



การพัฒนากระบวนการผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรตด้วยกระบวนการหมักบนอาหารแข็ง
โดยแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* SWU01

The Development of Polyhydroxybutyrate Production Using Solid State Fermentation
by *Bacillus Megaterium* SWU01

แพรวสุภา เหล่าศิริ¹ ปิยะดา จิตรตั้งประเสริฐ¹ ชิปชัย วัฒนวิจารย์² และ สิริขวัญ พลประทีป^{1*}

Praewsupa Laosiri¹ Piyada Jittungprasert¹ Tipachai Vattanavichan² and Sirikwan Ponprateep^{1*}

¹คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย

²คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย

¹Faculty of Science, Sirikharinwirot University, Bangkok, Thailand

²Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, Thailand

*corresponding author, E mail: sirikwanp@g.swu.ac.th

บทคัดย่อ

พอลิไฮดรอกซีบิวทีเรต หรือ พีเอชบี เป็นเทอโมพลาสติกชีวภาพ ที่สามารถผลิตได้จากแบคทีเรียหลายชนิด โดยแบคทีเรียผลิตและสะสมพีเอชบีเพื่อเป็นแหล่งพลังงานสำรองให้กับเซลล์เมื่ออยู่ในสภาวะเครียด งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อพัฒนากระบวนการผลิตพีเอชบีโดยแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* SWU01 ด้วยกระบวนการหมักบนอาหารแข็งที่มีส่วนผสมของกากน้ำตาล ผลการหาสภาวะที่เหมาะสม พบว่า การเพาะเลี้ยงโดยใช้ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 1 หน่วย ลงบนอาหาร NB ที่มีส่วนประกอบของกากน้ำตาลเข้มข้นร้อยละ 2 โดยมวลต่อปริมาตร โดยมีปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ที่ 20 mL ต่อจานเพาะเชื้อ และบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ได้ปริมาณพีเอชบีได้เท่ากับ 5.81 ± 0.32 g/L จากนั้นทำการขยายขนาดการผลิตเพื่อทำการเปรียบเทียบวิธีการสกัดพีเอชบีจากเซลล์แบคทีเรีย พบว่าการสกัดด้วยระบบตัวทำละลายผสม (อะซิโตน/เอทานอล/โพรพิลีนคาร์บอนเนต อัตราส่วนโดยปริมาตรเท่ากับ 1:1:1) ได้ปริมาณพีเอชบีมากที่สุด เท่ากับ 0.22 กรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า สภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการผลิตพลาสติกชีวภาพโดยใช้ต้นทุนต่ำและเป็นกระบวนการผลิตที่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมน้อย

คำสำคัญ: พอลิไฮดรอกซีบิวทีเรต บาซิลลัส เมกะทีเรียม กากน้ำตาล กระบวนการหมักบนอาหารแข็ง



Abstract

Polyhydroxybutyrate or PHB is a thermoplastic synthesized by numerous bacteria as intracellular carbon source for energy reservation under stress conditions. This work aimed to develop a PHB production by *Bacillus megaterium* SWU01 using solid state fermentation containing molasses. The optimized condition to grow the PHB producing bacteria equals 1 unit of the optical density at 600 nm (OD_{600}) of a bacterial culture incubated on 20 mL NA medium supplemented 2% molasses (v/v) at 37 °C for 24 h. The *Bacillus megaterium* SWU01 can produce the PHB reaching to 5.81 ± 0.32 g/L. Then, production of PHB under optimized condition was expanded for the large scale to compare the methods of PHB extraction. In order to achieve high recovery of PHB extraction, the best extraction method was obtained using environmental solvent mixture, consisting of acetone/ethanol/propylene carbonate, provided maximum yield of PHB reached to 0.22 g/g CDW. This process could be a promising alternative for producing biodegradable polymer at low cost and with less environmental impact.

Keywords: Polyhydroxybutyrate, *Bacillus megaterium*, Molasses, solid state fermentation

1. บทนำ

การใช้พลาสติกปิโตรเคมีเป็นที่นิยมกันอย่างแพร่หลายเนื่องจากมีคุณสมบัติที่สามารถอำนวยความสะดวกสบายให้แก่ผู้นิยมใช้ มีความทนทาน น้ำหนักเบา ยืดหยุ่น และคงทนต่อสภาวะต่างๆ ได้ดี สามารถนำมาใช้งานได้หลากหลายวัตถุประสงค์ตามความเหมาะสม ทำให้พลาสติกปิโตรเคมีมีปริมาณเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ แต่ภายหลังการใช้งานพลาสติกเหล่านี้กลายเป็นขยะที่ต้องใช้เวลานานมากในการย่อยสลาย ส่งผลเสียต่อสิ่งแวดล้อมจนกลายเป็นปัญหาสิ่งแวดล้อมที่ส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศ พลาสติกชีวภาพจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจในการนำมาใช้แทนพลาสติกปิโตรเคมีเพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว เนื่องจากสามารถย่อยสลายได้ด้วยกระบวนการทำงานของจุลินทรีย์ในธรรมชาติ เช่น แบคทีเรีย เชื้อรา และสาหร่ายบางประเภท ในสภาวะที่เหมาะสมโดยระยะเวลาอันสั้น

พอลิไฮดรอกซีบิวทีเรต (Polyhydroxybutyrate : PHB) หรือ พีเอชบี เป็นพลาสติกชีวภาพที่มีคุณสมบัติคล้ายพลาสติกสังเคราะห์พอลิโพรพิลีนและพอลิเอทิลีน เช่น ไม่ละลายน้ำ ทนความร้อนได้สูง มีความแข็งแรง ยืดหยุ่นและน้ำหนักเบา ทำให้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมได้อย่างหลากหลาย (Das et al, 2018) โดยพีเอชบีเป็นสารประเภทไฮดรอกซีเอซิดพอลิเอสเทอร์ที่แบคทีเรียหลายชนิดสามารถผลิตและสะสมในแกรนูลเพื่อเป็นแหล่งพลังงานสำรองภายในเซลล์ การสะสมพีเอชบีภายในเซลล์จะเกิดขึ้นเมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะที่ไม่สมดุล คือ มีปริมาณคาร์บอนมากเกินไปในขณะที่ไนโตรเจนและแร่ธาตุอื่นๆ มีจำนวนจำกัด โดยในกระบวนการสังเคราะห์พีเอชบีในแบคทีเรียเริ่มจาก acetyl-coA เปลี่ยนเป็น acetoacetyl-CoA ด้วยเอนไซม์ β -ketothiolase จากนั้นเอนไซม์ acetoacetyl-CoA reductase จะเปลี่ยน acetoacetyl-CoA เป็น 3-hydroxybutyryl-CoA ต่อมาเกิดการสร้างสายพอลิเมอร์เป็นพีเอชบีด้วยเอนไซม์พอลิไฮดรอกซีบิวทีเรตซินเทส (Verliden et al, 2007) การสะสมพีเอชบี พบในแบคทีเรียหลายชนิดทั้งแก



รณบวกลและแกรมลลล เช่น *Bacillus*, *Ralstonia*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Aeromonas* และ *Pseudomonas* ในปัจจุบัน มีการใช้แหล่งคาร์บอนจากวัตถุดิบที่ผลิตทดแทนขึ้นใหม่ได้ในธรรมชาติ (Renewable resource) เช่น แป้ง น้ำตาล น้ำมัน มาใช้ในการผลิตฟิเอบีจากแบคทีเรียค้วย (Obruca et al, 2014)

แบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus megaterium* เป็นแบคทีเรียอีกสายพันธุ์หนึ่งที่สามารถผลิตฟิเอบีได้ในปริมาณมาก (Maheswari et al, 2017) โดยในการหมักแบคทีเรียส่วนใหญ่นิยมหมักโดยใช้อาหารเหลว ซึ่งต้องอาศัยเครื่องมือที่ราคาแพง เช่น ถังปฏิกรณ์ เครื่องปั่นเหวี่ยงสำหรับเก็บเซลล์ โดยในการหมักนั้นมีความยุ่งยากในการควบคุมสภาวะการหมักให้คงที่ งานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะศึกษาการหมักแบคทีเรียบนอาหารแข็งเพื่อผลิตฟิเอบี ซึ่งทำการหมักได้ง่ายกว่าไม่จำเป็นต้องอาศัยเครื่องปฏิกรณ์ สามารถเก็บเซลล์โดยไม่ต้องใช้เครื่องปั่นเหวี่ยง จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่ามีการนำวัสดุเหลือใช้จากอุตสาหกรรมเกษตร เช่น เปลือกถั่ว กากน้ำตาล ชานอ้อย มาใช้ในกระบวนการหมักบนอาหารแข็ง ซึ่งให้ปริมาณเซลล์มากกว่าการหมักในอาหารเหลว (Pandey, 2008) นอกจากนั้นกระบวนการเก็บเกี่ยวผลผลิตฟิเอบีจากแบคทีเรียถือว่ามีความสำคัญมาก เพื่อให้ได้ฟิเอบีที่มีบริสุทธิ์และปริมาณมาก ส่วนใหญ่นิยมสกัดด้วยตัวทำละลายที่สามารถทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรีย โดยตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดนอกจากจะมีผลต่อปริมาณฟิเอบีที่สกัดได้แล้วยังส่งผลต่อคุณสมบัติของฟิเอบีที่สกัดอีกด้วย (Ashieh et al, 2018) การสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม (CHCl_3) เป็นวิธีที่เป็นที่นิยมน้อยกว่าหลายเนื่องจากให้ร้อยละผลได้และความบริสุทธิ์ของฟิเอบีสูง แต่ทำให้เกิดสารละลายที่เป็นพิษในปริมาณมากหลังการสกัด นอกจากนี้ยังนิยมสกัดด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (NaOCl) ซึ่งเป็นเทคนิคที่สามารถสกัดที่มีความบริสุทธิ์สูง แต่ให้ร้อยละผลได้ของฟิเอบีค่อนข้างต่ำ ดังนั้นงานวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยมีวัตถุประสงค์ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตฟิเอบีโดยกระบวนการหมักบนอาหารแข็งโดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน รวมถึงศึกษาวิธีการสกัดฟิเอบีจากเซลล์แบคทีเรียให้ได้ปริมาณมากและความบริสุทธิ์สูง โดยคณะผู้วิจัยได้เปรียบเทียบวิธีการสกัดทั้ง 3 วิธี ได้แก่ การสกัดด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรต์, คลอโรฟอร์มและระบบตัวทำละลายผสมที่การฟลักซ์ด้วยตัวทำละลายระบบอะซิโตน/เอทานอล/โพรพิลีนคาร์บอนด ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม เพื่อเป็นต้นแบบสำหรับการสกัดฟิเอบีในปริมาณมากต่อไป

2. วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนากระบวนการผลิตพอลิไฮดรอกซิลบิวทีเรตในแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* SWU01 ด้วยกระบวนการหมักบนอาหารแข็งที่มีกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน และเปรียบเทียบวิธีการสกัดเพื่อให้ได้ฟิเอบีในปริมาณมาก

3. วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 ตรวจสอบการผลิตฟิเอบีของแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* SWU01 ด้วยการย้อมสี Sudan Black B

ยื่นยันการผลิตฟิเอบีของแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* SWU01 โดยการย้อมด้วยสารละลาย 0.5 % Sudan Black B ใน 70% เอทานอล โดยทดสอบสารละลาย Sudan Black B ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโคโลนีเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus*



megaterium SWU01 ขึ้นทิ้งไว้ 30 นาที แล้วล้างออกด้วย 95% เอทานอล ซึ่งแบคทีเรียที่มีการสะสมฟิเอชปีภายในเซลล์จะติดสีดำของ Sudan Black B

3.2 วิเคราะห์คุณสมบัติของกากน้ำตาล (กากน้ำตาล 77% บริษัท อี เอ็ม เอ็ดดร้า Thailand)

3.2.1 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในกากน้ำตาล ด้วยวิธี DNS method (Miller G, 1959)

ปิเปตสารละลายกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้น 0, 0.2, 0.4, 0.6 และ 0.8 mg/mL ลงในหลอดทดลองที่ 1-5 ตามลำดับ และเจือจางกากน้ำตาลโดยปิเปตกากน้ำตาลมา 1 mL ทำให้เจือจางด้วยน้ำกลั่น 9 mL ผสมให้เข้ากัน จะได้กากน้ำตาลเจือจาง 10 เท่า จากนั้นปิเปตกากน้ำตาลที่เจือจางนี้ให้เป็น 100 และ 1,000 เท่า จากนั้นเติมสารละลาย 3,5-dinitrosalicylic acid 0.5 mL ลงในสารละลายกลูโคสมาตรฐานทั้ง 5 หลอดและกากน้ำตาลทั้ง 3 ความเข้มข้น จากนั้นนำสารตัวอย่างที่เตรียมไว้ทั้งหมดไปต้มในอ่างน้ำเดือด 5 นาที เติมน้ำกลั่นลงไปอีกหลอดละ 4 mL เพื่อเจือจาง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 470 nm จากนั้นสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคสมาตรฐานแล้วคำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในกากน้ำตาลเทียบกับกราฟมาตรฐานกลูโคส

3.2.2 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรวมในกากน้ำตาล ด้วยวิธี Phenol Sulfuric method

ปิเปตสารละลายกลูโคสมาตรฐาน 10 ความเข้มข้น (0-100 µg/mL) ลงในหลอดทดลองที่ 1-10 ตามลำดับ และเจือจางกากน้ำตาลให้ได้เป็น 10, 100 และ 1000 เท่า แล้วเติมฟีนอล 5% ลงไป 1 mL แล้วเขย่า เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 mL ลงไปอย่างรวดเร็ว ตั้งหลอดทดลองทิ้งไว้ 10 นาที จากนั้นเขย่าแล้วรออีก 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 nm แล้วสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคสมาตรฐานแล้วคำนวณหาปริมาณน้ำตาลรวมในกากน้ำตาลเทียบกับกราฟมาตรฐานกลูโคส

3.3 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตฟิเอชปีบนอาหารแข็งที่มีกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน

3.3.1 การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นและอาหารสำหรับเพาะเชื้อแบคทีเรีย

แบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัยนี้คือ *Bacillus megaterium* SWU01 ทำการเตรียมเชื้อเริ่มต้น (Starter culture) โดยแยกโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกแล้ว 1-2 โคโลนี ใส่ในอาหาร NB (Nutrient Broth, ยี่ห้อ HIMEDIA, India) 5 mL บ่มในตู้บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 °C ที่ความเร็วรอบ 250 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อเริ่มต้นมาวัดความขุ่นของเชื้อเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 600 nm

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย เตรียมโดยเจือจางกากน้ำตาลมีความเข้มข้นที่ต้องการโดยนำมาผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ NB (Nutrient Broth) กับผงวุ้น Agar ให้ได้ปริมาตร 20 mL แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งแรงดันสูง จากนั้นนำมาเทในจานเพาะเชื้อเพื่อขึ้นรูปอาหารแข็ง ทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัว 15 นาที เก็บเข้าตู้เย็น 4°C จนกระทั่งใช้

3.3.2 ผลของความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นต่อการผลิตฟิเอชปี

วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm ของหัวเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้ จากนั้นทำการเจือจางหัวเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ให้ได้เท่ากับ 0.5, 1, 1.5 และ 2 จากนั้นปิเปตเชื้อเริ่มต้นที่เจือจางแล้ว 800 µL ลงใน



อาหารแข็งที่เตรียมไว้จากข้อ 3.3.1 บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บเซลล์แบคทีเรียโดยการขูดผิวหนังอาหาร ละลายใน 1X PBS (Phosphate Buffered Saline) pH 7.4 เพื่อนำไปทำการสกัด PHB และหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.3.3 ผลของความเข้มข้นของกากน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการผลิตพีเอชบี

นำเชื้อเริ่มต้นที่เจือจางแล้ว 800 μ L เทลงในอาหารแข็งที่มีกากน้ำตาลในช่วงความเข้มข้นร้อยละ 1, 2, 4 และ 6 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรที่เตรียมไว้ บ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บเซลล์แบคทีเรียโดยการขูดเก็บเซลล์มาละลายใน 1X PBS เพื่อนำไปทำการสกัดพีเอชบี และหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.3.4 ผลของเวลาต่อการผลิตพีเอชบี

นำเชื้อเริ่มต้นที่เจือจางแล้ว 800 μ L เทลงในอาหารแข็งที่มีกากน้ำตาลที่เตรียมไว้ ทั้งไว้ให้เชื้อซึมลงบริเวณผิวของอาหารแข็ง แล้วปิดฝาให้สนิท บ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เก็บเซลล์แบคทีเรียโดยการขูดเก็บเซลล์มาละลายใน 1X PBS เพื่อนำไปทำการสกัดพีเอชบี และหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.3.5 ผลของปริมาตรของอาหารเพาะเลี้ยงต่อการผลิตพีเอชบี

นำเชื้อเริ่มต้นที่เจือจางแล้ว 800 μ L เทลงในอาหารแข็งที่เตรียมไว้ที่ปริมาตร 15, 17.5, 20, 22.5 และ 25 mL ทั้งไว้ให้เชื้อบริเวณผิวของอาหารแข็งแห้ง และบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ในระยะเวลาที่เหมาะสม เก็บเซลล์แบคทีเรียโดยการขูดเก็บเซลล์ที่ผิวหนังของอาหาร มาละลายใน 1X PBS เพื่อนำไปทำการสกัดพีเอชบี และหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.4 การวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์ของแบคทีเรียและปริมาณพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรต

ทำการบ่มเซลล์แบคทีเรียในสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาลงในอาหาร 20 mL ต่อ 1 จานเพาะเชื้อ แล้วขูดแบคทีเรียบนผิวของอาหารแข็งมาละลายใน 1X PBS ทำให้เซลล์แบคทีเรียกระจายตัวในสารละลายบัฟเฟอร์เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่อง Vortex mixture จากนั้น ชั่งน้ำหนักเซลล์เปียกทั้งหมด แล้วแบ่งสารละลายมา 500 μ L (บันทึกน้ำหนักเปียก) เพื่อใช้ในการวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง เซลล์เปียกที่เหลือนำไปชั่งน้ำหนักและนำไปสกัดพีเอชบี

3.4.1 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง

นำเซลล์เปียกที่แบ่งมา 500 μ L มาปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอนของเซลล์ที่ 8,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำ 2 ครั้ง ชั่งน้ำหนักเปียกของเซลล์แบคทีเรียไว้ แล้วนำไปอบให้น้ำหนักเซลล์คงที่อุณหภูมิ 60 °C 24 ชั่วโมง คำนวณน้ำหนักเซลล์แห้งทั้งหมดต่อจานเพาะเชื้อแล้วคำนวณปริมาณเซลล์แห้งต่ออาหาร 1 ลิตร ตามสูตร ด้านล่าง

$$\text{ปริมาณเซลล์แห้งทั้งหมดต่อจานเพาะเชื้อ (g)} = \frac{\text{น้ำหนักเซลล์แห้งที่แบ่งมา} \times \text{น้ำหนักเปียกของแบคทีเรียทั้งหมด}}{\text{น้ำหนักเซลล์เปียกของแบคทีเรียทั้งหมด}}$$

$$\text{ปริมาณเซลล์แห้งทั้งหมดต่ออาหาร 1 ลิตร (g/L)} = \text{ปริมาณเซลล์แห้งทั้งหมดต่อจานเพาะเชื้อ} \times 50$$



3.4.2 ปริมาณพีเอสบี

นำเซลล์แบคทีเรีย ชั่งน้ำหนักตะกอนไว้ (น้ำหนักเปียกที่ใช้ในการสกัดพีเอสบี) และนำเซลล์มาปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำการสกัดพีเอสบี โดยเติมโซเดียมไฮโปคลอไรด์ เข้มข้น 12.5% ปริมาตร 3 mL แล้วนำไปบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จะสังเกตเห็นตะกอนสีขาวของพีเอสบี นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm 5 นาที แล้วเก็บตะกอน จากนั้นล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้งตามด้วยอะซิโตนและเอทานอลตามลำดับ นำไปบ่มที่ 60 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือจนน้ำหนักคงที่ จากนั้นนำไปชั่งน้ำหนักแห้ง แล้วคำนวณหาปริมาณพีเอสบีในเซลล์แบคทีเรียแล้วคำนวณเป็นปริมาณพีเอสบีต่ออาหาร 1 ลิตร โดยการเทียบน้ำหนักกับปริมาณเซลล์ของแบคทีเรียทั้งหมด ดังสมการ (Grothe & Chisti, 2000)

$$\text{ปริมาณพีเอสบีทั้งหมดต่อจานเพาะเชื้อ (g)} = \frac{\text{น้ำหนักพีเอสบีที่ได้จากการสกัด} \times \text{น้ำหนักเปียกของแบคทีเรียทั้งหมด}}{\text{น้ำหนักเซลล์เปียกของแบคทีเรียที่ใช้สกัดพีเอสบี}}$$

$$\text{ปริมาณพีเอสบีทั้งหมดต่ออาหาร 1 ลิตร (g/L)} = \text{ปริมาณเซลล์แห้งทั้งหมดต่อจานเพาะเชื้อ} \times 50$$

$$\text{ร้อยละของพีเอสบี} = \frac{\text{ปริมาณพีเอสบีทั้งหมด}}{\text{ปริมาณเซลล์แห้งทั้งหมด}} \times 100$$

3.5 การสกัดพีเอสบีจากแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* SWU01

ทำการบ่มเซลล์แบคทีเรีย *Bacillus megaterium* SWU01 โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาก่อนหน้า โดยขยายขนาดการผลิตในอาหาร 1 ลิตร (เทอาหาร 100 ml ในภาชนะแบนเลสพื้นที่หน้าตัดลาด 348.75 ตร.ซม. จำนวน 10 ภาชนะ) จากนั้นชุดเก็บเซลล์แบคทีเรียมารวมกันโดยแบ่งใส่หลอดให้มือน้ำหนักเซลล์เปียกหลอดละ 2 กรัม เพื่อนำมาศึกษาวิธีการสกัดและหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

3.5.1 ศึกษาการสกัดพีเอสบีจากแบคทีเรียด้วยคลอโรฟอร์ม (Heinrich et al, 2012)

นำเซลล์แบคทีเรีย 2 กรัม (น้ำหนักเซลล์เปียก) เติมคลอโรฟอร์ม 30 mL ทำการรีฟลักซ์ที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมากรองเพื่อแยกของเหลวออกจากเศษเซลล์ชีวมวล จากนั้นตกตะกอนพีเอสบีด้วยอะซิโตนเย็นแล้วล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้งตามด้วยอะซิโตนและเอทานอลตามลำดับ จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงเก็บตะกอน นำไปบ่มที่ 60 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะได้ตะกอนพีเอสบี นำไปชั่งน้ำหนักแห้ง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.5.2 ศึกษาการสกัดพีเอสบีจากแบคทีเรียด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรด์ (วิสันต์ เชื้อวงศ์ และคณะ, 2561)

นำเซลล์แบคทีเรีย 2 กรัม (น้ำหนักเซลล์เปียก) เติมโซเดียมไฮโปคลอไรด์ 12.5% โดยปริมาตร 6 mL ลงในตะกอนของเซลล์แบคทีเรีย แล้วนำไปบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จะสังเกตเห็นตะกอนสีขาวของพีเอสบี นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm 5 นาที แล้วเก็บตะกอน จากนั้นล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้งตามด้วยอะซิโตนและเอทานอลตามลำดับ นำไปบ่มที่ 60 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะได้ตะกอนพีเอสบี นำไปชั่งน้ำหนักแห้ง ในการทดลองนี้ได้นำแบคทีเรียทำการทดลอง 3 ซ้ำ



3.5.3 ศึกษาการสกัดฟิโชนีจากแบคทีเรียที่ทำละลายระบบอะซิโตน/เอทานอล/โพรพิลีนคาร์บอนเนต (ปรับปรุงจาก Fei et al, 2016)

นำเซลล์แบคทีเรีย 2 กรัม (น้ำหนักเซลล์เปียก) ละลายในเอทานอล 30 mL จากนั้นทำการโซนิเคชันด้วยเครื่อง Sonic dismembrator (ยี่ห้อ Sonics&materials, INC USA) 10 นาที ที่ 70% amplitude นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 rpm 5 นาที แล้วเก็บตะกอน จากนั้นเติมตัวทำละลายระบบอะซิโตน/เอทานอล/โพรพิลีนคาร์บอนเนต (ปริมาตร 1:1:1) 20 mL แล้วทำการรีฟลักซ์ในอ่างน้ำมันอุณหภูมิ 120 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำสารละลายมากรองทันทีเพื่อแยกตะกอนของเศษเซลล์ออกเก็บส่วนสารละลายไว้ (ฟิโชนีละลายอยู่ในตัวทำละลาย) ทำการตกตะกอนฟิโชนีด้วยอะซิโตน 40 mL ตั้งทิ้งไว้ 4-8 ชั่วโมงจะสังเกตเห็นตะกอนฟิโชนีอยู่ด้านล่างของสารละลาย นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที แล้วเก็บตะกอน ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น 2 รอบแล้วตามด้วยอะซิโตนและเอทานอล นำไปอบที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะได้ตะกอนฟิโชนี นำไปชั่งน้ำหนักแห้ง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

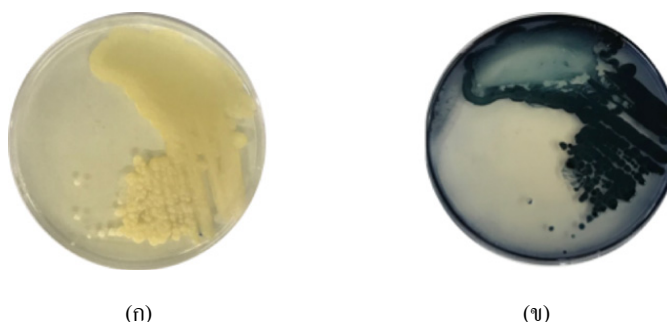
3.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำข้อมูลมาวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 26 วิเคราะห์ด้วย One-way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เพื่อพิจารณาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

4. ผลการวิจัย

4.1 ตรวจสอบการผลิตและสะสมพอลิไฮดรอกซีลิพิดที่เรตของแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* SWU01 ด้วยการย้อมสี Sudan Black B

นำแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* SWU01 ที่ทำการเลี้ยงบนอาหารแข็ง NA เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาตรวจสอบการสะสมฟิโชนีในเซลล์ โดยการย้อมด้วย Sudan black B พบว่า โคลนของแบคทีเรียมีการย้อมติดสีดำของ Sudan Black B อย่างชัดเจนดังแสดงดังภาพที่ 1 ซึ่งแสดงถึงการสะสมฟิโชนีภายในเซลล์ของแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* SWU01



รูปที่ 1 แบคทีเรีย *Bacillus megaterium* SWU01 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA (ก) และ โคลนที่ติดสีย้อม Sudan Black B ของแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* SWU01 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA (ข)



4.2 การวิเคราะห์คุณสมบัติของกากน้ำตาล

ในการทดลองนี้มีการใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อผลิตฟิเอซบี โดยได้วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในกากน้ำตาลด้วยวิธี DNS พบว่า มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์อยู่ร้อยละ 20.09 โดยมวลต่อปริมาตร และจากการวัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาลด้วยวิธี Phenol sulfuric method พบว่า กากน้ำตาลที่ใช้ในการทดลอง มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดอยู่ที่ร้อยละ 48.00 โดยมวลต่อปริมาตร

4.3 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตฟิเอซบีบนอาหารแข็งที่มีกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน

4.3.1 ความเข้มข้นของกากน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการผลิตฟิเอซบี

จากการผลิตฟิเอซบีบนอาหารแข็ง NA ที่มีกากน้ำตาลในช่วงความเข้มข้นร้อยละ 1, 2, 4 และ 6 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พบว่าความเข้มข้นของกากน้ำตาลที่เหมาะสมที่ทำให้แบคทีเรียสามารถผลิตฟิเอซบีได้มากที่สุดคือ ความเข้มข้นของกากน้ำตาลร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ซึ่งมีน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณฟิเอซบี เท่ากับ 4.90 ± 0.28 และ 1.12 ± 0.01 g/L ตามลำดับ ดังรูปที่ 2ก ซึ่งให้ปริมาณฟิเอซบีมากถึง 4.67 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่มีกากน้ำตาลเป็นส่วนประกอบ

4.3.2 ผลของความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นต่อการผลิตฟิเอซบี

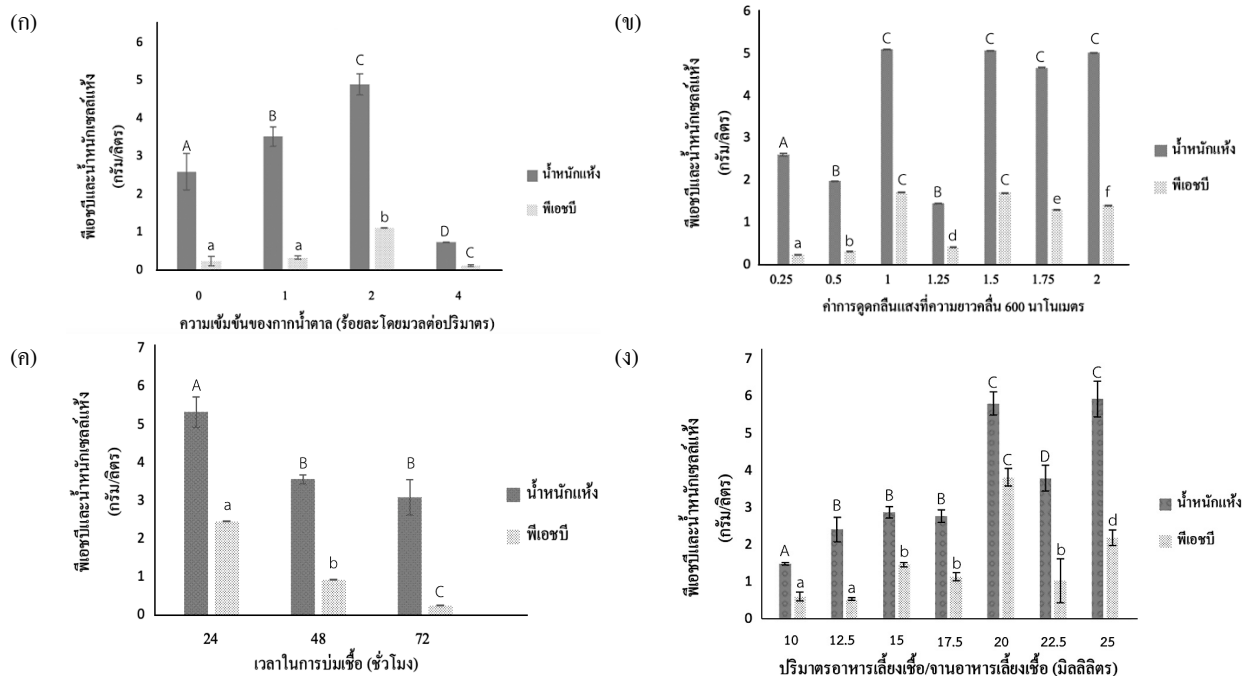
จากการศึกษาปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรียต่อการผลิตฟิเอซบี โดยใช้เชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ OD₆₀₀ เท่ากับ 0.25, 0.50, 1.00, 1.25, 1.50, 1.75 และ 2.00 หน่วย ในการหมักบนอาหารแข็งที่มีกากน้ำตาลเข้มข้นร้อยละ 2 เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ OD₆₀₀ เท่ากับ 1 และ 1.5 ให้ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณฟิเอซบีที่สูงที่สุด ดังนั้น ผู้วิจัยจึงเลือกใช้ค่าความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรีย OD₆₀₀ เท่ากับ 1 ซึ่งมีน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณฟิเอซบีมากที่สุดคือ 5.12 ± 0.001 g/L และ 1.73 ± 0.007 g/L ตามลำดับ ดังรูปที่ 2ข

4.3.3 ผลของเวลาในการบ่มต่อการผลิตฟิเอซบี

การศึกษาระยะเวลาในการหมักแบคทีเรียต่อการผลิตฟิเอซบี โดยนำเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ OD₆₀₀ เท่ากับ 1 เทลงในอาหารแข็งที่มีกากน้ำตาลเข้มข้นร้อยละ 2 โดยบ่มเป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง จากการทดลองพบว่า ระยะเวลาในการหมัก 24 ชั่วโมง เป็นระยะเวลาในการหมักที่เหมาะสมที่สุดที่ทำให้แบคทีเรียมีน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณฟิเอซบี มากที่สุดคือ 5.34 ± 0.40 g/L และ 2.47 ± 0.001 g/L ตามลำดับ โดยพบว่ามีค่าแตกต่างจากกลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ดังรูปที่ 2ค

4.3.4 ผลของปริมาตรของอาหารเพาะเลี้ยงต่อการผลิตฟิเอซบี

ศึกษาปริมาตรของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตฟิเอซบี โดยนำเชื้อเริ่มต้นที่เจือจางแล้วเทลงในอาหารแข็งที่เตรียมไว้ที่ปริมาตร 10, 12.5, 15, 17.5, 20, 22.5 และ 25 mL ต่อ จากนั้นบ่มในระยะเวลาที่เหมาะสม พบว่า ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ 20 mL เป็นปริมาตรอาหารที่ทำให้แบคทีเรียมีการสะสมปริมาณฟิเอซบีมากที่สุดคือ 3.83 ± 0.23 g/L และมีน้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ 5.81 ± 0.32 g/L ดังรูปที่ 2ง



รูปที่ 2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตพีเอชบีของแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* SWU01 บนอาหารแห้ง ได้แก่ ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตพีเอชบี (ก) ความเข้มข้นของกากน้ำตาลที่เหมาะสม (ข) ค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อเริ่มต้นที่ OD₆₀₀ (ค) เวลาในการบ่ม และ (ง) ปริมาณอาหารเพาะเชื้อที่เหมาะสม ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วย One-way ANOVA กราฟแท่งที่มีอักษร A,B,C,...และ a,b,c,... ต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ของน้ำหมักแห้งและพีเอชบี ตามลำดับ

4.4 ศึกษาการสกัดพีเอชบีจากแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* SWU01

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตพีเอชบีบนอาหารแห้งของแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* SWU01 ซึ่งผู้วิจัยใช้เป็นสภาวะต้นแบบในการผลิตพีเอชบี โดยทำการขยายขนาดการในการเลี้ยงแบคทีเรียจากจานเพาะเชื้อมาเพาะเลี้ยงในภาชนะแบนเลขนาด 15.5 x 22.5 เซนติเมตร ซึ่งทำการหมักครั้งละ 1 ลิตร โดยเทอาหาร 100 mL ต่อภาชนะ จำนวน 10 ภาชนะ หลังจากการเพาะเลี้ยงได้ทำการดูดเก็บเซลล์แบคทีเรียมาผสมกันและแบ่งแบคทีเรีย (น้ำหมักเปียก) หลอดละ 2 กรัม ซึ่งนำไปคำนวณน้ำหนักเซลล์แห้ง (CDW) ได้เท่ากับ 11.059 g/L ทำการสกัดพีเอชบีเพื่อเปรียบเทียบกัน 3 วิธี ได้แก่ การสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม การสกัดด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรด์ และการสกัดด้วยทำละลายระบบบอริโตน/เอทานอล/โพรพิลีนคาร์บอนเนต ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 1 พบว่าการสกัดด้วยทำละลายระบบบอริโตน/เอทานอล/โพรพิลีนคาร์บอนเนตเป็นวิธีการสกัดที่ทำให้ได้ปริมาณพีเอชบีมากที่สุดคือ 2.39 ± 0.16 g/L คิดเป็นร้อยละ 21.6 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบผลการสกัดฟิโชนีจากแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* SWU01 ทั้ง 3 วิธี

วิธีการสกัด	ปริมาณฟิโชนี (g/L)	ร้อยละฟิโชนีต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง
สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม	1.85 ± 0.31	16.7
สกัดด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรด์	1.99 ± 0.27	18.0
สกัดด้วยทำละลายระบบอะซิโตน/เอทานอล/โพรพิลีนคาร์บอนเนต	2.39 ± 0.16	21.6

5. การอภิปรายผล

งานวิจัยนี้สกัดฟิโชนีจากแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* SWU 01 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่คณะผู้วิจัยคัดเลือกมาจากการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่าสามารถผลิตฟิโชนีได้ในปริมาณมาก โดยทั่วไปการหมักแบคทีเรียสามารถหมักได้ทั้งในอาหารเหลว (Submerged fermentation) และการหมักบนอาหารแข็ง (solid-state fermentation) แต่กระบวนการหมักบนอาหารแข็ง สามารถทำการหมักได้ง่ายกว่า เนื่องจากต้องการพลังงานที่ใช้ในการหมักน้อยกว่า ต้องการเงินลงทุนต่ำและความเข้มข้นของสารตั้งต้นของกระบวนการหมักบนอาหารแข็งจะมากกว่าความเข้มข้นในอาหารเหลว ทำให้บนอาหารแข็งได้ปริมาณเซลล์ที่มากกว่า (Sindh et al, 2015) โดยการหมักแบคทีเรียให้เกิดการสะสมฟิโชนีจะต้องทำให้เซลล์อยู่ในสภาวะที่มีปริมาณคาร์บอนมากแต่ธาตุอื่นๆ มีอยู่อย่างจำกัด ในการศึกษาการผลิตฟิโชนีจากแบคทีเรียพบว่ายังไม่เคยมีการศึกษาการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* บนอาหารแข็ง ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะเพาะเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหารแข็งและใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน เนื่องจากราคาถูกและใช้ร่วมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ได้ โดยกากน้ำตาลเข้มข้นร้อยละ 2 โดยมวลต่อปริมาตรให้ปริมาณเซลล์แบคทีเรียและให้ปริมาณฟิโชนีสูงกว่าไม่ใส่กากน้ำตาลถึง 4.67 เท่า ซึ่งผลการวิจัยสอดคล้องกับงานวิจัยของ Mona K et al, 2001 ที่พบว่าในอาหารสังเคราะห์ที่มีการเติมกากน้ำตาล 2% และหมักด้วยแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* ให้ผลิตฟิโชนีสูงสุดถึง 44.6% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง นอกจากนั้นในการทดลองนี้ยังได้ศึกษาปริมาณหัวเชื้อที่ใช้บ่มในอาหารพบว่า หัวเชื้อที่เจือจางให้ค่าดูดกลืนแสงที่ 600 nm เท่ากับ 1 หน่วย สามารถผลิตฟิโชนีได้มากที่สุด เนื่องจากการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหารแข็งถ้าใช้เชื้อเริ่มต้นน้อยเกินไปจะทำให้ได้ปริมาณแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้ช้าและไม่เต็มพื้นที่บนหน้าอาหาร แต่หากปริมาณเชื้อเริ่มต้นมีความเข้มข้นสูงเกินไปจะทำให้เกิดการแข่งขันระหว่างเซลล์แบคทีเรียทำให้ผลิตฟิโชนีได้น้อย (Das et al, 2018) จากสภาวะดังกล่าวคณะผู้วิจัยใช้เป็นต้นแบบในการขยายขนาดการผลิตโดยใช้ภาชนะสเตนเลสขนาด 15.5 x 22.5 เซนติเมตร ในการเพาะเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียขนาด 1 ลิตร เพื่อนำมาใช้ในการศึกษาและเปรียบเทียบวิธีการสกัดฟิโชนีจากแบคทีเรีย

จากการศึกษาวิธีการสกัดฟิโชนีจากแบคทีเรียด้วยตัวทำละลายผสมที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ระบบอะซิโตน/เอทานอล/โพรพิลีนคาร์บอนเนต เปรียบเทียบกับการสกัดด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรด์และคลอโรฟอร์ม พบว่าการสกัดฟิโชนีจากแบคทีเรียด้วยตัวทำละลายผสมที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมเป็นวิธีการสกัดที่ทำให้ได้ปริมาณฟิโชนีมากที่สุด เนื่องจากเป็นระบบตัวทำละลายที่มีสภาพขั้วใกล้เคียงกับฟิโชนีมากที่สุดทำให้สกัดฟิโชนีออกมาจากเซลล์



ของแบคทีเรียได้มาก (พิบูลย์ วงศ์ชนะ, 2556) แต่อย่างไรก็ตาม การสกัดด้วยตัวทำละลายผสมดังกล่าว มีขั้นตอนการสกัดค่อนข้างมากเมื่อเปรียบเทียบกับ การสกัดด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรด์ที่ถึงแม้จะได้ปริมาณฟิโอบีน้อยกว่าแต่เป็นวิธีการสกัดที่มีขั้นตอนไม่ซับซ้อนและได้ฟิโอบีที่มีความบริสุทธิ์สูง จึงสามารถนำไปใช้เป็นต้นแบบในการผลิตฟิโอบีอย่างง่ายได้ (Aramvash et al, 2018) ส่วนการสกัดด้วยคลอโรฟอร์มเป็นวิธีที่ได้ปริมาณฟิโอบีน้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการสกัดอีก 2 วิธี รวมถึงทำให้เกิดสารละลายที่เป็นพิษภายหลังการสกัดด้วย จึงไม่เหมาะแก่การนำมาใช้ในการสกัดฟิโอบีในเชิงพาณิชย์

6. บทสรุป

แบคทีเรีย *Bacillus megaterium* SWU สามารถเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตฟิโอบีได้บนอาหารแข็งที่มีการเติม 2% กากน้ำตาล โดยเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งให้ปริมาณฟิโอบีมากที่สุด เท่ากับ 3.83 ± 0.23 g/L และมีน้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ 5.81 ± 0.32 g/L คิดเป็นร้อยละ 66 กรัมต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อทำการขยายขนาดการผลิตและสกัดด้วยระบบตัวทำละลายอะซิโตน/เอทานอล/โพรพิลีนคาร์บอเนต อัตราส่วน 1:1:1 โดยปริมาตร วิธีการสกัดนี้ให้ปริมาณฟิโอบีมากที่สุด เท่ากับร้อยละ 21.6 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง จากผลการทดลองทั้งหมดแสดงให้เห็นว่า การผลิตฟิโอบีบนอาหารแข็งเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง ซึ่งมีกระบวนการผลิตง่าย ไม่ยุ่งยากและไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องปฏิกรณ์ซึ่งมีราคาแพง สามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตได้ง่าย วิธีที่ใช้ในการสกัดฟิโอบีโดยระบบตัวทำละลายผสมสามารถให้ผลผลิตมากและส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมน้อยกว่ากระบวนการผลิตทั่วไปที่นิยมใช้คลอโรฟอร์มในการสกัด

7. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยชิ้นนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินรายได้มหาวิทยาลัย ประจำปีงบประมาณ 2561 สัญญาเลขที่ 093/2562 และโครงการส่งเสริมการผลิตครูที่มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์ (สกว.) โดยสถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี(สสวท.)

8. เอกสารอ้างอิง

- พิบูลย์ วงศ์ชนะ. (2556). เคมีพอลิเมอร์. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- วิสันต์ เชื้อวงศ์, กตัญญู ชุกกลิน, กนกพรรณ อนันต์สกุลชัย, ปานิสรา ลีเทียน, ศิริขวัญ พลประทีป, และธิปชัย วัฒนวิจารณ์. (2561). การใช้ขาน้อยและกากน้ำตาลในการผลิตพอลิไฮดรอกซีบีทีเรด โดยแบคทีเรีย *Bacillus sp.* SWU01. วารสารวิทยาศาสตร์ มศว, 2, 99-112.
- ศุภรัตน์ จูติรัตนอัสว. (2561). การผลิตพลาสติกชีวภาพพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากน้ำมันปาล์มโดยใช้เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 1287. วารสารวิชาการเทคโนโลยีอุตสาหกรรม, 2, 24-36.



- Aramvash, A., Zavareh, F. & Banadkuki, N. (2018). Comparison of different solvent for extraction of polyhydroxybutyrate from *Cupriavidus necator*. *journal of Enineering in life science*, 18, 20-28.
- Das, S., Majumder, A., Suhazsini, P. & Radha, P. (2018). Biosynthesis of Poly(3-hydroxybutyrate) from Cheese Whey by *Bacillus megaterium* NCIM 5472. *journal of polymers and environment*(26), 4176-4187.
- Fei, T., Cazeneuve, S., Wen, Z., Wu, L. & Wang, T. (2016). Effect recovery of Poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) biopolymer from *cupriavidus necator* using a novel and environmentally friendly solvent system. *American insititute of Chemical Engineers*, 32 (3), 1-7.
- Heinrich, D., Madkour, M., Al-Ghamdi, M., Shabbaj, I., and Steinbüchel, A. (2012). Large scale extraction of polyhydroxybutyrate from *Ralstonia eutropha* H16 using sodium hypochlorite. *AMB Express*, 2(1), 1-6.
- Maheswari, U. and Mary, S. (2017). A comparative study on the PHB production by bacillus species under solid state fermentation by agricultural wastes. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 7, 1473-1487.
- Miller, G. (1959). Use of dinitrisalicylic acid for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry* 31, 426-429
- Mona ,K. Gouda, Azza E. Swellam, Omar, S. H. (2001). Production of PHB by a *Bacillus megaterium* strain using sugarcane molasses and corn steep liquor as sole carbon and nitrogen sources. *Microbiological Research*, 156, 201-207.
- Nikodinovic-Runic, J ., Guzik, M., Shane T.Kenny, Babu, R ., Werker, A. & Kevin E.O Connor. (2013). Chapter Four Carbon Rich Wastes as Feedstocks for Biodegradable Polymer (Polyhydroxyalkanoate) Production Using Bacteria. *Advances in Applied Microbiology*, 84, 139-200.
- Obruca, S., Petrik, S., Benesova, P., Svoboda, Z., Eremka, L. and Marova, I. (2014). Utilization of oil extracted from spent coffee grounds for sustainable production of polyhydroxyalkanoates. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(13), 58-83. doi:10.1007/s00253-014-5653-3
- Pandey, A. (2008). Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering*, 13 , 81-84.
- Sindh, R., Pandey, A. and Binod, P. (2015). Solid-state fermentation for the production of poly(hydroxyalkanoates). *Biochem*, 29(2), 173-181.
- Verliden, R., Hill, D., Kenward, M., Williams, C., & Radecka, I. (2007). bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *journal of Applied Microbiology*, 1437-1449.