนกระทั่งผงเจลละลายหมด เทลงในถาดสำหรับขึ้นรูปเจล รอจนกระทั่งเจลแข็งตัวในอุณหภูมิห้องประมาณ 15-30 นาที จากนั้นวางอะกาโรสเจลลงในแชมเบอร์ของเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส เดิมบัฟเฟอร์ 1X loading buffer และใช้ VC 1kb DNA Ladder เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน จากนั้นทำอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้กระแสไฟฟ้า 120 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที และนำเจลไปส่องในเครื่องให้กำเนิดแสง Blue/White Light Transilluminator

2.4.4 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA

นำลำดับเบสที่ได้จากข้อ 2.4.2 มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA โดยส่งบริษัท U2bio ประเทศเกาหลี เพื่อทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์และวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้ไพรเมอร์ 27F และ 1492R หลังจากนั้นตรวจสอบคุณภาพลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้โปรแกรม Chromas Pro 2.1.8 เปรียบเทียบคุณภาพของแต่ละสาย และรวมส่วนที่มีคุณภาพสูงให้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์สายเดียว นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์และเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลนิวคลีโอไทด์ ใน GenBank ด้วยโปรแกรม BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) และเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียโอโซเลท SG1 SG2 SG3 SG4 SG5 SG6 SG7 และ SG8 จากงานวิจัยของนางสาว ปวันรัตน์ ชัยศรี

2.4.5 วิเคราะห์ต้นไม้วิวัฒนาการ phylogenetic tree

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ที่ผ่านการวิเคราะห์จากข้อ 2.4.4 และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของแบคทีเรียที่คัดเลือกไว้ เปรียบเทียบความเหมือนของสายนิวคลีโอไทด์ด้วยฟังก์ชัน multiple alignment โดยใช้โปรแกรม Clustal W จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาคำนวณ distance matrix สร้าง phylogenetic tree ด้วยการวิเคราะห์แบบ Neighbor-joining และ Bootstrap จำนวน 1,000 ซ้ำ โดยใช้โปรแกรม MEGA-X version 10.1.7

2.5 ตรวจสอบยีนและโปรตีนในกระบวนการชีวสังเคราะห์ PHAs จากฐานข้อมูลจีโนม

ค้นหาจีโนมของเชื้อแบคทีเรียที่ระบุชนิดได้ในฐานข้อมูล หลังจากนั้นตรวจสอบกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการชีวสังเคราะห์ PHAs ได้แก่ *phaA phaB phaC phaJ* และ *fabG* และยีนในกระบวนการย่อยสลาย PHAs ได้แก่ *phaZ* ค้นหางานวิจัยที่รายงานการผลิต PHA ของเชื้อแบคทีเรียที่ระบุชนิดได้ หลังจากนั้นออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนชีวสังเคราะห์ PHAs และยีนย่อยสลาย PHAs

2.5.1 จีโนมของแบคทีเรียที่ระบุชนิดได้

ค้นหาจีโนมของแบคทีเรียที่ระบุชนิดได้จากผลวิเคราะห์ต้นไม้วิวัฒนาการ ในฐานข้อมูล GenBank ระบุชนิดการค้นหาจาก Genome (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>) จากนั้น

ตรวจ สอบคุณภาพของจีโนมในฐานะข้อมูลจากรายงานจีโนม เลือกจีโนมของแบคทีเรียจากคุณภาพ (quality) ระดับการรวม (assembly level) และความน่าเชื่อถือของข้อมูล

2.5.2 กลุ่มยีนและโปรตีนในกระบวนการชีวสังเคราะห์ PHAs

ค้นหาที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการชีวสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต จากจีโนมที่ถูกคัดเลือกจากข้อ 2.5.1 จากนั้นค้นหาโปรตีนของจีโนมนั้น จากฟังก์ชันค้นหาโปรตีนที่สามารถแสดงออกได้ (protein coding genes, CDS) โดยค้นหาด้วยชื่อยีนและโปรตีนแสดงดังตารางที่ 2.4

ค้นหาโดยใช้ลำดับกรดอะมิโนอ้างอิงของโปรตีนในกระบวนการชีวสังเคราะห์ PHAs เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนที่สามารถถอดรหัสได้จากยีนและโปรตีนในฐานะข้อมูลจีโนมของแต่ละไอโซเลทโดยใช้โปรแกรม tBLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/tBlastn>) และ BLASTp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blastp>) ตามลำดับ ค้นหาบริเวณอนุรักษ์ของยีนโดยใช้ NCBI conserved domain (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd>)

ตารางที่ 2.4 ยีนและโปรตีนที่ใช้ค้นหาในฐานะข้อมูลจีโนม

ยีน	โปรตีน
<i>phaA</i>	acetyl-CoA acetyltransferase (PhaA)
<i>phaB</i>	acetoacetyl-CoA reductase (PhaB)
<i>phaC</i>	PHA synthase, poly(3-hydroxyalkanoate) polymerase (PhaC)
<i>phaJ</i>	(R)-specific enoyl-CoA hydratase. (PhaJ)
<i>phaZ</i>	PHA depolymerase, poly(3-hydroxyalkanoate) depolymerase (PhaZ)
<i>fabG</i>	3-ketoacyl-acyl carrier protein reductase (FabG)

แผนการดำเนินงานวิจัยในอนาคต

เนื่องจากสถานการณ์การระบาดของไวรัสโควิด-19 ในปัจจุบัน ผู้วิจัยได้วางแผนการทดลองในขั้นถัดไปดังนี้

2.5.3 ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับกลุ่มยีนชีวสังเคราะห์ PHAs

ออกแบบไพรเมอร์โดยใช้ข้อมูลจีโนมของแบคทีเรียแต่ละชนิดมาวิเคราะห์ความเหมือนและความแตกต่างกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ของกลุ่มยีนชีวสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอตโดยใช้โปรแกรม MEGA-X version 10.1.7 Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) และโปรแกรมออนไลน์ Benchling (<https://www.benchling.com/>) ออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะกับยีนในแต่ละชนิดของแบคทีเรียที่ระบุชนิดได้

2.5.4 ตรวจสอบกลุ่มยีนชีวสังเคราะห์ PHAs ของแบคทีเรียแต่ละชนิด

ตรวจสอบยีนในกลุ่มยีนชีวสังเคราะห์ PHAs ของแบคทีเรียที่ระบุชนิดได้ทั้ง 8 ตัวอย่าง โดยนำไพรเมอร์ที่ได้จากข้อ 2.5.3 มาเพิ่มจำนวน DNA ด้วยวิธี *insilico* PCR amplification โดยใช้จีโนมของแบคทีเรียแต่ละชนิดเป็นชุดทดสอบ และปรับสภาวะให้เหมาะสมกับแต่ละไพรเมอร์

2.5.5 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนชีวสังเคราะห์ PHAs

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนชีวสังเคราะห์ PHAs ที่ได้จากข้อ 2.5.4 มาวิเคราะห์และเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลนิวคลีโอไทด์ (nucleotide database, nr) ใน GenBank ด้วยโปรแกรม BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) ของ national center for biotechnology Information (NCBI) เพื่อยืนยันผลการทดลองในข้อ 2.5.3 และ 2.5.4

2.6 ตรวจสอบยีนในกระบวนการชีวสังเคราะห์ PHAs จากโคโลนีบริสุทธิ์

นำโคโลนีเดี่ยวที่ได้จากข้อ 2.3 มาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีนในกระบวนการชีวสังเคราะห์ PHAs โดยใช้วิธี colony-PCR (ขั้นตอนที่ 2.4.1) ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะแต่ละยีน ตรวจสอบผลด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 1% agarose gel จากนั้นวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้

2.6.1 การเพิ่มจำนวน DNA บริเวณยีนชีวสังเคราะห์ PHAs

เพิ่มจำนวน DNA บริเวณยีนชีวสังเคราะห์ PHAs ด้วยวิธี PCR ในหลอดปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ ดำเนินปฏิกิริยาด้วยเครื่อง thermal cycler จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR เกิดขึ้นด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้ความเข้มข้นเจลร้อยละ 1 และผลิตภัณฑ์ PCR 2 ไมโครลิตรผสมกับสีติดตาม 1 ไมโครลิตร เปรียบเทียบกับสารละลาย DNA มาตรฐาน VC 1kb DNA Ladder

2.6.2 ตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR

เตรียมอะกาโรสเจลโดยชั่งผงอะกาโรส 1.0 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตร สำหรับเตรียมเจล เติมน้ำบัฟเฟอร์ 1X TAE ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ละลายเจลด้วยไมโครเวฟจนกระทั่ง

ผงเจลละลายหมด เทลงในภาตสำหรับขึ้นรูปเจล รอจนกระทั่งเจลแข็งตัวในอุณหภูมิห้องประมาณ 15-30 นาที จากนั้นวางอะกาโรสเจลลงในแชมเบอร์ของเครื่องอิเล็กโทรโฟริซิส เต็มบัฟเฟอร์ 1X loading buffer และใช้ VC 1kb DNA Ladder เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน จากนั้นทำอิเล็กโทรโฟริซิส โดยใช้กระแสไฟฟ้า 120 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที และนำเจลไปส่องในเครื่องให้กำเนิดแสง Blue/White Light Transilluminator

2.6.3 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีนชีวสังเคราะห์ PHAs

นำลำดับเบสที่ได้จากข้อ 2.6.2 มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีนชีวสังเคราะห์ PHAs โดยส่งบริษัท U2bio ประเทศเกาหลีใต้ เพื่อทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์และวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ไพรมเมอร์จำเพาะ หลังจากนั้นตรวจสอบคุณภาพลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้โปรแกรม Chromas Pro 2.1.8 เปรียบเทียบคุณภาพของแต่ละสาย และรวมส่วนที่มีคุณภาพสูงให้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์สายเดียว นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์และเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลนิวคลีโอไทด์ใน GenBank ด้วยโปรแกรม BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) ของ national center for biotechnology Information (NCBI)



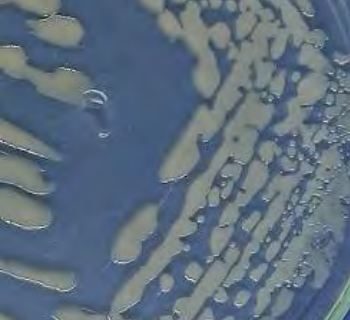

บทที่ 3

ผลการทดลอง


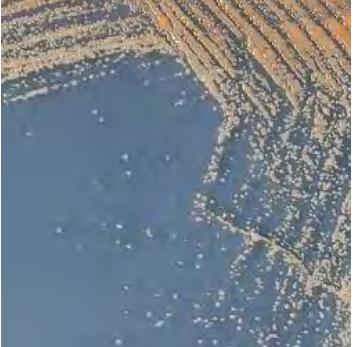

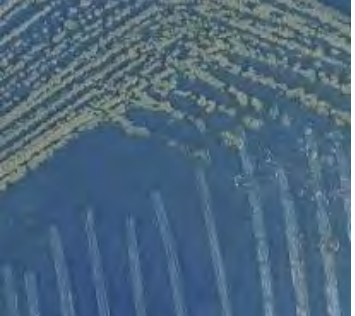
3.1 แบริ่งที่เรีย การเจริญ และลักษณะโคโลนี

ผลจากการนำแบคทีเรีย TSG1 ถึง TSG8 ที่เก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสมาชีดบนอาหารแข็ง LB จากนั้นนำไปป้อมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรียทั้ง 8 ไอโซเลทมีลักษณะโคโลนีแสดงดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียทั้ง 8 ไอโซเลท

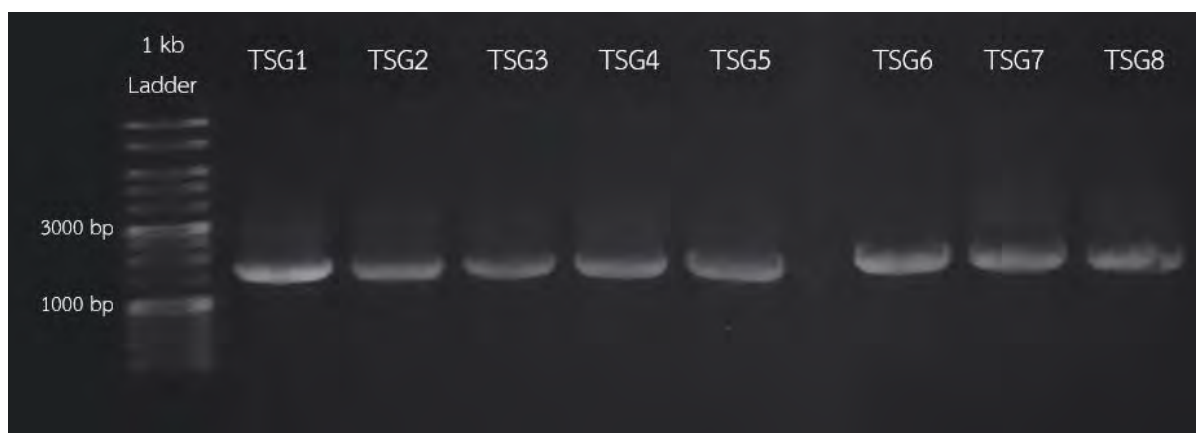
แบคทีเรีย	รูปภาพแสดงโคโลนี	ลักษณะโคโลนี
TSG1		มีลักษณะกลม ขนาดเล็ก สีเหลือง ขอบเรียบ
TSG2		มีลักษณะกลม ขนาดปานกลาง สีขาว ขอบเรียบ
TSG3		มีลักษณะกลม ขนาดใหญ่ สีขาว ขอบเรียบ
TSG4		มีลักษณะกลม ขนาดเล็ก สีขาว ขอบเรียบ

ตารางที่ 3.1 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียทั้ง 8 ไอโซเลท (ต่อ)

แบคทีเรีย	รูปภาพแสดงโคโลนี	ลักษณะโคโลนี
TSG5		มีลักษณะกลม ขนาดเล็ก สีเหลือง ขอบเรียบ
TSG6		มีลักษณะกลม ขนาดเล็ก สีส้ม ขอบเรียบ
TSG7		มีลักษณะกลม ขนาดเล็ก สีขาว ขอบเรียบ
TSG8		มีลักษณะกลม ขนาดเล็ก สีขาวอมเหลือง ขอบเรียบ

3.2 การจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียด้วยวิธีวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16s rDNA

จากการตรวจสอบยีนบริเวณ 16S rDNA ในปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ 27F และ 1492R ตรวจสอบขนาดด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ผลิตรหัสที่ได้มีขนาดประมาณ 1,500 bp แสดงดังรูปที่ 3.1 จากนั้นวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLASTn พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียทั้ง 8 ตัวอย่าง มีความคล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ โดยแสดงความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ ชนิดแบคทีเรียที่คล้ายกัน ร้อยละความเหมือน (% identity) เลขที่อ้างอิง (accession number) และความรุนแรงของเชื้อ (bio-safety level) แสดงดังตารางที่ 3.2 เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียไอโซเลท SG1 SG2 SG3 SG4 SG5 SG6 SG7 และ SG8 จากงานวิจัยของนางสาวปวันรัตน์ ชัยศรี พบว่า แบคทีเรียไอโซเลทที่ 1-6 ของกลุ่ม TSG และ SG มีความคล้ายกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่แบคทีเรียไอโซเลทที่ 7 และ 8 ของกลุ่ม TSG และ SG มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงดังตารางที่ 3.3



รูปที่ 3.1 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์ 27F และ 1492R ของแบคทีเรียทั้ง 8 ตัวอย่าง

ตารางที่ 3.2 ผลวิเคราะห์การจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16s rDNA

ไอโซเลท	ความยาว (bp)	ความคล้าย	หมายเลขเข้าถึง	% ความเหมือน	ความครอบคลุม	กลุ่มเสี่ยง*
TSG1	1383	<i>Chryseobacterium daecheongense</i> strain SNA43	HQ220101.1	98.63	100	2
TSG2	1383	<i>Pseudomonas chengduensis</i> strain L02	MG719530.1	99.35	100	2
TSG3	1416	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> strain 4	KF916674.1	98.87	99	2
TSG4	1405	<i>Enterobacter hormaechei</i> strain IPBCC 19.1426	MN428803.1	100.0	99	2
TSG5	1354	<i>Sphingopyxis indica</i> strain DS15	NR_108185.1	99.78	99	2
TSG6	1376	<i>Gordonia bronchialis</i> strain A5-8	JN627170.1	98.25	98	2
TSG7	1400	<i>Pseudomonas denitrificans</i> strain H38A	KT337533.1	99.93	99	2
TSG8	1418	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> strain L13	KC428749.1	99.93	99	2
SG1	1384	<i>Chryseobacterium daecheongense</i>	FJ455451.1	98.99	99	2
SG2	1370	<i>Pseudomonas chengduensis</i> strain L02	MG719530.1	98.55	99	2
SG3	1430	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> strain 4	KF916674.1	100.0	100	2
SG4	1092	<i>Enterobacter hormaechei</i> strain C44	CP042566.1	99.54	99	2
SG5	1320	<i>Sphingopyxis indica</i> strain DS15	NR_108185.1	99.92	98	2
SG6	1337	<i>Gordonia bronchialis</i> strain A5-8	JN627170.1	98.80	99	2
SG7	1357	<i>Mesorhizobium plurifarum</i> strain G187	MK817576.1	97.50	99	2
SG8	1402	<i>Pseudomonas citronellolis</i> strain PY1	MH685460.1	99.64	100	2

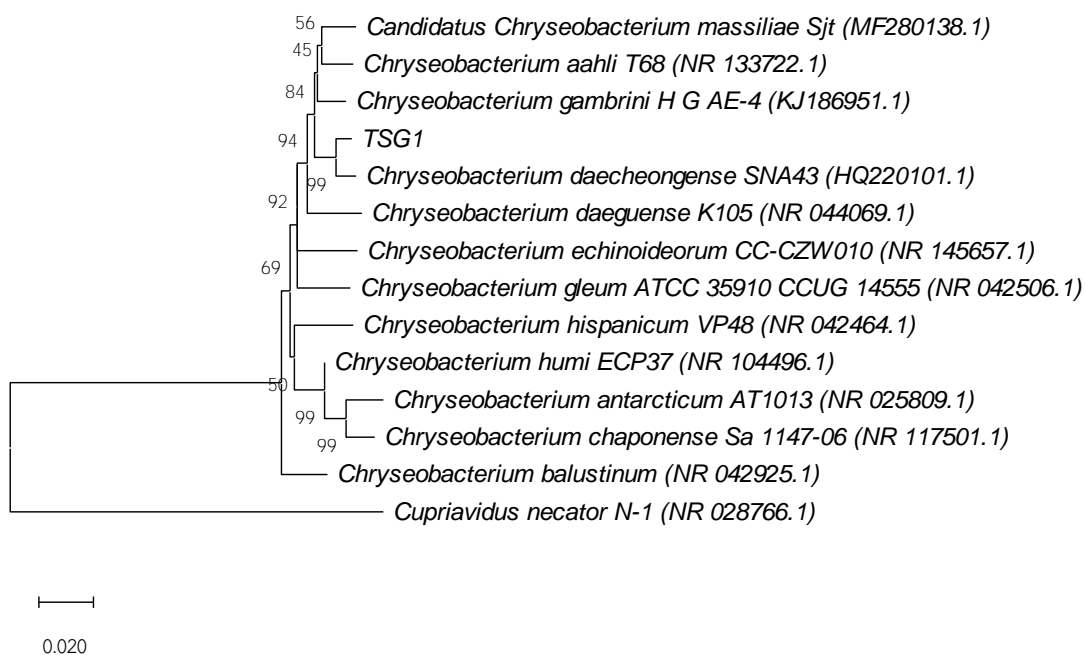
*อ้างอิงเชื้อโรคกลุ่มเสี่ยง (Biosafety level) จากพระราชบัญญัติเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ พ.ศ. 2558

ตารางที่ 3.3 ความแตกต่างระหว่างแบคทีเรียกลุ่ม TSG และกลุ่ม SG

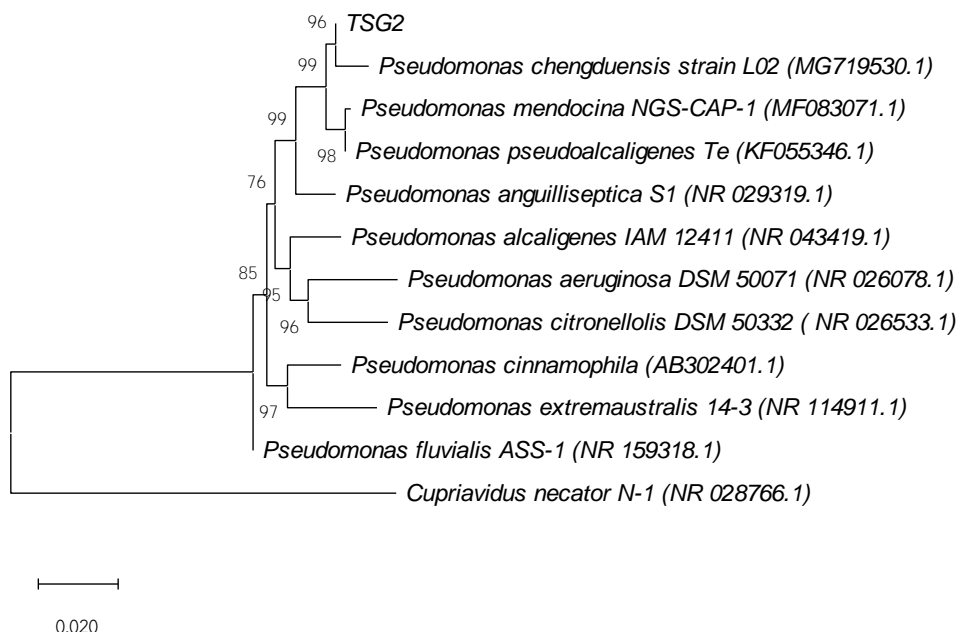
กลุ่ม TSG	กลุ่ม SG	ระยะห่าง	ส่วนเบี่ยงเบน
TSG1	SG1	0.00	0.00
TSG2	SG2	2.00	1.32
TSG3	SG3	3.00	1.74
TSG4	SG4	0.00	0.00
TSG5	SG5	4.00	1.90
TSG6	SG6	3.00	1.64
TSG7	SG7	243.00	14.00
TSG8	SG8	294.00	14.40

3.3 ต้นไม้วิวัฒนาการ (phylogenetic tree)

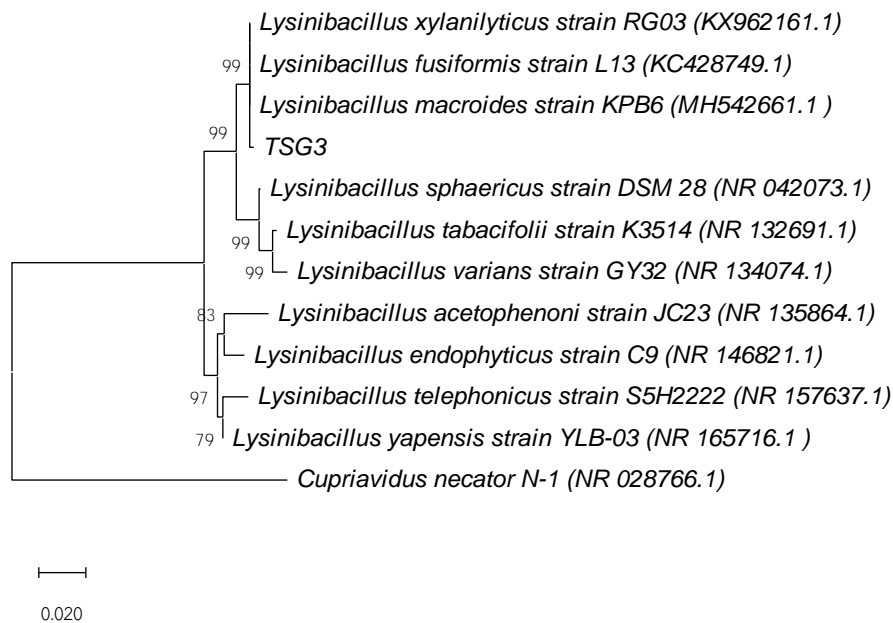
เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของแบคทีเรียทั้ง 8 ตัวอย่างที่ผ่านการวิเคราะห์คุณภาพ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของแบคทีเรียที่คัดเลือกไว้ นำมาเปรียบเทียบความเหมือนของสายนิวคลีโอไทด์ด้วยฟังก์ชัน multiple alignment โดยใช้โปรแกรม Clustal W จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาคำนวณ distance matrix สร้าง phylogenetic tree ด้วยการวิเคราะห์แบบ Neighbor-joining และ Bootstrap จำนวน 1,000 ซ้ำ โดยใช้โปรแกรม MEGA-X พบว่า พบว่า TSG1 มีความใกล้เคียงกับ *Chryseobacterium daecheongense* สายพันธุ์ SNA 43 โดยมีเลขหน้ากิ่งเท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์ TSG2 มีความใกล้เคียงกับ *Pseudomonas chengduensis* สายพันธุ์ L02 โดยมีเลขหน้ากิ่งเท่ากับ 96 เปอร์เซ็นต์ TSG3 มีความใกล้เคียงกับ *Lysinibacillus mecroides* สายพันธุ์ KPB6 โดยมีเลขหน้ากิ่งเท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์ TSG4 มีความใกล้เคียงกับ *Enterobacter hormaechei* สายพันธุ์ IPBCC 19.1426 โดยมีเลขหน้ากิ่งเท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์ TSG5 มีความใกล้เคียงกับ *Sphingopyxis indica* สายพันธุ์ DS15 โดยมีเลขหน้ากิ่งเท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์ TSG6 มีความใกล้เคียงกับ *Gordonia bronchialis* สายพันธุ์ A5-8 โดยมีเลขหน้ากิ่งเท่ากับ 94 เปอร์เซ็นต์ TSG7 มีความใกล้เคียงกับ *Pseudomonas denitrificans* สายพันธุ์ H38A โดยมีเลขหน้ากิ่งเท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์ และ TSG8 มีความใกล้เคียงกับ *Lysinibacillus fusiformis* สายพันธุ์ L13 โดยมีเลขหน้ากิ่งเท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์แสดงดังในแผนภูมิที่ 3.2 ถึง 3.9



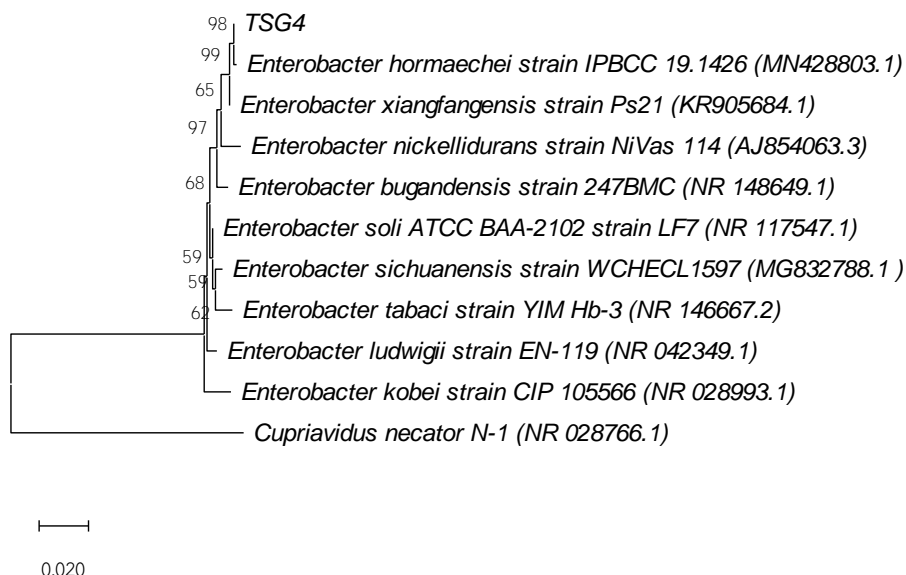
แผนภูมิที่ 3.1 ต้นไม้วิวัฒนาการของ 16S rDNA ของ TSG1 โดยใช้ 16S rDNA ของ *Cupriavidus necator* สายพันธุ์ N1 (NR 028766.1) เป็น out-group และตัวเลขบนกิ่งสาขา บอกถึงการนับที่ให้ผลซ้ำจากทั้งหมด 1,000 ครั้ง ด้วย bootstrap



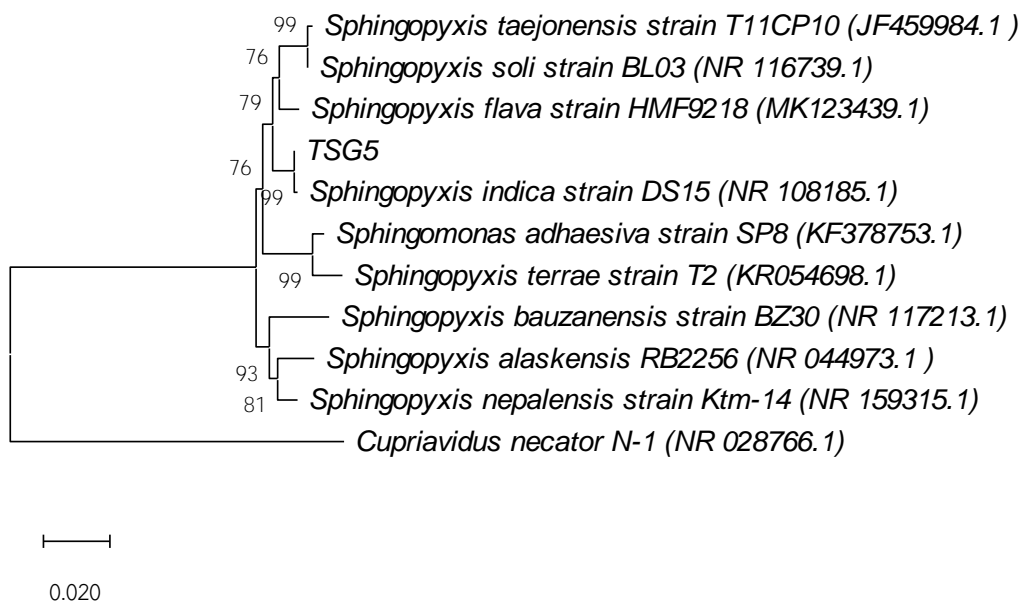
แผนภูมิที่ 3.2 ต้นไม้วิวัฒนาการของ 16S rDNA ของ TSG2 โดยใช้ 16S rDNA ของ *Cupriavidus necator* สายพันธุ์ N1 (NR 028766.1) เป็น out-group และตัวเลขบนกิ่งสาขา บอกถึงการนับที่ให้ผลซ้ำจากทั้งหมด 1,000 ครั้ง ด้วย bootstrap



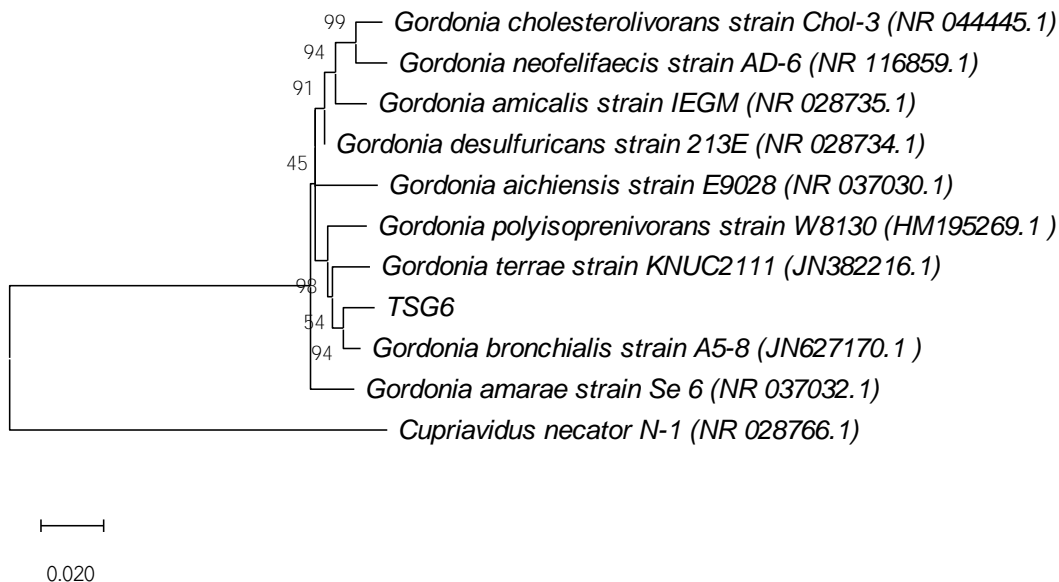
แผนภูมิที่ 3.3 ต้นไม้วิวัฒนาการของ 16S rDNA ของ TSG3 โดยใช้ 16S rDNA ของ *Cupriavidus necator* สายพันธุ์ N1 (NR 028766.1) เป็น out-group และตัวเลขบนกิ่งสาขา บอกลถึงการนับที่ให้ผลซ้ำจากทั้งหมด 1,000 ครั้ง ด้วย bootstrap



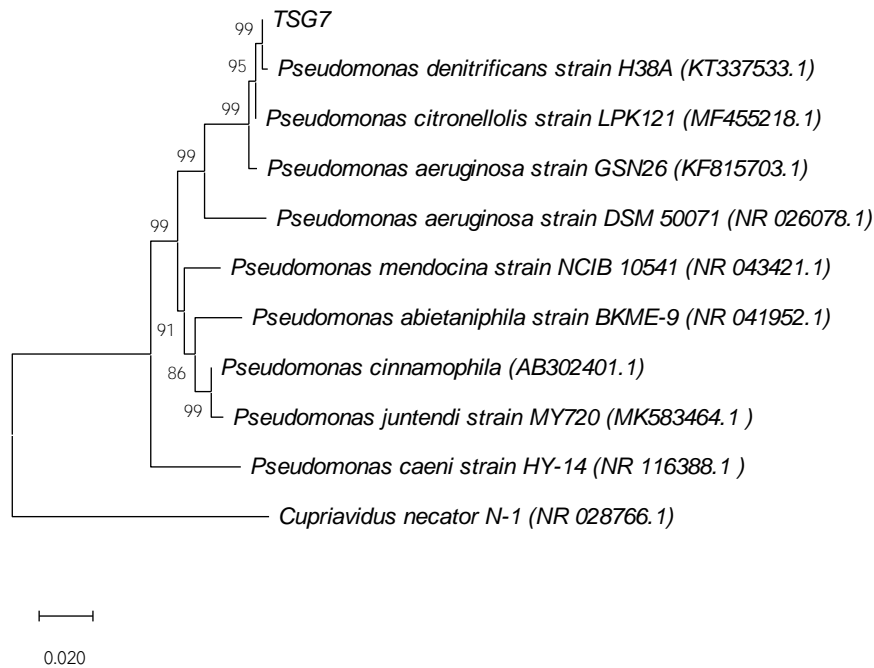
แผนภูมิที่ 3.4 ต้นไม้วิวัฒนาการของ 16S rDNA ของ TSG4 โดยใช้ 16S rDNA ของ *Cupriavidus necator* สายพันธุ์ N1 (NR 028766.1) เป็น out-group และตัวเลขบนกิ่งสาขา บอกลถึงการนับที่ให้ผลซ้ำจากทั้งหมด 1,000 ครั้ง ด้วย bootstrap



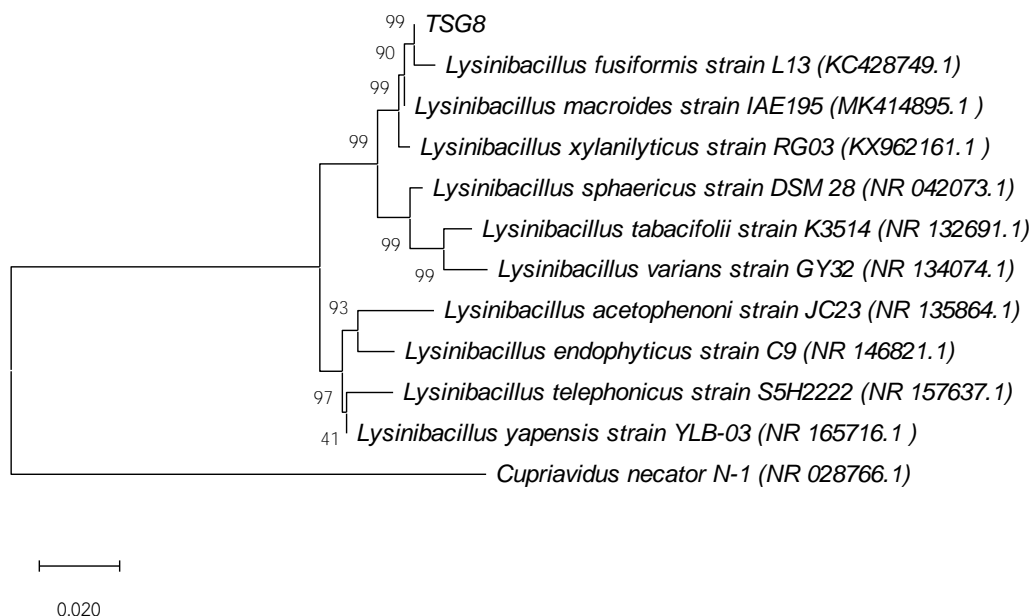
แผนภูมิที่ 3.5 ต้นไม้วิวัฒนาการของ 16S rDNA ของ TSG5 โดยใช้ 16S rDNA ของ *Cupriavidus necator* สายพันธุ์ N1 (NR 028766.1) เป็น out-group และตัวเลขบนกิ่งสาขา บอกรถึงการนับที่ให้ผลซ้ำจากทั้งหมด 1,000 ครั้ง ด้วย bootstrap



แผนภูมิที่ 3.6 ต้นไม้วิวัฒนาการของ 16S rDNA ของ TSG6 โดยใช้ 16S rDNA ของ *Cupriavidus necator* สายพันธุ์ N1 (NR 028766.1) เป็น out-group และตัวเลขบนกิ่งสาขา บอกรถึงการนับที่ให้ผลซ้ำจากทั้งหมด 1,000 ครั้ง ด้วย bootstrap



แผนภูมิที่ 3.7 ต้นไม้วิวัฒนาการของ 16S rDNA ของ TSG7 โดยใช้ 16S rDNA ของ *Cupriavidus necator* สายพันธุ์ N1 (NR 028766.1) เป็น out-group และตัวเลขบนกิ่งสาขา บอกลถึงการนับที่ให้ผลซ้ำจากทั้งหมด 1,000 ครั้ง ด้วย bootstrap



แผนภูมิที่ 3.8 ต้นไม้วิวัฒนาการของ 16S rDNA ของ TSG8 โดยใช้ 16S rDNA ของ *Cupriavidus necator* สายพันธุ์ N1 (NR 028766.1) เป็น out-group และตัวเลขบนกิ่งสาขา บอกลถึงการนับที่ให้ผลซ้ำจากทั้งหมด 1,000 ครั้ง ด้วย bootstrap

3. ฐานข้อมูลจีโนมของแบคทีเรียที่ระบุชนิด

เมื่อค้นหาจีโนมของแบคทีเรียที่ระบุชนิดได้จากผลวิเคราะห์ต้นไม้วิวัฒนาการ ระบุชนิดการค้นหาจีโนมในฐานข้อมูล GenBank จากนั้นพิจารณาคคุณภาพของจีโนมจากรายงานชนิดยีน (genome annotation report) เลือกจีโนมของแบคทีเรียจากระดับการประกอบ (assembly level) และความน่าเชื่อถือของข้อมูล โดยค้นหา ยีนและโปรตีนจากฟังก์ชันค้นหาโปรตีนที่สามารถแสดงออกได้ (protein coding genes, CDS) พบว่า ทั้ง 8 ไอโซเลทมีจีโนม และ ปริมาณสัดส่วนร้อยละ GC แสดงดังตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.4 ฐานข้อมูลจีโนมของแบคทีเรียที่ระบุชนิด

ตัวอย่าง	แบคทีเรีย	ระดับ	ฐานข้อมูลจีโนม	%GC
TSG1	<i>Chryseobacterium daecheongense</i>	comtiq	SAMN05421667	36.20
TSG2	<i>Pseudomonas chengduensis</i>	completed	SAMN05216576	62.3
TSG3	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	completed	SAMN02892976	37.60
TSG4	<i>Enterobacter hormaechei</i>	completed	SAMN07988874	54.66
TSG5	<i>Sphingopyxis indica</i>	completed	NZ_FZPA00000000.1	65.7
TSG6	<i>Gordonia bronchialis</i>	completed	SAMN11056391	67.07
TSG7	<i>Pseudomonas denitrificans</i>	completed	SAMN12691970	65.30
TSG8	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	completed	SAMN05216576	62.3

3.5 ยีนและโปรตีนในกระบวนการชีวสังเคราะห์ PHAs จากฐานข้อมูลจีโนม

เมื่อค้นหา ยีนโดยใช้ลำดับกรดอะมิโนอ้างอิงของโปรตีนในกระบวนการชีวสังเคราะห์ PHAs เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนที่สามารถถอดรหัสได้จากยีนและโปรตีนในฐานข้อมูลจีโนมของแต่ละไอโซเลท โดยใช้โปรแกรม tBLASTn และ BLASTp ตามลำดับ เมื่อศึกษา ยีนและโปรตีนในวิถีย่อยสลายกรดไขมันที่เกี่ยวข้องกับการผลิต PHAs พบว่าทั้ง 8 ไอโซเลทมีบริเวณอนุรักษ์ของ enoyl-CoA hydratase (PhaJ) จากยีน phaJ ทำหน้าที่เปลี่ยน trans-2-enoyl-CoA เป็น (R)-3-hydroxyacyl-CoA ซึ่งสารชนิดนี้เป็นมอนอเมอร์ในการผลิต PHAs ชนิด poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) (Fukui และคณะ, 1998) และบริเวณอนุรักษ์ของ 3-ketoacyl-acyl carrier protein (ACP) reductase (FabG) จากยีน fabG ทำหน้าที่เปลี่ยน 3-ketoacyl-ACP เป็น (R)-3-hydroxyacyl isomer (Nomura และคณะ, 2005) เมื่อศึกษาโปรตีนในวิถีชีวสังเคราะห์ PHAs จากยีน phaC phaA phaB และ phaZ พบว่าไอโซเลททั้งหมดมีบริเวณอนุรักษ์ของ acetyl-CoA C-acyltransferase (PhaA) จากยีน phaA ไอโซเลทที่ 2 4 5 6 และ 7 มีบริเวณอนุรักษ์ของ poly(R)-hydroxyalkanoic acid synthase (PhaC) จากยีน phaC ในขณะที่ไอโซเลทที่ 1 3

และ 8 พบบริเวณอนุรักษ์ของ alpha/beta hydrolase ที่มีความใกล้เคียงกับบริเวณอนุรักษ์ของ PHA synthase ของโปรตีนอ้างอิง แบบที่เรียสกุล *Pseudomonas* ในไอโซเลทที่ 2 และ 7 พบบริเวณอนุรักษ์ของ PHA depolymerase (PhaZ) จากยีน *phaZ* โดยตรง ในขณะที่ไอโซเลทอื่น ๆ พบบริเวณอนุรักษ์ของ alpha/beta hydrolase และ carboxylesterase ที่พบใน PhaC นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อนำโปรตีนอ้างอิง acetoacetyl-CoA reductase (PhaB) จากยีน *phaB* ที่พบใน *Mesorhizobium japonicum* MAFF 303099^T (BAB49825.1) มาเปรียบเทียบกับข้อมูลพบว่าทั้ง 8 ไอโซเลท มีบริเวณอนุรักษ์เหมือนกับ 3-ketoacyl- (ACP) reductase (FabG) ที่มาจากยีน *fabG* ซึ่ง ทั้ง PhaB และ FabG ทำหน้าที่เปลี่ยน acetoacetyl-CoA เป็น (R)-3-hydroxybutyryl-CoA ซึ่งเป็นสารตัวกลางในการผลิต PHAs ผ่านโปรตีน PHA synthase (Numata และคณะ, 2013) แสดงดังตารางที่ 3.5 และรูปที่ 3.2

3.6 บริเวณอนุรักษ์ของโปรตีน PHAs

เมื่อศึกษาบริเวณอนุรักษ์แต่ละโปรตีนพบว่า *C. daecheongense* *P. chengduensis* *L. fusiformis* *E. hormaechei* *S. indica* *G. bronchialis* และ *P. denitrificans* มีบริเวณอนุรักษ์เหมือนกันคือ PhaA ซึ่งมีบริเวณอนุรักษ์ของ acetyl-CoA C-acetyltransferase (PhaA) ในกลุ่มโปรตีน thiolase แสดงดังรูปที่ 3.3 FabG มีบริเวณอนุรักษ์ของ 3-oxoacyl-ACP reductase (FabG) แสดงดังรูปที่ 3.4 PhaJ มีบริเวณอนุรักษ์ของ enoyl-CoA hydratase (PhaJ) แสดงดังรูปที่ 3.5

เมื่อศึกษาบริเวณอนุรักษ์ของ PhaC โดยใช้โปรตีนอ้างอิง poly(3-hydroxybutyrate) polymerase ของ *Cupriavidus necator* N-1T [AEI76811.1] และ class II poly(R)-hydroxyalkanoate synthase ของ *Pseudomonas aeruginosa* [WP_132663818.1] พบว่า *P. chengduensis* และ *P. denitrificans* มีบริเวณอนุรักษ์ของ class II PHA synthase แสดงดังรูปที่ 3.6 *E. hormaechei* *S. Indica* พบบริเวณอนุรักษ์ของ class I PHA synthase แสดงดังรูปที่ 3.7 และ *G. bronchialis* พบบริเวณอนุรักษ์ของ PHA synthase และมีความคล้ายกับ class III PHA synthase แสดงดังรูปที่ 3.8 ในขณะที่ *C. Daecheongense* และ *L. fusiformis* ไม่พบ PhaC โดยตรง แต่พบบริเวณที่เหมือนกับโปรตีนอ้างอิง และบริเวณดังกล่าวมีความเหมือนกับ pimeloyl-ACP methyl ester carboxylesterase แสดงดังรูปที่ 3.9

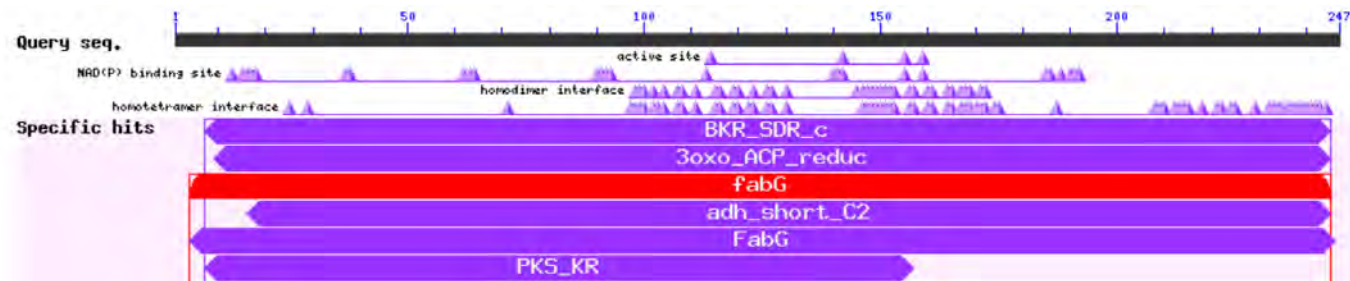
เมื่อศึกษาบริเวณอนุรักษ์ของ PhaZ โดยใช้โปรตีนอ้างอิง polyhydroxyalkanoate depolymerase -ของ *C. necator* [WP_013957652.1] พบว่า *C. daecheongense* *L. fusiformis* *E. hormaechei* *S. Indica* และ *G. bronchialis* มีบริเวณที่เหมือนกับ PhaZ ของโปรตีนอ้างอิง และบริเวณที่เหมือนกันนั้นตรงกับบริเวณอนุรักษ์ของ alpha/beta hydrolase และ carboxylesterase แสดงดังรูปที่ 3.10 ในขณะที่ *P. chengduensis* และ *P. denitrificans* พบ PhaZ จากฐานข้อมูลโดยตรงและมีบริเวณอนุรักษ์ตรงกับ PHA depolymerase super family แสดงดังรูปที่ 3.11

ตารางที่ 3.5 โปรตีนในกระบวนการชีวสังเคราะห์ PHAs จากฐานข้อมูลโปรตีน

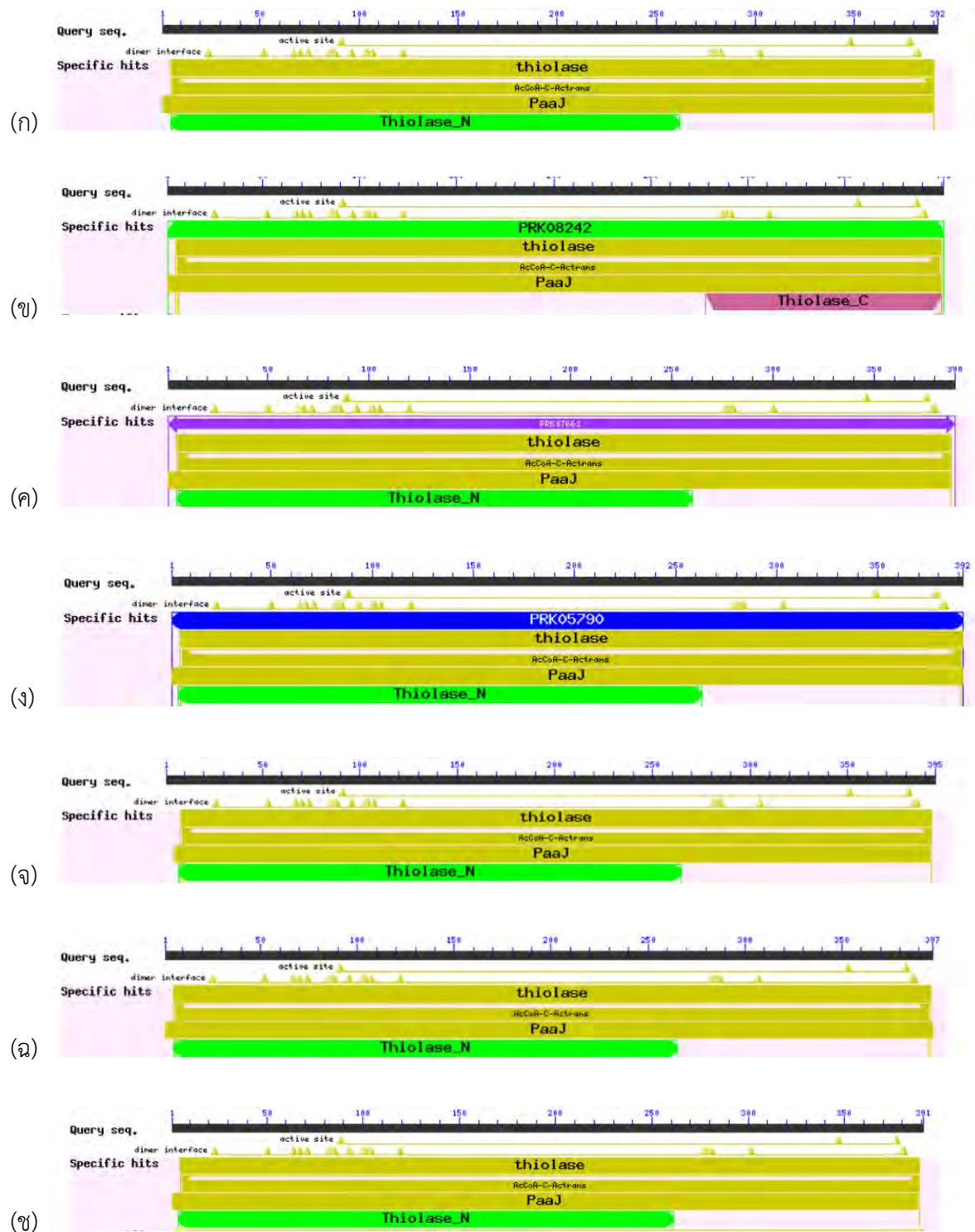
ตัวอย่าง	หมายเลขเข้าถึง	โปรตีน	ยีน	บริเวณอนุรักษ์	หมายเลขเข้าถึง	E value
TSG1	WP_123261368	acetyl-CoA C-acyltransferase	<i>phaA</i>	thiolase	cd00751	0e+00
	WP_123262498.1	carboxylesterase family protein	<i>phaZ</i>	Abhydrolase super family	cl21494	4.50e-64
	WP_123264316.1	3-oxoacyl-ACP reductase FabG	<i>fabG</i>	fabG	cd05333	7.86e-106
	WP_123261370.1	enoyl-CoA hydratase	<i>phaJ</i>	FadB	PRK07659	5.50e-75
	WP_123262344.1	ester carboxylesterase	<i>phaC</i>	MhpC	COG0596	1.48e-29
TSG2	WP_017678526.1	class II PHA synthase	<i>phaC I</i>	PHA syn II super family	cl31144	0e+00
	WP_017678527.1	PHA depolymerase	<i>phaZ</i>	PHA depoly super family	cl30397	0e+00
	WP_017678571.1	3-oxoacyl-ACP reductase	<i>fabG</i>	fabG	PRK05653	1.26e-126
	WP_017677192.1	acetyl-CoA C-acetyltransferase	<i>phaA</i>	thiolase	cd00751	6.70e-16
	WP_123261370.1	enoyl-CoA hydratase	<i>phaJ</i>	FadB	COG1250	5.50e-75
TSG3	WP_036126136.1	3-oxoacyl-ACP reductase FabG	<i>fabG</i>	fabG	PRK05653	2.06e-108
	WP_036120015.1	acetyl-CoA C-acetyltransferase	<i>phaA</i>	thiolase	cd00751	0e+00
	WP_036120354.1	enoyl-CoA hydratase	<i>phaJ</i>	PRK07659	PRK07659	1.20e-142
	WP_069480331.1	3-oxoacyl ACP reductase	<i>fabG</i>	fabG	PRK05557	2.95e-142
	WP_036125645.1	alpha/beta hydrolase	<i>phaZ</i>	bhydrolase_3	pfam07859	4.59e-86
	WP_036121449.1	alpha/beta hydrolase	<i>phaC</i>	MhpC	COG0596	3.93e-21

TSG4	WP_003857956.1	3-oxoacyl-ACP reductase FabG	<i>FabG</i>	FabG	PRK05557	3.12e-138
	WP_003862843.1	acetyl-CoA C-acetyltransferase	<i>phaA</i>	thiolase	cd00751	0e+00
	WP_032609349.1	enoyl-CoA hydratase	<i>phaJ</i>	PRK08788	PRK08788	5.14e-171
	WP_023098586.1	PHA synthase, class I	<i>phaC I</i>	PHA_synth_I	TIGR01838	3.56e-172
	WP_151550377.1	ester carboxylesterase	<i>phaZ</i>	MhpC	COG0596	6.94e-47
	WP_003861395.1	beta-ketoacyl-ACP synthase I	<i>fabG</i>	PRK07967	PRK07967	0e+00
TSG5	WP_089214834.1	class I PHA synthase	<i>phaC I</i>	PHA_synth_I	TIGR01838	0e+00
	WP_089214397.1	PHA synthesis repressor	<i>phaR</i>	COG5394 super family	COG5394	3.58e-59
	WP_089214379.1	acetyl-CoA C-acyltransferase	<i>phaA</i>	thiolase	cd00751	1.67e-174
	SNS26647.1	ester carboxylesterase	<i>phaZ</i>	PHA_depoly_ arom	TIGR02240	4.42e-21
	WP_003857956.1	3-oxoacyl-ACP reductase FabG	<i>FabG</i>	fabG	PRK05557	3.12e-138
	WP_032609349.1	enoyl-CoA hydratase family protein	<i>phaJ</i>	PRK08788	PRK08788	5.14e-171
TSG6	WP_012835831.1	enoyl-CoA hydratase	<i>phaJ</i>	PRK05862	PRK05862	1.15e-152
	WP_012832375.1	acetyl-CoA C-acyltransferase	<i>phaA</i>	PRK05862	PRK05862	1.15e-152
	WP_012835844.1	3-oxoacyl-ACP reductase FabG	<i>fabG</i>	fabG	PRK05653	1.59e-101
	WP_083775525.1	alpha/beta hydrolase	<i>phaZ</i>	Abhydrolase_1	pfam00561	8.54e-22
	WP_012834564.1	PHA synthase	<i>phaC</i>	PhaC	COG3243	1.40e-75
TSG7	WP_045208591.1	enoyl-CoA hydratase family protein	<i>phaJ</i>	PRK06213	PRK06213	4.60e-141
	WP_081516283.1	acetyl-CoA C-acyltransferase	<i>phaA</i>	thiolase	cd00751	0e+00

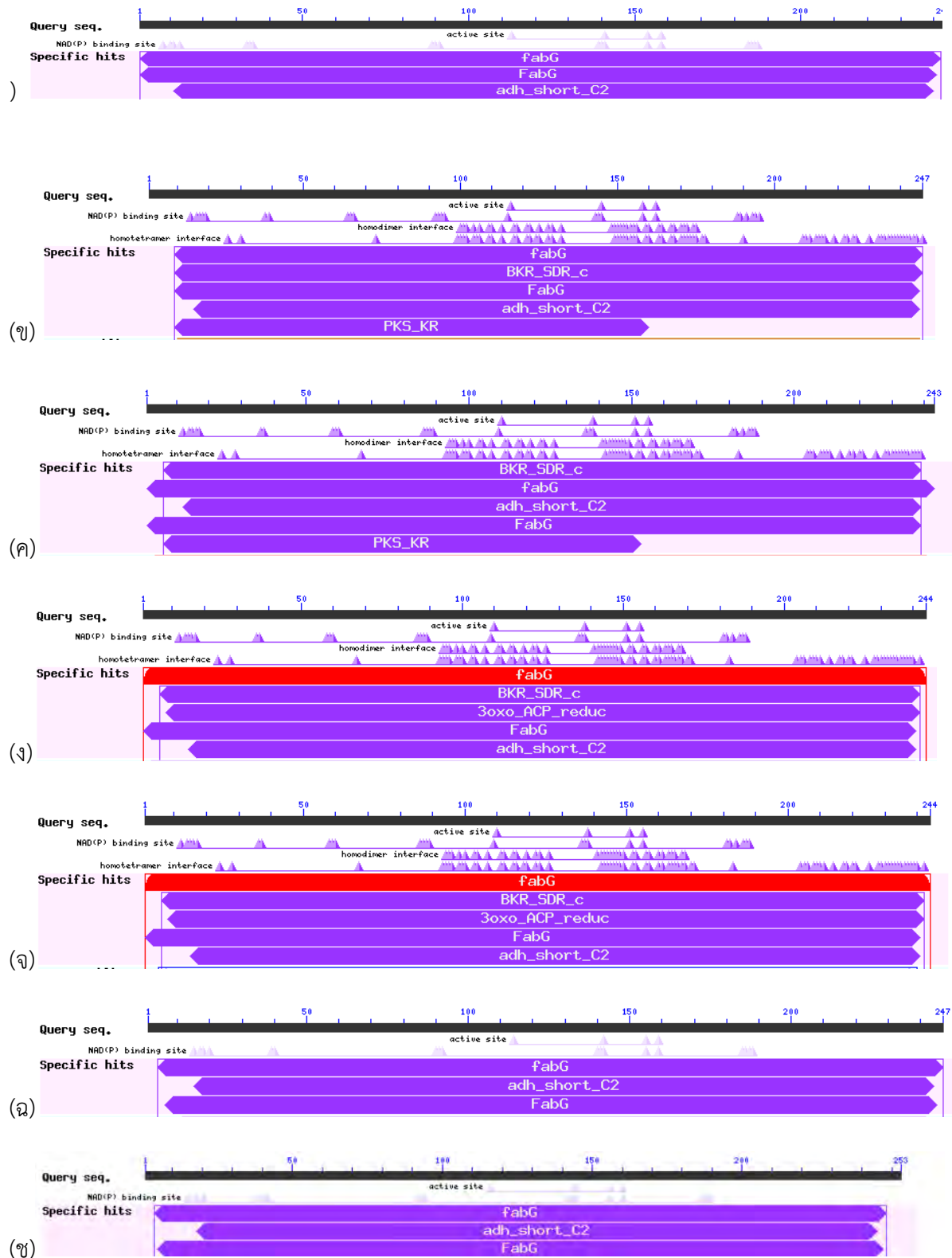
	WP_045208787.1	beta-ketoacyl-ACP synthase I	<i>fabG</i>	PRK07967	PRK07967	0e+00
	WP_081519477.1	beta-ketoacyl-ACP synthase II	<i>fabF</i>	BKR_SDR_c	cd05333	3.96e-98
	WP_151187558.1	3-oxoacyl-ACP reductase FabG	<i>fabG</i>	fabG	PRK05557	8.66e-128
	WP_151189074.1	class II PHA synthase	<i>phaC II</i>	PHA_synth_II super family	TIGR01839	0e+00
	WP_003095866.1	PHA depolymerase	<i>phaZ</i>	PHA_depoly_aron	TIGR02240	0e+00
TSG8	WP_036126136.1	3-oxoacyl-ACP reductase FabG	<i>fabG</i>	fabG	PRK05653	2.06e-108
	WP_036120015.1	acetyl-CoA C-acetyltransferase	<i>phaA</i>	thiolase	cd00751	0e+00
	WP_036120354.1	enoyl-CoA hydratase	<i>phaJ</i>	PRK07659	PRK07659	1.20e-142
	WP_069480331.1	3-oxoacyl ACP reductase	<i>fabG</i>	fabG	PRK05557	2.95e-142
	WP_036125645.1	alpha/beta hydrolase	<i>phaZ</i>	bhydrolase_3	pfam07859	4.59e-86
	WP_036121449.1	alpha/beta hydrolase	<i>phaC</i>	MhpC	COG0596	3.93e-21



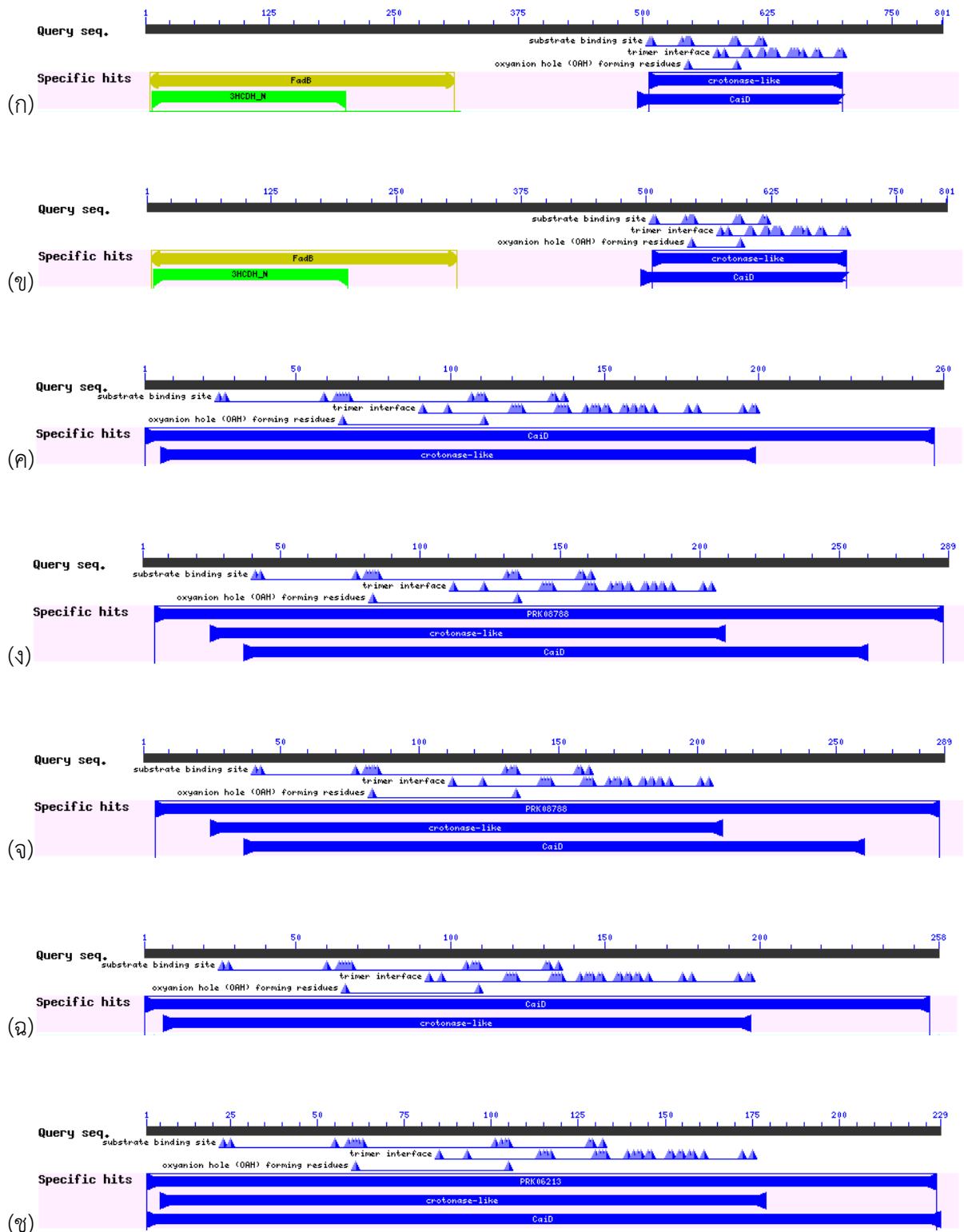
รูปที่ 3.2 บริเวณอนุรักษ์ของ PhaB เมื่อเปรียบเทียบกับ FabG



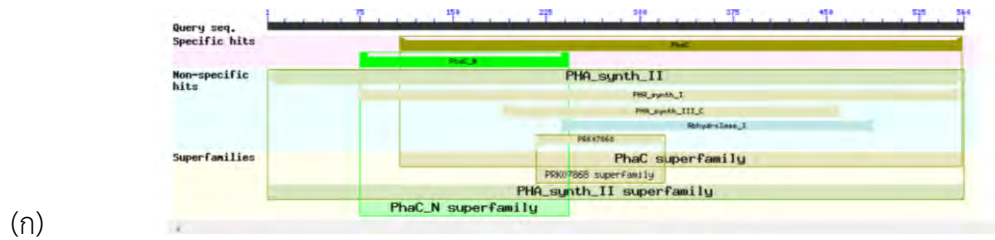
รูปที่ 3.3 บริเวณอนุรักษ์ของ PhaA ใน *C. daecheongense* (ก) และ *P. chengduensis* (ข). *L. fusiformis* (ค) *E. hormaechei* (ง) *S. indica* (จ) *G. bronchialis* และ *P. denitrificans* (ช) ซึ่งตรงกับบริเวณอนุรักษ์ของ acetyl-CoA C-acetyltransferase (PhaA) หรือ thiolase



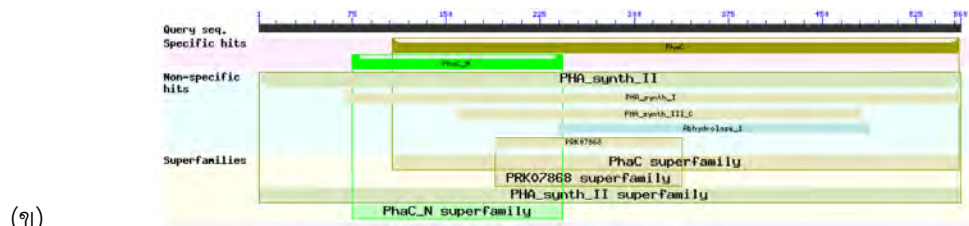
รูปที่ 3.4 บริเวณอนุรักษ์ของ FabG ใน *C. daecheongense* (ก) และ *P. chengduensis* (ข).
L. fusiformis (ค) *E. hormaechei* (ง) *S. indica* (จ) *G. bronchialis* และ *P. denitrificans* (ข)
 ซึ่งตรงกับบริเวณอนุรักษ์ของ 3-oxoacyl-ACP reductase (FabG)



รูปที่ 3.5 บริเวณอนุรักษ์ของ PhA1 ใน *C. daecheongense* (ก) และ *P. chengduensis* (ข). *L. fusiformis* (ค) *E. hormaechei* (ง) *S. indica* (จ) *G. bronchialis* (ฉ) และ *P. denitrificans* (ช) ซึ่งตรงกับบริเวณอนุรักษ์ของ enoyl-CoA hydratase (PhA1)

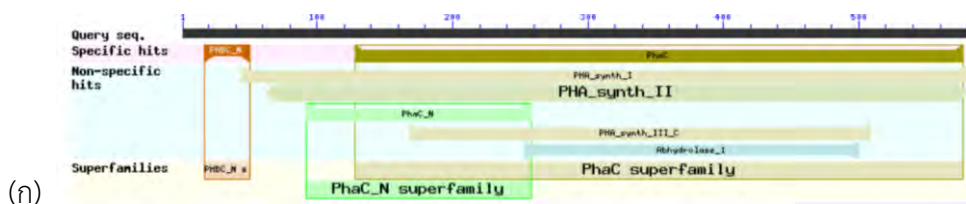


(ก)

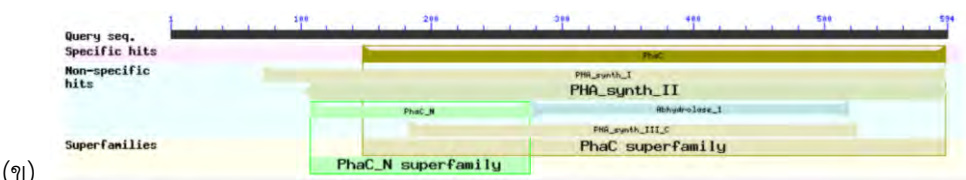


(ข)

รูปที่ 3.6 บริเวณอนุรักษ์ของ PhaC class II ใน *P. chengduensis* (ก) และ *P. denitrificans* (ข)

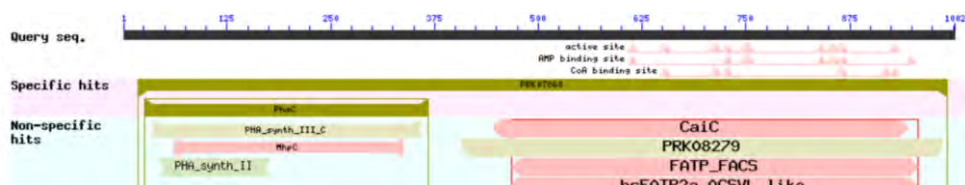


(ก)

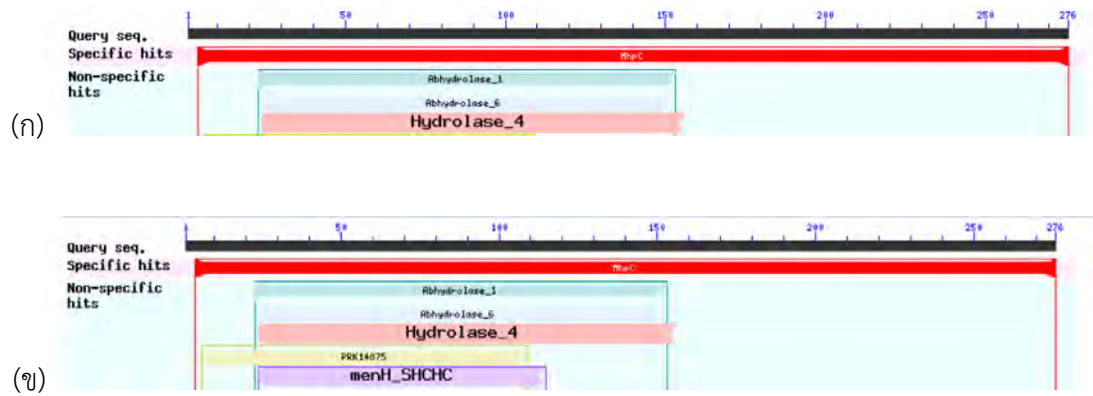


(ข)

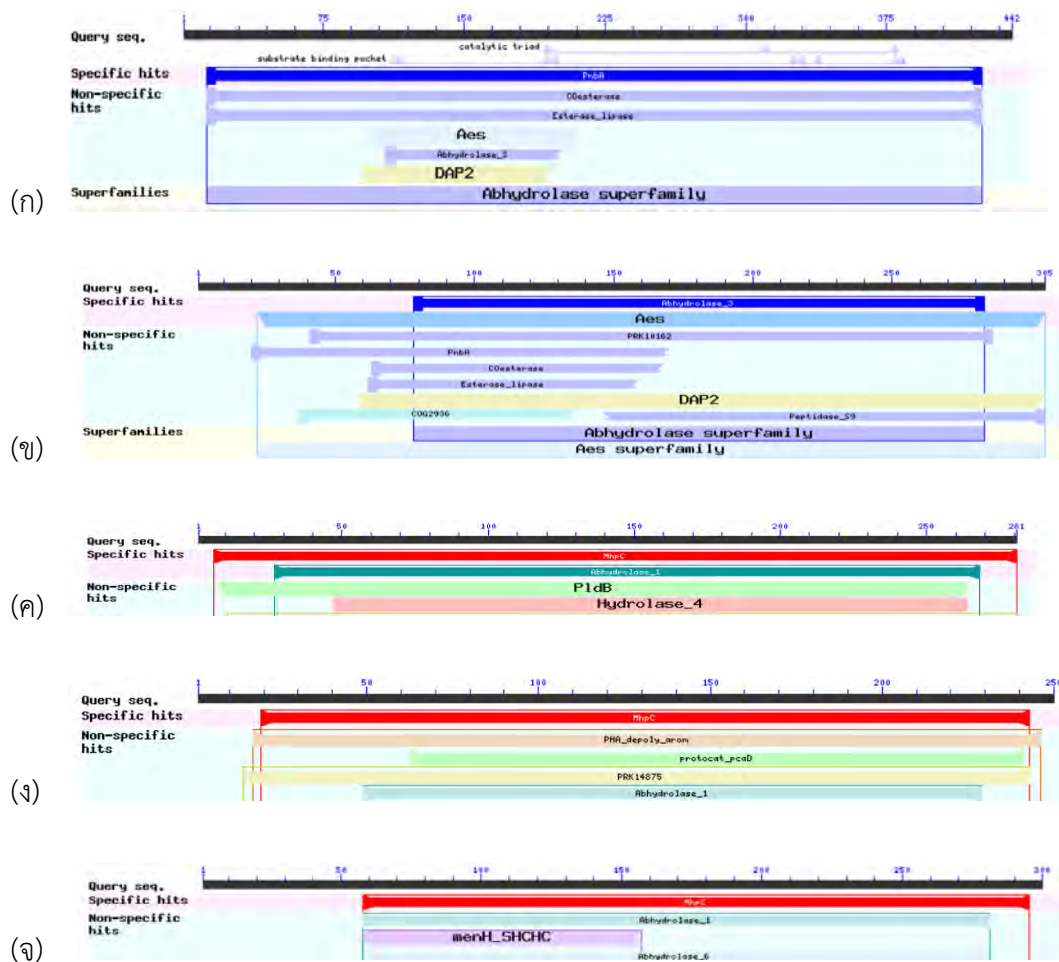
รูปที่ 3.7 บริเวณอนุรักษ์ของ PhaC class I ของ *E. hormaechei* (ก) และ *S. indica* (ข)



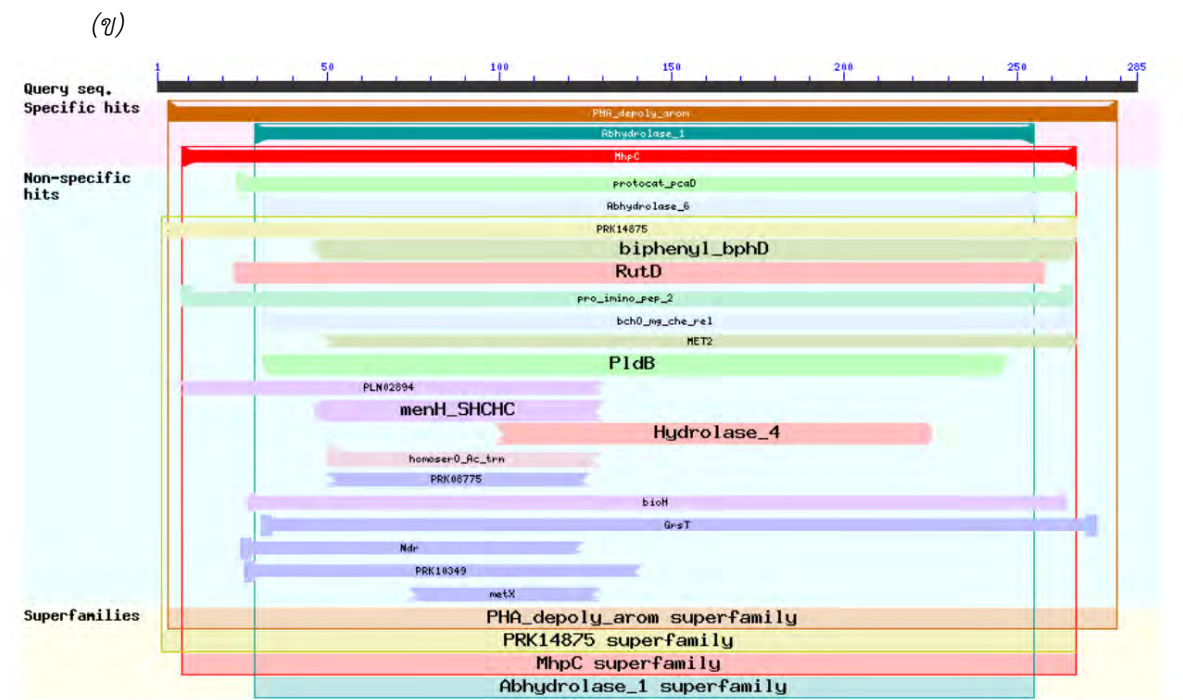
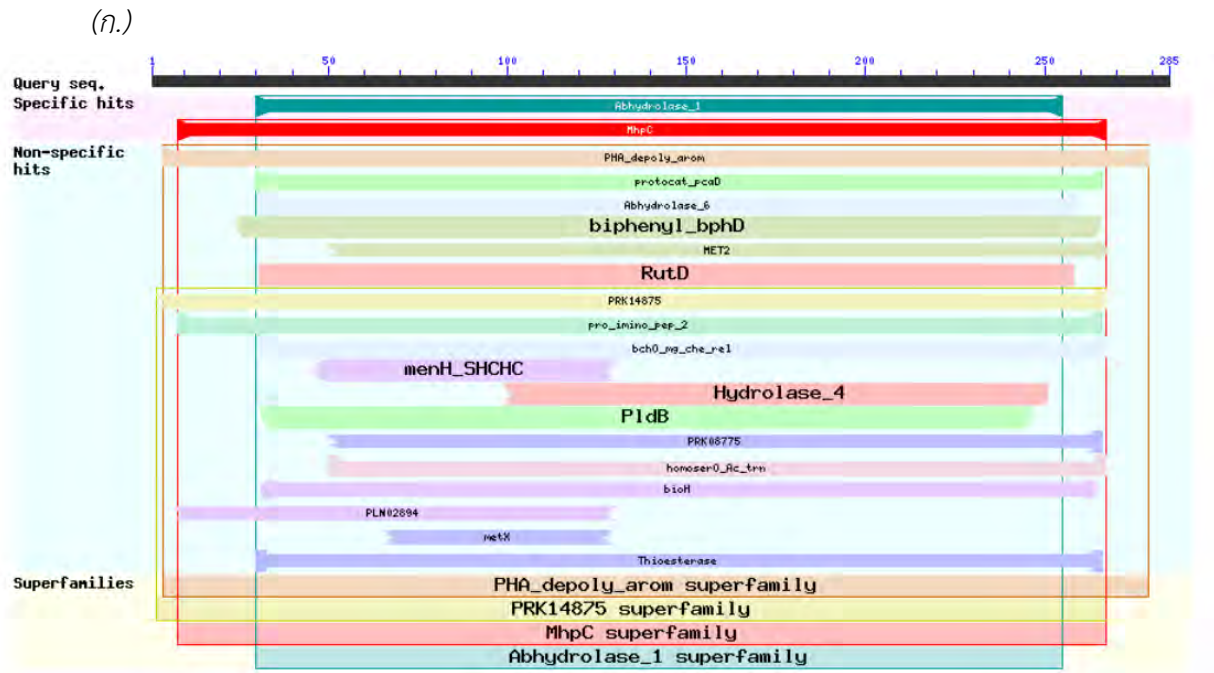
รูปที่ 3.8 บริเวณอนุรักษ์ของ PhaC ที่คาดว่าเป็น PhaC class III ของ *G. bronchialis*



รูปที่ 3.9 บริเวณอนุรักษ์ของ PhaC ใน *C. daecheongense* (ก) และ *L. fusiformis* (ข) ซึ่งตรงกับ บริเวณอนุรักษ์ของ Pimeloyl-ACP methyl ester carboxylesterase



รูปที่ 3.10 บริเวณอนุรักษ์ของ PhaZ ของ *C. daecheongense* (ก) และ *L. fusiformis* (ข) *E. hormaechei* (ค) *S. Indica* (ง) และ *G. bronchialis* (จ) ซึ่งตรงกับบริเวณอนุรักษ์ของ alpha/beta hydrolase และ carboxylesterase



รูปที่ 3.11 บริเวณอนุรักษ์ของ PhaZ ของ *P. chengduensis* (ก) และ *P. denitrificans* (ข) ซึ่งตรงกับบริเวณอนุรักษ์ PHA depolymerase superfamily และ abhydrolase

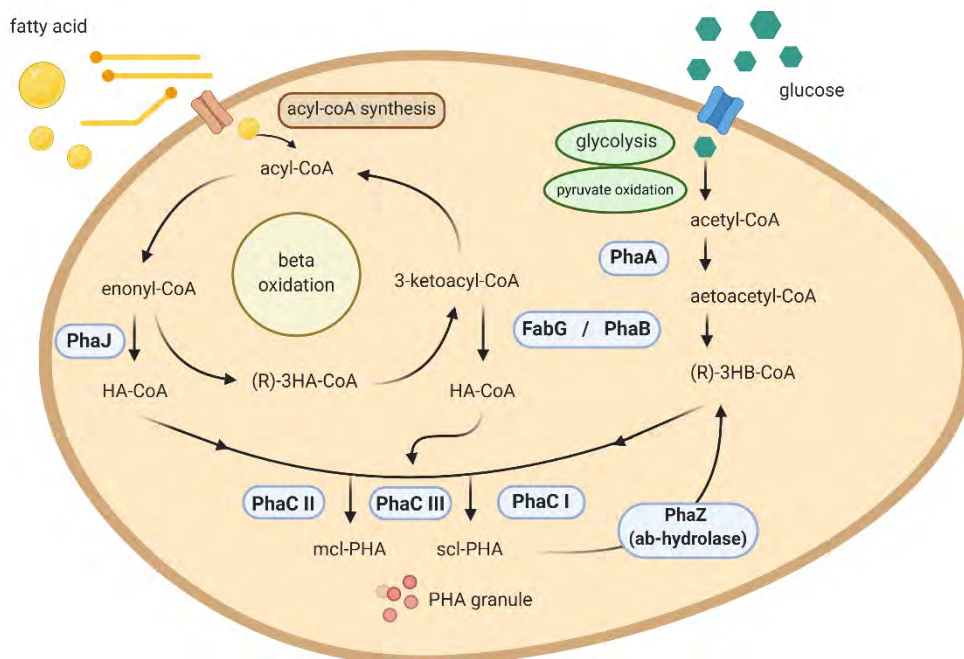
3.7 การผลิต PHAs จากกลูโคสและกรดไขมัน

ผลการทดลองทั้งหมดแสดงให้เห็นว่า *C. daecheongense* *P. chengduensis* *L. fusiformis* *E. hormaechei* *S. Indica* *G. bronchialis* และ *P. denitrificans* มีโปรตีน PhaA PhaB PhaC PhaJ PhaZ และ FabG ที่มาจากยีน phaA phaB phaC phaJ phaZ และ FabG ตามลำดับ โดยสามารถแบ่งเป็นสองชนิดตามวิธีผลิต PHAs จากสารตั้งต้น ได้แก่ กลูโคส และ กรดไขมัน

เมื่อกรดไขมันถูกนำเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรียจะถูกเปลี่ยนเป็น acyl-CoA เพื่อเข้าสู่วิถีบีตาออกซิเดชัน (beta oxidation) และเปลี่ยนเป็น enonyl-coA เปลี่ยนเป็น (R)-3HA-CoA จนได้เป็น 3-ketoacyl-CoA โดยโปรตีนในวิถีบีตาออกซิเดชันจนครบหนึ่งรอบตามลำดับ enonyl-coA สามารถนำมาผลิต PHAs ได้โดยการทำงานของ PhaJ ซึ่งจะเปลี่ยนสารดังกล่าวเป็น HA-CoA และเป็นสารตัวกลางในการผลิต PHAs โดย PhaC ชนิดชั้นต่าง ๆ ในชั้นถัดไป เช่นเดียวกับกับ 3-ketoacyl-CoA ที่สามารถนำมาผลิตสารตัวกลาง HA-CoA ได้โดยการทำงานของ FabG

เมื่อกลูโคสถูกนำเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรียจะถูกสลายเพื่อนำมาสร้างพลังงานผ่านวิถีไกลโคไลซิส (glycolysis) และไพรูเวทออกซิเดชัน (pyruvate oxidation) ได้เป็น acetyl-CoA หลังจากนั้นจะถูกนำมาผลิต (R)-3HB-CoA ผ่านโปรตีน PhaA และ PhaB ตามลำดับ

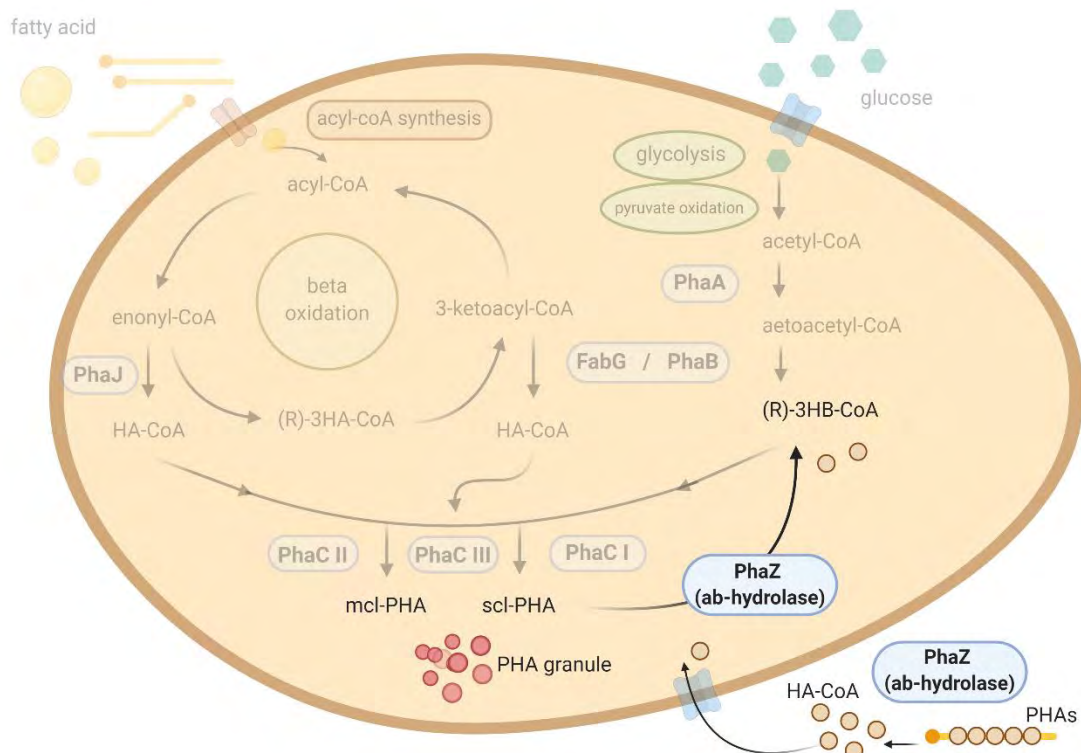
การผลิต PHAs จึงสามารถนำ HA-CoA และ (R)-3HB-CoA จากทั้งสองกระบวนการมาผลิต PHAs ผ่าน PhaC แต่ละชนิด ได้แก่ PhaC class I PhaC class II และ PhaC class III ซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์คือ PHAs สองชนิดขึ้นอยู่กับชนิดของ PhaC โดย PhaC class I ที่พบใน *E. hormaechei* และ *S. Indica* สามารถผลิต scl-PHA PhaC class II ที่พบใน *P. chengduensis* และ *P. denitrificans* สามารถผลิต mcl-PHA และ PhaC class III ที่พบ *G. bronchialis* สามารถผลิตได้ทั้ง scl-PHAs และ mcl-PHAs ดังรูปที่ 3.12



รูปที่ 3.12 การผลิต PHAs จากกลูโคสและกรดไขมัน (modified from Keiji และคณะ, 2013)

3.8 การย่อยสลาย PHAs

ผลการทดลองทั้งหมดแสดงให้เห็นว่า *C. daecheongense* *P. chengduensis* *L. fusiformis* *E. hormaechei* *S. indica* *G. bronchialis* และ *P. denitrificans* มีโปรตีนที่สามารถทำลายพันธะเอสเทอร์ได้โดยเป็นโปรตีนในกลุ่ม alpha/beta hydrolase ซึ่งตรงกับคุณสมบัติของ PHA depolymerase (PhaZ) การย่อยสลาย PHAs ของจุลินทรีย์โดยใช้เอนไซม์ PHA depolymerase โดยเอนไซม์ชนิดนี้สามารถใช้ภายในเซลล์ และ ภายนอกเซลล์ (Keiji และคณะ, 2008) โดยขึ้นอยู่กับรูปแบบของปฏิกิริยาต่อ PHAs แบบที่เรียกว่าย่อยสลาย PHAs ที่สะสมภายในเซลล์เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานแก่แบคทีเรียในการเจริญเติบโต โดยมีความสัมพันธ์กับการผลิต PHAs ของเอนไซม์ PHA synthase ที่ทำหน้าที่สร้าง PHAs granule จากนั้น PHA depolymerase จะทำหน้าที่สลาย PHAs ที่สะสมไว้เพื่อเป็นพลังงานแก่เซลล์ การทำงานของ PHA depolymerase จะไฮโดรไลซ์ในส่วนของ amorphous ก่อน จากนั้นจึงเข้าจับ crystalline (Organ และ Barham, 1988) โดยทำหน้าที่สลายพันธะเอสเทอร์ของ PHAs นอกจากนี้ยังสามารถหลั่งเอนไซม์ PHA depolymerase ออกสู่ภายนอกเซลล์เพื่อย่อยสลาย PHAs และดูดซึมผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการสร้างพลังงานและชีวมวลของเซลล์ แสดงดังรูปที่ 3.13



รูปที่ 3.13 การย่อยสลาย PHAs ภายในเซลล์และภายนอกเซลล์ (modified from Keiji และคณะ, 2013)

บทที่ 4

สรุป และวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากงานวิจัยของนางสาววันรัตน์ ชัยศรี (2019) ที่ได้คัดแยกและระบุลักษณะสมบัติของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิต PHAs จากดิน โดยคัดแยกแบคทีเรียจาก 21 ไอโซเลทด้วยวิธีคัดเลือกบนอาหารตามสูตรของ Kouhei M. และคณะ (2010) ที่มีส่วนประกอบของกลูโคส และ Nile Blue A (ภาคผนวก ก) นำไปตรวจสอบภายใต้ลำแสง UV ที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร จะเห็นลักษณะโคโลนีที่เรืองแสงสีส้ม ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมัน (spontaneous oxidation) ทำให้ Nile blue A ที่อยู่ในรูปออกซาซิน (oxazine form) เปลี่ยนเป็นรูปออกซาโซน (oxazone form) ซึ่งจะคลายพลังงานออกมาในช่วงคลื่น 543-598 nm จึงทำให้เกิดสีส้มดังกล่าว (Kitamura และคณะ, 1994) และอาจเป็นไปได้ว่าเซลล์มีการสะสม PHAs ที่เป็นไขมันชนิดหนึ่ง พบว่ามีทั้งหมด 8 ไอโซเลท ที่ให้ลักษณะการเรืองแสงสีส้ม จึงตั้งชื่อไอโซเลททั้ง 8 ไอโซเลทว่า SG1 SG2 SG3 SG4 SG5 SG6 SG7 และ SG8

งานวิจัยนี้จึงนำแบคทีเรียทั้ง 8 ไอโซเลทมาเลี้ยงบนอาหารแข็งเชื้อแข็ง LB และตั้งชื่อไอโซเลทใหม่ทั้งหมดว่า TSG1 TSG2 TSG3 TSG4 TSG5 TSG6 TSG7 และ TSG8 หลังจากนั้นนำไปวิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยา จำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียด้วยวิธีวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16s rDNA วิเคราะห์ต้นไม้วิวัฒนาการ และเปรียบเทียบกับลำดับพันธุกรรมของแบคทีเรีย SG1 ถึง SG8 พบว่าไอโซเลท SG และไอโซเลท TSG ที่ 1 ถึง 6 ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ไอโซเลทที่ 7 และ ไอโซเลทที่ 8 มีความแตกต่างกัน โดยไอโซเลท SG7 มีความคล้ายกับ *Mesorhizobium plurifarum* สายพันธุ์ G187 เท่ากับ 97.50 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ไอโซเลท TSG7 มีความคล้ายกับ *Pseudomonas denitrificans* สายพันธุ์ H38A เท่ากับ 99.93 เปอร์เซ็นต์ โดยมีความแตกต่างจากค่าระยะห่าง คือ 243 ± 14.00 และไอโซเลท SG8 มีความคล้ายกับ *Pseudomonas citronellolis* สายพันธุ์ PY1 เท่ากับ 99.64 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ไอโซเลท TSG8 มีความคล้ายกับ *Lysinibacillus fusiformis* สายพันธุ์ L13 เท่ากับ 99.93 เปอร์เซ็นต์ โดยมีความแตกต่างจากค่าระยะห่าง คือ 294 ± 14.40 ความแตกต่างที่เกิดขึ้นของทั้งสองไอโซเลทนี้อาจจะเกิดจากการปนเปื้อนระหว่างการจัดเก็บหรือเกิดจากการปนเปื้อนระหว่างการทดลอง

เมื่อพิจารณายีนชีวสังเคราะห์ PHAs จากจีโนมด้วยวิธีหาฮัยนจากลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนอ้างอิง พบว่า *C. daecheongense* *P. chengduensis* *L. fusiformis* *E. hormaechei* *S. indica* *G. bronchialis* และ *P. denitrificans* มี PhaA PhaJ และ FabG เมื่อวิเคราะห์ PhaC พบว่า *P. chengduensis* และ *P. denitrificans* มีบริเวณอนุรักษ์ของ class II PHA synthase *E. hormaechei* และ *S. Indica* พบบริเวณอนุรักษ์ของ class I PHA synthase และ *G. bronchialis* พบบริเวณอนุรักษ์ของ PHA synthase และมีความคล้ายกับ class III PHA synthase ในขณะที่ *C. daecheongense* และ *L. fusiformis* ไม่พบ PhaC โดยตรง แต่พบบริเวณที่เหมือนกับโปรตีนอ้างอิง และบริเวณดังกล่าวมีความเหมือนกับ pimeloyl-ACP methyl ester carboxylesterase ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของบริเวณ alpha/beta hydrolase ที่พบใน PhaC

เมื่อพิจารณา ยีนชีวสังเคราะห์ PHAs จากจีโนมด้วยวิธีหา ยีนจากลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนอ้างอิง PhaZ พบว่า *C. daecheongense* *L. fusiformis* *E. hormaechei* *S. Indica* และ *G. bronchialis* มีบริเวณที่เหมือนกับ PhaZ ของโปรตีนอ้างอิง และบริเวณที่เหมือนกันนั้นตรงกับบริเวณอนุรักษ์ของ alpha/beta hydrolase และ carboxylesterase ในขณะที่ *P. chengduensis* และ *P. denitrificans* พบ PhaZ จากฐานข้อมูลโดยตรงและมีบริเวณอนุรักษ์ตรงกับ PHA depolymerase super family อย่างไรก็ตาม PhaZ ที่ระบุได้ยังไม่สามารถระบุได้ว่าเป็น PhaZ ชนิดภายนอกเซลล์หรือภายในเซลล์ เนื่องจาก PhaZ ชนิดภายในและภายนอกเซลล์มาจากยีนต่างกัน (De Eugenio และคณะ, 2007)

ผลจากการทดลองดังกล่าวมีความสอดคล้องกับผลการค้นคว้าหาข้อมูลเบื้องต้น พบว่า สกุล *Sphingopyxis* (Tobella และคณะ, 2005) และสกุล *Lysinibacillus* (Mohapatra, 2016) สามารถผลิตโคพอลิเมอร์ชนิด scl-PHAs และ mcl-PHAs สกุล *Enterobacter* (Favaro และคณะ, 2019) สามารถผลิต scl-PHAs และสกุล *Pseudomonas* (Song และคณะ, 2008) เป็นสกุลแบคทีเรียที่สามารถผลิต mcl-PHAs อย่างแพร่หลาย ในขณะที่สกุล *Chryseobacterium* และสกุล *Gordonia* ยังไม่พบรายงานถึงความสามารถในการผลิต PHAs

งานวิจัยนี้จึงสามารถระบุชนิดของยีนและโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิต PHAs และการย่อยสลาย PHAs โดยแบคทีเรียทั้ง 7 สายพันธุ์นั้นสามารถนำกลูโคสและกรดไขมันมาผลิต PHAs ผ่านกลุ่มยีนและโปรตีนชีวสังเคราะห์ PHAs ที่ระบุได้ของแบคทีเรียแต่ละชนิด และยังสามารถย่อยสลาย PHAs ผ่านกลุ่มยีนและโปรตีนย่อยสลาย PHAs อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้เป็นการตรวจสอบและทำนายกลุ่มยีนชีวสังเคราะห์ PHAs จากฐานข้อมูลในเบื้องต้น อาจต้องมีการศึกษาค้นคว้าเพิ่มเติมโดยการออกแบบไพรเมอร์ให้จำเพาะต่อยีนและนำไปตรวจสอบกับโคลนบริสุทธิ์ เพื่อยืนยันถึงชนิดของยีนชีวสังเคราะห์ PHAs และวิธีการผลิตของแบคทีเรียทั้งหมดนี้

เอกสารอ้างอิง

ภาษาไทย

ปวันรัตน์ ชัยศรี (2019). การคัดแยกและระบุลักษณะสมบัติของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอตจากดิน โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาษาอังกฤษ

- Boyandin, A. N., Prudnikova, S. V., Filipenko, M. L., Khrapov, E. A., Vasil'ev, A. D., & Volova, T. G. (2012). Biodegradation of polyhydroxyalkanoates by soil microbial communities of different structures and detection of PHA degrading microorganisms. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 48(1), 28-36. doi:10.1134/S0003683812010024
- Cai, L., Yuan, M.-Q., Liu, F., Jian, J., & Chen, G.-Q. (2009). Enhanced production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates (PHA) by PHA depolymerase knockout mutant of *Pseudomonas putida* KT2442. *Bioresource Technology*, 100(7), 2265-2270. doi:10.1016/j.biortech.2008.11.020
- Chanprateep, S. (2010). Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 110(6), 621-632. doi:10.1016/j.jbiosc.2010.07.014
- de Eugenio, L. I., García, P., Luengo, J. M., Sanz, J. M., Román, J. S., García, J. L., & Prieto, M. A. (2007). Biochemical evidence that phaZ gene encodes a specific intracellular medium chain length polyhydroxyalkanoate depolymerase in *Pseudomonas putida* KT2442: characterization of a paradigmatic enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 282(7), 4951-4962. doi:10.1074/jbc.M608119200
- Favaro, L., Basaglia, M., & Casella, S. (2019). Improving polyhydroxyalkanoate production from inexpensive carbon sources by genetic approaches: a review. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 13(1), 208-227. doi:10.1002/bbb.1944
- Fukui, T., Shiomi, N., & Doi, Y. (1998). Expression and characterization of (R)-specific enoyl coenzyme A hydratase involved in polyhydroxyalkanoate biosynthesis by *Aeromonas caviae*. *Journal of Bacteriology*, 180(3), 667-673. doi:10.1128/jb.180.3.667-673.1998
- Gao, X., Jian, J., Li, W.-J., Yang, Y., Shen, X.-W., Sun, Z.-R., Chen, G.-Q. (2013). Genomic study of polyhydroxyalkanoates producing *Aeromonas hydrophila* 4AK4. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 9099-9109. doi: 10.1007/s00253-013-5189-y

- Ishii-Hyakutake, M., Mizuno, S., & Tsuge, T. (2018). Biosynthesis and characteristics of aromatic polyhydroxyalkanoates. *Polymers*, *10*(11), 1267. doi:10.3390/polym10111267
- Kim, D.-Y., Kim, H., Chung, M., & Rhee, Y. (2007). Biosynthesis, modification, and biodegradation of bacterial medium-chain-length polyhydroxyalkanoates. *Journal of Microbiology*, *45*, 87-97. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17483792/>
- Kitamura, S., & Doi, Y. (1994). Staining method of poly(3-hydroxyalkanoic acids) producing bacteria by Nile blue. *Biotechnology Techniques*, *8*(5), 345-350. doi:10.1007/BF02428979
- Mohapatra, S., Samantaray, D. D., Samantaray, S., Mishra, B. B., Das, S., Majumdar, S., Pradhan, S., Rath, S., Rath, C., Akthar, J., Achary, K. (2016). Structural and thermal characterization of PHAs produced by *Lysinibacillus* sp. through submerged fermentation process. *International Journal of Biological Macromolecules*, *93*(Pt A), 1161-1167. doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.09.077
- Nomura, C. T., Taguchi, K., Gan, Z., Kuwabara, K., Tanaka, T., Takase, K., & Doi, Y. (2005). Expression of 3-ketoacyl-acyl carrier protein reductase (fabG) genes enhances production of polyhydroxyalkanoate copolymer from glucose in recombinant *Escherichia coli* JM109. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*(8), 4297-4306. doi:10.1128/aem.71.8.4297-4306.2005
- Numata, K., Abe, H., & Doi, Y. (2008). Enzymatic processes for biodegradation of poly(hydroxyalkanoate)s crystals. *Canadian Journal of Chemistry*, *86*, 471-483. doi:10.1139/V08-004
- Numata, K., Morisaki, K., Tomizawa, S., Ohtani, M., Demura, T., Miyazaki, M., Nogi, Y., Deguchi, S., & Doi, Y. (2013). Synthesis of poly- and oligo(hydroxyalkanoate)s by deep-sea bacteria, *Colwellia* spp., *Moritella* spp., and *Shewanella* spp. *Polymer Journal*, *45*, 1094-1100. doi:10.1038/pj.2013.25
- Obruca, S., Sedlacek, P., Slaninova, E., Fritz, I., Daffert, C., Meixner, K., Koller, M. (2020). Novel unexpected functions of PHA granules. *Applied Microbiology and Biotechnology*. *104*, 4795–4810. doi:10.1007/s00253-020-10568-1
- Shrivastav, A., Kim, H.-Y., & Kim, Y.-R. (2013). Advances in the applications of polyhydroxyalkanoate nanoparticles for novel drug delivery system. *BioMed research international*, *2013*, 581-684. doi:10.1155/2013/581684

- Song, J., Jeon, C., Choi, M., Yoon, S., & Park, W. (2008). Polyhydroxyalkanoate (PHA) production using waste vegetable oil by *Pseudomonas* sp. strain DR2. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18, 1408-1415.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18756101/>
- Tobella, L. M., Bunster, M., Pooley, A., Becerra, J., Godoy, F., & Martinez, M. A. (2005). Biosynthesis of poly-beta-hydroxyalkanoates by *Sphingopyxis chilensis* S37 and *Wautersia* sp. PZK cultured in cellulose pulp mill effluents containing 2,4,6-trichlorophenol. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 32(9), 397-401.
 doi:10.1007/s10295-005-0011-1
- 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 biodegradable plastic. *FEMS Microbiology Letters*, 189(1), 25-29. doi:10.1111/j.1574-6968.2000.tb09201.x
- Verma, H., Dhingra, G. G., Sharma, M., Gupta, V., Negi, R. K., Singh, Y., & Lal, R. (2020). Comparative genomics of *Sphingopyxis* spp. unravelled functional attributes. *Genomics*, 112(2), 1956-1969. doi:10.1016/j.ygeno.2019.11.008

เอกสารอ้างอิงออนไลน์

- กรมควบคุมมลพิษ. (2018). การจัดการขยะพลาสติก พ.ศ. 2561-2565 และ แผนปฏิบัติการด้านการจัดการขยะพลาสติก พ.ศ. 2561-2565 สืบค้น 20 เมษายน 2018,
 จาก http://www.pcd.go.th/Info_serv/File/17-09-62/40.pdf
- กรมส่งเสริมการค้าระหว่างประเทศ. (2019) สินค้าพลาสติกชีวภาพในญี่ปุ่น. สืบค้น 8 ตุลาคม 2019,
 จาก https://www.ditp.go.th/contents_attach/577232/577232.pdf
- Laura Parker. (2020). The world's plastic pollution crisis explained. สืบค้น 12 กุมภาพันธ์ 2020,
 จาก <https://www.nationalgeographic.com/environment/habitats/plastic-pollution>
- The japan plastics industry federation. (2020). Production of plastics materials in 2019-2020 Japan สืบค้น 20 มกราคม 2020, จาก <http://www.jpif.gr.jp/english/statistics/monthly/2020>

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Luria-Bertani (LB)

อาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

Tryptone	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	5	กรัม
Agar	20	กรัม

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตามสูตร Mizuno K. และคณะ (2010)

อาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

Yeast extract	0.5	กรัม
Peptone	1	กรัม
Glucose	10	กรัม
Nile blue A	0.5	มิลลิกรัม
Agar	20	กรัม

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข
สารเคมีและวิธีเตรียมสารที่ใช้ในการทดลอง

1. 10X TAE Electrophoresis buffer

10X TAE 1 ลิตร ประกอบด้วย

Tris [tris (hydroxymethyl) aminomethane]	48.4	กรัม
ผงกรดอะซิติก (17.4 M)	11.4	มิลลิลิตร
EDTA, เกลือโซเดียม	3.7	กรัม
น้ำปราศจากไอออน (DI)	988.6	มิลลิลิตร

ละลาย Tris ผงกรดอะซิติกและ EDTA ใน 800 มิลลิลิตรของน้ำปราศจากไอออน เจือจางบัฟเฟอร์ถึง 1 ลิตร เก็บสารละลายบัฟเฟอร์ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อนำมาใช้งานต้องเจือจางสารละลายบัฟเฟอร์ โดยผสม 10X TAE บัฟเฟอร์ปริมาตร 100 มิลลิลิตร กับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนมีปริมาตร 1 ลิตร

ภาคผนวก ค
ผลการทดลองเพิ่มเติม

1. ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16s rDNA

1.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16s rDNA ของไอโซเลท TSG1

ขนาด 1383 bp

```
>ATGCAGCCGAGCGGTAGAGTTCCTTCGGGGACTTGAGAGCGGCGTACGGGTGCGGAACA
CGTGTGCAACCTGCCTTTATCTGGGGGATAGCCTTTCGAAAGGAAGATTAATACCCATAATAT
AATGAGTGGCATCACTTATTATTGAAAACCTCCGGTGGATAGAGATGGGCACGCGCAAGATTAGA
TAGTTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGTCAGTGATCTTTAGGGGGCCTGAGAGGGTGATCCCCC
ACACTGGTACTGAGACACGGACCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGACAAT
GGGTGAGAGCCTGATCCAGCCATCCCGCGTGAAGGACGACGGCCCTATGGGTTGTAAACTTCTT
TTGTACAGGGATAAACCCAGATACGTGTATCTGGCTGAAGGTAAGTGTACGAATAAGCACCGGCT
AACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGTTTA
AAGGGTCCGTAGGCGGATCAGTAAGTCAGTGGTGAATCTCATAGCTTAACTATGAAACTGCCA
TTGATACTGCTGGTCTTGAGTAAGGTAGAAGTAGCTGGAATAAGTAGTGTAGCGGTGAAATGCA
TAGATATTACTTAGAACACCAATTGCGAAGGCAGGTTACTATGCTTAACTGACGCTGATGGAC
GAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGCTAACTC
GTTTTTGGGTTTTTCGGATTCAGAGACTAAGCGAAAGTGATAAGTTAGCCACCTGGGGAGTACGA
ACGCAAGTTTGAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGATTATGTGGTTTTAA
TTCGATGATACGCGAGGAACCTTACCAAGGCTTAAATGGGAATTGATCGGTTTAGAAATAGACC
TTCCTTCGGGCAATTTTCAAGGTGCTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGCCGTGAGGTGTTAGGT
TAAGTCCTGCAACGAGCGCAACCCCTGTCACTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGGACTCTAGTGA
GACTGCCTACGCAAGTAGAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCACGGCCCTTACGCCTT
GGGCCACACACGTAATACAATGGCCGGTACAGAGGGCAGCTACACAGCGATGTGATGCAAATCT
CGAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCTATGAAGCTGGAATCGCTAGT
AATCGCGCATCAGCCATGGCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAAGC
CATGGAAGTCTGGGGTACCTGAAGTCGGTGACCGTAAAAGGAGCT
```

1.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16s rDNA ของไอโซเลท TSG2

ขนาด 1383 bp

```
>GCAAGTTCGAGCGGATGAAGGGAGCTTGCTCCTTGATTTCAGCGGCGCGACGGGTGAGTAAT
GCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGTTCCGAAAGGAACGCTAATACCGCATAACGTC
CTACGGGAGAAAAGCGGGGGATCTTCGGACCTCGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCCGATTAGC
TAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTC
ACACTGGAAGTCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAAT
GGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTT
AAGTTGGGAGGAAGGGTATTCACCTAATACGTGAGTATTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCAC
CGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGG
GCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTTCGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAA
CTGCATCCAAAAGTGGCGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTG
AAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACAC
TGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGA
TGTCAACTAGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCC
TGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAAGTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGA
GCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGCTGAGAAGTTTC
CAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAGCTCAGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGT
GTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCCTTAGTTACCAGCACGTT
ATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGT
CATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCCGGTACAAAGGGTTGCCAAG
CCGCGAGGTGGAGCTAATCCATAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTG
CGTGAAGTCCGGAATCGCTAGTAATCGTGAATCAGAATGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTT
GTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCTCCAGAAGTAGCTAGT
```

1.3 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16s rDNA ของไอโซเลท TSG3

ขนาด 1416 bp

```
>GCAAGTTCGAGCGAACAGAAAAGGAGCTTGCTCCTTTGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGT
AACACGTGGGCAACCTACCCTATAGTTTTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGAATA
ATCTCTTTTGGCTTCATGGTGAAAGACTGAAAGACGGTTTTCGGCTGTCGCTATAGGATGGGCCCCG
CGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAG
AGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGG
AATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGAT
CGTAAACTCTGTTGTAAGGGAAGAACAAGTACAGTAGTAACTGGCTGTACCTTGACGGTACCT
TATTAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGT
CCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCCTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGC
TCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCA
AGNGTANCNGTGAAATNCGTAGAGANTTGGANGAACACCAGTNGCGAAGGCGACTTTCTGGTC
TGTNACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTNGGGAGCAAACAGGATTAGATANCCTGGTAGTCCN
CGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCNCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCAT
TAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCG
CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACAT
CCCGTTGACCACTGTAGAGATATAGTTTTCCCCTTCNGGGGCAACGGTGACAGGTGGTGCATGGT
TGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTA
GTTGCCATCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGA
TGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGATACAAA
CGGTTGCCAACTCGCGAGAGGGAGCTAATCCGATAAAGTCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTG
CAACTCGCCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGT
TTCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCCCCTACTACGAGAGTTTGTAAACCCGAAGTCGGTGAGG
TAACCTTTTGGAGCCAGC
```

1.4 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16s rDNA ของไอโซเลท TSG4

ขนาด 1405 bp

```
>CATGCAGTCGAACGGTAACAGGAAGCAGCTTGCTGCTTTGCTGACGAGTGGCGGACGGGT
GAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGC
ATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCGGATGTGCCCAGATGG
GATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGAT
GACCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATAT
TGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAA
AGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGATAAGGTTAATAACCTTGTCGATTGACGTTACCCGCAGA
AGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGG
AATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAA
CCTGGGAACTGCATTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGT
AGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGA
CTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCG
TAAACGATGTGCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTC
GACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAG
CGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAG
AACTTAGCAGAGATGCTTTGGTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCA
GCTCGTGTGTTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAG
CGGTTAGGCCGGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGT
CAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAAAGAGAAG
CGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCCTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTC
GACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGG
GCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAGAAGTAGGTAGCTTAACCT
TCGGGAGGG
```

1.5 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16s rDNA ของไอโซเลท TSG5

ขนาด 1354 bp

```
>TGCAGTCGAACGAGATCTTCGGATCTAGTGGCGCACGGGTGCGTAACCGCGTGGGAATCT
GCCCTTGGGTGCGGAATAACTTCCCGAAAGGGATGCTAATACCGCATAATGTCGCAAGACCAAA
GATTTATCGCCCAAGGATGAGCCCGCGTAAGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAAGCCTACCAAG
GCGACGATCTTTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGA
CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCAATGCC
GCGTGAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTTACCCGGGATGATAATGACAGTACCG
GGAGAATAAGCTCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGAGCTAGCGTTG
TTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGCGTTTTTTAAGTCAGAGGTGAAAGCCCGGG
GCTCAACCCCGGAATAGCCTTTGAAACTGGAAAAGTGAATCTTGGAGAGGTGAGTGGAAATTC
GAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTGACTGGA
CAAGTATTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC
ACGCCGTAAACGATGATAACTAGCTGTCCGGGTTTCATAGAACTTGGGTGGCGCAGCTAACGCAT
TAAGTTATCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTA AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCTGC
ACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCGTTTGACATC
CTGATCGCGGTTACCAGAGATGGTTTTCTTCAGTTCGGCTGGATCAGTGACAGGTGCTGCATGG
CTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCATCCCT
AGTTGCCATCATTAGTTGGGCACTCTAAGGAACTGCCGGTGATAAGCCGGAGGAAGGTGGG
GATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTACGCGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACA
GTGGGCAGCAACCGGGCGACCGGTAGCTAATCTCCAAAACCGTCTCAGTTCGGATTGTTCTCT
GCAACTCGAGAGCATGAAGGCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATAC
GTTCCAGGCCTTGATACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGTTTTACCCGAAGGCAGTGC
TCTAACCCGCAAGGGGGAAGC
```

1.6 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16s rDNA ของไอโซเลท TSG6

ขนาด 1376 bp

```
>CACTGCAAGTCGAACGGAAAGGCCAGCTTGCTGGGTGCTCGAGTGGCGAACGGGTGAG
TAACACGTGGGTGATCTGCCCCTGACTTTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGAT
ATGACCAGTTGGTGCATGCCTTCTGGTGGAAAGCCTTGTGCGGTTGGGGATGGGCCCCGCGGCC
TATCAGCTTGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGACCTGAGAGGGT
GATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATAT
TGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTA
AACCTCTTTCACCAGGGACGAAGCTTTTGTGACGGTACCTGGAGAAGAAGCACCGGCCAACTAC
GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAG
CTCGTAGGCGGTTTTGTCGCGTCGTCTGTGAAATTCTGCAGCTTAACTGCAGGCGTGCAGGCGAT
ACGGGCAGACTTGAGTACTACAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGA
TATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGTAGTAACTGACGCTGAGGAGCGAA
AGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGTACTAGG
TGTGGGGCTCATTTACGAGTTCGTCGCCGTAGCTAACGCATTAAGTACCCCGCCTGGGGAGTA
CGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGA
TTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATACACCAGACGCGGCTAGAGATA
GTCGTTCCCTTGTGGTTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGT
TGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTGTATTGCCAGCGGGTTATGCCGGGGACT
TGCAGGAGACTGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCCCT
TATGTCCAGGGCTTCACACATGCTACAATGGCCGGTACAGAGGGCTGCGATACCGTGAGGTGG
AGCGAATCCCTTAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATCGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTCGG
AGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCG
CCCGTCACGTCTCGGTAACACCCGAAGCCGGGCCTAACCCCTGAGGAGC
```


1.7 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16s rDNA ของไอโซเลท TSG7

ขนาด 1400 bp

```
>TGGTCGAGCGGATGAAGGGAGCTTGCTTCTGGATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCC
TAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGACAACGTTCCGAAAGGAGCGCTAATACCGCATACTCCTA
CGGGAGAAAGTGGGGGATCTTCGGACCTCACGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAG
TAGGTGGGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCGTAACGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACA
CTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGG
CGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAG
TTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGG
CTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCG
TAAAGCGCGCGTAGGTGGTTTGGTAAGATGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTG
CATCCATAACTGCCTGACTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTTCTGTGTAGCGGTGAAAT
GCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAG
GTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTC
GACTAGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTCGACCCGCTGG
GGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCA
TGTGGTTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGTCCGGAATCCTGCAG
AGATGCGGGAGTGCCTTCGGGAATCGGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTC
GTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCCTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCACGTTAAG
GTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAT
CATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCCGGTACAGAGGGTTGCCAAGCC
GCGAGGTGGAGCTAATCCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGC
GTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGAATCAGAATGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTG
TACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCTCCAGAAGTAGCTAGTCTAACCGCAAGG
GGGACGGT
```

1.8 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16s rDNA ของไอโซเลท TSG8

ขนาด 1418 bp

```
>AGTCGAGCGAACAGAAAAGGAGCTTGCTCCTTTGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAAC
ACGTGGGCAACCTACCCTATAGTTTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGAATAATC
TCTTTTGCTTCATGGTGAAAGACTGAAAGACGGTTTCGGCTGTCGCTATAGGATGGGCCCGCGG
CGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGG
GTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAT
CTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGTTTTTCGGATCG
TAAACTCTGTTGTAAGGGAAGAACAAGTACAGTAGTAACTGGCTGTACCTTGACGGTACCTTA
TTAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTC
CGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCCTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGC
TCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGGGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCA
AGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTC
TGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA
CGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCAT
TAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCCG
CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACAT
CCCGTTGACCACTGTAGAGATATAGTTTCCCCTTCGGGGGCAACGGTGACAGGTGGTGCATGGT
TGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTA
GTTGCCATCATTTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGG
ATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGATACAA
ACGTTGCCAACTCGCGAGAGGGAGCTAATCCGATAAAGTCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCT
GCAACTCGCCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATAC
GTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCACGAGGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAG
GTAACCTTTTGGAGCCAGCCGCCGA
```

1.9 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16s rDNA ของไอโซเลท SG1

ขนาด 1385 bp

```
>GCAGCCGAGCGGTAGAGTTCCTTCGGGGACTTGAGAGCGGCGTACGGGTGCGGAACACG
TGTGCAACCTGCCTTTATCTGGGGGATAGCCTTTCGAAAGGAAGATTAATACCCATAATATAA
TGAGTGGCATCACTTATTATTGAAAACCTCCGGTGGATAGAGATGGGCACGCGCAAGATTAGATA
GTTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGTCAGTGATCTTTAGGGGGCCTGAGAGGGTGATCCCCCA
CACTGGTACTGAGACACGGACCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGACAATG
GGTGAGAGCCTGATCCAGCCATCCCGCGTGAAGGACGACGGCCCTATGGGTTGTAACTTCTTT
TGTACAGGGATAAAACCCAGATACGTGTATCTGGCTGAAGGTAAGTACTGTACGAATAAGCACCGGCTA
ACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGTTTAA
AGGGTCCGTAGGCGGATCAGTAAGTCAGTGGTGAAATCTCATAGCTTAACTATGAAACTGCCAT
TGATACTGCTGGTCTTGAGTAAGGTAGAAGTAGCTGGAATAAGTAGTGTAGCGGTGAAATGCAT
AGATATTACTTAGAACACCAATTGCGAAGGCAGGTTACTATGTCTTAACTGACGCTGATGGACG
AAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGCTAACTCG
TTTTTGGGTTTTTCGGATTCAGAGACTAAGCGAAAGTGATAAGTTAGCCACCTGGGGAGTACGAA
CGCAAGTTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGATTATGTGGTTTTAAT
TCGATGATACGCGAGGAACCTTACCAAGGCTTAAATGGGAATTGATCGGTTTAGAAATAGACCT
TCCTTCGGGCAATTTTCAAGGTGCTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGCCGTGAGGTGTTAGGTT
AAGTCCTGCAACGAGCGCAACCCCTGTCACTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGGACTCTAGTGAG
ACTGCCTACGCAAGTAGAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCACGGCCCTTACGCCTTG
GGCCACACACGTAATACAATGGCCGGTACAGAGGGCAGCTACACAGCGATGTGATGCAAATCTC
GAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCTATGAAGCTGGAATCGCTAGTA
ATCGCGCATCAGCCATGGCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCAAGCC
ATGGAAGTCTGGGGTACCTGATAGTCGGTGACCGTAAAAGGAGCTGC
```

1.10 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16s rDNA ของไอโซเลท SG2

ขนาด 1371 bp

```
>TGCAGTCGAGCGGAGAAGGGATGCTCCTTGATTTCAGCGGCGGAGGTGAGTAATGCCT
AGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGTTCCGAAAGGAACGCTAATACCGCATAACGTCC
TACGGGAGAAAAGCGGGGGATCTTCGGACCTCGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCCGATTAG
CTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATC
AGTCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTG
GACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTA
AAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGTATTCACCTAATACGTGAGTATTTTGACGTTACCGA
CAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGAAGCGTT
AATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTCGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCC
CGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAAGTGGCGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTG
GAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGA
CCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAC
CCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCAACTAGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGG
CGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAAGTCAAATG
AATTGACGGGGGCCCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAA
CCTTACCTGGCCTTGACATGCTGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAGCTC
AGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGT
AACGAGCGCAACCCCTTGCCTTAGTTACCAGCACGTTATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTG
CCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAG
GGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAAAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAAT
CCCATAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATC
GCTAGTAATCGTGAATCAGAATGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCC
CGTCTGGGAGTGGGTTGCTCCAGAAGTAGCTAGT
```

1.11 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16s rDNA ของไอโซเลท SG3

ขนาด 1431 bp

```
>CTATACATGCAAGTCGAGCGAACAGAAAAGGAGCTTGCTCCTTTGACGTTAGCGGCG
GACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTACCCTATAGTTTGGGATAACTCCGGGAAACCGG
GCTAATACCGAATAATCTCTTTTGTTCATGGTGAAAGACTGAAAGACGGTTTCGGCTGTC
GCTATAGGATGGGCCC GCGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGAC
GATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACT
CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCC
GCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTAAGGGAAGAACAAGTACAGT
AGTAACTGGCTGTACCTTGACGGTACCTTATTAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCA
GCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAG
GCGGTCCTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTTCATTGGAAACTG
GGGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCCAAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGA
TTTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTA ACTGACGCTGAGGCGCGAA
AGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTA
AGTGTTAGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGG
AGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGC
ATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCGTTGACCAC
TGTAGAGATATAGTTTTCCCCTTCGGGGCAACGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAG
CTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCC
ATCATTTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGA
CGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGATACAAA
CGGTTGCCAACTCGCGAGAGGGAGCTAATCCGATAAAGTCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGG
CTGCAACTCGCCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGA
ATACGTTCCCGGGCCTTGTTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAG
TCGGTGAGGTAACCTTTTGGAGCCAGCCGCCGA
```

1.12 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16s rDNA ของไอโซเลท SG4

ขนาด 1093 bp

```
>AATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGT  
AAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGATAAGGTTAATAACCTTGTTCGATTGACGTTACCC  
GCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCG  
TTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATC  
CCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGT  
AGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCC  
GCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATA  
CCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTT  
CCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAAT  
GAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGA  
ACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTTAGCAGAGATGCTTTGGTGCCTTCGGGAACT  
CTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCG  
CAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTTAGGCCGGGAACTCAAAGGAGACTG  
CCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGG  
GCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACC  
TCATAAAGTGCGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCG  
CTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCC  
GTCACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAAAGAAGTACTTAACCTTCGGGAGGGCGCTTACCAC
```

1.13 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16s rDNA ของไอโซเลท SG5

ขนาด 1321 bp

```
>TGCAGTTAGTGGCGCACGGGTGCGTAACGCGTGGGAATCTGCCCTTGGGTGCGGAAT
AACTTCCCGAAAGGGATGCTAATACCGCATAATGTGCGCAAGACCAAAGATTTATCGCCAA
GGATGAGCCCCGCGTAAGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAAGCCTACCAAGGCGACGATCTT
TAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGG
GAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGA
GTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTTACCCGGGATGATAATGACAGTACCGGGA
GAATAAGCTCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGAGCTAGCGTTGT
TCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGCGGTTTTTTAAGTCAGAGGTGAAAGCCCGG
GGCTCAACCCCGGAATAGCCTTTGAAACTGGAAAAGTGAATCTTGGAGAGGTCAGTGGAA
TTCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTG
ACTGGACAAGTATTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTT
GGTAGTCCACGCCGTAAACGATGATAACTAGCTGTCCGGGTTTCATAGAACTTGGGTGGCGC
AGCTAACGCATTAAGTTATCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAGTCAAAGGAAT
TGACGGGGGCCTGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCT
TACCAGCGTTTGACATCCTGATCGCGGTTACCAGAGATGGTTTCCTTCAGTTCGGCTGGAT
CAGTGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG
CAACGAGCGCAACCCTCATCCCTAGTTGCCATCATTGAGTTGGGCACTCTAAGGAAACTGC
CGGTGATAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTACGCGCTGG
GCTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACAGTGGGCAGCAACCGGGCGACCGGTAGCTAATC
TCCAAAACCGTCTCAGTTCGGATTGTTCTCTGCAACTCGAGAGCATGAAGGCGGAATCGC
TAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCAGGCCTTGACACACCGCCCG
TCACACCATGGGAGTTGGTTTCACCCGAAGGCATAACCCGCAAGG
```

1.14 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16s rDNA ของไอโซเลท SG6

ขนาด 1338 bp

```
>TGGGTGCTCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGACTTTG
GGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACCAGTTGGTGCATGCCTTCTGGT
GGAAAGCCTTGTGCGGTTGGGGATGGGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGG
CCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAG
ACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCC
TGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCACCAGGG
ACGAAGCTTTTGTGACGGTACCTGGAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGC
GGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGT
TTGTCGCGTCTGTGAAATTCTGCAGCTTAACTGCAGGCGTGCAGGCGATACGGGCAGA
CTTGAGTACTACAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGG
AGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGTAGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCG
TGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGGTGGGTAAGGTG
TGGGGCTCATTTACAGAGTTCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGTACCCCGCCTGGGGAGT
ACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATG
TGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATACACCAGACGCGGCT
AGAGATAGTCGTTCCCTTGTGGTTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTGTCGTCAGCTCGTGT
CGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCTTGTCTGTATTGCCAGCGGGT
TATGCCGGGGACTTGCAGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAAGGTTGGGGATGACG
TCAAGTCATCATGCCCCCTTATGTCCAGGGGCTTACACATGCTACAATGGCCGGTACAGAG
GGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTTAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATCGGGGTC
TGCAACTCGACCCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGA
ATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCATGAAAGTCGGTAACACCCGAAG
CTCG
```


1.15 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16s rDNA ของไอโซเลท SG7

ขนาด 1358 bp

```
>TGCAAGTTCGAGCGCCCTGCTTGCAGGGAGCGGCAGACGGGTGAGTAACGCGTGGGA
ATCTACCCATCTCTACGGAACAGCTCCGGGAAACTGGAATTAATACCGTATACGCCCTTTT
GGGAAAGATTTATCGGAGATGGAAGAGCCCGCGTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAG
GCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAG
ACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCC
TGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAGCTCTTTCACCGGTG
AAGATAATGACGGTAACCGGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAA
TACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTCCGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGACATTT
AAGTCAGGGGTGAAATCCCAGGGCTCAACCCCGGAACTGCCTCTGATACTGGGTGTCTTGA
GTTTCGAGAGAGGTGAGTGAATTCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAA
CACCAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGCTCGATACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGG
AGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGGAAGCTAGCCGTTGGC
AGGTTTACCTGTTCGGTGGCGCAGTTAACGCATTAAGCTTCCCAGCCTGGGGAGTACGGTCGC
AAGATTA AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAAT
TCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTTGACATCCCAGTCCGCGTTACCAGAGATGG
TATCCTTCAGTTCGGCTGGACCGGTGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCT
GAGATGTTGGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTCGCCCTTAGTTGCCAGCATTGAG
TTGGGCACTCTAAGGGGACTGCCGGTGATAAGCCGAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAG
TCCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTGGTGACAGTGGGCAGC
GAGACCGCGAGGTTCGAGCTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTCGGATTGCACTCTGCAACT
CGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTT
CCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTTGGCTTTACCCGAAGGCGCTGTG
CTAACCGCAAGGAGGCAGGCACC
```

1.16 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16s rDNA ของไอโซเลท SG8

ขนาด 1403 bp

```
>TGCAAGTTCGAGCGGATGAAGGGAGACATTGCTTCTGGATTACAGCGGCGGACGGGTGA
GTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGACAACGTTCCGAAAGGAGCGCTAATACCG
CATACGTCCTACGGGAGAAAGTGGGGGATCTTCGGACCTCACGCTATCAGATGAGCCTAGG
TCGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAG
AGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGG
GGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTT
CGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGA
CGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGT
GCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTTTGGTAAGATGGATG
TGAAATCCCCGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCATAACTGCCTGACTAGAGTACGGTAGA
GGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGC
GAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG
ATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTAGCCGTTGGGATCCTTGAGA
TCTTAGTGCGCAGCTAACGCGATAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAA
ACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAA
CGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGTCCGGAATCCTGCAGAGATGCGGGAGTGCCTT
CGGGAATCGGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCGTGTGAGATGTTGGGGT
TAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCACGTTAAGGTGGGCACTCT
AAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCC
TTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGG
TGGAGCTAATCCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGA
AGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGAATCAGAATGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGT
ACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCTCCAGAAGTAGCTAGTCTAACCGCAAG
GGGGA
```

บริเวณอนุรักษ์ของ PhaB เมื่อเปรียบเทียบกับ FabG

query	4	LEGKVALITGATRGIGRIGIAEVFAQQGAKI . [1] .FTYVGSV . [2] .AKELEAT . [3] .V	TQIKG . [3] .DASDY	67	
167621922	11	LQGKVALVTGGNTGLGQAI AVALAKAGADI . [1] .VAGRTEP . [2] .TRLEVEQ	A . [1] .RGFIS . [3] .DFFT	72	
24374346	12	LQGKVAFVQGGSRGIGAAIVKRLASEGAAV . [1] .FTYVSS . [2] .SQLLVDE . [3] .Q	. [1] .GKAIA . [3] .DSTEP	76	
295688966	7	LEGKVALVTGANTGIGQGI AIALAAAGADI . [1] .AAGRSEP . [2] .TQAAVEA	L . [1] .RKFLS . [3] .DFGST	68	
16125739	7	LEGKVALITGANTGIGQGI AIALAAAGADI . [1] .AAGRSAP . [2] .TQAAVEA	L . [1] .RKFLS . [3] .DFSSI	68	
221234496	7	LEGKVALITGANTGIGQGI AIALAAAGADI . [1] .AAGRSAP . [2] .TQAAVEA	L . [1] .RKFLS . [3] .DFSSI	68	
145297514	7	LSGQVAFVQGGSRGIGAAIVKRLARDGAAV . [1] .FTYVSSA . [2] .AEEIVAT . [3] .A	. [1] .GKALA . [3] .DSADA	71	
125718728	3	LQNKVLITGSARGIGLAI AHKFASVGMV . [1] .LNLGSLG	SDDILAE . [3] .Y . [1] .GKVA . [3] .DVSKA	65	
260597464	3	FEGKIALVTGASRGIGRAIAETLAARGAKV	IGTATSE . [2] .AQAISDY . [3] .N . [1] .KGLML	NVTDA	63
296504346	2	LKGKVALVTGASRGIGRAIAIDLAKQGMV . [1] .VNYAGNE . [2] .ANEVDE . [3] .L	. [1] .SDAIA . [3] .DVANA	66	
query	68	DAAQKLVVEEVAEFGQIDILINNAGITRDNLLL RMSKEDWDTIKVNLD SVFNLT KAVIKPMMKA . [2] .GSIINM TSV		143	
167621922	73	EPIARTLEETLAAFGVRVDILVNNAGVIRRADSIDFTEADWDVAVMDTNLKVVFLLTQAFARQALKQ . [7] .GKVINIASL		153	
24374346	77	EAIRRAIRETKAHLGLDILVNNAGILWDSIENLTLEDWERTVNTNVRSVFVASQEAAALHMNDG	GRINIIGST	150	
295688966	69	EPVQRVDETVATFGKVDILVNNAGIIRRADSI EFSEADWDVAVMDTNLKVVFLLTQAFARQALKQ . [2] .GKVINIASL		144	
16125739	69	EPVQRVDETVAAFGKVDILVNNAGIIRRADSI EFSEADWDVAVMDTNLKVVFLLTQAFARQALKQ . [6] .AKVINIASL		148	
221234496	69	EPVQRVDETVAAFGKVDILVNNAGIIRRADSI EFSEADWDVAVMDTNLKVVFLLTQAFARQALKQ . [6] .AKVINIASL		148	
145297514	72	IAVQHAIRQVTTFRGLDILVNNAGVLVWGDIEELTLDLDRTLAVNIRSVFVACQEAALHMKGK	GRINIIGST	145	
125718728	66	ADAQRIVEEAVTALGSVDLVNAGITRDKMLMTEEDFEQVLKVNLTGTFNMTQSVLKPMTKA . [2] .GAINLSSV		141	
260597464	64	ASIESVLEIRSEFGEVDILVNNAGITRDNLLMRMKDDEWNDIETNLSSVFRLSKAVMRAMMK . [2] .GRIITIGSV		139	
296504346	67	DDVTNMMVQTVDTFGQVDILVNNAGVTKDNLLMRMKEEWDVTINTNLKGVFLCTKAVSRVMMRQ . [2] .GRIINIASV		142	
query	144	VGISGNGGQANYAASKAGVIGFTKSVALELGSRNIRCNIAIPGFIEETEMTAS . [1] .DEKTL	QAWRDGIP	209	
167621922	154	LSFQGGIRVPSY T ASK SGLAGLTKILANEWATKGVNVAIAPGYFDTNNTA . [2] .NDPDR . [1] .AAILQRIP		221	
24374346	151	. [1] .AERIPFVGGAIYGMSKSALVGLAKGLARDLGPRAITVNNIQPGPVDTDMNPD	NGDSS	EPIKAIGV	216
295688966	145	LSFQGGIRVPSY T ASK SGLAGLTKILANEWATKGINVVAIAPGYFDTNNTA . [2] .ADQDR . [1] .AAILARIP		212	
16125739	149	LSFQGGIRVPSY T ASK SGLAGLTKILANEWATKGINVVAIAPGYFDTNNTA . [2] .ADQDR . [1] .AAILARIP		216	
221234496	149	LSFQGGIRVPSY T ASK SGLAGLTKILANEWATKGINVVAIAPGYFDTNNTA . [2] .ADQDR . [1] .AAILARIP		216	
145297514	146	. [1] .ADRIPMVGGSVYAMS KSALVGLTKGMARDLGPKGITVNNVQPGPVDTDMNPA	DGESA	AQLKGMMA	211
125718728	142	VGLAGNIGQANYAASKAGLIGFSKSVAREVAARNIRVNCIAPGFIESDMTDV . [1] .PEKIK	EASLALIP	207	
260597464	140	VGTMGNAGQANYAAKAGLIGFSKSLAREVASRGITVNVVAPGFIEETDMTRA . [1] .SDDQR	AGILAEV	205	
296504346	143	VGVTGNPGQANYVAAKAGVIGLTKTSAKELASRNITVVAIAPGFIAETDMTDV . [1] .DENIK	AEMLKVIP	208	
query	210	MKRGQPEDIANACVFLGSE . [2] .SYITGQVLNVDGGM		245	
167621922	222	AGRLGLPADIAGAAVFLASA . [2] .DYVQGITLTPVDGGW		257	
24374346	217	LGRYGKAEIASFVAFIAGP . [2] .GYITGASLMIDGGF		252	
295688966	213	AGRWGRPEDIGGAAVFLASS . [2] .DYVQGITLTPVDGGW		248	
16125739	217	AGRWGRPEDIGGAAVFLASS . [2] .DYVQGITLTPVDGGW		252	
221234496	217	AGRWGRPEDIGGAAVFLASS . [2] .DYVQGITLTPVDGGW		252	
145297514	212	LARYGKDEEIASFVAYLAGP . [2] .GYITGASLTIDGGF		247	
125718728	208	MKRFGTPEEVADVALFLAGQ	EYLTGQVITIDGGF	241	
260597464	206	AGRLGDAKEIASAVFLASD . [2] .GYITGETLHVNGGM		241	
296504346	209	AAQFGAEAKDIANA VTF FASD . [2] .KYVTGQTLNVDGGM		244	