

การสกัดและการทำให้บริสุทธิ์ของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตชนิดสายโซ่กลางที่ผลิตโดย *Streptomyces* sp. โดยใช้เอนไซม์และระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค

Extraction and purification of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates produced by *Streptomyces* sp. using enzymes and an aqueous two-phase system

พรทิพพา พิณญาพงษ์^{1*} และสมใจ เขียวสดใส²

Pornthippa Pinyaphong^{1*} and Somjai Khiewsdaisai²

Received: 9 March 2025 ; Revised: 7 May 2025 ; Accepted: 6 June 2025

บทคัดย่อ

พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (PHA) เป็นพอลิเมอร์ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ สังเคราะห์โดยแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติคล้ายพลาสติกจากปิโตรเคมี เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม วิธีการสกัดแบบเดิมเป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม จึงจำเป็นต้องมีวิธีการสกัดที่คุ้มค่าและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการสกัดและทำให้บริสุทธิ์ของ PHA จากเซลล์แบคทีเรียที่ใช้เอนไซม์และระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค (ATPS) แบคทีเรียที่ใช้ศึกษาถูกแยกจากดินเพาะปลูก และเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่ประกอบด้วยเกลือแร่ชนิดต่าง ๆ โดยไม่มีแหล่งคาร์บอนที่ซับซ้อน และจำกัดไนโตรเจน เอนไซม์สามชนิด (ไลโซไซม์ ปาเปน และไลเปส) ที่ความเข้มข้น 2-10 กรัม/กรัมเซลล์ ถูกใช้ในการย่อยผนังเซลล์แบคทีเรียที่แยกได้ จากนั้นศึกษาการทำให้บริสุทธิ์ของ PHA ด้วย ATPS ห้าระบบ และตรวจสอบองค์ประกอบ PHA ด้วยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี-แมสสเปคโตรเมตรี ผลการวิจัยพบว่า แบคทีเรียที่แยกได้เป็นชนิดแกรมบวกในสกุล *Streptomyces griseoincarnatus* เอนไซม์ปาเปน (10 กรัม/กรัมเซลล์) มีประสิทธิภาพสูงสุดในการย่อยผนังเซลล์ รองลงมาคือไลโซไซม์ และไลเปส ที่ความเข้มข้นเดียวกัน โดยให้ค่าการลดลงสัมพัทธ์การดูดกลืนแสง 81.9%, 34.2% และ 26.2% ตามลำดับ การสกัดมีประสิทธิภาพสูงสุดเมื่อใช้ไลโซไซม์เข้มข้น 10 กรัม/กรัมเซลล์ ย่อยผนังเซลล์ก่อน 8 ชั่วโมง และตามด้วยปาเปนเข้มข้น 10 กรัม/กรัมเซลล์ อีก 12 ชั่วโมง ให้ผลผลิต PHA สูงสุด 87.2% ระบบ PEG6000/K₂HPO₄ เป็น ATPS ที่มีประสิทธิภาพในการทำให้ PHA ที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 58.8% และองค์ประกอบของ PHA ที่สกัดได้เป็นชนิดสายโซ่กลาง ดังนั้นการพัฒนาวิธีการสกัดโดยใช้เอนไซม์และวิธีการทำให้บริสุทธิ์โดย ATPS เป็นอีกแนวทางหนึ่งเพื่อนำไปใช้ในการกู้คืน PHA จากเซลล์แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม

คำสำคัญ: การสกัด, การทำให้บริสุทธิ์, พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต, เอนไซม์, ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค

Abstract

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are biodegradable polymers synthesized by bacteria, exhibiting properties similar to petrochemical-based plastics while being environmentally friendly. Traditional extraction methods pose environmental hazards, necessitating cost-effective and eco-friendly alternatives. This study aimed to investigate the extraction and purification of PHA from bacterial cells using enzymes and an aqueous two-phase system (ATPS). The bacteria used in this study were isolated from agricultural soil and cultivated in a nitrogen-limited minimal salts medium without

¹ หลักสูตรเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรดิตถ์

² ศูนย์วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรดิตถ์

¹ Chemistry Program, Faculty of Science and Technology, Uttaradit Rajabhat University, E-mail: p.pinyaphong@gmail.com

² Science and Technology Center, Uttaradit Rajabhat University, E-mail sujara-kuk@hotmail.com

* Corresponding author; E-mail: p.pinyaphong@gmail.com

complex carbon sources. Three enzymes—lysozyme, papain, and lipase—at concentrations ranging from 2 to 10 g/g cell, were employed to digest the bacterial cell wall. Subsequently, the purification of PHA was examined using five different ATPSs, and the composition of the extracted PHA was analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The results indicated that the isolated bacterium was identified as the Gram-positive species *Streptomyces griseoincarnatus*. Among the tested enzymes, papain at 10 g/g cell exhibited the highest efficiency in cell wall digestion, followed by lysozyme and lipase at the same concentration, with relative absorbance reductions of 81.9%, 34.2%, and 26.2%, respectively. The optimal extraction efficiency was achieved when lysozyme (10 g/g cell) was used to pre-digest the cell wall for 8 hours, followed by papain (10 g/g cell) for an additional 12 hours, yielding the highest PHA recovery of 87.2%. The PEG6000/K₂HPO₄ system was found to be the most effective ATPS, increasing the purity of the extracted PHA by 58.8%. The extracted PHA was identified as a medium-chain-length polymer. Therefore, the development of an enzymatic extraction method combined with ATPS purification provides an efficient and environmentally friendly approach for recovering PHA from bacterial cells.

Keywords: Extraction, purification, polyhydroxyalkanoates, enzyme, aqueous two-phase system

บทนำ

พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (PHA) เป็นพอลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพซึ่งสะสมอยู่ในเซลล์ของแบคทีเรียจำนวนมากเพื่อใช้เป็นแหล่งสำรองคาร์บอนและพลังงานของเซลล์ในสภาวะที่ขาดสมดุลของสารอาหาร เช่น สภาวะที่มีปริมาณคาร์บอนมากเกินพอ แต่ขาดธาตุไนโตรเจน (Gumel *et al.*, 2013) PHA มีสมบัติทางกายภาพใกล้เคียงกับพลาสติกจากปิโตรเคมี เช่น พอลิโพรพิลีน ซึ่งเหมาะสำหรับการนำไปผลิตเป็นเทอร์โมพลาสติก จัดเป็นวัสดุหมุนเวียนตามธรรมชาติ และเข้ากันได้กับสิ่งมีชีวิตจึงมีแนวโน้มที่จะนำมาใช้ทดแทนพลาสติกที่ผลิตจากอุตสาหกรรมปิโตรเคมีเพื่อลดปัญหามลภาวะทางสิ่งแวดล้อม (Raza *et al.*, 2018) ในการผลิต PHA ในระดับอุตสาหกรรมมีข้อจำกัดที่สำคัญ คือ ต้นทุนการผลิตสูงกว่าต้นทุนในการผลิตพลาสติกจากปิโตรเคมีประมาณ 5-10 เท่า โดยต้นทุนหลักของการผลิต PHA มาจากสองส่วน คือ ต้นทุนวัตถุดิบ และต้นทุนกระบวนการสกัดและทำให้บริสุทธิ์ ซึ่งเป็นกระบวนการปลายทางของการผลิต PHA ที่ส่งผลต่อต้นทุนการผลิตมากที่สุด วิธีการสกัดและทำให้บริสุทธิ์ของ PHA มี 2 วิธี คือ การสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น คลอโรฟอร์ม แอลกอฮอล์ คีโตน เอสเทอร์ คาร์บอนเนต เป็นต้น และการสกัดโดยการทำลายเซลล์ด้วยสารเคมี เช่น สารออกซิไดซ์ กรด-ด่าง สารลดแรงตึงผิว และเอนไซม์ วิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ เป็นวิธีที่ได้ PHA ที่มีความบริสุทธิ์สูง แต่ใช้ต้นทุนสูง ใช้พลังงานมากในการกำจัดตัวทำละลายอินทรีย์เนื่องจากต้องใช้ตัวทำละลายอินทรีย์จำนวนมากประมาณ 20 เท่าของเซลล์แบคทีเรีย และเป็นวิธีที่ให้ค่าคาร์บอนฟุตพริ้นท์สูงกว่าการผลิตพลาสติกจากปิโตรเลียม (Saavedra del Oso *et al.*, 2020) อีกทั้งวิธีการดังกล่าวต้องใช้เวลาในการปรับสภาพของเซลล์

ก่อนโดยใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ หรือ ความร้อน เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัด (Pagliano *et al.*, 2021) สำหรับการสกัดโดยใช้สารเคมีในการทำลายเซลล์ สามารถใช้กับเซลล์แห้งของแบคทีเรียได้โดยตรง แต่อาจส่งผลต่อลักษณะของ PHA ที่สกัดได้ เช่น มีน้ำหนักโมเลกุลลดลงเนื่องจากเกิดการสลายของโมเลกุลพอลิเมอร์ และมีความบริสุทธิ์ต่ำกว่า แต่มีต้นทุนต่ำกว่าการสกัดด้วยตัวทำละลาย นอกจากนั้นสารเหล่านี้นักจะไม่สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ (Mannina *et al.*, 2020)

สำหรับการใช้เอนไซม์ในการทำลายเซลล์จะมีข้อดีที่เหนือกว่าการใช้สารเคมี คือ เอนไซม์มีความจำเพาะต่อเพปทิโดไกลแคนที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ในแบคทีเรียชนิดแกรมบวกและแกรมลบ สภาวะที่ใช้ในการทำลายเซลล์ไม่รุนแรง และพอลิเมอร์ที่สกัดได้ไม่เสียหาย แต่มีข้อเสียคือใช้เวลานาน ราคาของเอนไซม์สูงกว่าสารเคมี Kapritchkoff *et al.* (2006) ได้ศึกษาการใช้เอนไซม์ในการสกัดและทำให้พอลิไฮดรอกซีบิวทีเรต (polyhydroxybutyrate, PHB) บริสุทธิ์ ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่ผลิตโดยแบคทีเรีย *Ralstonia eutropha* DSM545 พบว่าการใช้โบรมิเลนเข้มข้น 2% ให้ผลผลิต PHB ที่มีความบริสุทธิ์ 88.8% ดังนั้นการทำลายเซลล์โดยใช้เอนไซม์ดิบ (crude enzyme) ที่หาได้ง่ายในท้องถิ่น เช่น เอนไซม์ปาเปน เอนไซม์ไลเปสจากยางมะละกอ และเอนไซม์ไลโซไซม์จากไข่ขาว จึงน่าสนใจในการลดต้นทุนโดยใช้เอนไซม์แทนสารเคมี

ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค (aqueous two-phase system, ATPS) เป็นเทคนิคการแยกและทำให้สารทางชีวภาพบริสุทธิ์ โดยใช้วัฏภาคของเหลวสองชั้นที่ไม่ผสมกัน เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ต้นทุนต่ำ และสามารถขยายขนาดการผลิตได้ง่าย (Grilo *et al.*, 2016) ตัวอย่างการประยุกต์ใช้ของ ATPS

เช่น การทำโปรตีนและเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ การสกัดแอนติบอดี การสกัดกรดนิวคลีอิก การแยกเซลล์และออร์แกเนลล์ เป็นต้น ในการทำลายเซลล์ของแบคทีเรียโดยใช้เอนไซม์จะเพิ่มขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีความสนใจที่จะศึกษาการสกัด PHA จากเซลล์ของแบคทีเรียโดยใช้การย่อยด้วยเอนไซม์จากยีสและเพิ่มความสามารถของ PHA ที่สกัดได้โดยใช้ระบบ ATPS เพื่อเป็นแนวทางในการลดต้นทุนในการสกัดจากการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ และเพื่อเป็นกระบวนการสกัดที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม

การทดลอง

1. การเตรียมสารละลาย

สารละลาย Winogradsky Salt (WS) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย K_2HPO_4 0.25 กรัม $MgSO_4$ 0.125 กรัม $NaCl$ 0.125 กรัม $Fe_2(SO_4)_3$ 2.5 มิลลิกรัม และ $MnSO_4$ 2.5 มิลลิกรัม อาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่ประกอบด้วยเกลือแร่ชนิดต่าง ๆ โดยไม่มีแหล่งคาร์บอนที่ซับซ้อน (Minimal Salt Medium, MSM) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย กลูโคส 10 กรัม $(NH_4)_2SO_4$ 1 กรัม $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 6.7 กรัม KH_2PO_4 0.1 กรัม $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 กรัม $C_6H_8O_7 \cdot xFe_3^+ \cdot yNH_3$ 60 มิลลิกรัม $CaCl_2 \cdot 7H_2O$ 10 มิลลิกรัม และสารละลาย Trace element 1 มิลลิกรัม

สารละลาย Trace element 1 ลิตร ประกอบด้วย $CaCl_2 \cdot 7H_2O$ 1.67 กรัม $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 2.78 กรัม $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 1.98 กรัม $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.17 กรัม และ $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 กรัม สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7 ประกอบด้วย $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 19.37 กรัม $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 10.24 กรัม

สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 6 ประกอบด้วย $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 14.52 กรัม $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 6.31 กรัม

สารละลาย Sudan Black B เข้มข้น 0.3% เตรียมโดย ชั่ง Sudan Black B 0.3 กรัม ละลายในเอทานอล 95% ปริมาตร 100 มิลลิกรัม

2. การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิต PHA จากดิน

เก็บตัวอย่างดินบริเวณพื้นที่เพาะปลูกในตำบลศรีพนมมาศ อำเภอปลวกแดง จังหวัดอุตรดิตถ์ เก็บเศษวัสดุ ใบไม้ กิ่งไม้ออกไปก่อนเก็บตัวอย่างดิน เก็บดิน 6 จุด ที่ความลึก 15 เซนติเมตร โดยแต่ละจุดใช้หลอดดูดเป็นรูปตัว V ในแนวตั้ง แล้วรวมดินทั้ง 6 จุดเข้าด้วยกัน จากนั้นแบ่งดินบางส่วน

ลงในถุงพลาสติกประมาณ 1 กิโลกรัม เก็บรักษาตัวอย่างดินในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอทำการวิเคราะห์ต่อไป (Thuithaisong *et al.*, 2011)

การแยกจุลินทรีย์จากดิน ทำได้โดยชั่งตัวอย่างดิน 1 กรัม เติมน้ำละลาย WS 9 มิลลิกรัม ที่นิ่งมาเชื้อแล้วนำไปเขย่าในเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้องด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ปิเปตสารละลาย 1 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดทดลองที่มีสารละลาย WS ที่นิ่งมาเชื้อแล้ว 9 มิลลิกรัม เขย่าให้เข้ากัน (สารละลายตัวอย่างมีความเข้มข้น 10^{-1}) ปิเปตสารละลายเชื้อที่ได้ (10^{-1}) ปริมาตร 1 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดที่มีสารละลาย WS ที่นิ่งมาเชื้อแล้ว ปริมาตร 9 มิลลิกรัม เขย่าให้เข้ากัน จะได้สารละลายเชื้อที่มีความเข้มข้น 10^{-2} แล้วทำการเจือจางสารละลายเชื้อต่อไปจนถึงความเข้มข้น 10^{-10} ปิเปตสารละลายตัวอย่างในแต่ละระดับการเจือจางลงในจานเพาะเชื้อละ 1 มิลลิกรัม (2 ข้าง) เทอาหาร MSM agar อุณหภูมิประมาณ 45 ± 1 องศาเซลเซียส ประมาณ 12-15 มิลลิกรัม ในจานเพาะเชื้อ หมุนจานเพาะเชื้อเพื่อให้อาหารและสารละลายเชื้อเข้ากัน ทิ้งไว้จนกระทั่งอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน แล้วนำไปทดสอบการย้อมสีแกรม และความสามารถในการผลิต PHA โดยการย้อมสีด้วย Sudan Black B

3. การย้อมสีแกรม

การย้อมสีแกรมของจุลินทรีย์บริสุทธิ์ที่แยกได้จากดินว่ามีลักษณะเป็นแบคทีเรียชนิดแกรมบวกหรือแกรมลบมีขั้นตอนดังนี้ ใช้หัวเข็มเย็บเย็บมาลงไฟจนกระทั่งร้อนจัดแล้วแตะน้ำมันใส่บนแผ่นสไลด์เล็กน้อย จากนั้นใช้หัวเข็มเย็บเย็บและเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ในข้อ 2 แล้วนำมาเกลี่ยลงบนแผ่นสไลด์ให้บางที่สุด ตีring โดยผ่านความร้อน และรอให้สไลด์แห้งสนิท หยด Crystal Violet ลงให้ท่วมรอยจุลินทรีย์ วางสไลด์ทิ้งไว้ 30 วินาที ล้างสีออกด้วยน้ำกลั่น จนสีของ Crystal Violet ถูกชะออกจนหมด จากนั้นหยดสารละลายไอโอดีนให้ท่วมรอยจุลินทรีย์ตั้งทิ้งไว้ 30 วินาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่น และล้างสีออกด้วยเอทานอล 95% หยด Safranin O ตั้งทิ้งไว้ 30 วินาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่นจนสีส่วนเกินนอกเหนือบริเวณที่ละเลงไว้ถูกชะจนหมด จากนั้นวางสไลด์ไว้ให้แห้งสนิทแล้วนำไปส่องตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ (Optika, B-383PLi, Italy) ที่กำลังขยายของเลนส์ใกล้วัตถุ 100X ถ้าเป็นแบคทีเรียแกรมลบจะติดสีแดงของ Safranin O ถ้าเป็นแบคทีเรียแกรมบวกจะติดสีม่วงของ Crystal violet

4. การทดสอบการสังเคราะห์ PHA

การทดสอบจุลินทรีย์ที่สามารถผลิต PHA โดยการย้อมสีด้วย Sudan Black B มีรายละเอียดดังนี้ นำห้วงเชื้อเชื่อมาลนไฟให้ปลายห้วงมีสีแดง ใช้ห้วงเชื้อเชื่อมและเชื้อที่แยกได้ในข้อ 2 แล้วนำมาเกลี่ยตรงกลางสไลด์ รอให้แห้งในอากาศตรึงโดยผ่านความร้อน หยดสารละลาย Sudan Black B 1-2 หยด วางสไลด์ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 10 นาที ล้างสไลด์ด้วยน้ำกลั่น ทำสไลด์ให้แห้ง แล้วหยด Safranin O เข้มข้น 0.5% วางสไลด์ทิ้งไว้ 5 วินาที ล้างสไลด์ด้วยน้ำกลั่น และปล่อยให้แห้ง นำไปส่องกล้องจุลทรรศน์โดยใช้กำลังขยายของเลนส์ใกล้วัตถุ 100x หากจุลินทรีย์มีการผลิต PHA ภายในเซลล์ จะย้อมติดสีน้ำเงินของ Sudan Black B ดัดแปลงจาก Burdon (1946)

5. การจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียที่แยกได้จากดิน

นำแบคทีเรียโอโซเลตที่สามารถผลิตและสะสม PHA ได้ มาจัดจำแนกสายพันธุ์ด้วยวิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA โดยส่งวิเคราะห์ที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

6. การเตรียมเซลล์แบคทีเรีย

นำแบคทีเรียที่แยกได้ในข้อ 2 มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MSM โดยปรับพีเอชของอาหารให้เท่ากับ 7 บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ในเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 60 ชั่วโมง ได้ปริมาณเซลล์ 30 กรัม ที่สะสม PHA คิดเป็น 68.9% โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง (พริกพิพาพิญญาพงษ์, 2564) นำสารละลายเซลล์ของเซลล์ทั้งหมด 2000 มิลลิลิตร มาแบ่งปั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) จำนวน 10 ครั้ง ด้วยความเร็ว 7000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำตะกอนเซลล์ที่ได้มารวมกัน แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่หนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง จากนั้นอบเซลล์ให้แห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส (Bhuwal *et al.*, 2013) เพื่อนำไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป

7. การย่อยเซลล์แบคทีเรียโดยเอนไซม์

เตรียมสารละลายเซลล์ความเข้มข้น 20 กรัม/ลิตร เพื่อใช้ในการศึกษาความสามารถในการย่อยเซลล์แบคทีเรียโดยเอนไซม์ 3 ชนิด ได้แก่ ปาเปนจากผงมะละกอ ไลเปสจากยางมะละกอ และไลโซไซม์จากไข่ขาว ดังนี้ ตวงสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมน้ำในขวดรูปชมพู่ใบที่ 1 (ทดสอบการย่อยเซลล์ของเอนไซม์ไลโซไซม์จากไข่ขาว) และใบที่ 2 (ทดสอบการย่อยเซลล์ของเอนไซม์ไลเปสจากยางมะละกอ) ตวง

สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 6 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมน้ำในขวดรูปชมพู่ใบที่ 3 (ทดสอบการย่อยเซลล์ของเอนไซม์ปาเปนจากผงมะละกอ) จากนั้นเติมสารละลายเซลล์ (ความเข้มข้น 20 กรัม/ลิตร) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ทั้ง 3 ใบ แล้วเติมเอนไซม์ไลโซไซม์จากไข่ขาว เอนไซม์ไลเปสจากยางมะละกอ และเอนไซม์ปาเปนจากผงมะละกอ อย่างละ 2 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ใบที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ (ความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อมวลแบคทีเรียเท่ากับ 2%) นำสารละลายในขวดรูปชมพู่ใบที่ 1 และ 3 ไปบ่มในเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส สำหรับสารละลายในขวดรูปชมพู่ใบที่ 2 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที (Kapritchkoff *et al.*, 2006) สำหรับการทดลองควบคุมดำเนินการแบบคู่ขนานโดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์แทนเอนไซม์ เก็บสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ในช่วงเวลา 4, 8 และ 12 ชั่วโมง ตามลำดับ นำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร (อัตราส่วน 1:50) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตรโดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณเป็นค่าการลดลงสัมพัทธ์ของการดูดกลืนแสง (Relative absorbance reduction; AR) ดังสมการ

$$AR = [(Abs_{min} - Abs_0) \times 100] / Abs_0$$

เมื่อ Abs_{min} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายปฏิกริยา
 Abs_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงของการทดลองควบคุม
ทำการทดลองซ้ำดังกล่าวข้างต้น โดยเปลี่ยนปริมาณเอนไซม์แต่ละชนิด เป็น 4, 6, 8 และ 10 กรัม ตามลำดับ

สำหรับการศึกษาการใช้เอนไซม์สองชนิด (ไลโซไซม์และปาเปน) ในการสกัด PHA ออกจากเซลล์แบคทีเรียแบบเรียงลำดับ เริ่มต้นโดยตวงสารละลายเซลล์เข้มข้น 20 กรัม/ลิตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร จำนวน 3 ใบ จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ทั้งสามใบ เติมน้ำในขวดรูปชมพู่ 10 กรัม แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พร้อมทั้งเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที โดยขวดรูปชมพู่ใบที่ 1, 2 และ 3 บ่มเป็นเวลา 4, 8 และ 12 ชั่วโมง ตามลำดับ จากนั้นนำสารละลายในขวดรูปชมพู่แต่ละใบไปปั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำตะกอนเซลล์มาล้างด้วยน้ำกลั่นที่หนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 1 ครั้ง แล้วตามด้วยการล้างด้วยสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 6 อีกครั้ง จากนั้นนำไปปั่นแยกด้วยเครื่อง

ปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 7000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำเซลล์ที่ได้มาเติมสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 6 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเอนไซม์ปาเปน 10 กรัม ลงไปในสารละลายขูดรูปชมพูทั้งสามใบ นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เก็บสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในช่วงเวลา 4, 8 และ 12 ชั่วโมง ตามลำดับ นำไปวิเคราะห์ปริมาณ PHA ต่อไป

8. การคัดเลือกระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคในการทำ PHA ให้บริสุทธิ์

ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคได้มาจากการผสมสารละลายพอลิเมอร์สองชนิดที่ต่างกัน เช่น พอลิเอทิลีน-ไกลคอล (Polyethylene glycol, PEG) กับเด็กซ์แทรน (Dextran) พอลิเอทิลีนไกลคอลกับมอลโตเดกซ์ทริน (maltodextrin) เป็นต้น หรือ การผสมพอลิเมอร์เพียงชนิดเดียวกับสารประกอบเกลืออนินทรีย์ เช่น พอลิเอทิลีนไกลคอลกับ K_2HPO_4 (Grilo *et al.*, 2016) ในการศึกษาครั้งนี้ได้เตรียมระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค 5 ระบบในหลอดทดลอง ได้แก่ PEG8000/ K_2HPO_4 , PEG6000/ K_2HPO_4 , PEG4000/ K_2HPO_4 , PEG4000/Maltodextrin และ PEG4000/Dextran40000 แต่ละระบบมีน้ำหนักรวม 40 กรัม โดยส่วนประกอบที่สร้างวัฏภาค คือ 14.6:9.0, 18.0:7.5, 11.0:12.0, 10.5:9.2 และ 5.4:8.0 (%โดยน้ำหนัก) ตามลำดับ ซึ่งได้จากการศึกษาแผนภาพวัฏภาคของการเกิดระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคเบื้องต้น (พริกพิพาพิญญาพงษ์, 2567) จากนั้นเติมสารละลายผสมของเอนไซม์กับเซลล์จากการทดลองในข้อ 7 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคแต่ละระบบ เขย่าสารละลายให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งเกิดการแยกวัฏภาคอย่างสมบูรณ์ ทำการวิเคราะห์ปริมาณของ PHA ในแต่ละวัฏภาค

9. การวิเคราะห์ปริมาณ PHA

นำสารละลายในแต่ละวัฏภาคมาเติมคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เพื่อสกัด PHA ให้มาอยู่ในชั้นของคลอโรฟอร์ม นำสารละลายในชั้นของคลอโรฟอร์มไปต้มในอ่างน้ำเดือดเพื่อระเหยคลอโรฟอร์มออกไป จากนั้นเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงไป แล้วนำไปต้มต่อในอ่างน้ำเดือดอีก 10 นาที เพื่อเปลี่ยน PHA ให้เป็นกรดโครโทนิค (crotonic acid) แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 235 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดโครโทนิค เพื่อคำนวณหาปริมาณของ PHA ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

10. การวิเคราะห์องค์ประกอบของ PHA

ชั่งน้ำหนักเซลล์แห้ง 20 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดทดลอง ที่มีฝาปิด เติมคลอโรฟอร์ม 2 มิลลิลิตร และสารละลายกรดซัลฟิวริกในเมทานอลความเข้มข้น 3% 2 มิลลิลิตร ปิดฝาให้แน่น นำไปแช่ในอ่างน้ำร้อนอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ปลอยสารละลายทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องแล้วเติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันนาน 5 นาที ตั้งหลอดทดลองไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งสารละลายแยกเป็น 2 ชั้น เก็บสารละลายในชั้นคลอโรฟอร์มเพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี-แมสสเปกโตรมิเตอร์ โดยใช้แคปิลลารีคอลัมน์ ชนิด DB-5 (30 เมตร x 0.25 มิลลิเมตร) ความหนา 0.25 ไมโครเมตร อุณหภูมิ injector เท่ากับ 230 องศาเซลเซียส อุณหภูมิคอลัมน์ เริ่มต้นที่ 80 องศาเซลเซียส แล้วเพิ่มอุณหภูมิด้วยอัตรา 10 องศาเซลเซียส/นาที จนกระทั่งถึง 180 องศาเซลเซียส อุณหภูมิ detector เท่ากับ 250 องศาเซลเซียส split ratio เท่ากับ 1:50 ใช้แก๊สฮีเลียมเป็นแก๊สตัวพาด้วยอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรตัวอย่างที่ฉีด 1 ไมโครลิตร

ผลการทดลองและอภิปรายผล

การคัดเลือกแบคทีเรียจากดินและจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่ผลิต PHA

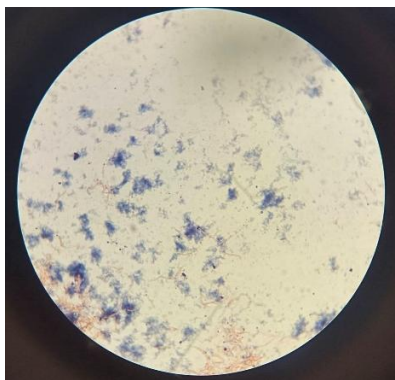
จากการนำตัวอย่างดินเพาะปลูก มาทำการเจือจางแบบต่อเนื่อง (serial dilution) และเพาะเชื้อในอาหารสูตร MSM agar ตรวจพบจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดเท่ากับ 5.5×10^6 CFU/g เมื่อพิจารณาการเจริญของโคโลนีพบว่ามีความแตกต่างกันอยู่ 2 ลักษณะ คือ โคโลนีที่เจริญอยู่บนอาหารแข็ง และโคโลนีเจริญอยู่ในอาหารแข็ง โดยกำหนดเป็นไอโซเลต 1 และ ไอโซเลต 2 ตามลำดับ ผลการตรวจสอบการย้อมสีแกรม และความสามารถในการผลิต PHA เบื้องต้นด้วย Sudan Black B ของทั้งสองไอโซเลต แสดงใน Table 1 และ Figure 1 สำหรับผลการจำแนกสายพันธุ์ด้วยวิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA แสดงใน Table 2

Table 1 Characteristics of isolated bacteria observed under the microscope.

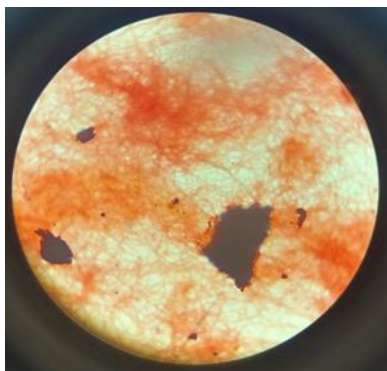
Isolate	Colony characteristics	Gram staining	Staining with Sudan Black B
1	Round-shaped and clustered together, resembling a grape-like arrangement	Gram positive	Dark blue
2	Filamentous and clustered together	Gram positive	Reddish-orange

Table 2 Analysis of the gene nucleotide sequence of 16S rRNA.

Isolate	Similar to	%Identity
1	<i>Streptomyces griseoincarnatus</i>	99.40
	<i>Streptomyces griseoflavus</i>	99.00
	<i>Streptomyces althioticus</i>	98.70
2	<i>Streptomyces kebangsaanensis</i>	99.10
	<i>Streptomyces cyslabdanicus</i>	98.60
	<i>Streptomyces corchorusii</i>	98.40



(a)



(b)

Figure 1 The characteristics of bacteria stained with Sudan Black B under a microscope are observed when (a) it is isolated bacterium 1 and (b) it is isolated bacterium 2.

ผลการตรวจสอบแบคทีเรียที่แยกได้ทั้งสอง ไอโซเลตเบื้องต้นโดยการย้อมสีด้วย Sudan Black B แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียไอโซเลต 1 สามารถผลิต PHA ได้ เนื่องจากเซลล์แบคทีเรียยังคงมีสีน้ำเงินเข้มหลังกระบวนการล้างสี ซึ่งถูกจัดว่าเป็นสายพันธุ์ที่สามารถผลิต PHA ได้อย่างมี

ประสิทธิภาพ (Adebajo *et al.*, 2024) จากการศึกษาคู่มือ 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลต 1 ที่แยกได้ จัดอยู่ในกลุ่ม *Streptomyces* ซึ่งมีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces griseoincarnatus* มากที่สุด สอดคล้องกับรายงานการศึกษาเกี่ยวกับการแยกแบคทีเรียสายพันธุ์ *Streptomyces* จากตัวอย่างดิน เป็นแบคทีเรียแกรมบวก สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น สารต้านจุลชีพ และสารออกฤทธิ์ทางเภสัชกรรมได้ (Zhang *et al.*, 2023) แต่ยังไม่มียานงานการศึกษาเกี่ยวกับการผลิต PHA ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงนำแบคทีเรีย *S. griseoincarnatus* มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MSM เพื่อทำการศึกษากักเก็บ PHA ออกจากเซลล์ของแบคทีเรียโดยวิธีการใช้เอนไซม์และทำให้บริสุทธิ์โดยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค

การกู้คืนพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากเซลล์ของแบคทีเรียโดยวิธีการสกัดโดยใช้เอนไซม์

ผลการศึกษาการใช้เอนไซม์สามชนิด ได้แก่ ปาเปนไลโซไซม์ และไลเปส ในการทำลายเซลล์ *S. griseoincarnatus* แสดงใน Figure 2 จะเห็นได้ว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์แต่ละชนิดจะทำให้เซลล์ถูกทำลายเพิ่มขึ้นตามไปด้วย ซึ่งพิจารณาได้จากค่าการลดค่าการดูดกลืนแสงสัมพัทธ์ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร เมื่อพิจารณาถึงความเข้มข้นของเอนไซม์แต่ละชนิดเท่ากับ 10 กรัม/กรัมเซลล์ พบว่าเอนไซม์ปาเปนสามารถทำลายเซลล์แบคทีเรียได้สูงที่สุด (ค่า AR เท่ากับ 81.9%) ในขณะที่เอนไซม์ไลโซไซม์ และเอนไซม์ไลเปสทำลายเซลล์แบคทีเรียได้น้อยกว่า (ค่า AR < 56%) ซึ่งอาจเป็นเพราะในโครงสร้างของผนังเซลล์แบคทีเรียประกอบด้วยเพปติโดไกลแคนและโปรตีนอื่น ๆ ภายในเซลล์ ซึ่งคิดเป็น 55% ของมวลชีวภาพทั้งหมดจึงทำให้เอนไซม์ปาเปนซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มเอนไซม์โปรติเอสสามารถทำการย่อยเซลล์ได้ดีกว่าเอนไซม์อีกสองชนิด (Kapritchkoff *et al.*, 2006) แม้ว่าไลโซไซม์จะมีประสิทธิภาพต่ำกว่าปาเปนในการทำลายเซลล์แต่ไลโซไซม์สามารถย่อยพันธะบีตา 1,4-ไกลโคซิดิกกระหว่างเอ็นอะซีทิลกลูโคซามีน (N-acetylglucosamine, GlcNAc) และเอ็นอะซีทิลมูรามิกแอซิด (N-acetylmuramic acid, MurNAc) ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเพปติโดไกลแคนที่พบอยู่ในผนังเซลล์ของแบคทีเรียโดยเฉพาะชนิดที่ย้อมติดสีแกรมบวก (Vanderkelen *et al.*, 2011) ส่วนเอนไซม์ไลเปสจากยีส *Saccharomyces cerevisiae* มีความสามารถในการย่อยเซลล์ได้น้อยที่สุด ซึ่งอาจเนื่องจากเอนไซม์ไลเปสจากยีสมีความสามารถในการไฮโดรไลซิสไตรกลีเซอไรด์ทำได้ไม่ดีเท่าไรนักและกลีเซอรอลจึงไม่สามารถย่อยฟอสฟาติดิลกลีเซอรอล กรดรีบิทอลโทโคอิกและกรดไลโปเตอิกอิกที่เป็นองค์ประกอบในผนังเซลล์ของแบคทีเรียสกุล *Streptomyces* ได้ (Mistou *et al.*, 2016)

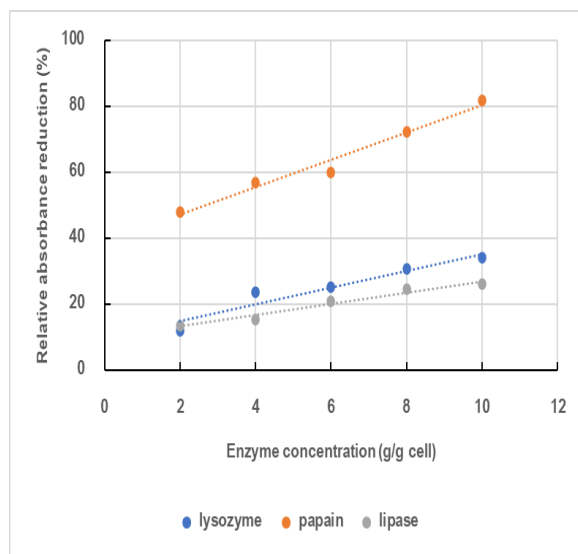


Figure 2 The ability of each enzyme to reduce absorbance after 12 hours of incubation.

ดังนั้นในการเพิ่มประสิทธิภาพของการย่อยเซลล์แบคทีเรีย *S. griseoincamatus* โดยใช้เอนไซม์ จึงทำการศึกษาการใช้เอนไซม์สองชนิดในการย่อยเซลล์แบคทีเรียแบบเรียงลำดับ คือ เริ่มต้นย่อยเซลล์โดยใช้เอนไซม์ไลโซไซม์ก่อน แล้วตามด้วยเอนไซม์ปาเปน ผลการศึกษาพบว่า การสกัดโดยใช้ไลโซไซม์เข้มข้น 10 กรัม/กรัมเซลล์ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ที่พีเอช 7 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แล้วตามด้วยการสกัดโดยใช้ปาเปนเข้มข้น 10 กรัม/กรัมเซลล์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ที่พีเอช 6 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ทำให้ได้ปริมาณ PHA 84.5% (Table 3) เมื่อเพิ่มเวลาในการสกัดโดยเอนไซม์ไลโซไซม์เป็น 8 ชั่วโมง แล้วตามด้วยปาเปน 12 ชั่วโมง จะได้ปริมาณของ PHA เพิ่มขึ้นเป็น 87.2% ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาของ Yasotha *et al.* (2006) ทำการสกัด PHA สายโซ่กลางจากเซลล์ *Pseudomonas putida* ด้วยเอนไซม์อัลคาเลสกับ SDS ที่พีเอช 8.5 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส แล้วตามด้วยเอนไซม์ไลโซไซม์กับ EDTA ที่พีเอช 7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้ปริมาณ PHA เกือบ 90% แต่ถ้าเพิ่มเวลาในการสกัดด้วยไลโซไซม์เพิ่มขึ้นเป็น 12 ชั่วโมง แล้วตามด้วยปาเปนอีก 12 ชั่วโมง จะทำให้ปริมาณ PHA ลดลงเหลือ 82.2% (Table 3) ซึ่งเป็นไปได้ว่าการใช้เวลาในการบ่มเซลล์กับไลโซไซม์ที่ 12 ชั่วโมงจะส่งผลให้เกิดการสลายผนังเซลล์มากเกินไปจึงทำให้ความหนืดของสารละลายเพิ่มขึ้น (Eggink & Northolt, 1999)

Table 3 The sequential enzymatic extraction of PHA begins with lysozyme, followed by papain.

Lysozyme (g/g cell)	Extraction time (h)	Papain (g/g cell)	Extraction time (h)	Extracted PHA (%)
10	4	10	4	82.5
			8	83.6
			12	84.5
10	8	10	4	85.7
			8	86.4
			12	87.2
10	12	10	4	80.5
			8	81.3
			12	82.2

การทำพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่ได้จากการสกัดให้บริสุทธิ์

ผลการศึกษากระบวนการละลายน้ำสองวัฏภาคชนิดต่าง ๆ 5 ระบบ ได้แก่ (1) PEG8000/K₂HPO₄ (2) PEG6000/K₂HPO₄ (3) PEG4000/K₂HPO₄ (4) PEG 4000/Maltodextrin และ (5) PEG4000/Dextran 40,000 ในการแยก PHA ออกจากสารละลายผสมของเซลล์และเอนไซม์ แสดงใน Table 4 พบว่าค่าสัมประสิทธิ์การแบ่งส่วนของ PHA (partition coefficient, K_{pa}) ซึ่งคำนวณได้จากอัตราส่วนของผลผลิตที่ได้ในวัฏภาคบนสุดต่อวัฏภาคล่างสุด ของระบบ PEG6000/K₂HPO₄ มีค่าสูงสุด รองลงมาคือระบบ PEG4000/K₂HPO₄, PEG4000/Maltodextrin, PEG 4000/Dextran และ PEG8000/K₂HPO₄ ตามลำดับ ผลผลิต (yield) ของ PHA ที่แยกได้เป็นไปในแนวทางเดียวกันกับค่าสัมประสิทธิ์การแบ่งส่วน ขณะที่ความบริสุทธิ์ของ PHA ที่แยกได้จากกระบวนการละลายน้ำสองวัฏภาค PEG8000/K₂HPO₄ จะมีค่าสูงสุดเท่ากับ 59.9% ส่วนระบบอื่น ๆ มีค่าความบริสุทธิ์ของ PHA อยู่ในช่วง 43.8 – 47.0% ถึงแม้ว่า PEG ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงจะมีแนวโน้มที่จะสร้างระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่เสถียร และเพิ่มระดับการแบ่งวัฏภาคได้มากกว่า PEG ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (Nontawong *et al.*, 2023) อย่างไรก็ตามการแยกชั้นของ PHA ในระบบอาจมีความซับซ้อนขึ้นอยู่กับโครงสร้างของ PHA และสภาพแวดล้อมอีกทางหนึ่งด้วย ในการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกน้ำหนักโมเลกุลของ PEG ที่ 6000 เนื่องจากทำให้ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่ได้มีค่าสัมประสิทธิ์การแบ่งส่วนของ PHA และผลผลิตของ PHA ที่ได้สูงสุด (29%) เมื่อเปรียบเทียบกับทำให้ PHA ที่สกัดได้จาก *P. putida* บริสุทธิ์โดยวิธีอัลตราฟิลเตรชัน (ultrafiltration) ซึ่งทำให้ PHA บริสุทธิ์ขึ้นถึง 92.6% (Yasotha *et al.*, 2006) อย่างไรก็ตามการใช้ระบบ

สารละลายน้ำสองวัฏภาคเป็นระบบที่เตรียมได้ง่าย ราคาถูก สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้อีก

Table 4 Purification of PHA using different types of aqueous two-phase systems.

Aqueous two-phase system	Partition coefficient (K_{pa})	Yield (%)	Purity (%)
PEG8000/ K_2HPO_4	0.681	13.7	59.9
PEG6000/ K_2HPO_4	1.630	29.0	47.0
PEG4000/ K_2HPO_4	1.332	26.9	47.2
PEG4000/Maltodextrin	0.804	17.2	43.8
PEG4000/Dextran	0.796	17.3	47.1

องค์ประกอบของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่ผลิตได้โดยเชื้อ *Streptomyces griseoincarnatus*

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของ PHA ที่ผลิตโดยเซลล์ *S. griseoincarnatus* ด้วย GC-MS ผลการวิเคราะห์แสดงใน Table 5 จะเห็นได้ว่า สาร PHA ที่สกัดได้จัดเป็นพอลิเมอร์ชนิดสายโซ่กลางที่ประกอบด้วย 3-ไฮดรอกซี-14-เมทิลเพนตะเดคาโนเอต (3-hydroxy-14-methylpentadecanoate) มากที่สุด รองลงมาคือ 3-ไฮดรอกซีเฮกซะเดคาโนเอต (3-hydroxyhexadecanoate, C16) 3-ไฮดรอกซีเตตระเดคาโนเอต (3-hydroxy-tetradecanoate, C14) 3-ไฮดรอกซีเตตระเดซีโนเอต (3-hydroxytetradecenoate, C14:1) 3-ไฮดรอกซี-เฮกซะเดคาไดอีโนเอต (3-hydroxy-hexadecadienoate, C16:2) 3-ไฮดรอกซีเฮกซะเดซีโนเอต (3-hydroxyhexadecenoate, C16:1) และ 3-ไฮดรอกซี-12-เมทิลไตรเดคาโนเอต (3-hydroxy-12-methyltridecanoate, C15) ตามลำดับ ซึ่งไม่สอดคล้องกับการศึกษาของ Valappil *et al.* (2007) พบว่าองค์ประกอบของ PHA ส่วนใหญ่ที่พบใน *Streptomyces* sp. (ATCC1238) เป็นชนิดสายโซ่สั้น ทั้งนี้อาจเนื่องจากการใช้แหล่งของคาร์บอนและแร่ธาตุในอาหารเลี้ยงเชื้อแตกต่างกัน (Wampler *et al.*, 2010)

Table 5 The composition of polyhydroxyalkanoates in the form of methyl esters produced by *S. griseoincarnatus*.

Peak No	Retention time (min)	Compound identified	Composition (%)
1	19.010	3-hydroxy-12-methyltridecanoate	2.19
2	21.162	3-hydroxytetradecenoate	7.15
3	21.325	3-hydroxytetradecanoate	16.27
4	23.235	3-hydroxy-14-methylpentadecanoate	34.42
5	23.961	3-hydroxyhexadecenoate	6.39
6	25.194	3-hydroxyhexadecadienoate	6.76
7	25.353	3-hydroxyhexadecanoate	19.12

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นการใช้เอนไซม์ปาเปนร่วมกับไลโซไซม์ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงในการทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรียสกุล *S. griseoincarnatus* ทำให้ได้ปริมาณของ PHA สูงสุด โดยไลโซไซม์จะช่วยย่อยเพปติโดไกลแคนทำให้ผนังเซลล์ถูกทำลาย ซึ่งส่งผลให้ปาเปนสามารถเข้าไปย่อยโปรตีนภายในเซลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคสามารถนำมาใช้ในการทำ PHA ให้มีความบริสุทธิ์สูงขึ้นได้ โดยใช้ระบบ PEG/ K_2HPO_4 ทำให้ PHA ที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น และ PHA ที่ได้จากแบคทีเรีย *S. griseoincarnatus* เป็นชนิดสายโซ่กลาง ดังนั้นควรมีการศึกษาคุณลักษณะของ PHA ที่สกัดได้ต่อไป เพื่อจะได้นำ PHA ไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ที่เหมาะสมต่อไป รวมถึงการทดลองสกัดและทำให้ PHA ให้บริสุทธิ์ในระดับการผลิตที่มากขึ้นเพื่อเตรียมความพร้อมสำหรับการนำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรม

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับงบประมาณสนับสนุนจากมูลนิธิสำนักงานงบประมาณ 2567 จากกองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัย และนวัตกรรม (รหัสโครงการ 193502)

เอกสารอ้างอิง

- พรทิพพา พิญาพงษ์. (2564). การผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากน้ำมันใช้แล้วโดยแบคทีเรียที่แยกได้จากดิน. *PSRU Journal of Science and Technology*, 6(2), 69–85.
- พรทิพพา พิญาพงษ์. (2567). การกู้คืนและการทำให้บริสุทธิ์ของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากชีวมวลของแบคทีเรียโดยใช้การย่อยด้วยเอนไซม์และระบบน้ำสองวัฏภาค. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรดิตถ์.
- Adebajo, S. O., Bankole, P. O., Ojo, A. E., & Akintokun, P. O. (2024). Screening and optimization of polyhydroxybutyrate (PHB) by *Lysinibacillus fusiformis* from diverse environmental sources. *The Microbe*, 2, Article 100043. <https://doi.org/10.1016/j.microb.2024.100043>
- Bhuwal, A. K., Singh, G., Aggarwal, N. K., Goyal, V., & Yadav, A. (2013). Isolation and screening of polyhydroxyalkanoates producing bacteria from pulp, paper, and cardboard industry wastes. *International Journal of Biomaterials*, 2013, Article 752821. <https://doi.org/10.1155/2013/752821>
- Burdon, K. L. (1946). Fatty material in bacteria and fungi revealed by staining dried, fixed slide preparations. *Journal of Bacteriology*, 52(6), 665–678.
- Eggink, G., & Northolt, M. D. (1999). *Method for producing a biological degradable polyhydroxyalkanoate coating with the aid of an aqueous dispersion of polyhydroxyalkanoate* (U.S. Patent No. 5,958,480). U.S. Patent and Trademark Office.
- Grilo, A. L., Aires-Barros, M. R., & Azevedo, A. M. (2016). Partitioning in aqueous two-phase systems: Fundamentals, applications and trends. *Separation and Purification Reviews*, 45(1), 68–80.
- Gumel, A. M., Annuar, M. S. M., & Chisti, Y. (2013). Recent advances in the production, recovery and applications of polyhydroxyalkanoates. *Journal of Polymers and the Environment*, 21, 580–605.
- Kapritchkoff, F. M., Viotti, A. P., Alli, R. C. P., Zuccolo, M., Pradella, J. G. C., Maiorano, A. E., Miranda, E. A., & Bonomi, A. (2006). Enzymatic recovery and purification of polyhydroxybutyrate produced by *Ralstonia eutropha*. *Journal of Biotechnology*, 122(4), 453–462.
- Mannina, G., Presti, D., Montiel-Jarillo, G., Carrera, J., & Suarez-Ojeda, M. E. (2020). Recovery of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from wastewater: A review. *Bioresource Technology*, 297, Article 122478. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122478>
- Mistou, M. Y., Sutcliffe, I. C., & van Sorge, N. M. (2016). Bacterial glycobiology: Rhamnose-containing cell wall polysaccharides in Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 40(4), 464–479.
- Nontawong, B., Bunchoen, P., & Ratanapongleka, K. (2023). Factors affecting the partitioning of peroxidase from aqueous two-phase extraction. *Engineering and Technology Horizons*, 40(3), Article 400306. <https://doi.org/10.55003/ETH.400306>
- Pagliano, G., Galletti, P., Samori, C., Zaghini, A., & Torri, C. (2021). Recovery of polyhydroxyalkanoates from single and mixed microbial cultures: A review. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, Article 624021. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.624021>
- Raza, Z. A., Abid, S., & Banat, I. M. (2018). Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 126, 45–56.
- Saavedra del Oso, M., Mauricio-Iglesias, M., & Hospido, A. (2020). Evaluation and optimization of the environmental performance of PHA downstream processing. *Chemical Engineering Journal*, 412, Article 127687. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.127687>
- Thuithaisong, C., Parkpian, P., Shipin, O. V., Shrestha, R. P., Naklang, K., Delaune, R. D., & Jugsujinda, A. (2011). Soil-quality indicators for predicting sustainable organic rice production. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 42(5), 548–568.
- Valappil, S. P., Boccaccini, A. R., Bucke, C., & Roy, I. (2007). Polyhydroxyalkanoates in Gram-positive bacteria: Insights from the genera *Bacillus* and *Streptomyces*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 91, 1–17.

- Vanderkelen, L., Van Herreweghe, J. M., Vanoirbeek, K. G. A., Baggerman, G., Myrnes, B., Declerck, P. J., Nilsen, I. W., Michiels, C. W., & Callewaert, L. (2011). Identification of a bacterial inhibitor against g-type lysozyme. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68, 1053–1064.
- Wampfler, B., Ramsauer, T., Rezzonico, S., Hischier, R., Köhling, R., Thöny-Meyer, L., & Zinn, M. (2010). Isolation and purification of medium chain length poly(3-hydroxyalkanoates) (mcl-PHA) for medical applications using nonchlorinated solvents. *Biomacromolecules*, 11(10), 2716–2723.
- Yasothea, K., Aroua, M. K., Ramachandran, K. B., & Tan, I. K. P. (2006). Recovery of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates (PHAs) through enzymatic digestion treatments and ultrafiltration. *Biochemical Engineering Journal*, 30(3), 260–268.
- Zhang, Z., Sun, Y., Yi, Y., Bai, X., Zhu, L., Zhu, J., Gu, M., Zhu, Y., & Jiang, L. (2023). Screening and identification of a *Streptomyces* strain with quorum-sensing inhibitory activity and effect of the crude extracts on virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microorganisms*, 11(8), Article 2079. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11082079>