

การสกัดพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตจากเชื้อ *Alcaligenes eutrophus* ด้วยบรอมิเลนจากน้ำสับปะรด

The extraction of polyhydroxybutyrate from *Alcaligenes eutrophus* by bromelain from pineapple juice

ปิยาภรณ์ วงศิริกุล^{1*}, นิษา ไพจิตร², เทวัญ หยูหนู², กนกพร สังขรักษ์³

Piyaporn Wangsirigun^{1*}, Nisa Paijit², Tewan Yunu², Kanokphorn Sangkharak³

บทคัดย่อ

การสกัดพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต จากเชื้อ *Alcaligenes eutrophus* ด้วยบรอมิเลนจากน้ำสับปะรด แบ่งออกเป็นสามการทดลอง โดยทำการศึกษาผลของอายุสับปะรดที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ การประยุกต์ใช้บรอมิเลนในการสกัดฟิเอซบี และการยีสันโครงสร้างพอลิเมอร์ด้วยเครื่องอินฟราเรดสเปคโตรสโคปี ผลการทดลองพบว่า น้ำสับปะรดจากผลที่มีอายุแตกต่างกัน (100-200 วันหลังจากบังคับดอก) จะมีปริมาณโปรตีนในช่วง 98.7-123.46 มิลลิกรัม และมีความกิจกรรมของบรอมิเลนในช่วง 1.41-1.64 ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยพบว่าปริมาณโปรตีนและกิจกรรมของเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในผลสับปะรดที่ใช้ในการทดลอง เมื่อนำน้ำสับปะรดมาสกัดฟิเอซบีจากเชื้อ *A. eutrophus* ที่เลี้ยงในอาหาร Nutrient broth โดยมีกลูโคสความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน จะได้ฟิเอซบีปริมาณ 1.57 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 82.63 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง จากการวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเครื่องอินฟราเรดสเปคโตรสโคปีเปรียบเทียบกับฟิเอซบีทางการค้าพบว่าพอลิเมอร์ที่ได้เป็นพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต

คำสำคัญ : เชื้อ *Alcaligenes eutrophus* ฟิวรีทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปคโตรสโคปี Nutrient Broth NB พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต บรอมิเลน

¹นิสิตปริญญาโท สาขาเคมีประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ พัทลุง 93110

²นักวิชาชีพ สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ พัทลุง 93110

³ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ พัทลุง 93110

*Corresponding author: e-mail: piyaporn2531@hotmail.com

จากงานประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยทักษิณ ครั้งที่ 23 ปี 2556

Abstract

The study of polyhydroxybutyrate (PHB) extraction from *Alcaligenes eutrophus* by bromelain from pineapple juice was separated into three experiments including the effect of pineapple age on enzyme activity, the application of bromelain for PHB extraction and the confirmation of isolated polymer by Infrared spectroscopy. The result revealed that pineapple juice from different age (100-200 days of cultivation) had protein content and bromelain activity in the range of 98.7-123.46 mg and 1.41-1.64 unit/mL, respectively. However, the content did not show the significant different. Pineapple age did not affected on protein content and bromelain activity. Therefore, pineapple juice was utilized for PHB extraction from *A. eutrophus* cultivated in Nutrient broth (NB) contained glucose (40 g/L) as carbon source. The extraction yielded PHB content at 1.57 g PHB /L with 82.63 % of dry cell weight (DCW). The structure of isolated polymer was confirmed by Infrared spectroscopy compared with commercial PHB. The structure indicated that isolated polymer was polyhydroxybutyrate.

บทนำ

พลาสติกถือว่าเป็นวัสดุที่นิยมนำมาใช้เป็นวัสดุสิ่งของต่าง ๆ ที่ใช้ในชีวิตประจำวัน เนื่องจากอำนวยความสะดวกสบายให้แก่ผู้นิยมใช้ ทั้งในเรื่องรูปแบบของผลิตภัณฑ์ การตอบสนองด้านการใช้งาน ความคงทนถาวร ตลอดจนราคาที่เหมาะสม เนื่องจากง่ายต่อการขึ้นรูปเป็นรูปทรงต่าง ๆ ไม่ว่าจะเป็นเส้นใย (fiber) หรือแม้กระทั่งเป็นแผ่นฟิล์มบาง ๆ แม้ว่าผลิตภัณฑ์ที่ทำจากพลาสติกจะอำนวยความสะดวกสบายในการใช้งานแต่ในขณะเดียวกันก็ก่อให้เกิดปัญหาตามมาจากการใช้พลาสติกดังกล่าว เนื่องจากพลาสติกเป็นสารที่ผลิตขึ้นจากปิโตรเคมีหรืออนุพันธ์ของปิโตรเคมี ซึ่งไม่สามารถย่อยสลายได้ ก่อให้เกิดปัญหาในด้านการจัดการในการกำจัดพลาสติก เนื่องจากปริมาณขยะที่เป็นพวกพลาสติกจะมีปริมาณที่เพิ่มสูงขึ้นทุก ๆ ปี และเพื่อเป็นการลดปัญหาที่เกิดจากขยะพลาสติกที่ไม่สามารถย่อยสลายได้ง่ายทางธรรมชาติจึงเกิดแนวคิดในการนำพลาสติกชีวภาพหรือพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ทางธรรมชาติมาใช้แทนพลาสติกที่ผลิตได้จากปิโตรเคมี [3] ซึ่งพอลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้หรือพลาสติกชีวภาพมีคุณสมบัติคล้ายกับพลาสติกสังเคราะห์ อย่างเช่นพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตเป็นอนุพันธ์ของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต ซึ่งจัดเป็นพอลิเมอร์ประเภทอะลิฟาติก พอลิเอสเทอร์ (aliphatic polyester) มีโครงสร้างเป็นสายยาว และมีคุณสมบัติต่าง ๆ คล้ายกับพลาสติกทั่วไป เช่นพอลิโพรไพลีน [2] นอกจากนี้พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตยังสามารถย่อยสลายได้ด้วยกระบวนการทางชีวภาพได้เป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำ แต่การใช้พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตยังมีข้อจำกัดในเรื่องของราคา เนื่องจากในกระบวนการผลิตต้องทำการสกัดพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตออกมาจากเซลล์จุลินทรีย์ ซึ่งวิธีการสกัดที่ได้รับการนิยมนิยมนในอุตสาหกรรมคือ การใช้ตัวทำละลายในการสกัดพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต อย่างเช่น chlorinated solvents และ isoamlic alcohol เป็นต้น แต่สารเคมีดังกล่าวมีข้อเสียคือสารที่ใช้ไม่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม มีราคาแพง และลดน้ำหนักมวลโมเลกุลของพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตทำให้พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตที่ได้ไม่เหมาะสมในการใช้งานในระดับอุตสาหกรรม สำหรับอีกวิธีที่เหมาะสมคือ การสกัดด้วยเอนไซม์ซึ่งมีข้อดีคือ เกิดปฏิกิริยาได้ดี ไม่ทำลายผลผลิตที่ต้องการ และได้

ผลิตผลที่มีความบริสุทธิ์สูง แต่การใช้เอนไซม์ในการสกัดมีข้อจำกัดคือ เอนไซม์มีราคาแพง ซึ่งเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพในการสกัดพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตได้ดีคือ เอนไซม์บรอมีเลน โดยผลการทดลองของ [6] พบว่า ผลจากการทดลองใช้โบรมิเลนทางการค้าในการสกัดพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตจากเชื้อ *Alcaligenes eutrophus* จะได้พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตที่มีความบริสุทธิ์สูงสุดถึง 88.8% แต่วิธีการดังกล่าวมีข้อจำกัด คือ การใช้เอนไซม์ทางการค้าจะทำให้ต้นทุนการผลิตสูง อีกทั้งในงานวิจัยดังกล่าวเป็นเพียงแค่การศึกษาถึงชนิดเอนไซม์ที่เหมาะสมต่อการสกัดเพียงเบื้องต้นเท่านั้น ดังนั้นเพื่อเป็นการลดต้นทุนการผลิตพอลิไฮ-ดรอกซีบิวทิเรต วัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่การสกัด และทำบริสุทธิ์เอนไซม์บรอมีเลนจากสับปะรดในธรรมชาติ และทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการใช้บรอมีเลนจากสับปะรดในการสกัด รวมทั้งการประเมินความคุ้มค่าทางเศรษฐกิจของผลิตภัณฑ์อีกด้วย เนื่องจากสับปะรดเป็นพืชที่สามารถหาได้ง่ายในจังหวัดพัทลุง แล้วจึงนำเอนไซม์มาประยุกต์ใช้ในการสกัดพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตจากเชื้อ *Alcaligenes eutrophus* เพื่อเป็นการลดต้นทุนการผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต

วิธีการวิจัย

การเตรียมน้ำสับปะรด

นำผลของสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียที่อายุแตกต่างกัน ได้แก่ ผลแก้ว (100 วัน) ผลสุก (160 วัน) ผลแก่ (180 วัน) และผลสุกงอม (200 วัน) มาล้างแล้วสไลด์ให้มีขนาดชิ้นเล็ก นำไปทำการปั่นหรือทำการบีบ แล้วกรองด้วยผ้าขาวบาง จากนั้นนำไปเซนตริฟิวก์ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ซึ่งจะเรียกน้ำที่ได้จากการกรองว่าสารสกัดหยาบ นำสารสกัดหยาบที่ได้วิเคราะห์โปรตีน และกิจกรรมของเอนไซม์ ทำการเปรียบเทียบผลของอายุสับปะรดที่มีต่อปริมาณโปรตีน และกิจกรรมของบรอมีเลน

การทดสอบกิจกรรมของบรอมีเลน [5]

สารสกัดหยาบจากน้ำสับปะรด 10 ไมโครลิตร เติม 50 มิลลิโมลาร์ disodium hydrogen phosphate (pH 7) 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายที่ได้มาเติม 0.65% casein 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ตกตะกอนโปรตีนที่ไม่ถูกย่อยด้วย 110 มิลลิโมลาร์ Trichloro acetic acid 2.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำสารละลายที่ได้ไปเซนตริฟิวก์ที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงแยกเอาเฉพาะส่วนในสมาวัดปริมาตรที่ได้ นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จะนำมาเทียบกับกราฟไทโรซีนมาตรฐานเพื่อคำนวณปริมาณไทโรซีน

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์บรอมีเลนหมายถึงปริมาณ เอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีนให้ได้ไทโรซีน 1 ไมโครกรัมต่อนาที ภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน [7]

สารสกัดหยาบจากน้ำสับปะรด 50 ไมโครลิตร เติม Alkaline copper reagent 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เขย่า แล้วนำไปวางที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที เติม Folin Ciocalteu 0.3 มิลลิลิตร บ่มเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐาน BSA

จากงานประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยทักษิณ ครั้งที่ 23 ปี 2556

การเลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes eutrophus* [3]

เลี้ยงเชื้อด้วยอาหาร Nutrient broth (NB) ที่ประกอบด้วย peptone และ beef extract โดยมีการเติมกลูโคสความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน เติมน้ำเกลือที่เตรียมได้ปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ลงในอาหาร NB ทำการเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทั้งหมดนำไปหมუნเหวี่ยง ที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ซึ่งน้ำหนักเซลล์ที่ได้ เซลล์ที่ได้จะนำไปสกัดพีเอชบีด้วยน้ำสับปะรดในการทดลองต่อไป

การสกัดพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต [6]

เซลล์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหาร NB นำมาสกัดด้วยน้ำสับปะรดโดยเติมสารละลายบัฟเฟอร์ pH 7 ปริมาณ 5 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่ 85 องศาเซลเซียส 15 นาที เพื่อกำจัดเซลล์ส่วนที่เป็นผนังเซลล์บางส่วนที่เป็นสารพันธุกรรมและโปรตีนออกเพื่อให้การสกัดมีคุณภาพมากขึ้น แล้วนำไปเซนตริฟิวก์ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำเซลล์ที่ได้ไปเติมบัฟเฟอร์ 50 มิลลิลิตร พร้อมเติมน้ำสับปะรด 5 มิลลิลิตร ที่มีปริมาณโปรตีน 108.02 ± 6.14 มิลลิกรัม และกิจกรรมเอนไซม์ 1.59 ± 0.03 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตั้งเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 ชั่วโมง แล้วนำมาเซนตริฟิวก์ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำเซลล์ที่ได้ออกให้แห้ง ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส 8 ชั่วโมง ซึ่งน้ำหนักพีเอชบี แล้วนำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์พีเอชบี ดังสมการที่ 1

$$PHB\% = \frac{\text{น้ำหนัก PHB}}{\text{น้ำหนักเซลล์}} \times 100 \quad \dots\dots\dots 1$$

การวิเคราะห์โครงสร้างพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตด้วยเครื่องอินฟราเรดสเปกโตรสโคปี [4]

วิเคราะห์ด้วย FTIR ยี่ห้อ Agilent Cary 630 FTIR รุ่น Cary 630 FTIR Spectrometer โดยใช้เป็นการยืนยันเกี่ยวกับโครงสร้างของพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตหลังจากการสกัดด้วยเอนไซม์บรอมิเลนจากสับปะรด

ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

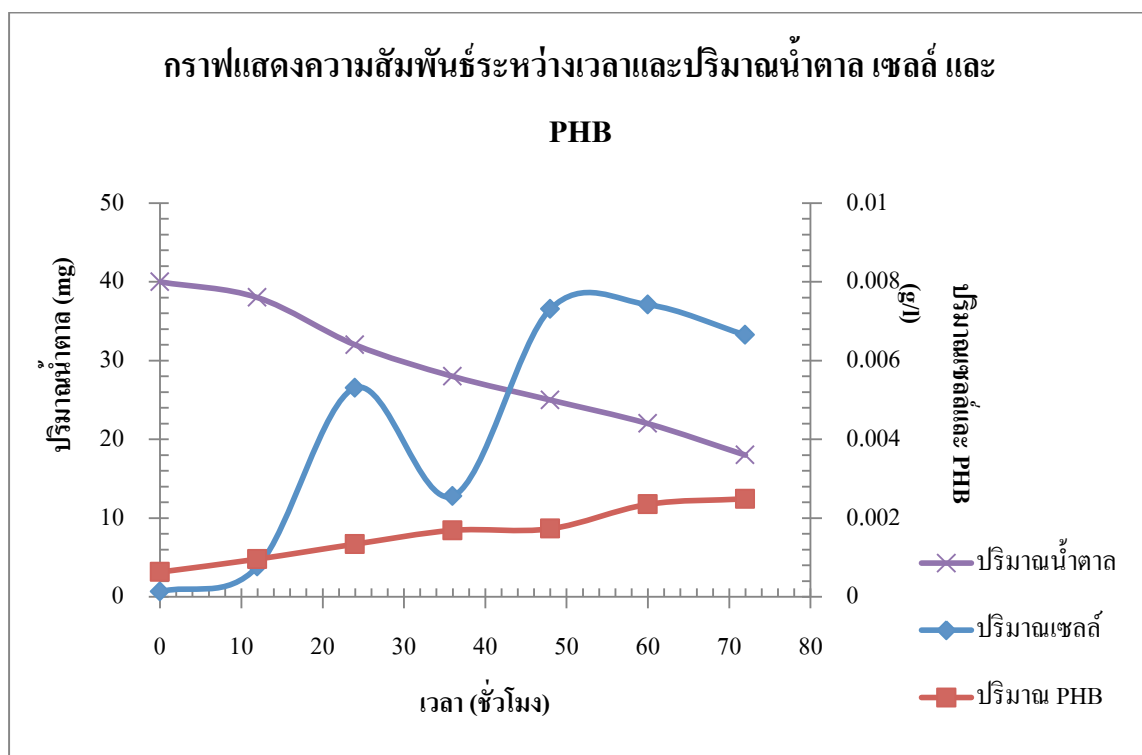
งานวิจัยเรื่องการสกัดพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (พีเอชบี) จากเชื้อ *Alcaligenes eutrophus* ด้วยบรอมิเลนจากน้ำสับปะรด แบ่งออกเป็นสามการทดลอง โดยทำการศึกษาผลของอายุสับปะรดที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ การประยุกต์ใช้บรอมิเลนในการสกัดพีเอชบี และการยืนยันโครงสร้างของพอลิเมอร์ที่สกัดได้ด้วยเครื่องอินฟราเรดสเปกโตรสโคปี

1. ผลของอายุสับปะรดที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์

สับปะรดผลแก่ ผลแก้ว ผลสุก ผลสุกงอม อายุตั้งแต่ 100-200 วันหลังจากบังคับดอก จะมีปริมาณโปรตีนในสารละลายก่อนและหลังเซนตริฟิวก์อยู่ในช่วง 98.7-123.46 มิลลิกรัม และกิจกรรมเอนไซม์อยู่ในช่วง 1.46-1.63 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าปริมาณของโปรตีน และกิจกรรมของ บรอมิเลนจากน้ำสับปะรดที่แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ จากการวิเคราะห์ทั้งปริมาณโปรตีนและกิจกรรมบรอมิเลนเพื่อนำไปศึกษาในการสกัดพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตจากเชื้อ *A. eutrophus* ด้วยเอนไซม์บรอมิเลนจากสับปะรด เนื่องจากมีงานวิจัยของ [6] พบว่า ผลจากการทดลองใช้บรอมิเลนทางการค้าในการสกัดพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตจากเชื้อ *Alcaligenes eutrophus* จะได้พอลิไฮดรอกซี-บิวทิเรตที่มีความบริสุทธิ์สูงสุดถึง 88.8% จึงนำเอนไซม์บรอมิเลนจากสับปะรดมาสกัด ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงปริมาณ โปรตีนของค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างน้ำสับประรด

ชนิด และ อายุของผลสับประรด	ก่อนเซนตริฟิวก์		หลังเซนตริฟิวก์	
	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม)	กิจกรรมของบรอมิเลน (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม)	กิจกรรมของบรอมิเลน (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
ผลแก้ว (100 วัน)	104.76±4.90	1.51±0.09	106.3±27.64	1.45±0.06
ผลสุก (160 วัน)	116.13±10.01	1.46±0.02	115.6±17.32	1.61±0.06
ผลแก่ (180 วัน)	123.46±9.98	1.62±0.05	120.73±25.83	1.63±0.01
ผลสุกงอม (200 วัน)	98.7±1.83	1.60±0.03	131.4±20.03	1.54±0.04



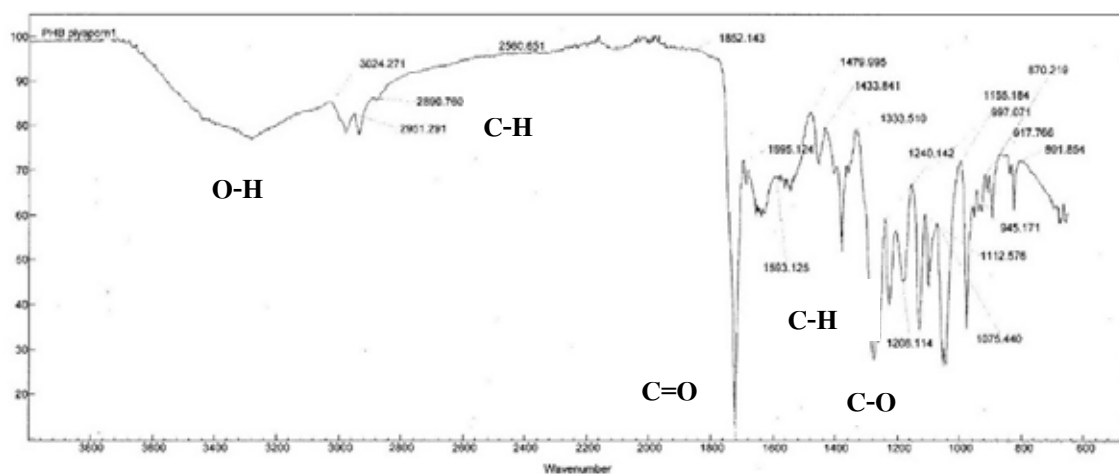
ภาพที่ 1 แสดงการเจริญเติบโต ปริมาณน้ำตาล และปริมาณพีเอชบี จากเชื้อ *A. eutrophus* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร NB ที่มี กลูโคสความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ความ เป็นเชื้อทำการเขย่า 200 รอบต่อวินาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตัวอย่างจะถูกเก็บมาวิเคราะห์ทุก ๆ 12 ชั่วโมง จนครบ 72 ชั่วโมง

จากงานประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยทักษิณ ครั้งที่ 23 ปี 2556

การใช้เชื้อจุลินทรีย์ *A. eutrophus* เป็นจุลินทรีย์ที่มีการวิจัยค้นคว้าเพื่อใช้ผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (PHB) กันอย่างกว้างขวาง เนื่องจากจุลินทรีย์ชนิดนี้มีความสามารถที่จะสะสมสารพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตไว้ในเซลล์ได้มากถึงประมาณร้อยละ 80 โดยน้ำหนักเซลล์โดยการเพาะเลี้ยงด้วยแหล่งคาร์บอนง่าย ๆ เช่น กลูโคส นอกจากกลูโคสยังสามารถใช้สารประกอบอินทรีย์เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนได้หลากหลาย ได้แก่ กลูโคส ฟรุคโตส ฟีนอล เพนโตส เป็นต้น ในการทดลองนี้ได้ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเนื่องจากสามารถหาได้ง่ายและมีราคาถูก [1]

3. การวิเคราะห์โครงสร้างของพอลิเมอร์ที่สกัดได้ด้วยเครื่องอินฟราเรดสเปกโตรสโคปี

จากผลการทดลองพบว่า โดยมีหมู่ฟังก์ชัน C=O ที่ 1695.125 หมู่ C-O ที่ 1240.142 หมู่ O-H 3350 และ C-H ที่ 1333.510 cm^{-1} (ภาพที่ 2) จึงสามารถยืนยันได้ว่าพอลิเมอร์ที่สกัดได้เป็นพีเอชบี โดยเปรียบเทียบกับพีเอชบีทางการค้า (ตารางที่ 2)



ภาพที่ 2 สเปกตรัมของพอลิเมอร์ที่สกัดได้จากเชื้อ *A. eutrophus* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร NB ที่มีกลูโคสความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน โดยใช้ไม้สับปะรดเป็นตัวสกัด

ตารางที่ 2 Wavelength number ของพอลิเมอร์ที่สกัดได้จากเชื้อ *A. eutrophus* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร NB ที่มีกลูโคสความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน โดยใช้น้ำสับปะรดเป็นตัวสกัด เปรียบเทียบกับพีเอชบีทางการค้า

Spectrum	Wavelength number (cm ⁻¹)	
	พีเอชบี ^ก	พีเอชบีทางการค้า ^ข
C=O stretching	1695.125	1725 และ 1277
C-O stretching	1240.142	1000-1300
O-H	3350	3444
C-H bending	1333.51	1375 และ 1450

^ก พีเอชบีที่สกัดได้จากการทดลองนี้

^ข พีเอชบีทางการค้าจากบริษัท Biocycle [4]

สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองการศึกษาผลของอายุสับปะรดต่อโปรตีน และกิจกรรมของเอนไซม์พบว่า น้ำสับปะรดจากผลที่มีอายุแตกต่างกัน (100-200 วัน) จะมีปริมาณโปรตีนในช่วง 98.7-123.46 มิลลิกรัม และมีกิจกรรมของ บรอมิเลนในช่วง 1.46-1.64 ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยพบว่าปริมาณโปรตีนและกิจกรรมของเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในผลสับปะรดที่มีอายุต่างกันในการทดลอง เนื่องจากการสุกของผลสับปะรดขึ้นอยู่กับการบ่มให้สุกแต่ผลที่ได้จากการทดลองมีกิจกรรมของเอนไซม์บรอมิเลนแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ เมื่อนำน้ำสับปะรดมาสกัดพีเอชบีจากเชื้อ *A. eutrophus* ที่เลี้ยงในอาหาร Nutrient broth (NB) ที่มีกลูโคสความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน จะได้พีเอชบีปริมาณ 1.57 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 82.63 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์บรอมิเลน 1.62 ± 0.03 จากการวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเครื่องอินฟราเรดสเปกโตรสโคปีเปรียบเทียบกับพีเอชบีทางการค้าพบว่าพอลิเมอร์ที่ได้เป็นพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต โดยมีหมู่ฟังก์ชัน C=O ที่ 1695.125 หมู่ C-O ที่ 1240.142 หมู่ O-H 3350 และ C-H ที่ 1333.510 cm⁻¹

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของงานวิจัยเรื่องการใช้เอนไซม์ในการสกัดและทำบริสุทธิ์พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตจากเชื้อ *Cupriavidus necator* ซึ่งได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยทักษิณ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2555

ขอขอบคุณ สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยทักษิณ และขอบคุณสาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ที่อำนวยความสะดวกในเรื่องของห้องปฏิบัติการและเครื่องมือ รวมทั้งขอบคุณเอกสารอ้างอิงทุก ๆ ฉบับที่ให้ข้อมูลและความรู้

จากงานประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยทักษิณ ครั้งที่ 23 ปี 2556

เอกสารอ้างอิง

- [1] ดวงนภา แซ่ลิ้ม. (2549). การผลิตและการย่อยสลายพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากน้ำเสียโดยใช้ *Ralstonia eutropha* TISTR 1095. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. สงขลา : มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- [2] พรเทพ ถนนแก้ว และตรีตาภรณ์ จันทน์เทศ. (2553). “โพลิไฮดรอกซีบีวทิเรต : พลาสติกชีวภาพที่ ย่อยสลายได้ง่าย.” วารสารศูนย์บริการวิชาการ. 18 (1): 26-29.
- [3] สุวิมล กาญจนสุธา. (2551). การใช้กากมันสำปะหลังและฟางข้าวเป็นวัตถุดิบในการผลิตพลาสติก ชีวภาพ โพลิ-ไฮดรอกซีอัลคานอยด์และการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีชีวภาพจากกากของแข็งที่เกิดจากอุตสาหกรรมสกัดปาล์มน้ำมัน. วิทยานิพนธ์ การศึกษามหาบัณฑิต. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ.
- [4] Fabiane,C.O., Marcos,L.D., Leda R.C., Denise,M.G.F. (2007). “Characterization of poly(3-hydroxybutyrate) produced by *Cupriavidus necator* in solid-state fermentation.” **Bioresource Technology**. 98: 633–638.
- [5] Devakate, R. V., Patil, V. V., Waje, S. Sand Thorat, B. N. (2009). “Purification and drying of bromelain.” **Separation and Purification Technology**. 64: 259-264.
- [6] Kapritchkoff, F. M., Viotti, A. P., Alli, R. C. P., ZuccoloM., Pradella J. G. C., Maiorano A. E., Miranda E. A. and Bonomi A. (2006). “Enzymatic recovery and purification of polyhydroxybutyrate produced by *Ralstonia eutropha*.” **Journal of Biotechnology**. 122: 453–462.
- [7] Lowry, O.H., Rosbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J., (1951). Protein Measurement with the Folin-Phenol Reagent, **Journal Biological Chemistry**. 193: 265-275.