

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคานอยด์จาก
น้ำมันพืชสำหรับทอดที่ใช้แล้วด้วย *Bacillus megaterium*

Optimization of polyhydroxyalkanoates production from used
frying oil by *Bacillus megaterium*



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิศวกรรมอาหารและเกษตรอัจฉริยะ

คณะวิศวกรรมศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ.2567

KMITL-2024-EN-M-117-252

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Optimization of polyhydroxyalkanoates production from used frying
oil by *Bacillus megaterium*

Mr. Wacharakorn Tojumsri



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF ENGINEERING IN FOOD AND AGRICULTURAL INTELLIGENCE
ENGINEERING
SCHOOL OF ENGINEERING
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
2024
KMITL-2024-EN-M-117-252

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



COPYRIGHT 2024

SCHOOL OF ENGINEERING

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากน้ำมันพืชสำหรับทอดที่ใช้แล้วด้วย <i>Bacillus megaterium</i>
นักศึกษา	นาย วัชรกร โตจำสี
รหัสประจำตัว	63601291
ปริญญา	วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	วิศวกรรมอาหารและเกษตรอัจฉริยะ
พ.ศ.	2567
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ.ดร.ธีรินทร์ ฉายศิริโชติ

บทคัดย่อ

ในปัจจุบันปัญหาทางด้านสิ่งแวดล้อมที่เกิดจากการใช้พลาสติกปิโตรเคมีและการสะสมของขยะพลาสติกทำให้เกิดการศึกษา วิจัย และพัฒนาเกี่ยวกับพลาสติกชีวภาพที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมปลอดภัย และสามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ งานวิจัยนี้จึงมุ่งหวังที่จะผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (polyhydroxyalkanoate) หรือ PHA ซึ่งเป็นพลาสติกชีวภาพที่มีคุณสมบัติคล้ายและสามารถนำมาใช้งานทดแทนพลาสติกปิโตรเคมีได้ โดยมีการลดต้นทุนการผลิตด้วยการใช้น้ำมันพืชสำหรับทอดที่ใช้แล้ว (waste frying oil) หรือ UFO มาเป็นแหล่งอาหารในการผลิต ในงานวิจัยนี้ต้องการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต PHA จากน้ำมันพืชสำหรับทอดที่ใช้แล้วด้วย *Bacillus megaterium* TISTR1875 โดยปัจจัยที่ศึกษา ได้แก่ ปริมาณกรดไขมันอิสระ (free fatty acid, FFA 0.5, 1.0 และ 1.5 %) ปริมาณไนโตรเจน (1, 2 และ 3 กรัม/ลิตร) และอุณหภูมิในการบ่ม (30, 35 และ 40 °C) สำหรับการผลิต PHA ผลการวิจัยพบว่าปัจจัยที่ศึกษานั้นส่งผลต่อการผลิต PHA อย่างมีนัยสำคัญ สภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิต PHA คือสภาวะปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต 2.03 (กรัม/ลิตร), FFA 1.1 % และอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม 35 °C และได้รับสมการทำนายของการผลิตน้ำหนักเซลล์ทั้งหมดที่เหมาะสมในการนำมาใช้งาน เนื่องจากค่า adjusted R² นั้นเท่ากับ 94.0 % แสดงถึงความแม่นยำในการใช้งานแบบทดลอง นอกจากนั้นแบบจำลองของปริมาณ PHA นั้นมีค่า adjusted R² นั้นเท่ากับ 95.8 % และสำหรับแบบจำลองของการสะสม PHA มี ค่า adjusted R² ของแบบทดลองนั้นเท่ากับ 93.4 %

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis	Optimization of polyhydroxyalkanoates production from used frying oil by <i>Bacillus megaterium</i>
Student	Mr. Wacharakorn Tojumsi
Student ID.	63601291
Degree	Master of Engineering
Program	Food and Agricultural Intelligence Engineering
Year	2024
Thesis Advisor	Assoc.Prof.Dr. Teerin Chysirichote

ABSTRACT

The environmental issues associated with petrochemical-based plastics and the accumulation of plastic waste have led to extensive research and development of biodegradable polymers that are environmentally friendly, non-toxic and biodegradable. Therefore, this research aims to produce polyhydroxyalkanoates (PHA), which is biopolymer exhibiting similar properties to petrochemical-based plastics and reduce the cost by using the used frying oil as the material for bacteria fermentation.

In this research, the effect of free fatty acid content, nitrogen content and fermentation temperature on PHA production using *Bacillus megaterium* TISTR1875 was studied. The results showed that all of them significantly affected PHA production. The optimum condition for producing PHA were a medium containing an ammonium sulfate quantity of 2.03 grams per liter, 1.1 % FFA and a fermentation temperature of 35 °C. The predicted cell weight from the experiment is appropriate for practical use, as indicated by an adjusted R-squared of 94.0 %. These values demonstrate the accuracy of the experimental model. Regarding the PHA quantity model, the experiment yields a high level of accuracy with an adjusted R-squared of 95.8 %. The PHA accumulation experimental model obtained the respectable adjusted R-squared of 93.4 %.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สามารถลงไปได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความอนุเคราะห์จากบุคคลหลายท่านและหลายหน่วยงานที่ช่วยชี้แนะ รวมถึงอำนวยความสะดวกในหลายด้าน จึงส่งผลให้งานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จ

ขอขอบคุณ รศ.ดร.ธีรินทร์ ฉายศิริโชติ ที่ให้ความรู้ คำแนะนำ รวมถึงให้โอกาสในการทำสิ่งต่างๆ ที่ช่วยเสริมสร้างประสบการณ์ เพิ่มพูนความรู้ที่เป็นประโยชน์ ทั้งในระหว่างการศึกษาและงานวิจัยของข้าพเจ้า และทำหน้าที่ในฐานะของอาจารย์ที่ปรึกษาได้อย่างดีเยี่ยม

ขอขอบคุณ คุณอำนาจ คุณตะคุ คุณบุญญา ผลโพธิ์ และคุณวรารักษ์ มาไพศาลทรัพย์ ซึ่งเป็นเจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการและธุรการภาควิชาวิศวกรรมอาหารที่มีส่วนร่วมอย่างมากในการสนับสนุน ช่วยในขณะที่ยังดำเนินงานวิทยานิพนธ์ของข้าพเจ้า เอื้อเฟื้อสถานที่อำนวยความสะดวกในการเยี่ยมชมและห้องปฏิบัติการ

ขอขอบคุณเพื่อนทั้งสองคนที่ชอบกันประทับใจประคอง รวมถึงผ่านอุปสรรคในการทดลองไปด้วยกัน เพื่อนอีกหลายคนที่ยังคอยเป็นกำลังใจเสมอ

ขอขอบคุณ คุณอรทัย โตจำสี สำหรับทุนการศึกษา การกินอยู่ รวมถึงความรัก และกำลังใจที่ทำให้ข้าพเจ้าผ่านพ้นการทำวิทยานิพนธ์นี้ไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณเพลงทุกเพลง หนังสือเรื่องที่ข้าพเจ้ารับฟัง และรับชมในระหว่างการศึกษาที่คอยประคองสุขภาพจิตใจของข้าพเจ้าเสมอ

ขอบคุณทุกท่านที่ได้ร่วมทำให้วิทยานิพนธ์นี้เป็นจริง การสนับสนุนและความอดทนของทุกท่านได้เป็นกำลังใจอันมีค่า และได้ช่วยให้ข้าพเจ้าสามารถสร้างผลงานที่มีคุณค่าและเป็นประโยชน์ต่อสังคมและวิชาการ

วัชรกร โตจำสี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	VI
สารบัญรูป	VII
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 หลักการและเหตุผลของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	2
1.4 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย	2
1.5 ประโยชน์และผลที่คาดว่าจะได้รับ	3
1.6 รายละเอียดของวิทยานิพนธ์	3
บทที่ 2 ตรวจสอบเอกสาร	5
2.1 พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต	5
2.1.1 ประวัติความเป็นมาของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต	5
2.1.2 การสังเคราะห์ PHA โดยใช้ของเสียที่อุดมด้วยไขมัน (lipid-rich wastes)	7
2.1.3 การสังเคราะห์ PHA ในแบคทีเรีย	8
2.2 ไขมันสำหรับทอดที่ใช้แล้ว (Used frying oil, UFO)	9
2.2.1 การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นระหว่างขั้นตอนการทอดของน้ำมันพืช	11
บทที่ 3 วัสดุและวิธีการทดลอง	17
3.1 วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้	17
3.2 วิธีการทดลอง	18
3.2.1 การออกแบบการทดลอง	18
3.2.2 การเตรียมน้ำมันทอดที่ใช้แล้ว (used frying oil, UFO) จากน้ำมันพืชบริสุทธิ์	19
3.2.3 เชื้อแบคทีเรียและอาหารเลี้ยงเชื้อ	20
3.2.4 การหมักเพื่อผลิต PHA	20
3.2.5 การหาน้ำหนักเซลล์แห้งทั้งหมด (total cell dry weight)	21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.2.6 การหาปริมาณ PHA และการสะสม PHA	21
3.2.7 วิเคราะห์ผลการทดลองด้วยวิธีการทางสถิติ	21
3.2.8 วิเคราะห์ลักษณะสมบัติของ PHA ด้วยวิธี Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR)	22
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง	23
4.1 อิทธิพลของปริมาณกรดไขมันอิสระ ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต และอุณหภูมิ ในการบ่มต่อการผลิต PHA จากน้ำมันพืชสำหรับทอดที่ใช้แล้วด้วย <i>Bacillus megaterium</i>	23
4.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิต PHA จากน้ำมันพืชสำหรับทอดที่ใช้แล้วด้วย <i>Bacillus megaterium</i> ด้วยวิธีการทางสถิติ	29
4.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิต PHA จากน้ำมันพืชสำหรับทอดที่ใช้แล้วด้วย <i>Bacillus megaterium</i>	35
4.4 การศึกษาลักษณะสมบัติของ PHA ด้วยวิธี Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR)	38
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	39
บรรณานุกรม	40
ภาคผนวก	46
ประวัติผู้เขียน	51

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
ตารางที่ 2.1 ตัวอย่าง PHA โคพอลิเมอร์	6
ตารางที่ 2.2 ตัวอย่างสายพันธุ์แบคทีเรียที่ถูกนำมาใช้ผลิต PHA ในระดับอุตสาหกรรม	10
ตารางที่ 2.3 องค์ประกอบของกรดไขมันในน้ำมันพืชและไขมันจากสัตว์	10
ตารางที่ 2.4 คุณสมบัติของ UFO และน้ำมันพืชบริสุทธิ์	12
ตารางที่ 3.1 รหัสและระดับของตัวแปรอิสระตามแผนการทดลอง Box-Behnken	19
ตารางที่ 3.2 การทดลองที่ถูกออกแบบตามแผนการทดลอง Box-Behnken	19
ตารางที่ 4.1 CDM (กรัม/ลิตร), ปริมาณ PHA (กรัม/ลิตร) และการสะสม PHA (%) ที่ สภาวะในระดับแตกต่างกัน	24
ตารางที่ 4.2 อิทธิพลของปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต, FFA และอุณหภูมิในการบ่มต่อการ ผลิต PHA	25
ตารางที่ 4.3 แสดงการทดสอบทางสถิติโดยใช้ ANOVA สำหรับแบบจำลองของ CDM (กรัม/ลิตร)	29
ตารางที่ 4.4 การทดสอบทางสถิติโดยใช้ ANOVA สำหรับแบบจำลองของปริมาณ PHA (กรัม/ลิตร)	30
ตารางที่ 4.5 การทดสอบทางสถิติโดยใช้ ANOVA สำหรับแบบจำลองของการสะสม PHA (%)	31
ตารางที่ 4.6 แสดงสมการแบบจำลองจากการใช้วิธีทางสถิติ	34
ตารางที่ 4.7 แสดงการเปรียบเทียบระหว่างค่าที่ได้จากการทำนายด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนองและ ค่าที่ได้จากการทำการทดลองที่สภาวะที่เหมาะสม	37

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
รูปที่ 2.1 โครงสร้างของ PHA โดยทั่วไป	6
รูปที่ 2.2 วิธีการสังเคราะห์ PHA ในเซลล์แบคทีเรีย	7
รูปที่ 4.1 แสดงคอนทัวร์พลอตที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการผลิตน้ำหนักเซลล์ทั้งหมด (CDM) กับ FFA และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต (ก), อุณหภูมิในการบ่ม และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต (ข), และอุณหภูมิในการบ่ม และ FFA (ค)	26
รูปที่ 4.2 แสดงคอนทัวร์พลอตที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ PHA กับ FFA และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต (ก), อุณหภูมิในการบ่ม และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต (ข), และอุณหภูมิในการบ่ม และ FFA (ค)	27
รูปที่ 4.3 แสดงคอนทัวร์พลอตที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการสะสม PHA กับ FFA และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต (ก), อุณหภูมิในการบ่ม และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต (ข), และอุณหภูมิในการบ่ม และ FFA (ค)	28
รูปที่ 4.4 แผนภาพพารेटแสดงค่าอิทธิพลของปัจจัยที่ได้ standardized แล้วต่อการผลิต CDM (กรัม/ลิตร)	33
รูปที่ 4.5 แผนภาพพารेटแสดงค่าอิทธิพลของปัจจัยที่ได้ standardized แล้วต่อการผลิต PHA (กรัม/ลิตร)	33
รูปที่ 4.6 แผนภาพพารेटแสดงค่าอิทธิพลของปัจจัยที่ได้ standardized แล้วต่อการสะสม PHA (%)	34
รูปที่ 4.7 ผลของการวิเคราะห์ลักษณะสมบัติด้วยวิธี FTIR ของ PHB ที่ได้จากการทดลอง และ PHB ทางการค้า	38

บทที่ 1

บทนำ

1.1 หลักการและเหตุผลของปัญหาที่ทำการวิจัย

เนื่องจากปัญหาทางสิ่งแวดล้อมที่เกิดขึ้นจากการใช้พลาสติกสังเคราะห์จากปิโตรเคมี รวมถึงปัญหาการสะสมของเสียของขยะพลาสติกและความตระหนักรู้ที่เพิ่มขึ้นเกี่ยวกับความอันตรายต่อสิ่งแวดล้อมที่เกิดจากขยะพลาสติก ทำให้มีการศึกษาและพัฒนาวัสดุพอลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ ปลอดภัย และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมเพิ่มมากขึ้น ซึ่งพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (polyhydroxyalkanoate) หรือ PHA เป็นพลาสติกชีวภาพในกลุ่มพอลิเอสเทอร์ทางชีวภาพที่สามารถสังเคราะห์ได้ในกลุ่มแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ สามารถทำเป็นวัสดุพลาสติกที่มีคุณสมบัติคล้ายกับพลาสติกปิโตรเคมีและสามารถนำมาใช้งานทดแทนวัสดุชนิดอื่นได้ในการใช้งานต่างๆ (Philip et al., 2007) ในปัจจุบันมีการนำ PHA มาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์หลายชนิด เช่น การใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตสารเคมีกลุ่ม Fine chemicals (Gao et al., 2011) และผลิตภัณฑ์กลุ่มบรรจุภัณฑ์และวัสดุเคลือบ (Bucci et al., 2005) โดยสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่นำมาใช้ประโยชน์ในการผลิต PHA ในระดับอุตสาหกรรม ตัวอย่างเช่น *Cupriavidus necator* (Verliden et al., 2011), *Alcaligenes latus* (Wang et al., 2013), *Azotobacter vinelandii* (Garcia et al., 2014) และแบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas* (Ashby et al., 2002) พอลิ-3-ไฮดรอกซีบิวทีเรท (Poly-3-hydroxybutyrate, PHB) ได้รับการยอมรับอย่างแพร่หลายว่าเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพมากในการจัดการกับปัญหาที่เกิดขึ้นจากพลาสติกที่ผลิตจากปิโตรเคมีเนื่องจากมีความสามารถในการย่อยสลายได้ตามธรรมชาติอย่างมีประสิทธิภาพ การผลิต PHB โดยจุลินทรีย์ที่เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นทางธรรมชาติเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมธรรมชาติ PHB ได้มีการใช้ประยุกต์การใช้งานอย่างหลากหลายในส่วนของอุตสาหกรรมทางการแพทย์ เช่น เครื่องมือการแพทย์ ผลิตภัณฑ์ในอุตสาหกรรมอาหาร รวมถึงอุตสาหกรรมเกษตร เนื่องจากมีคุณสมบัติทางกายภาพที่เปรียบเทียบกับพอลิโพรพิลีน (polypropylene, PP)

อย่างไรก็ตามในปัจจุบันการสังเคราะห์ PHA ยังพบปัญหาด้านต้นทุนการผลิตเมื่อเปรียบเทียบกับพลาสติกทางเคมี เนื่องจากแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิต PHA ในระดับอุตสาหกรรมนั้นส่วนใหญ่ยังคงใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นสารตั้งต้นเนื่องจากให้ปริมาณ PHA ที่สูง (Chen, 2009) จึงเกิดแนวทางการลดต้นทุนในการผลิต PHA ได้อย่างมีประสิทธิภาพด้วยการเลือกใช้แหล่งคาร์บอนที่ราคาถูกสำหรับเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการผลิต PHA โดยเฉพาะวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรม เช่น น้ำมันสำหรับทอดที่ใช้แล้ว (Verliden et al., 2011) เป็นต้น น้ำมันสำหรับทอดที่ใช้แล้ว (waste frying oil) หรือ UFO นั้นถูกเปรียบเทียบกับน้ำมันพืชบริสุทธิ์ในถูกใช้เป็นแหล่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คาร์บอนสำหรับการผลิต PHA โดยที่ UFO นั้นมีประสิทธิภาพมากกว่าในแง่ของผลผลิต และถูกจัดเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีต้นทุนต่ำ (Kamilah et al., 2013)

การจัดการของเสียประเภทน้ำมันเสียที่มีความสำคัญเป็นอย่างมาก เนื่องจากการประกอบอาหารด้วยน้ำมันนั้นเป็นที่นิยมไปทั่วโลก จึงเกิดการศึกษาศึกษาเพื่อการนำน้ำมันทอดที่ใช้แล้วมาใช้ประโยชน์ เช่น การผลิตไบโอดีเซล และการผลิต PHA เป็นต้น เนื่องจากการผลิต PHA โดยใช้กระบวนการทางชีวภาพนั้นจะต้องคำนึงถึงปัจจัยที่สามารถส่งผลต่อปริมาณ และคุณสมบัติของพอลิเมอร์ ซึ่งสามารถเปลี่ยนแปลงตามสภาวะแวดล้อม ดังนั้นงานวิจัยนี้ต้องการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต PHA จากน้ำมันพืชสำหรับทอดที่ใช้แล้วด้วย *Bacillus megaterium* โดยปัจจัยที่ศึกษาได้แก่ ปริมาณกรดไขมันอิสระ ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต และอุณหภูมิในการบ่ม

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาอิทธิพลที่ส่งผลต่อการผลิต PHA จากน้ำมันพืชสำหรับทอดที่ใช้แล้วด้วย *Bacillus megaterium* โดยปัจจัยที่ศึกษาได้แก่ ปริมาณกรดไขมันอิสระ ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต และอุณหภูมิในการบ่ม

1.2.2 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต PHA จากน้ำมันพืชสำหรับทอดที่ใช้แล้วด้วย *Bacillus megaterium* โดยปัจจัยที่ศึกษาได้แก่ ปริมาณกรดไขมันอิสระ ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต และอุณหภูมิในการบ่ม

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

ในงานวิจัยนี้มีเป้าหมายในการศึกษาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต PHA จากน้ำมันพืชสำหรับทอดที่ใช้แล้วด้วย *Bacillus megaterium* TISTR1875 โดยปัจจัยที่ศึกษาได้แก่ ตัวแปรต้นคือปริมาณกรดไขมันอิสระ(0.5, 1.0 และ 1.5 %) ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต (1, 2 และ 3 กรัม/ลิตร) และอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม (30, 35 และ 40 °C) ตัวแปรตามคือปริมาณ PHA และน้ำหนักเซลล์แห้งทั้งหมด ตัวแปรควบคุมคือ ระยะเวลาการหมัก 72 ชั่วโมง ความเร็วในการเขย่า 150 รอบ/นาที น้ำมันปาล์ม (Yok, Thailand) ด้วย *Bacillus megaterium* TISTR1875 ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร

1.4 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

1.4.1 ศึกษาและค้นคว้างานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1.4.2 เขียนโครงร่างวิทยานิพนธ์และวางแผนการทดลอง

1.4.3 เตรียมวัสดุอุปกรณ์ สารเคมี และเชื้อตัวอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4.3.1 การเตรียมน้ำมันทอดแล้ว (used frying oil, UFO) จากน้ำมันพืชบริสุทธิ์

1.4.3.2 การเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อ

1.4.4 การทำการทดลองหมักเพื่อผลิต PHA จากน้ำมันพืชสำหรับทอดที่ใช้แล้วด้วย *Bacillus megaterium* โดยปัจจัยที่ศึกษา ได้แก่ ปริมาณกรดไขมันอิสระ ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต และอุณหภูมิในการบ่มที่แตกต่างกัน

1.4.5 การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทดลอง

1.4.5.1 การหาน้ำหนักเซลล์แห้งทั้งหมด

1.4.5.2 การหาปริมาณ PHA และการคำนวณเพื่อหาการสะสมของ PHA

1.4.6 วิเคราะห์และสรุปผลการทดลอง

1.4.7 เขียนรายงานการวิจัยและจัดทำรูปเล่มวิทยานิพนธ์

1.5 ประโยชน์และผลที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 ทราบถึงอิทธิพลของปริมาณกรดไขมันอิสระ ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต และอุณหภูมิในการบ่ม ต่อการผลิต PHA จากน้ำมันพืชสำหรับทอดที่ใช้แล้วด้วย *Bacillus megaterium*

1.5.2 ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต PHA จากน้ำมันพืชสำหรับทอดที่ใช้แล้วด้วย *Bacillus megaterium* โดยปัจจัยที่ศึกษา ได้แก่ ปริมาณกรดไขมันอิสระ ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต และอุณหภูมิในการบ่ม

1.6 รายละเอียดของวิทยานิพนธ์

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้จะถูกแบ่งเนื้อหาออกเป็น 5 บท โดยแต่ละบทจะมีเนื้อหารายละเอียดดังต่อไปนี้

บทที่ 1 จะประกอบไปด้วยหลักการและเหตุผลของปัญหาที่ทำการวิจัย วัตถุประสงค์ของการวิจัย ขอบเขตของการวิจัย ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย ประโยชน์และผลที่คาดว่าจะได้รับ และรายละเอียดของวิทยานิพนธ์

บทที่ 2 กล่าวถึงหลักการและทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ ประวัติความเป็นมาของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต การสังเคราะห์ PHA โดยใช้ของเสียที่อุดมด้วยไขมัน (lipid-rich wastes) การสังเคราะห์ PHA ในแบคทีเรีย น้ำมันสำหรับทอดที่ใช้แล้ว (Used frying oil, UFO) และการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นระหว่างขั้นตอนการทอดของน้ำมันพืช

บทที่ 3 คือเนื้อหาเกี่ยวกับการเตรียมวัสดุอุปกรณ์ การเตรียมสารเคมี การเตรียม UFO จากน้ำมันพืชบริสุทธิ์ การเตรียมเชื้อแบคทีเรียและอาหารเลี้ยงเชื้อ การหมักเพื่อผลิต PHA การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลองด้วยวิธีการทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4 คือเนื้อหาเกี่ยวกับผลการทดลอง การวิเคราะห์อิทธิพลของปริมาณกรดไขมันอิสระ ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต และอุณหภูมิในการบ่ม การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต PHA จาก น้ำมันพืชสำหรับทอดที่ใช้แล้วด้วย *Bacillus megaterium* ด้วยวิธีการทางสถิติ และการวิเคราะห์ ลักษณะสมบัติของ PHA ด้วยวิธี FTIR

บทที่ 5 คือการสรุปผล และข้อเสนอแนะ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

2.1 พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

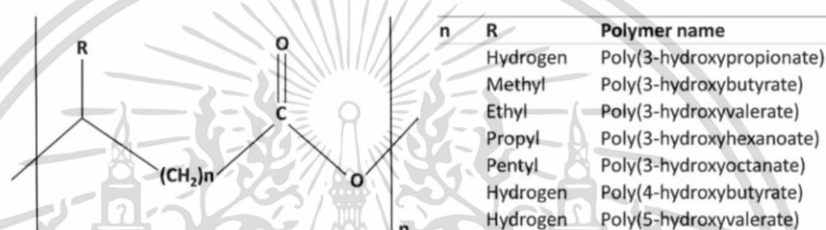
2.1.1 ประวัติความเป็นมาของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

Anita et al. (2020) พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (polyhydroxyalkanoate) หรือ PHA เป็นพลาสติกชีวภาพทางเลือกที่ดีที่สุดสำหรับการนำมาใช้ทดแทนพลาสติกจากปิโตรเคมี เนื่องจากคุณสมบัติในการย่อยสลายทางชีวภาพและสามารถนำมาใช้งานทดแทนพลาสติกทั่วไปได้อย่างหลากหลาย (Kourmentza et al., 2017) ครั้งแรกที่มีการทำการศึกษา PHA ใน *Bacillus megaterium* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่ทำหน้าที่เป็นตัวรวมการหักเหของแสงโดย Maurice Lemoigne (Lemoigne, 1926) โมเลกุลของ PHA นั้นมีการสะสมอยู่ในจุลินทรีย์โปรคาริโอตที่มีชีวิตเพื่อปกป้องเซลล์จุลินทรีย์จากปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อความเครียด เช่น ความเค็มสูง การแช่แข็ง ความร้อน ความเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน การฉายรังสี UV และการอดอาหาร (starvation) และการเชื่อมโยงกับการสังเคราะห์ทางชีวภาพ (biosynthesis) ของ PHA เมื่อไม่นานมานี้ (Obruca et al., 2018) ในปัจจุบัน PHA ชนิดเฮเทอโรพอลิเอสเทอร์ (heteropolyesters) และโฮโมพอลิเอสเทอร์ (homopolyesters) ที่ถูกพบในผู้ผลิต PHA นั้นมีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน เช่น โครงสร้างโมเลกุล องค์ประกอบ คุณสมบัติทางกายภาพ และคุณสมบัติทางความร้อน การสร้างบล็อกของพอลิเมอร์ทางชีวภาพ (biopolymers) จะกำหนดคุณสมบัติและโครงสร้างของ PHA โครงสร้างของมอนอเมอร์ (monomeric structure) ของ PHA นั้นจะถูกกำหนดด้วยประเภทของสารตั้งต้น (substrate) ที่ใช้ในการผลิต ดังนั้นคาร์บอนจากแหล่งคาร์บอนจึงถูกรวมเข้ากับสารตั้งต้นอื่นๆ ที่ทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นในการผลิต PHA (Koller et al., 2017; Kourmentza et al., 2017) น้ำหนักโมเลกุลของ PHA นั้นขึ้นอยู่กับรูปแบบของแหล่งคาร์บอน ชนิดของแบคทีเรียที่ผลิต และการทำงานของเอนไซม์ PHA ซินเทส (synthase) ซึ่งมีหน้าที่ในการทำให้เกิดพอลิเมอร์โซ่ของหน่วยมอนอเมอร์ไปจนถึงสายโซ่ไฮโปพอลิเมอร์ การทำงานของเอนไซม์ PHA ซินเทสนั้นถูกกำหนดโดยแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิต และพารามิเตอร์ของกระบวนการ เช่น อุณหภูมิ ค่า pH เป็นต้น ดังนั้น เพื่อจัดการความซับซ้อนของโมเลกุลของ PHA ที่มีอยู่ในระบบชีวภาพ องค์ประกอบ และระดับมอนอเมอร์ของการเกิดพอลิเมอร์โซ่ชั้น รูปที่ 2.1 แสดงถึงการจัดเรียงทางเคมีทั่วไปของ PHA พอลิเอสเทอร์ และตารางที่ 2.1 แสดงถึง PHA โคพอลิเมอร์ที่มีอยู่

โดยทั่วไป การสังเคราะห์ PHA ด้วยจุลินทรีย์นั้นได้รับความนิยมโดยการจำกัดส่วนประกอบของสารอาหารบางอย่าง เช่น ออกซิเจน ฟอสเฟต หรือสารประกอบไนโตรเจนที่เผาผลาญได้ซึ่งจำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ โดยมีแหล่งคาร์บอนที่มากเกินไปในตัวอย่างสำหรับการเจริญ ส่วนเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใหญ่ค่าใช้จ่ายของวัตถุดิบที่จำเป็นสำหรับการสังเคราะห์ PHA นั้นมีราคาค่อนข้างสูง ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการพัฒนาสารทดแทนเพื่อการผลิตเชิงพาณิชย์ของ PHA (Koller et al., 2017)

เพื่อมุ่งเน้นไปที่การใช้แหล่งคาร์บอนที่มีต้นทุนต่ำ จึงเกิดแนวคิดที่มีการวิเคราะห์ความเป็นไปได้ของการใช้ของเสียที่เป็นน้ำมัน เช่น ไขมันหมู ไขมันสำหรับทอดที่ใช้แล้ว ของเสียจากโรงฆ่าสัตว์ และของเสียจากอุตสาหกรรมการผลิตน้ำมัน (Koller and Brauneegg, 2018) ในปัจจุบันจึงมีงานวิจัยที่ดำเนินการโดยใช้ของเสียที่เป็นน้ำมันมาเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิต PHA จำนวนมาก ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อสังคมและสิ่งแวดล้อม โดยเน้นแนวคิดเรื่องความยั่งยืน และเศรษฐศาสตร์ชีวภาพของกระบวนการ



รูปที่ 2.1 โครงสร้างของ PHA โดยทั่วไป

ที่มา: Anita et al. (2020)

ตารางที่ 2.1 ตัวอย่าง PHA โคพอลิเมอร์

แหล่งคาร์บอน	สายพันธุ์แบคทีเรีย	โคพอลิเมอร์
Pentanoic acid and propanoic acid	<i>C. necator</i> and <i>A. latus</i>	P(3HB-3HV)
4-hydroxybutyric acid and sugar	<i>C. necator</i> and <i>Pseudomonas</i> sp.	P(3HB-3HD)
1,4-butanediol, γ -butyrolactone, 1,6-hexanediol, mixture of acetic acid and γ -butyrolactone	<i>D. acidovorans</i> , <i>A. latus</i> and <i>C. acidovorans</i>	P(3HB-4HB)
3-hydroxypropionic acid and Pentanoic acid	<i>C. necator</i>	P(3HB-3HP)
Plant oils and 1,5-pentanediol	<i>A. cavie</i> and <i>A. latus</i>	P(3HB-3HHX)

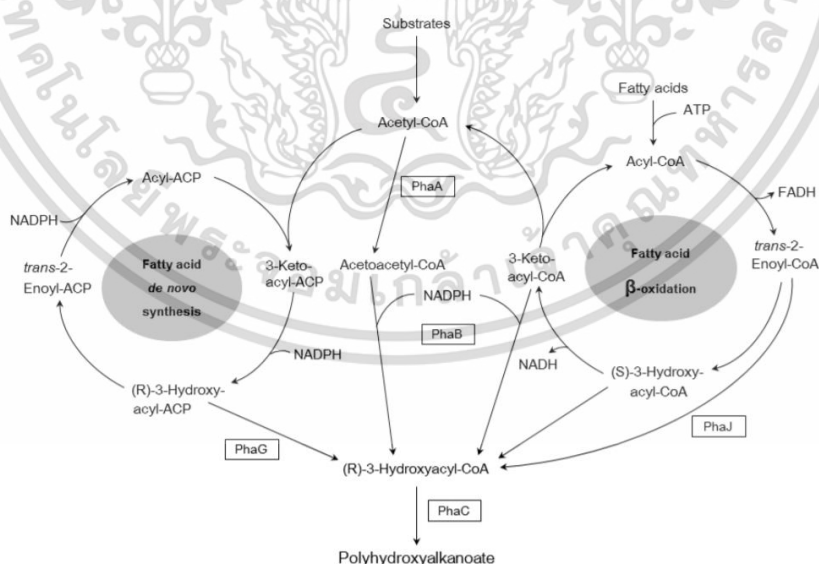
ที่มา: Anita et al. (2020)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2 การสังเคราะห์ PHA โดยใช้ของเสียที่อุดมด้วยไขมัน (lipid-rich wastes)

การสังเคราะห์ PHA ของแบคทีเรียที่เรื้อรังเกิดขึ้นโดยปฏิกิริยาของเอนไซม์ภายในจาก acetyl-co-enzymeA (acetyl-CoAs) ด้วย PHA ซินเทส ซึ่งเป็นเอนไซม์จำเพาะของสารตั้งต้นที่มีอยู่ในเซลล์ไซโตซอล (cytosol) และ PHA ที่ผลิตขึ้นจะถูกสะสมในเซลล์ไซโตซอลเช่นเดียวกัน ในปี 1995 ได้มีการแบ่งการสังเคราะห์ PHA ออกเป็นสามขั้นตอน (Steinbüchel and Valentin, 1995) ในขั้นตอนแรก ให้หาสารตั้งต้นที่เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการแทรกซึมเซลล์แบคทีเรียผ่านการแพร่หรือผ่านทางช่องทางพิเศษที่มีอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ไซโตพลาสซึม ในระยะที่สอง แหล่งคาร์บอนจะแตกตัวภายในกลายเป็น hydroxyacyl co-enzymeA (CoA) ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นสำหรับเอนไซม์ PHA ซินเทส ในระยะที่สาม CoA จะถูกปบดบอยโดยเอนไซม์ PHA ซินเทสที่สร้างพันธะออกโซเอสเทอร์ (oxoester bonds) (Sudesh et al., 2000) มีการอธิบายเส้นทางที่แตกต่างกันที่เส้นทางในการสังเคราะห์ PHA ภายในเซลล์แบคทีเรีย (Khanna and Srivastava, 2005)

PHB ผลิตขึ้นผ่านทาง การสังเคราะห์จากจุลินทรีย์ด้วยกรดไขมันเดอโนโว (de novo fatty acid) และเบต้าออกซิเดชัน (β -oxidation) จากไขมันที่อุดมไปด้วยกรดไขมันที่มีกรดไขมันและน้ำตาลจำนวนมาก (Tan et al., 2014) น้ำมันและโมเลกุลไขมันจะถูกแปลงไปเป็นโมเลกุลอื่น การสังเคราะห์เอนไซม์ acetyl-CoAs ซินเทเทส ที่เปลี่ยนโมเลกุลของน้ำมันให้เป็น acetyl-CoAs ที่นำไปเข้าสู่กระบวนการต่อไปนั้นคือวัฏจักรเครบส์ (Kreb's cycle) โคเอนไซม์ NADH และ FADH₂ จะถูกใช้ในกระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอน (electron transport chain) รูปที่ 2.2 แสดงถึงวิธีการสังเคราะห์ PHA ในเซลล์แบคทีเรีย



รูปที่ 2.2 วิธีการสังเคราะห์ PHA ในเซลล์แบคทีเรีย

ที่มา: eiamsa-ard (2017)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลิตภัณฑ์สุดท้ายของ β -oxidation คือ s 3-ketoacyl-CoA ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของเอนไซม์ 3-ketoacyl-CoA-thiolase ซึ่งใช้สำหรับสร้าง acetyl-CoAs เอนไซม์ไรโอเลสจะเริ่มทำปฏิกิริยาเคมีเมื่อโมเลกุลที่แตกต่างกันของ CoA ทำลายการเชื่อมโยงโดยนิวคลีโอฟิลิก (nucleophilic) ซึ่งทำลายไขมัน acetyl-CoA และ acyl CoA กระบวนการจะทำซ้ำจนกว่ากรดไขมันทั้งหมดจะเปลี่ยนเป็น acetyl-CoA ในขณะที่อยู่ในเส้นทางเดอโนโว ตัวกลางที่เกิดขึ้นจะถูกเปลี่ยนทิศทางไปในการสังเคราะห์ PHA ที่ถูกเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ PHAG ซึ่งเร่งการถ่ายโอน (R)-3-hydroxyacyl ของโปรตีนพาหะไทโอเอสเทอร์ (thioester) ถึง CoA (Hoffmann et al., 2002) ถ้าสารตั้งต้นที่ถูกใช้แล้วเป็นไขมันหรือน้ำมัน และถูกนำไปใช้ใน β -oxidation การออกซิเดชันของ enoyl-CoA ถึง (R)-3-hydroxyacyl-CoA เกิดขึ้นเนื่องจากตัวเร่งปฏิกิริยา PhaJ ส่วน (R)-3-hydroxyacyl-CoA ทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอนไซม์ PhaC และการสังเคราะห์ PHA (Tan et al., 2014)

2.1.3 การสังเคราะห์ PHA ในแบคทีเรีย

eiamsa-ard (2017) พลาสติกชีวภาพในกลุ่ม PHA สามารถสังเคราะห์ได้ในกลุ่มแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ซึ่งจะมีการสะสม PHA ภายในเซลล์ของแบคทีเรีย โดยปกติการสะสม PHA ในเซลล์แบคทีเรียเป็นวิธีการสังเคราะห์ทางธรรมชาติ เมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นให้เจริญในสภาพที่ไม่เหมาะสม เช่น สารอาหารขาดแคลน หรือถูกจำกัดปริมาณไนโตรเจน (Shang et al., 2003) ถึงแม้จะมีแบคทีเรียหลากหลายสายพันธุ์ที่สามารถสะสม PHA ไว้ในเซลล์ได้ แต่พบว่ามีเพียงไม่กี่สายพันธุ์ที่ถูกนำมาพัฒนาและนำมาใช้ประโยชน์ได้จริงในการผลิต PHA ในระดับอุตสาหกรรม ตัวอย่างเช่น *Cupriavidus necator* (Verliden et al., 2011), *Alcaligenes latus* (Wang et al., 2013), *Azotobacter vinelandii* (Garcia et al., 2014) และแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ในสกุล *Pseudomonas* (Ashby et al., 2002) โดยแสดงตัวอย่างสายพันธุ์แบคทีเรียที่ถูกนำมาใช้ผลิต PHA ในระดับอุตสาหกรรมในตารางที่ 2.2

การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียให้มีการสะสม PHA ให้ได้ในปริมาณมากนั้นสามารถทำได้ด้วยการควบคุมสภาพในการเพาะเลี้ยงไปจนถึงการปรับปรุงสายพันธุ์แบคทีเรียด้วยวิธีทางเทคโนโลยีชีวภาพ โดยการควบคุมสภาพในการเพาะเลี้ยงนั้นจะสามารถทำได้ด้วยการกำหนดชนิดและความเข้มข้นของสารตั้งต้น ที่นำมาใช้ในการผลิต PHA แต่อย่างไรก็ตามการผลิต PHA ในระดับอุตสาหกรรมส่วนใหญ่ยังคงใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นซับสเตรต เนื่องจากให้ปริมาณ PHA ที่สูง แม้ว่าจะใช้ต้นทุนที่สูง จึงเกิดงานวิจัยมากมายที่ต้องการลดต้นทุนในการผลิต PHA โดยการใช่วัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมมาผลิต PHA เช่น การนำของเสียที่เกิดจากกระบวนการกลั่นน้ำมันเรบซีสมาเป็นแหล่งคาร์บอน โดยใช้โพพานอลมาเป็นสารตั้งต้นให้ *Cupriavidus necator* เพื่อผลิต PHA (Obruca et al., 2010) การนำต้นหญ้าที่ใช้เป็นอาหารสัตว์มาใช้ในการผลิต PHA จากเชื้อกลุ่ม *Pseudomonas* โดยปรับสภาพต้นหญ้าด้วย NaOH ร่วมกับการใช้ความร้อน (Davis et al., 2013) เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 น้ำมันสำหรับทอดที่ใช้แล้ว (Used frying oil, UFO)

ของเสียจากน้ำมันที่อุดมไปด้วยไขมันในปริมาณมากนั้นเกิดจากกระบวนการทางอุตสาหกรรมที่พัฒนาแล้วต่างๆ รวมทั้งไขมันสัตว์ อาหารที่ทำจากนม และการแปรรูปอาหาร ซึ่ง UFO เป็นของเสียที่หมายถึงน้ำมันที่ผลิตจากพืชที่ใช้สำหรับการผลิตอาหาร และไม่สามารถนำมาบริโภคต่อได้ UFO นั้นมีแหล่งที่มาจากแหล่งต่างๆ เช่น การใช้งานในครัวเรือน การใช้งานในระดับอุตสาหกรรม และพาณิชย์กรรม เป็นของเสียที่ต้องการความเหมาะสมในการกำจัดหรือจัดการ เพราะการกำจัดของเสียโดยตรงด้วยการทิ้งลงแหล่งน้ำหรือลงดินโดยตรงนั้น จะก่อมลพิษให้แก่สิ่งแวดล้อมในธรรมชาติ ของเสียที่เป็นน้ำมันนี้จะทำให้ดินเสียและทำลายพืช (Vastano et al., 2019) มีการคาดการณ์โดย Energy Information Administration (EIA) ว่าจะมี UFO เกิดขึ้นประมาณ 11 พันล้านลิตรในทุกปี ของสหรัฐอเมริกา (Sangkharak et al., 2020) ซึ่ง UFO ส่วนใหญ่ถูกสร้างขึ้นจากอุตสาหกรรมแปรรูปอาหารที่ใช้หม้อทอดสำหรับการทอดแบบน้ำมันท่วม (deep frying) ร้านอาหารที่ให้บริการอาหารจานด่วน และโรงงานที่เกี่ยวข้องกับการแปรรูปอาหาร ในสหภาพยุโรป ปริมาณ UFO ที่ผลิตต่อปีนั้น คิดเป็นประมาณ 1 พันล้านลิตร และ UFO จำนวนมากถูกทิ้งอย่างผิดกฎหมายลงสู่สิ่งแวดล้อมที่นำไปสู่การปนเปื้อนของดินและแหล่งน้ำ (Talebian-Kiakalaieh et al., 2013)

การใช้น้ำมันพืชในการปรุงอาหารในประเทศเป็นตัวกำหนดการผลิต UFO การเปลี่ยนแปลงของน้ำมันที่เกิดขึ้นระหว่างการทอดนั้น จะส่งผลกระทบต่อคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของ UFO และถูกกำหนดให้ถูกใช้งานเป็นแหล่งคาร์บอนทางเลือก UFO ส่วนใหญ่จะประกอบด้วยองค์ประกอบของไขมัน ได้แก่ มอนอกลิเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ และไตรกลีเซอไรด์ โดยน้ำมันที่สามารถบริโภคได้ทั้งหมดจะประกอบไปด้วยไขมันไตรกลีเซอไรด์เอสเทอร์ (triglyceride esters) ที่มีความยาวของสายระดับของความอิมิตัว และ ไครัลลิตี (chirality) ที่แตกต่างกัน

UFO นั้นประกอบไปด้วยกรดไขมันและองค์ประกอบของกรดไขมันที่สำคัญ ได้แก่ กรดไมริสติก กรดปาล์มิติก กรดปาล์มิโตเลอิก กรดสเตียริก กรดโอเลอิก กรดไลโนเลอิก กรดลิโนเลนิก กรดอะราซิดิก กรดโอโคเซนิค กรดเบเฮนิค กรดเอรูซิก และกรดเตตราโซนิค โดยที่สัดส่วนของกรดไขมันของ UFO นั้นจะแตกต่างกันไปตามประเภทของพืชที่ถูกนำมาสกัดเป็นน้ำมัน อย่างไรก็ตามในขณะที่ทอดก็เกิดองค์ประกอบที่เป็นพิษขึ้นในน้ำมัน องค์ประกอบที่อันตรายที่สุดใน UFO คือผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นระหว่างกรดไขมันโดยเฉพาะกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน ดังนั้นสหภาพยุโรปในปี 2002 จึงห้ามใช้ UFO ในอาหารสัตว์ (Kulkarni and Dalai, 2006) ด้วยเหตุนี้ UFO นั้นควรมีการจัดการที่ปลอดภัย หรือนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์ทางด้านอื่น เช่น การผลิตพลาสติกชีวภาพ

ตารางที่ 2.2 ตัวอย่างสายพันธุ์แบคทีเรียที่ถูกนำมาใช้ผลิต PHA ในระดับอุตสาหกรรม

สายพันธุ์แบคทีเรีย	สารตั้งต้น
<i>Cupriavidus necator</i>	Waste Frying Oil Oil Palm Frond (OPF) Juice Sodium Glutamate Waste Oils/Fats
<i>Alcaligenes latus</i>	Palm Oil/Soy milk Waste Water Bean Curd Waste Sugarbeet Juice
<i>Pseudomonas putida</i>	Glucose, Glycerol, Citrate, Fatty Acid Condensed Corn Soluble, Glycerol, Soapstock
<i>Pseudomonas sp.</i>	Waste Vegetable Oil
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Agro-industrial Oily Wastes
<i>Azotobacter vinelandii</i>	Glucose Sucrose

ที่มา: eiamsa-ard (2017)

ตารางที่ 2.3 องค์ประกอบของกรดไขมันในน้ำมันพืชและไขมันจากสัตว์

กรดไขมัน (% โดยน้ำหนัก)	ของเสียที่เป็นน้ำมัน					
	น้ำมันถั่วเหลือง	น้ำมันมะกอก	น้ำมันงา	น้ำมันเรปซีด	ไขมันจากไก่	ไขมันหมู
ลอริก	-	-	-	0.2	0.1	0.1
มิริสติก	0.1	-	-	0.1	1-1.3	1-2.5
ปาล์มิติก	6-10.6	9-10	9.58-10.90	3-3.9	17-24	23.2-30
ปาล์มิโทเลอิก	-	-	0.10-0.18	0.2	5.4-6.0	2-4
สเตียริก	2-5	2-3	6.41-7.10	0.5-1.7	6-12	10-18
โอเลอิก	20-30	73-84	35.88-42.83	50-70	38-42.7	35-55
ไลโนเลอิก	50-60	10-12	38.70-44.32	18.8-25	20.7-24	7-20
ไลโนเลนิก	7.19	-	0.23-0.56	8.2-9.5	0.7-1.9	0-65

ที่มา: Anita et al. (2020)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.1 การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นระหว่างขั้นตอนการทอดของน้ำมันพืช

Anita et al. (2020) การใช้ไขมันทอดในการหมักเพื่อผลิต PHB นั้นทำให้ได้ PHB มากขึ้น นั่นคือ ผลิต 1.2 กรัม/ลิตร PHB ใน 48 ชั่วโมง ซึ่งเท่ากับเท่ากับ 0.02 กรัม/ลิตรต่อชั่วโมง และ PHB ที่ได้คือ 0.06 กรัม PHB/กรัมของไขมัน เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำมันพืชบริสุทธิ์ที่ได้ผลผลิต 0.06 กรัม/ลิตร PHB ใน 48 ชั่วโมง ซึ่งเท่ากับเท่ากับ 0.01 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง และ PHB ที่ได้คือ 0.03 กรัม PHB ต่อกรัมของไขมัน (Verlinden et al., 2011) เนื่องจากองค์ประกอบที่เปลี่ยนไปในระหว่างขั้นตอนการทอดด้วยการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน และเทอร์โมไลติก (thermolytic) โดบปฏิกิริยาทางเคมีเหล่านี้ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทั้งทางกายภาพและทางเคมีขององค์ประกอบในน้ำมันพืชที่ผ่านการทอด และเป็นสาเหตุสำคัญที่ส่งผลต่อปริมาณการผลิต PHB ภายในเซลล์ของแบคทีเรีย นอกจากนี้ยังพบว่ามีการดัดไขมัน 98 – 99 % ในน้ำมันพืชบริสุทธิ์ และระหว่างขั้นตอนการทอด โดยที่สารประกอบเชิงซ้อนหลายตัวถูกผลิตขึ้นในน้ำมัน รวมถึงเศษอาหารที่เหลืออยู่ในน้ำมันนั้นส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของน้ำมันเหล่านี้ด้วย (Tabee et al., 2009) การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและเคมีในกระบวนการทอดหรือการให้ความร้อนแก่ไขมันนั้นจะเกิดจากอากาศและน้ำ

การทอดเป็นวิธีการประเภทหนึ่งที่ใช้ในการเตรียมอาหารที่เกี่ยวข้องกับการปรุงอาหารดิบในน้ำมันและไขมันที่มีอุณหภูมิสูง เป็นวิธีการที่นิยมใช้ในการประกอบอาหาร เนื่องจากรสสัมผัสที่ยอดเยียม รวมถึงรสชาติของอาหารทอด โมเลกุลของไขมันและน้ำมันเป็นส่วนประกอบสำคัญในกระบวนการทอดที่ต้องใช้ความร้อนของน้ำมันหรือไขมันที่สูงมากประมาณ 160 – 200 °C ในพื้นที่ที่มีอากาศและแสงสว่างค่อนข้างมากเป็นเวลานาน น้ำมันและไขมันนั้นถูกใช้หลายครั้งอย่างต่อเนื่องด้วยเหตุผลทางเศรษฐกิจ โดยปกติการใช้ไขมันและไขมันในเชิงพาณิชย์ เช่น ร้านอาหาร นั้นจะมีการใช้ซ้ำหลายครั้ง การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและเคมีนั้นจะเกิดขึ้นแตกต่างกันตามวัตถุประสงค์ที่ใช้ในการทอด และประเภทของน้ำมันซึ่งมีองค์ประกอบแตกต่างกัน ตารางที่ 2.4 นั้นแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างในคุณสมบัติของ UFO และน้ำมันพืชบริสุทธิ์ การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพนั้นมีเพียงเล็กน้อยในน้ำมันและไขมันที่ผ่านกระบวนการทอดมาแล้ว พบว่าค่าความร้อนจำเพาะและความหนืดเพิ่มขึ้น สีและแรงตึงผิวเปลี่ยนแปลงไป และที่สำคัญที่สุดคือแนวโน้มการเกิดฟองจากไขมันเพิ่มขึ้น

คุณสมบัติทางเคมีกายภาพ (physiochemical) ของน้ำมัน เช่น ปริมาณความชื้น ความหนืด ความหนาแน่น และค่าสaponification ได้ถูกศึกษาถึงผลกระทบต่อสารสังเคราะห์ PHA ที่ใช้ UFO เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งพบว่าค่าเหล่านี้ไม่มีผลกระทบต่อสารสังเคราะห์ PHA ในเซลล์แบคทีเรีย (Ullah et al., 2014) นอกจากการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ สารประกอบบางอย่างยังถูกสร้างขึ้นระหว่างปฏิกิริยาออกซิเดชัน เทอร์โมไลติก และไฮโดรไลติก (hydrolytic) (Kulkarni and Dalai, 2006) เนื่องจากปฏิกิริยาออกซิเดชันคือการสร้างสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่าย (volatile organic compounds, VOC) ซึ่งเกี่ยวข้องกับกับความเข้มข้นของออกซิเจน การสร้าง VOC นั้นขึ้นอยู่กับจำนวนรอบของการทอด เนื่องจากค่าจุดเกิดควัน (smoke point) จะลดลงเมื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รอบการทอดเพิ่มขึ้น และลดความเข้มข้นของกรดไขมันไม่อิ่มตัวของการเกิดพอลิเมอร์ไรเซชัน (polymerization) ทำให้คุณภาพของน้ำมันลดลง รอบการทอดจำนวนมากจึงส่งผลเสียต่อลักษณะของน้ำมัน

องค์ประกอบของ UFO ที่ถูกค้นพบด้วย HS – SPME GC/MS คือ acetaldehyde, Methylamine, N,N-dimethyl-, octane, 2-Butanone, Butanal, 3-methyl-, Butyl-cyclopentane, pentanal, 8 hexanal, 2- Heptanone, 2-Furancarboxaldehyde, Heptanal, Pyridine, Limonene, Pyrazine, 2-Hexenal, (E)-, Furan, 2-pentyl-, 1-Pentanol, γ -terpinene, 8 Hexyl acetate, Pyrazine, methyl, 2-Octanone, Octanal, 2-Propanone, 1- hydroxy-, 2- Heptenal, 5-Hepten-2-one, 6-methyl-, 4-Heptadienal, Formamide, N,N, dimethyl, Nonanal, N,N, Dimethylacetamide, Ethyl octanoate, 2-Octenal, (E)-, Heptanol, Furfural, Pyridine, Furan-methanol, 4-ethenyl-, Propanoic acid, 2-Nonenal, 5-methyl-Butanoic acid, 2-Decenal, (E)-, α -Farnesene, 2-Undecenal, 2,4-Decadienal, and Hexanoic acid (Mannu et al., 2019) การสลายตัวขององค์ประกอบจำนวนมากที่มีอยู่ในน้ำมันนั้นเกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของไตรเอซิลกลีเซอรอล (triacylglycerols) (Choe and Min, 2007) เทอร์พีน (terpene) มาจากอาหารทอด ในขณะที่สารประกอบอัลเคน เช่น butyl-cyclopentane n-octane และ n-heptane นั้นถูกสร้างขึ้นระหว่างกระบวนการไพโรไลซิส (pyrolysis) ของน้ำมันพืช (Mannu et al., 2019)

ตารางที่ 2.4 คุณสมบัติของ UFO และน้ำมันพืชบริสุทธิ์

คุณสมบัติทางเคมีกายภาพ	UFO	น้ำมันพืชบริสุทธิ์
ความหนืดจลนศาสตร์ (cSt)	39.99	44.95
ความหนืดสัมบูรณ์ (cp)	35.92	40.51
ค่าสพอนิฟิเคชัน (mgKOH/g)	194.00	177.97
ค่ากรด (mgKOH/g)	0.30	4.03
ค่าความร้อน (J/g)	-	39658
ค่าเปอร์ออกไซด์ (meq k/g)	น้อยกว่า 10	10
ความหนาแน่น (g/cm)	0.898	0.9013
ค่าความชื้น (wt%)	0.10	0.14
จุดวาบไฟ (°C)	161-164	222-224

ที่มา: Anita et al. (2020)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เทอร์พีนบางตัว เช่น ลิโมนีน และ แคมฟิน มาจากการให้ความร้อนบำบัดน้ำมันถั่วลิสง ในขณะที่สารอนุพันธ์ไอโซพรีนจะถูกปล่อยออกจากเครื่องเทศที่ใช้ปรุงแต่งรายการอาหารขณะทอด (Wu and Chen, 1992) สารประกอบไพราซีน อนุพันธ์ของฟูราน (furan, 5-HMF หรือ 2-pentyl-pyridine-ethenyl) และสารประกอบวงแหวนไนโตรเจน ถูกปลดปล่อยมาระหว่างเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ดระหว่างอนุภาคอาหารต่างๆ อนุพันธ์ทางเคมีอื่นๆ เช่น ไดนอลส์ (dinals, 2,4-decadienal หรือ 2,4-heptadienal หรือ 2,4-decadienal) ที่มีอยู่ใน UFO นั้นเกิดจากการออกซิเดชันของกรดไลโนเลอิก (Mannu et al., 2019) ผลกระทบขององค์ประกอบเหล่านี้กับการผลิต PHA ยังไม่ถูกระบุ แต่มีสารประกอบบางอย่าง เช่น กรดไดเฟอรูลิก กรดเฟรูลิก กรดทรูซิลิก กรดวานิลลิก กรดเบนโซอิก (p-OH-539) โปโนโตตาทีซูอิก 540 อัลดีไฮด์ (protocatechuic 540 aldehyde) วานิลลิน กรดอซิติก (OH-phenyl) และ p-OH-benzaldehyde ที่มักจะถูกพบในกากตะกอนจากเยื่อกระดาษ ซึ่งเป็นพิษแม้ในระดับความเข้มข้นที่ต่ำ และส่งผลต่อเซลล์แบคทีเรียที่มีหน้าที่ในการสังเคราะห์ PHA (Kaur et al., 2019)

สารประกอบฟีนอลเหล่านี้ จะยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย และทำให้ระยะพักของแบคทีเรีย (lag Phase) เพิ่มขึ้น เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของระยะพักของผลิตภัณฑ์ และผลผลิตเชิงปริมาณลดลง สารประกอบฟีนอลิกเหล่านี้จะเข้าไปในเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย แล้วสร้างความเสียหายต่อความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ การรวมตัวของเยื่อหุ้มเซลล์จะเข้าไปขัดขวางสัญญาณวิทยาของแบคทีเรีย และการทำงานของเมตาบอลิซึม (metabolic functions) โดยการเปลี่ยนอัตราส่วนของไขมันต่อโปรตีน จึงเป็นการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย และการดูดซึมโมเลกุลของน้ำตาลที่ทำลาย DNA ที่ยับยั้งกระบวนการถอดรหัส (transcription) ต่อไป (Kim, 2018) ในสถานะที่มีความเข้มข้นต่ำของสารประกอบฟีนอล ซึ่งมีความเข้มข้นประมาณ 0.1 – 1 กรัม/ลิตร การยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Saccharomyces cerevisiae* ถูกพบเมื่อใช้สำหรับการผลิตเอทานอล (Lyra Colombi et al., 2018) ในกรณีนี้ คล้ายกัน พบว่าการผลิต PHA จะต่ำเมื่อไฮโดรไลสเสต (hydrolysates) จากผักตบชวาถูกใช้หลังการบำบัดด้วยกรดและเอนไซม์ ความเข้มข้นของ PHA ลดลงโดยใช้ไฮโดรไลสเสตที่บำบัดด้วยกรด เมื่อเทียบกับไฮโดรไลสเสตที่บำบัดด้วยเอนไซม์ ความเข้มข้นที่ต่ำของ PHA นั้นเกิดจากความเข้มข้นสูงของสารประกอบฟีนอลิกประมาณ 2.34 กรัม/ลิตร ที่เกิดขึ้นระหว่างการบำบัดด้วยกรด (Radhika and Murugesan, 2012) ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิก 0.5 – 0.65 มิลลิกรัม ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ β -glucosidase และ 25 มิลลิโมลาร์ ของกรดแทนนิก ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลโลไบโอไฮเดรส (cellobiohydase) และ β -glucosidase จาก *C. cubensis* และ *P. pinophilum* (Azar et al., 2018)

ฟูรานและอนุพันธ์ของฟูราน เช่น เฟอฟูรัล (furfural) ที่มีอยู่ใน UFO มีความสามารถในการยับยั้งและเป็นพิษต่อกระบวนการหมักที่ถูกนำไปใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ต่างๆ (Allen et al., 2010) ซึ่งเฟอฟูรัลนั้นจะยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระหว่างกระบวนการไกลโคไลซิส (glycolysis) และวัฏจักรเครบส์ เพื่อฟูล์นั้นจะมีหน้าที่ในการเพิ่มความเข้มข้นของ reactive oxidative species (ROS) ที่นำไปสู่การสร้าง ความเสียหายต่อเยื่อหุ้มเซลล์ออร์แกเนลล์ที่มีอยู่ในเซลล์ของแบคทีเรีย เพื่อฟูล์จะส่งผลกระทบต่อ การสังเคราะห์โปรตีนและ mRNA ที่มีโปรตีนจับ จึงสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย รวมถึงยับยั้งกระบวนการเมตาบอริซึมได้ (Kaur et al., 2019)

สารประกอบอื่นที่มีความสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่มีอยู่ใน UFO คือกรดอ่อน เช่น กรดบิวทาโนอิก ที่มีผลกระทบต่อ การสร้างผลิตภัณฑ์ (Kim, 2018) กรดอ่อนเหล่านี้มีส่วนที่ไม่สามารถแยกออกจากกันได้ ซึ่งทำให้พวกมันมีพิษมากขึ้นในธรรมชาติ เนื่องจากสามารถเข้าไปในเซลล์แบคทีเรียได้อย่างง่ายดายด้วยการแพร่ โดยส่วนที่ไม่สามารถแยกออกนี้จะแยกออกเป็นแอนไอออนและโปรตอนจากความเป็นกลางทางกรดเบสของโคโคซอลที่จะช่วยลดค่าความเป็นกรดเบสโดยรวมของแบคทีเรีย ดังนั้นโปรตอนส่วนเกินจะถูกปล่อยออกมาด้วยเอนไซม์ ATPase ของเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย เพื่อรักษาค่าความเป็นกรดเบสภายในเซลล์ไว้ สำหรับการรักษาค่าความเป็นกรดเบสนี้ ATPs ที่ถูกเพิ่มเติมมาจะต้องถูกไฮโดรไลซ์ การไฮโดรไลซิสของ ATP จะใช้พลังงานอิสระที่มีอยู่สำหรับการเจริญเติบโตของเซลล์ ซึ่งจะจำกัดการทำงานของเอนไซม์ ATPase และยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (Bellissimi et al., 2009; Obruca et al., 2015)

2.2.1.1 การสลายตัวด้วยความร้อนด้วยปฏิกิริยาเทอร์โมไลติก

การสลายตัวด้วยความร้อนหรือปฏิกิริยาเทอร์โมไลติกคือปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นที่อุณหภูมิสูงมากโดยที่ไม่มีออกซิเจน ไตรกลีเซอไรด์นั้นอุดมไปด้วยกรดไขมันอิ่มตัว และเมื่อความร้อนสูงประมาณ 180 °C เข้าไปทำปฏิกิริยากับกรดไขมันเหล่านั้น องค์ประกอบของสารเคมีบางอย่างจะถูกผลิตขึ้น เช่น คีโตน กรดไขมัน อัลเคน คาร์บอนไดออกไซด์ เอสเทอร์ และคาร์บอนมอนอกไซด์ กรดไขมันที่มีพันธะคู่หรือกรดไขมันไม่อิ่มตัวมักจะสร้างสารประกอบที่มีไดเมอร์ (dimer) ในธรรมชาติ เช่น กรดไขมันอิ่มตัวหรือพันธะเดี่ยว สารประกอบอินทรีย์พอลิไซคลิก และดีไฮโดรไดเมอร์ (dehydrodimers) ปฏิกิริยา Diels-Alder เกิดขึ้นระหว่างกรดไขมันไม่อิ่มตัวนั้นจะสร้างสารประกอบไดเมอร์และไตรเมอร์ ในขณะที่ในกลีเซอไรด์ ปฏิกิริยานี้จะเกิดขึ้นระหว่างหมู่เอซิล (acyl) ของโมเลกุลเดียวกัน

2.2.1.2 ปฏิกิริยาออกซิเดชัน

กรดไขมันที่มีพันธะคู่อาจทำปฏิกิริยากับโมเลกุลออกซิเจนผ่านปฏิกิริยาเคมีที่เกี่ยวข้องกับอนุมูลอิสระ ในระหว่างกลไกการเกิดอนุมูลอิสระ ไฮโดรเปอร์ออกไซด์เป็นผลิตภัณฑ์หลักที่เกิดขึ้นและนำไปสู่การสร้างสารประกอบไฮโดรเปอร์ออกไซด์ที่มีหมู่ไดอีน (diene) สารประกอบเหล่านี้มีความแตกต่างกันในมวลโมเลกุล ความสำคัญทางชีวภาพ และระดับของการแต่งรส เมื่อพันธะ O-O ที่มีอยู่ในไฮโดรเปอร์ออกไซด์แตกตัว จะทำให้เกิดอนุมูลอัลคอกซี (alkoxy) โดยอนุมูลอัลคอกซีเหล่านี้ อาจได้รับหรือสูญเสียอะตอมของไฮโดรเจน เพื่อสร้างสารประกอบไฮดรอกซีหรือคีโตน การสลายตัวของอัลคอกซีจะสร้างสารประกอบหลายชนิด คือสารประกอบกึ่งอัลดีไฮด์ อัลดีไฮด์ กรด และ

ไฮโดรคาร์บอน นอกจากนี้อัลคอกซีและสารประกอบเปอร์ออกซี สามารถเปลี่ยนเป็นโอลิโกเมอร์ (oligomer) และไดเมอร์ที่มีโมเลกุลของออกซิเจนอยู่มากได้ สารประกอบที่ระเหยง่ายอื่นๆ จะเกิดจากการสลายตัวด้วยความร้อน และออกซิเดชันของไขมันได้แก่ ไฮโดรคาร์บอนที่ไม่อิ่มตัว ไฮโดรคาร์บอนอิ่มตัว แลคโตน แอลกอฮอล์ กรด พูราน เอสเทอร์ และสารประกอบอะโรมาติก อย่างไรก็ตาม ไม่มีงานวิจัยเกี่ยวกับผลกระทบของสารประกอบเหล่านี้ที่เกิดขึ้นระหว่างปฏิกิริยาออกซิเดชัน และการสลายตัวทางความร้อนต่อการผลิต PHA

2.2.1.3 ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส

ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเป็นปฏิกิริยาเคมีที่เกี่ยวข้องกับโมเลกุลของน้ำเพื่อสร้างสารประกอบและน้ำที่ทำหน้าที่เป็นนิวคลีโอไฟล์ (nucleophile) ในระหว่างกระบวนการทอดอาหาร ในน้ำมันหรือไขมัน จะเกิดการกระตุ้นกระบวนการไฮโดรไลซิสของไตรกลีเซอไรด์ ทำให้เกิดไดกลีเซอไรด์ มอนอกลิเซอไรด์ กลีเซอรอล และกรดไขมันอิสระ ผลกระทบของการไฮโดรไลซิสต่อน้ำมันสามารถกำหนดได้ด้วยการหาปริมาณไดกลีเซอไรด์ และมอนอกลิเซอไรด์ ส่วนการเปลี่ยนแปลงของปริมาณกรดไขมันอิสระในน้ำมันก่อนหรือหลังการทอดนั้นไม่สามารถกำหนดคุณภาพของน้ำมันได้ เนื่องจากกรดไขมันอิสระจะเกิดการสลายตัวเมื่อได้รับความร้อนสูงที่ใช้ในการทอดอาหาร

จากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างการทอดที่กล่าวมา ปฏิกิริยาออกซิเดชันนั้นเป็นปฏิกิริยาที่สำคัญที่สุด (Boskou and Elmadfa, 1999) เนื่องจากมีการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบจำนวนมากในระหว่างการทอดในน้ำมันพืช และพบว่า UFO นั้นมีปริมาณกรดไขมันอิ่มตัวมากกว่าน้ำมันพืชบริสุทธิ์และน้ำมันพืชที่ได้รับความร้อน กรดไขมันอิ่มตัวจำนวนมากนี้เป็นสาเหตุหลักของการสังเคราะห์ PHB ภายในจุลินทรีย์ได้มากกว่ากรดไขมันที่ไม่อิ่มตัว (Koller and Braunegg, 2015) ที่พบในปริมาณที่ใกล้เคียงกันทั้งในน้ำมันบริสุทธิ์ น้ำมันที่ได้รับความร้อน และ UFO เนื่องจากกรดไขมันอิ่มตัวนั้นมีโอกาสมากกว่าในการแปลงเป็น acetylCoA ด้วย β -oxidation จึงส่งผลให้การผลิต PHB นั้นสูงด้วยการใช้ UFO ในการเป็นแหล่งคาร์บอน (Koller and Braunegg, 2015)

ดังนั้นการกำหนดลักษณะของ UFO ก่อนนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิต PHA นั้นมีส่วนช่วยในการเพิ่มการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ส่วนสารประกอบอื่นๆ ที่ถูกพบใน UFO เช่น ชิ้นส่วนของอาหารที่ตกค้าง สารประกอบเปอร์ออกไซด์ และกรดไขมันสายเล็กที่เกิดขึ้นขณะทำกระบวนการทอด (Anjum et al., 2016) อาจมีส่วนทำให้การผลิต PHB เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม การเปรียบเทียบสเปกตรัม FTIR ของน้ำมันปรุงอาหารที่ยังไม่ได้ใช้ และ UFO แสดงถึงโครงสร้างโมเลกุลที่เหมือนกันของไตรกลีเซอไรด์ และกลุ่มที่ทำหน้าที่คล้ายกันนั้น ไม่มีนัยสำคัญหรือไม่มีการเปลี่ยนแปลงในสเปกตรัมของน้ำมันปรุงอาหารที่ยังไม่ได้ใช้ และ UFO ซึ่งมีความหมายว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเกิดขึ้นหลังผ่านกระบวนการทอด การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของสารโดยอาศัยคุณสมบัติทางความร้อน (thermogravimetric analysis, TGA) ระหว่าง UFO กับน้ำมันบริสุทธิ์พบว่าน้ำมันนั้นมีความคงตัวทางความร้อนประมาณ 240 °C ชนิดน้ำมันที่แตกต่างกันนั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จะมีความแตกต่างกันเล็กน้อยในการดูตกสีแสง และตำแหน่งของแถบสเปกตรัม ความแตกต่างเล็กน้อยที่ไม่มีนัยสำคัญนี้ เกิดจากความหลากหลายขององค์ประกอบของสารประกอบไตรกลีเซอไรด์ (Ullah et al., 2014)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วัสดุและวิธีการทดลอง

3.1 วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้

3.1.1 น้ำมันปาล์ม (Yok, Thailand)

3.1.2 สารเคมีสำหรับการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

1 อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptone soya broth (Himedia, India)

2 agar (Chemicals Ltd., UK)

3 NaOH (Kemaus, Australia)

4 NaH_2PO_4 (Univar, Australia)

5 Na_2HPO_4 (Kemaus, Australia)

6 K_2SO_4 (Chemicals Ltd., UK)

7 CaCl_2 (Chemicals Ltd., UK)

8 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Central drug house ltd., India)

9 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Kemaus, Australia)

10 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Kemaus, Australia)

11 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Chemicals Ltd., UK)

12 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Kemaus, Australia)

13 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Daejong, Korea)

3.1.3 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ FFA

1 NaOH

2 ฟีนอร์ฟทาลีน

3.1.4 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ PHA

1 sodium hypochlorite

2 อะซิโตน

3 คลอโรฟอร์ม

4 เอทานอล

3.1.3 อุปกรณ์สำหรับการเตรียมและเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

1 ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร (GLASSCO, UK)

2 เครื่องควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (rotary incubator) (G25-KLG, New Brunswick)

3 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) (HV-85, Hirayama)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 4 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-visible spectrophotometer)
 - 5 เครื่องชั่งน้ำหนัก ทศนิยม 4 ตำแหน่ง (GR-200, AND)
 - 6 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) (UNIVERSAL.32, Hettich)
 - 7 ตู้ปลอดเชื้อ
 - 8 แ่งแก้วสามเหลี่ยม
 - 9 เข็มเย็บเชื้อ
 - 10 จานเพาะเชื้อ
 - 11 เทปพาราฟิล์ม
 - 12 คิวเวทท์
 - 13 ไมโครปิเปต
 - 14 หลอดเซนติฟิวจ์
- 3.1.4 อุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์ PHA จากการหมัก
- 1 Fourier-transform Infrared Spectrometer (Spectrum two, Perkin Elmer, USA)
 - 2 ตู้อบลมร้อน
 - 3 เครื่อง magnetic stirrer (Hotplate stirrer LMS HTS-1003)
 - 4 กลีเซอรอล
 - 5 กรดอะซิติก
- 3.1.5 เชื้อแบคทีเรีย
- 1 *Bacillus megaterium* TISTR1875
- 3.1.6 โปรแกรมคำนวณทางสถิติ
- 1 MINITAB v.21

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การออกแบบการทดลอง

การออกแบบการทดลองโดยใช้วิธี Box-Behnken designs ด้วยโปรแกรม MINITAB v.21 โดยกำหนดตัวแปรคือ ปริมาณกรดไขมันอิสระ ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต และอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มที่แตกต่างกันตามตารางที่ 3.1 โดยควบคุมเวลาในการบ่ม และความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนในการ จึงออกมาเป็นแผนการทดลองในตารางที่ 3.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1 รหัสและระดับของตัวแปรอิสระตามแผนการทดลอง Box-Behnken

ปัจจัย	ระดับของปัจจัย			
	รหัส	-1	0	1
ปริมาณ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (กรัม/ลิตร)	X_1	1	2	3
ปริมาณกรดไขมันอิสระ (%)	X_2	0.5	1.0	1.5
อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม ($^{\circ}\text{C}$)	X_3	30	35	40

ตารางที่ 3.2 การทดลองที่ถูกออกแบบตามแผนการทดลอง Box-Behnken

การทดลองที่	X_1	X_2	X_3
1	0	0	0
2	0	0	0
3	0	0	0
4	-1	0	1
5	0	1	-1
6	1	1	0
7	0	1	1
8	-1	0	-1
9	1	0	-1
10	0	-1	-1
11	-1	-1	0
12	-1	1	0
13	0	-1	1
14	1	0	1
15	1	-1	0

3.2.2 การเตรียมน้ำมันใช้แล้ว (used frying oil, UFO) จากน้ำมันพืชบริสุทธิ์

นำน้ำมันปาล์มมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 180 $^{\circ}\text{C}$ ตรวจสอบปริมาณกรดไขมันอิสระด้วยการนำตัวอย่างน้ำมันมาทำการไตเตรตตามวิธีการมาตรฐานด้วย NaOH (AOAC 940.28, 1990) เพื่อหาค่าปริมาณกรดไขมันอิสระภายในตัวอย่างน้ำมันตามที่กำหนดไว้ โดยนำตัวอย่างน้ำมันที่ผ่านความร้อนปริมาณ 7.05 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นเติมตัวทำละลายเอทานอลปริมาณเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

50 มิลลิลิตรลงในขวดรูปชมพู่ แล้วเติมสารละลายฟีนอล์ฟทาลีนปริมาณ 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปไตเตรทด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.25 นอร์มอล จนได้สารละลายสีชมพู คำนวณปริมาณกรดไขมันอิสระได้จากสมการที่ 3.1 โดยในการคำนวณนี้ใช้ค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดโอเลอิกเป็นตัวแทนของกรดไขมันอื่นๆ

$$FFA(\%) = \frac{V \times N \times 28.2}{w} \quad (3.1)$$

โดยที่ V คือปริมาณสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไตเตรท (มิลลิลิตร)

N คือความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (0.25 นอร์มอล)

W คือน้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

3.2.3 เชื้อแบคทีเรียและอาหารเลี้ยงเชื้อ

แบคทีเรียที่ใช้งานวิจัยนี้คือ *Bacillus megaterium* TISTR1875 ซึ่งเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C บนอาหารแข็ง Tryptone soya agar (TSA) ประกอบไปด้วย (กรัม/ลิตร) Tryptone, 17; Soya peptone, 3; NaCl, 5; Dextrose, 2.5; K₂HPO₄, 2.5 และ agar, 15 และอาหารเหลว Tryptone soya broth (TSB) ที่มีส่วนประกอบของอาหารเหมือน TSA แต่ไม่ใส่ agar ใช้เป็นอาหารสำหรับการ preculture

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการผลิต PHA ในงานวิจัยนี้คือ Mineral salt medium (MSM) ดัดแปลงจาก Sivagnanam et al. (2021) ซึ่งประกอบไปด้วย (กรัม/ลิตร) KH₂PO₄, 3.6; K₂HPO₄, 2.84; NaOH, 0.4; Na₂SO₄, 3.486; CaCl₂, 0.062; MgSO₄·7H₂O, 0.39; ZnSO₄·7H₂O, 0.024; CuSO₄·5H₂O, 0.005; FeSO₄·7H₂O, 0.15 และ MnSO₄·H₂O, 0.024 โดยใช้น้ำมันตัวอย่างที่มีปริมาณกรดไขมันอิสระที่แตกต่างกัน (0.5, 1.0 และ 1.5 %) ความเข้มข้น 20 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และ (NH₄)₂SO₄ ที่ถูกใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน ในปริมาณ 1, 2 และ 3 กรัม/ลิตร

3.2.4 การหมักเพื่อผลิต PHA

เชื้อ *Bacillus megaterium* ถูกบ่มในอาหาร TSB ปริมาณ 120 มิลลิลิตรถูกใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 35 °C และเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที บ่มจนค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเท่ากับ 0.6 จากนั้นนำอาหารปริมาณ 10 มิลลิลิตร ไปหมวนเหวี่ยงที่ 8000 × g เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเชื้อมาหมักในอาหาร MSM ที่มีน้ำมันตัวอย่างที่มีปริมาณกรดไขมันอิสระที่แตกต่างกัน (0.5, 1.0 และ 1.5 %) ความเข้มข้น 20 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และ (NH₄)₂SO₄ ที่ถูกใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน ในปริมาณ 1, 2 และ 3 กรัม/ลิตร หมักในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตรโดยใช้ปริมาตร 200 มิลลิลิตรบ่มที่อุณหภูมิ 30, 35 และ 40 °C ความเร็วในการเขย่าที่ 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.5 การหาน้ำหนักเซลล์แห้งทั้งหมด (total cell dry weight)

การหาน้ำหนักของเซลล์แห้งทั้งหมดนั้นทำได้ด้วยการ นำตัวอย่างที่ถูกหมักเสร็จแล้วปริมาณ 20 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดสำหรับเครื่องปั่นเหวี่ยง จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงที่ 8000 x g เป็นเวลา 10 นาที หลังจากผ่านการปั่นเหวี่ยงมาแล้วจะเกิดการแยกชั้นเกิดขึ้น เก็บตัวอย่างตะกอน ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น และนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง จากนั้นนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 105 °C จนน้ำหนักคงที่ และชั่งน้ำหนักเพื่อหาน้ำหนักของเซลล์แห้งทั้งหมด (CDM)

3.2.6 การหาปริมาณ PHA และการสะสม PHA

การหาปริมาณ PHA ในเซลล์ของแบคทีเรียที่เรียนั้นถูกดัดแปลงเล็กน้อยจากวิธีการของ Mohanrasu et al. (2020) ทำโดยการนำเซลล์แห้งแช่ในสารละลาย sodium hypochlorite ความเข้มข้น 4 % เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8000 x g เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น เมทานอล และอะซิโตน จากนั้นละลายในเดียมคลอโรฟอร์ม และนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่องอบลมร้อนที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง การสะสม PHA ที่แสดงผลของปริมาณความสามารถในการสะสม PHA ภายในเซลล์ของแบคทีเรียที่เรียนั้นสามารถหาได้โดยการคำนวณด้วยสมการที่ 3.2

$$PHA \text{ accumulation}(\%) = \frac{a}{b} * 100 \quad (3.2)$$

โดยที่ a คือปริมาณ PHA (กรัม/ลิตร)

b คือปริมาณ CDM (กรัม/ลิตร)

3.2.7 วิเคราะห์ผลการทดลองด้วยวิธีการทางสถิติ

ทำการทดลองตามแผนการทดลองที่ออกแบบการทดลองโดยใช้วิธี Box-Behnken designs ด้วยโปรแกรม MINITAB v.21 ตามตารางที่ 3.2 จากนั้นนำผลที่ได้มาวิเคราะห์ผลการทดลองด้วยวิธี พื้นผิวตอบสนอง (Response surface methodology, RSM) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % เพื่อนำมาใช้ในการสร้างแบบจำลองและวิเคราะห์ปัญหาที่เกิดจากความสัมพันธ์ของตัวแปรหลายตัวแปร เพื่อหาค่าที่ดีที่สุดของความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปร และการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรต้นกับผลตอบสนอง ความสัมพันธ์ดังกล่าวแสดงเป็นสมการพหุนามกำลังสอง ดังในสมการที่ 3.3 โดยสมการที่ได้จากการวิเคราะห์จะมีการตัดตัวแปรที่ไม่มีอิทธิพลต่อการผลิตออกก่อนการนำไปใช้ในการทำนาย

$$Y = \beta_0 + \sum_{j=1}^k \beta_j x_j + \sum \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j + \sum_{j=1}^k \beta_{jj} x_j^2 + \varepsilon \quad (3.3)$$

โดยที่ Y คือค่าที่สามารถทำนายได้

$\beta_0, \beta_j, \beta_{ij}$ และ β_{jj} คือสัมประสิทธิ์ค่าคงที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

x_i และ x_j คือรหัสแทนตัวแปรที่ศึกษา

ϵ คือค่าความคลาดเคลื่อน (error)

3.2.8 วิเคราะห์ลักษณะสมบัติของ PHA ด้วยวิธี Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR)

การวิเคราะห์ลักษณะสมบัติของ PHA นั้นเริ่มจากการทำฟิล์มพลาสติกจาก PHA ตัวอย่างที่ดัดแปลงวิธีทำจาก Anbukarasu et al. (2015) ด้วยการเตรียม PHA ที่ได้จากการสกัดปริมาณ 0.1 กรัม ละลายในกรดอะซิติก 10 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ จากนั้นให้ความร้อนด้วยเครื่อง magnetic stirrer ที่อุณหภูมิ 160 °C ผสมจนกว่า PHA ละลาย จากนั้นเติมกลีเซอรอล 30 % โดยน้ำหนัก ตัวอย่าง ทำการกวนผสมสารละลายเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำสารละลายเทใส่เพลท (Petri dishes) แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 80 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือจนกว่ากรดอะซิติกจะระเหยหมด และนำไปเก็บไว้ในถุงโพลีเอทิลีน เนื่องจากต้องการป้องกันให้ฟิล์มไม่สัมผัสกับอากาศและความชื้น จากนั้นฟิล์มตัวอย่างจะถูกนำไปวิเคราะห์ลักษณะสมบัติด้วย FTIR (Spectrum two, Perkin Elmer, USA) ด้วยสเปกตรัมอินฟราเรดในช่วง 400 – 4000 เซนติเมตร⁻¹ และรีโซลูชัน (resolution) ที่ 4 เซนติเมตร⁻¹ ด้วย 32 แสแกน เพื่อตรวจสอบโครงสร้างทางเคมีในรูปแบบของหมู่ฟังก์ชันของ PHA ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับ PHA ทางการค้าที่ถูกนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธีเดียวกัน

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง

4.1 อิทธิพลของปริมาณกรดไขมันอิสระ ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต และอุณหภูมิในการบ่มต่อการผลิต PHA จากน้ำมันพืชสำหรับทอดที่ใช้แล้วด้วย *Bacillus megaterium*

งานวิจัยนี้ทำการหมัก *Bacillus megaterium* โดยใช้ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตต่างๆ (1.0, 2.0 และ 3.0 กรัม/ลิตร) ดังแสดงในตารางที่ 4.1 พบว่าผลผลิต CDM ที่ดีที่สุดอยู่ที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต 2.0 กรัม/ลิตร ซึ่งได้ CDM 0.77 กรัม/ลิตร ที่ FFA 1.0 % และอุณหภูมิการหมัก 35 °C ในขณะที่ผลผลิต CDM ต่ำสุดอยู่ที่ 0.17 กรัม/ลิตร ที่ FFA 1.0 % อุณหภูมิการหมัก 30 °C และความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต 1.0 กรัม/ลิตร จากตารางที่ 4.2 แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตและอุณหภูมิการหมักมีผลอย่างมากต่อการผลิต CDM ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ส่วน FFA นั้นมีอิทธิพลต่อการผลิต CDM ที่ความเชื่อมั่น 90 % นอกจากนี้ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตยังมีผลอย่างมากต่อปริมาณ PHA โดยได้รับค่าที่สูงสุดที่ 0.45 กรัม/ลิตร รวมถึงในภายใต้สภาวะเดียวกันกับการผลิต CDM ที่ดีที่สุด (แอมโมเนียมซัลเฟต 2.0 กรัม/ลิตร, FFA 1.5 % และอุณหภูมิการหมัก 35 °C) แสดงให้เห็นว่าการสะสม PHA สูงสุดเกิดขึ้นภายใต้สภาวะเดียวกัน (59.28 %) อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตนั้นไม่มีอิทธิพลที่จะสร้างความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในเปอร์เซ็นต์การสะสม PHA

ความเข้มข้นของ FFA มีผลต่อการผลิต PHA อย่างมีนัยสำคัญทั้งในด้านของการผลิต CDM ปริมาณ PHA และการสะสม PHA ความเข้มข้นของ FFA ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเพิ่มปริมาณ PHA พบว่าอยู่ที่ 1.0 % คือสภาวะความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต 2.0 กรัม/ลิตร และอุณหภูมิการหมัก 35 °C (0.45 กรัม/ลิตร) อย่างไรก็ตามแม้ว่าความเข้มข้นของ FFA ที่มากอย่าง 1.5 % นั้นควรมีความเหมาะสมต่อการผลิต CDM มากกว่า เนื่องจากปริมาณคาร์บอนที่มีใน UFO ความแตกต่างนี้อาจเนื่องจากปริมาณคาร์บอนที่มากหรือน้อยเกินไป ซึ่งมีความสัมพันธ์อย่างมากกับการผลิต PHA ความเข้มข้นของคาร์บอนที่สูงอาจสัมพันธ์กับแรงดันออสโมติกที่เซลล์แบคทีเรียส่งผลให้การผลิต PHA ลดลง นอกจากนี้ยังอาจส่งผลต่อมวลโมเลกุลและคุณสมบัติบางประการของ PHA (Luo et al., 2002)

จากตารางที่ 4.2 แสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิการหมักมีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อการผลิต PHA ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการผลิต PHA อยู่ที่ประมาณ 35 °C เนื่องจากผลของการสะสม PHA ที่น้อยที่สุดคือ 42.55 % โดยใช้สภาวะอุณหภูมิการหมักที่ 40 °C ผลการวิจัยนี้สอดคล้องกับผลที่รายงานโดย Mohanrasu et al. (2020) ที่พบว่าอุณหภูมิที่ดีที่สุดสำหรับการผลิต PHA ใน *Bacillus megaterium* อยู่ที่ 37 °C และจะลดลงอย่างมากในช่วงอุณหภูมิ 40 °C อย่างไรก็ตาม สายพันธุ์ต่างๆ อาจมีความต้องการอุณหภูมิที่แตกต่างกัน เช่น *Bacillus thermoamylovorans* ผลิต PHB ได้

ดีที่อุณหภูมิ 45°C (Kanokphorn S. et al., 2021) ส่วนอุณหภูมิช่วง 30 °C แม้จะได้ผลของการสะสม PHA ใกล้เคียงกับช่วง 40 °C โดยได้รับการสะสม PHA โดยได้รับต่ำที่สุดคือ 43.58 % แต่ในช่วงอุณหภูมิ 30 °C นั้นมีการผลิต CDM และปริมาณ PHA ที่น้อยกว่า โดยได้รับ CDM ที่ 0.17 กรัม/ลิตร และปริมาณ PHA ที่ 0.07 กรัม/ลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับในช่วงอุณหภูมิ 40 °C ที่ได้รับ CDM ที่ 0.32 กรัม/ลิตร และปริมาณ PHA ที่ 0.14 กรัม/ลิตร โดยเปรียบเทียบที่การสะสม PHA ที่ใกล้เคียงกัน

ตารางที่ 4.1 CDM (กรัม/ลิตร), ปริมาณ PHA (กรัม/ลิตร) และการสะสม PHA (%) ที่สภาวะในระดับแตกต่างกัน

ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต (กรัม/ลิตร)	FFA (%)	อุณหภูมิในการบ่ม (°C)	CDM (กรัม/ลิตร)	ปริมาณ PHA (กรัม/ลิตร)	การสะสม PHA (%)
1.0	1.0	30	0.17	0.07	43.58
2.0	0.5	30	0.21	0.10	46.00
2.0	1.5	30	0.24	0.12	50.12
3.0	1.0	30	0.26	0.12	46.16
1.0	0.5	35	0.53	0.27	51.65
1.0	1.5	35	0.60	0.33	55.06
2.0	1.0	35	0.76	0.45	59.28
2.0	1.0	35	0.77	0.45	58.30
2.0	1.0	35	0.75	0.43	57.68
3.0	0.5	35	0.59	0.30	50.68
3.0	1.5	35	0.63	0.32	51.59
1.0	1.0	40	0.27	0.12	43.99
2.0	0.5	40	0.27	0.13	46.52
2.0	1.5	40	0.29	0.14	48.64
3.0	1.0	40	0.32	0.14	42.55

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 อิทธิพลของปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต, FFA และอุณหภูมิในการบ่มต่อการผลิต PHA

ปัจจัย	p value		
	CDM (กรัม/ลิตร)	PHA (กรัม/ลิตร)	PHA (%)
ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต	0.013*	0.077**	0.162
FFA	0.096**	0.016*	0.000*
อุณหภูมิในการบ่ม	0.005*	0.024*	0.079**

* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($p < 0.05$)

** แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 90 % ($p < 0.1$)

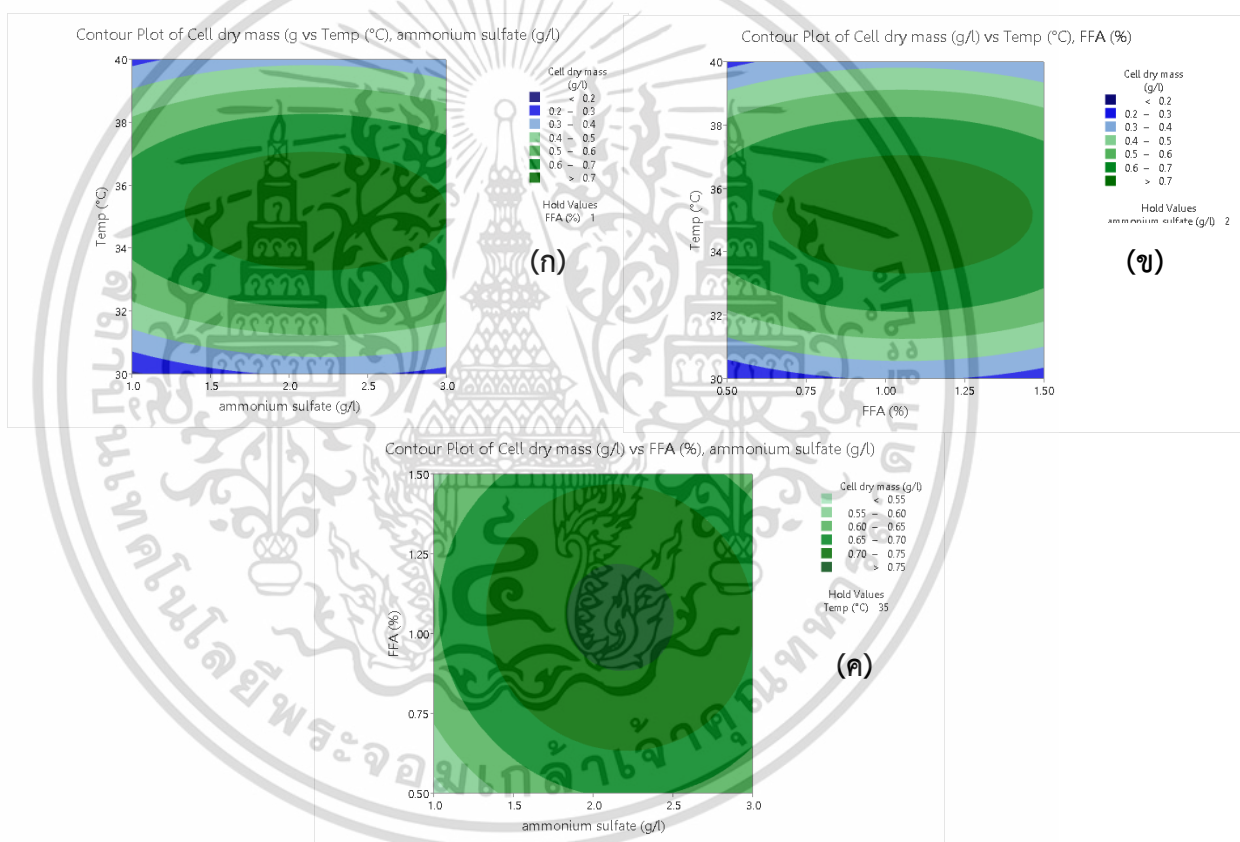
รูปที่ 4.1, 4.2 และ 4.3 นั้นคือคอนทัวร์พลอตที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการผลิตน้ำหนักรวม (CDM), ปริมาณ PHA และการสะสม PHA กับปัจจัยที่ใช้ในการศึกษาได้แก่ อุณหภูมิในการบ่ม FFA และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่แตกต่างกัน โดยคอนทัวร์พลอต หรือแผนภาพเส้นระดับที่ใช้ในการแสดงผลของข้อมูลในรูปแบบสามมิติบนกราฟสองมิติ โดยแสดงการกระจายของค่าตัวแปรตามแกน x และ y โดยใช้เส้นระดับ (contour lines) และบริเวณที่มีสีส้น (contour regions) เพื่อแสดงค่าตัวแปรที่สามซึ่งคือปริมาณสูงต่ำของผลผลิตที่ได้จากการทดลอง โดยค่าที่น้อยที่สุดจะปรากฏเป็นบริเวณที่มีสีน้ำเงินเข้ม ไส้ระดับปริมาณที่มากขึ้นด้วยสีน้ำเงินอ่อน สีฟ้า สีเขียวอ่อน จนถึงสีเขียวเข้มที่แสดงถึงค่าที่มากที่สุด

การผลิต CDM นั้นสามารถหาช่วงที่เหมาะสมในการผลิตได้จากรูปที่ 4.1 (ก), 4.1 (ข) และ 4.1 (ค) ที่แสดงให้เห็นช่วงบริเวณสีเขียวที่แสดงถึงความเหมาะสมในการผลิต CDM ที่คล้ายกันคือสภาวะความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต 2.0 กรัม/ลิตร, FFA 1.0 % และอุณหภูมิการหมักประมาณ 35 °C ซึ่งเป็นสภาวะที่ได้รับค่า CDM มากที่สุดในรูป 4.1 (ข) ที่มีค่าสภาวะคงที่ FFA 1 % นั้นมีบริเวณสีน้ำเงินเข้มในช่วงสภาวะอุณหภูมิที่ใช้บ่ม 30 °C และ 40 °C ส่วนคือปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต 1.0 กรัม/ลิตร และ 3.0 กรัมต่อลิตร ซึ่งสอดคล้องกับสภาวะที่ได้รับ CDM น้อยที่สุด จากในตารางที่ 4.1 และรูปที่ 4.1 (ค) นั้นที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิในการบ่ม และ FFA นั้นให้ผลอุณหภูมิที่ใช้บ่มเหมือนกับรูป 4.1 (ข) แต่สภาวะ FFA ที่ 1.0 % และ 1.5 % นั้นไม่เหมาะสมกับการผลิต CDM นอกจากนั้นรูปที่ 4.2 นั้นให้ผลลัพธ์ที่ค่อนข้างใกล้เคียงกับรูปที่ 4.1 แม้ว่า จะแสดงความสัมพันธ์ของปริมาณ PHA ก็ตาม เนื่องจากทั้งอิทธิพลของปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต, FFA และอุณหภูมิในการบ่มนั้นส่งผลต่อการผลิต CDM และปริมาณ PHA ที่ได้อย่างมีนัยสำคัญ

จากรูปที่ 4.3 ที่แสดงความสัมพันธ์ของการสะสม PHA ที่แสดงผลของปริมาณความสามารถในการสะสม PHA ภายในเซลล์ของแบคทีเรีย นั้นมีสภาวะที่เหมาะสมที่ FFA ในช่วง 1.0 ถึง 1.5 % โดยมีปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่ 2.0 กรัม/ลิตร และอุณหภูมิ 35 °C อ้างอิงจากรูป 4.2 (3) สภาวะดังกล่าวได้รับผลการสะสม PHA ที่ 59.28 % เมื่อใช้ FFA ที่ 1.0 % ซึ่งเป็นค่าสูงสุดที่ได้รับในการ

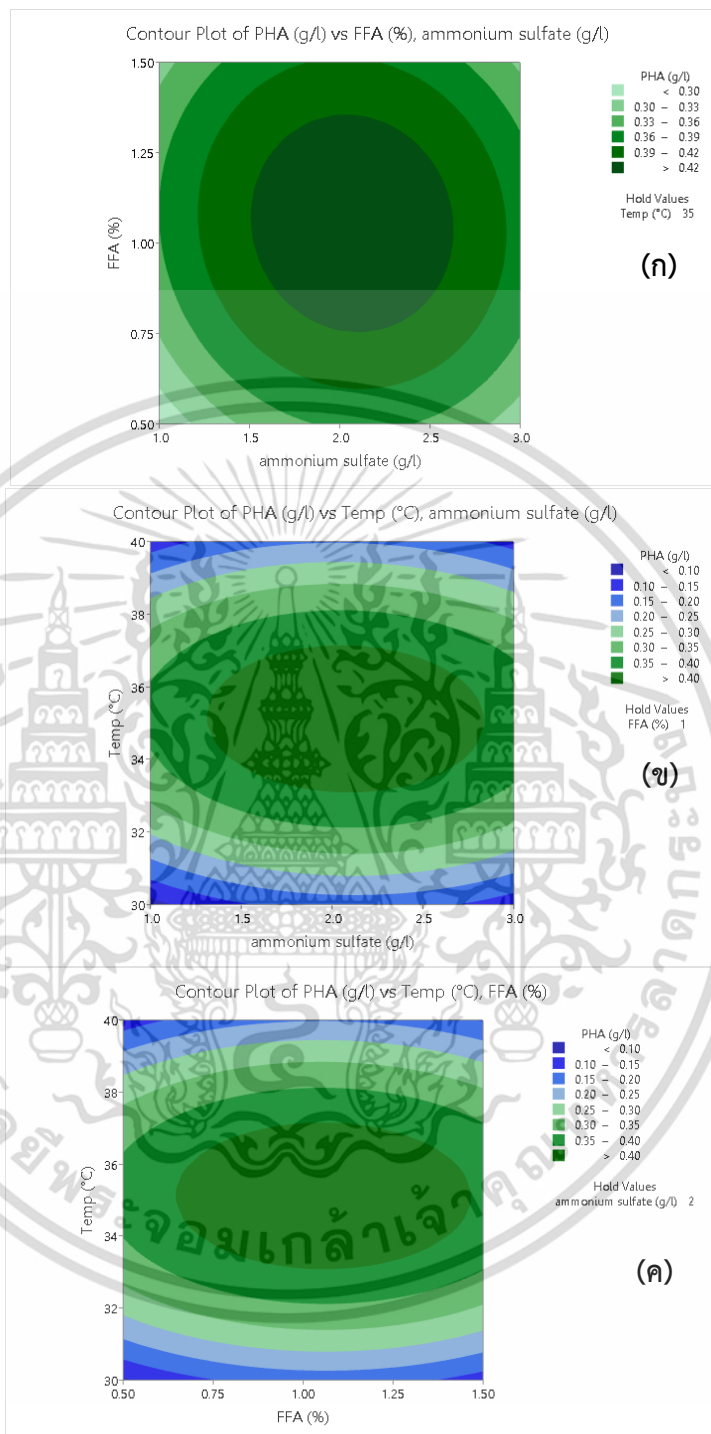
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทดลอง ส่วนสภาวะที่ได้รับค่าการสะสม PHA น้อยที่สุดซึ่งจะปรากฏเป็นบริเวณสีน้ำเงินเข้มในรูป 4.3 (ค) ซึ่งจะเห็นได้อย่างชัดเจนว่าที่อุณหภูมิที่ใช้บ่ม 30 °C และ 40 °C และ FFA ในช่วง 0.5% นั้นให้การสะสม PHA ที่ไม่ดี โดยสภาวะอุณหภูมิที่ใช้บ่ม 30 °C ได้รับการสะสม PHA ที่ 46.00 % และที่อุณหภูมิที่ใช้บ่ม 40 °C นั้นได้รับการสะสม PHA ที่ 46.52 % แม้ว่าทั้งสองสภาวะจะได้รับการสะสม PHA ที่น้อย แต่ค่าการสะสม PHA ที่น้อยที่สุดนั้นอยู่ที่ 42.55 % โดยพบที่สภาวะปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่ 3.0 กรัม/ลิตร FFA 1 % ที่ 40 °C อาจเนื่องมาจากอิทธิพลที่มีต่อกันของปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตกับอุณหภูมิบ่มที่มีความแตกต่างอย่างนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($p < 0.05$)



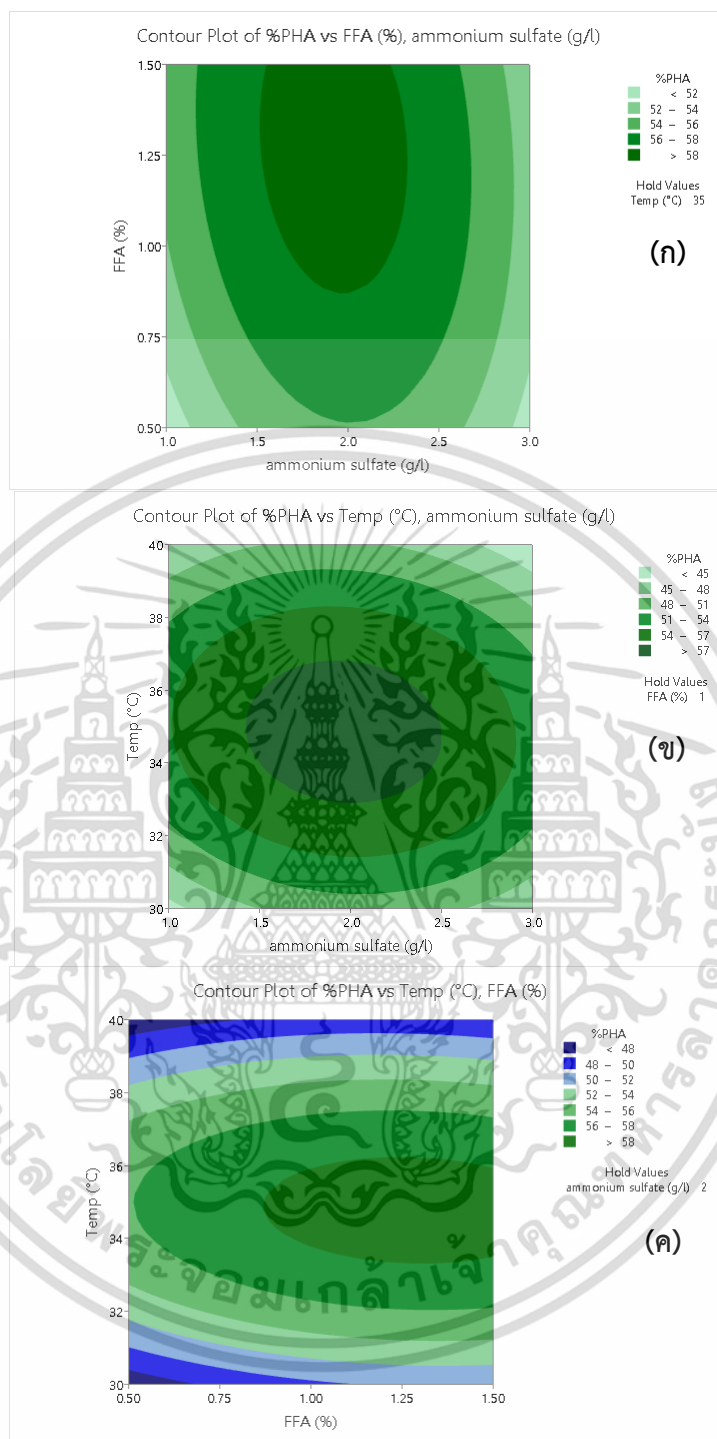
รูปที่ 4.1 แสดงคอนทัวร์พลอตที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการผลิตน้ำหนักรวมเซลล์ทั้งหมด (CDM) กับ FFA และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต (ก), อุณหภูมิในการบ่ม และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต (ข), และอุณหภูมิในการบ่ม และ FFA (ค)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 แสดงคอนทัวร์พลอตที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ PHA กับ FFA และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต (ก), อุณหภูมิในการบ่ม และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต (ข), และอุณหภูมิในการบ่ม และ FFA (ค)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 แสดงคอนทัวร์พลอตที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการสะสม PHA กับ FFA และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต (ก), อุณหภูมิในการบ่ม และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต (ข), และอุณหภูมิในการบ่ม และ FFA (ค)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิต PHA จากน้ำมันพืชสำหรับทอดที่ใช้แล้วด้วย *Bacillus megaterium* ด้วยวิธีการทางสถิติ

การออกแบบการทดลองโดยใช้วิธี Box-Behnken designs ด้วยโปรแกรม MINITAB v.21 โดยกำหนดตัวแปรคือ ปริมาณกรดไขมันอิสระ ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต และอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มที่แตกต่างกันตามตารางที่ 3.1 โดยควบคุมเวลาในการบ่ม และความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนในการทดลอง จะได้ผลการวิเคราะห์ดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 แสดงการทดสอบทางสถิติโดยใช้ ANOVA สำหรับแบบจำลองของ CDM (กรัม/ลิตร)

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F Value	P Value
CDM (กรัม/ลิตร)					
Model	9	2.04866	0.22763	77.46	0.000*
A-Ammonium sulfate (กรัม/ลิตร)	1	0.02022	0.02022	6.88	0.013*
B-FFA (%)	1	0.00863	0.00863	2.94	0.096**
C-Temperature (°C)	1	0.02611	0.02611	8.89	0.005*
AA	1	0.07968	0.07968	27.12	0.000*
BB	1	0.08152	0.08152	27.74	0.000*
CC	1	1.93292	1.93292	657.77	0.000*
AB	1	0.00070	0.00070	0.24	0.628
AC	1	0.00123	0.00123	0.42	0.521
BC	1	0.00005	0.00005	0.02	0.902
Lack-of-Fit	3	0.00326	0.00109	0.35	0.790
Pure Error	32	0.09959	0.00311		
R-squared		0.9522			
Adjusted R square		0.9399			
Predicted R square		0.9186			

* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($p < 0.05$)

** แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 90 % ($p < 0.1$)

ตารางที่ 4.3 แสดงการทดสอบทางสถิติโดยใช้ ANOVA สำหรับแบบจำลองของ CDM (กรัม/ลิตร) โดยปัจจัยที่มีผลอย่างมากต่อการผลิต CDM นั้นคือปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต (A) และอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม (C) ที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($p < 0.05$) ส่วน FFA (B) นั้นส่งผลอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 90 % ($p < 0.1$) นอกจากนี้ตัวแปรเชิงกำลังสองได้แก่ AA, BB และ CC นั้นก็ส่งผลอย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน ส่วนตัวแปรเชิงโต้ตอบ AB, AC และ BC นั้นไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ สมการที่ใช้ในการทำนาย CDM นั้นเหมาะสมในการนำมาใช้งาน เนื่องจากค่า R^2 ของแบบทดลองเท่ากับ 95.22 % ค่า adjusted R^2 นั้นเท่ากับ 93.99 % และ predicted R^2 เท่ากับ 91.86 % แสดงถึงความแม่นยำในการใช้งานแบบทดลอง อีกทั้ง lack of fit ที่มี $p > 0.05$ (0.790) แสดงให้เห็นว่าสมการแบบทดลองนั้นสามารถใช้งานได้ที่น่าเชื่อถือ

ตารางที่ 4.4 การทดสอบทางสถิติโดยใช้ ANOVA สำหรับแบบจำลองของปริมาณ PHA (กรัม/ลิตร)

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F Value	P Value
PHA production (กรัม/ลิตร)					
Model	9	0.796552	0.088506	111.59	0.000*
A-Ammonium sulfate (กรัม/ลิตร)	1	0.002639	0.002639	3.33	0.077**
B-FFA (%)	1	0.005104	0.005104	6.44	0.016*
C-Temperature (°C)	1	0.004401	0.004401	5.55	0.024*
AA	1	0.058223	0.058223	73.41	0.000*
BB	1	0.044236	0.044236	55.77	0.000*
CC	1	0.734469	0.734469	926.01	0.000*
AB	1	0.000752	0.000752	0.95	0.337
AC	1	0.000626	0.000626	0.79	0.380
BC	1	0.000039	0.000039	0.05	0.826
Lack-of-Fit	3	0.001586	0.000529	0.65	0.591
Pure Error	32	0.026174	0.000818		
R -squared			0.9663		
Adjusted R square			0.9577		
Predicted R square			0.9430		

* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($p < 0.05$)

** แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 90 % ($p < 0.1$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 การทดสอบทางสถิติโดยใช้ ANOVA สำหรับแบบจำลองของการสะสม PHA (%)

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F Value	P Value
PHA accumulation (%)					
Model	9	1248.75	138.750	69.79	0.000*
A-Ammonium sulfate (กรัม/ลิตร)	1	4.06	4.064	2.04	0.162
B-FFA (%)	1	41.79	41.792	21.02	0.000*
C-Temperature (°C)	1	6.52	6.516	3.28	0.079**
AA	1	272.68	272.681	137.15	0.000*
BB	1	16.25	16.252	8.17	0.007*
CC	1	976.03	976.026	490.91	0.000*
AB	1	4.64	4.636	2.33	0.136
AC	1	12.06	12.058	6.06	0.019*
BC	1	3.00	2.996	1.51	0.228
Lack-of-Fit	3	14.95	4.982	2.92	0.050
Pure Error	32	54.64	1.707		
R-squared		0.9472			
Adjusted R square		0.9336			
Predicted R square		0.9115			

* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($p < 0.05$)

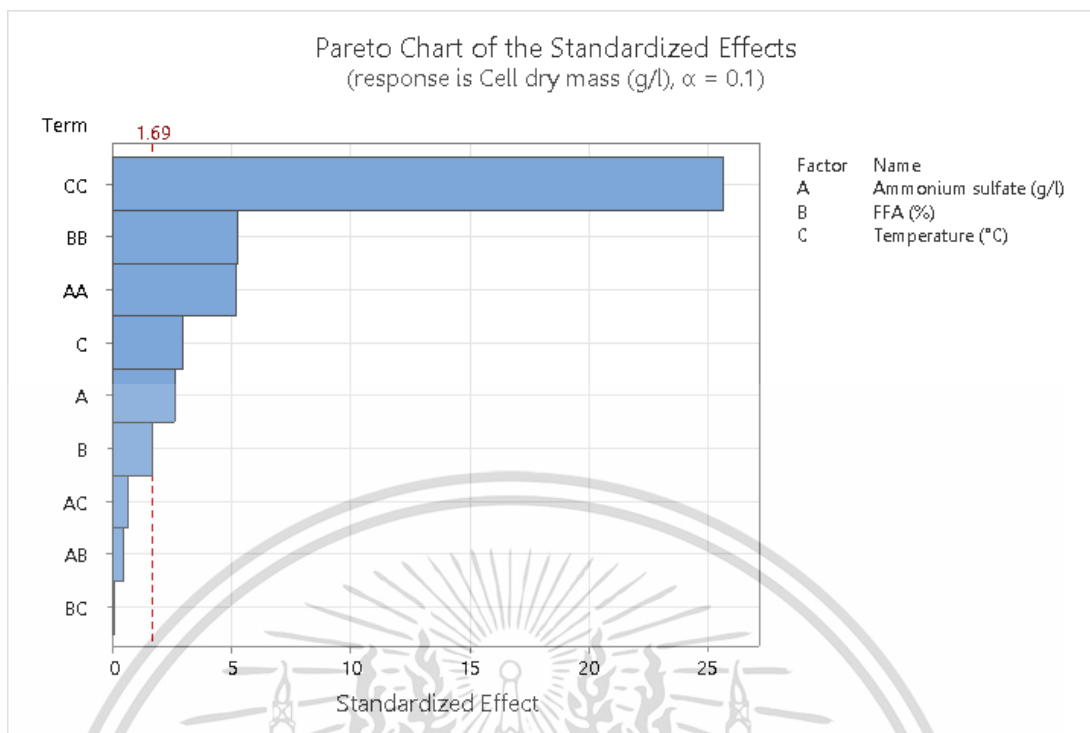
** แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 90 % ($p < 0.1$)

จากตารางที่ 4.4 ที่แสดงการทดสอบทางสถิติโดยใช้ ANOVA สำหรับแบบจำลองของปริมาณ PHA (กรัม/ลิตร) นั้นให้ผลทางสถิติใกล้เคียงกันกับแบบจำลองของ CDM (กรัม/ลิตร) โดยปัจจัยที่มีผลอย่างมากต่อปริมาณ PHA คือตัวแปรเชิงกำลังสองได้แก่ AA, BB และ CC และตัวแปรเชิงเดียว ได้แก่ FFA (B) และอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม (C) ที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($p < 0.05$) ส่วนปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต (A) นั้นส่งผลอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 90 % ($p < 0.1$) และตัวแปรเชิงโต้ตอบ AB, AC และ BC นั้นไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เช่นเดียวกันกับแบบจำลองของ CDM ค่า R^2 ของแบบทดลองเท่ากับ 96.63 % ค่า adjusted R^2 นั้นเท่ากับ 95.77 % predicted R^2 เท่ากับ 94.30 % และ lack of fit ที่มี $p > 0.05$ (0.591) ยังแสดงให้เห็นถึงความน่าเชื่อถือของสมการ

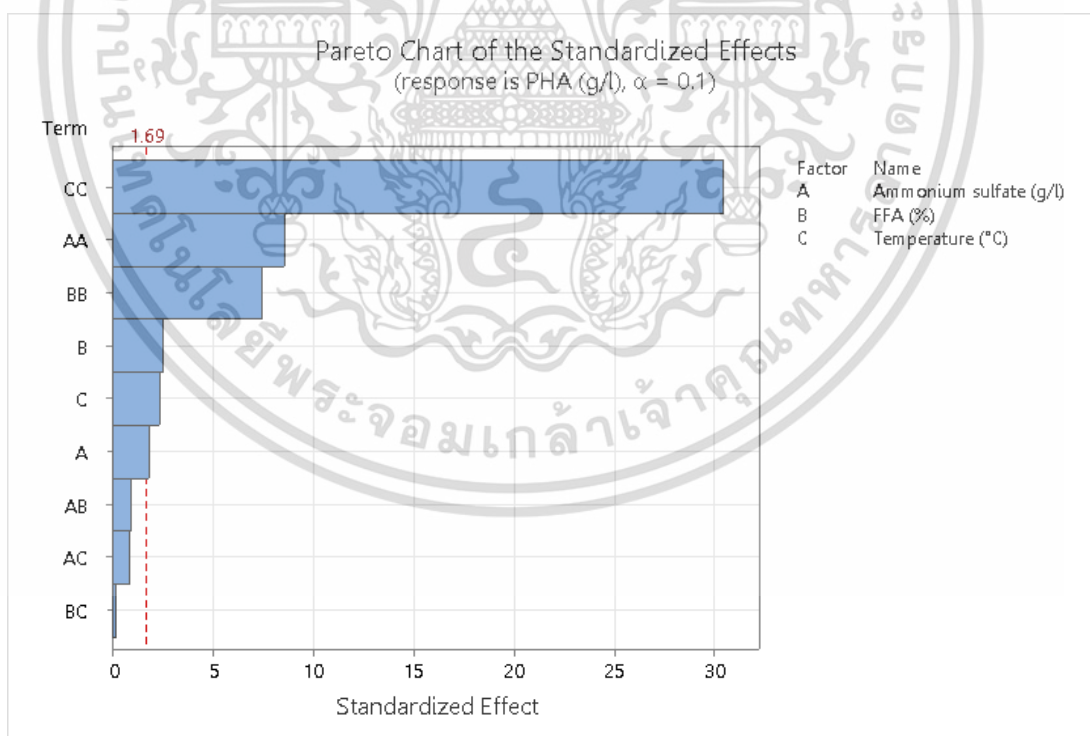
จากตารางที่ 4.5 ที่แสดงการทดสอบทางสถิติโดยใช้ ANOVA สำหรับแบบจำลองของการสะสม PHA (%) นั้นแสดงให้เห็นว่าสมการที่ใช้การทำนายการสะสม PHA นั้นเหมาะสมในการนำมาใช้ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการทำนาย เนื่องจากค่าของ lack of fit มีค่า $p > 0.05$ (0.05) ค่า R^2 ของแบบทดลองเท่ากับ 94.72 % ค่า adjusted R^2 นั้นเท่ากับ 93.36 % และ predicted R^2 เท่ากับ 91.15 % ที่แสดงถึงความแม่นยำในการทำนาย และความเหมาะสมในการนำสมการมาใช้ก็ตาม ปัจจัยที่มีผลต่อการสะสม PHA ได้แก่ FFA ตัวแปรเชิงกำลังสอง และตัวแปรเชิงตอบโต้ระหว่างปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตกับ อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม ที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 90 % ($p < 0.05$) ส่วน ปัจจัยที่ไม่มีผลต่อการสะสม PHA คือ ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่มี $p > 0.05$ (0.162) รวมถึงตัวแปรเชิงตอบโต้ AB และ BC เช่นกัน

แผนภาพพาเรโตคือแผนภาพที่แสดงค่าจริงของขนาดอิทธิพลจากปัจจัยบนกราฟพาเรโต ขนาดของปัจจัยที่ศึกษา (term) นั้นจะถูกเทียบว่าเกินหรือไม่เกินเส้นอ้างอิงที่แสดงระดับนัยสำคัญต่อ ค่าตอบสนอง จากรูปที่ 4.4 ที่แสดงค่าอิทธิพลของปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต FFA และอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มที่ได้ standardized แล้วต่อการผลิต CDM (กรัม/ลิตร) ว่าตัวแปรเชิงกำลังสองอย่าง CC BB และ AA นั้นส่งผลอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 90 % เนื่องจากทั้งสามตัวแปรมีค่าเกิดเส้นอ้างอิง โดยจะเห็นได้อย่างชัดเจนว่า CC นั้นส่งผลต่อการผลิต CDM เป็นอย่างมาก ในขณะที่ตัวแปรเชิงตอบโต้ AC AB และ BC นั้นไม่ส่งผลต่อการผลิต CDM อย่างมีนัยสำคัญ ในส่วนของปัจจัยที่ศึกษา อุณหภูมิส่งผลต่อการผลิต CDM มากที่สุด รองลงมาคือปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต และ FFA ตามลำดับ จากรูปที่ 4.5 ที่แสดงค่าอิทธิพลของปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต FFA และอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มที่ได้ standardized แล้วต่อการผลิต PHA (กรัม/ลิตร) นั้น ได้รับผลของค่าอิทธิพลใกล้เคียงกับแผนภาพพาเรโตที่แสดงผลการผลิต CDM เนื่องจาก CC นั้นส่งผลต่อการผลิต CDM เป็นอย่างมาก ในขณะที่ตัวแปรเชิงตอบโต้ AC AB และ BC นั้นไม่ส่งผลต่อการผลิต CDM อย่างมีนัยสำคัญ แต่ในส่วนของปัจจัยที่ศึกษานั้น FFA เป็นปัจจัยส่งผลต่อการผลิต PHA มากที่สุด รองลงมาคืออุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตนั้นส่งผลเพียงเล็กน้อยเท่านั้น แต่ว่าอิทธิพลของปัจจัยที่ได้ standardized แล้วต่อการสะสม PHA (%) ในรูปที่ 4.6 นั้นมีความแตกต่างจาก CDM และปริมาณ PHA โดย CC นั้นยังคงส่งผลต่อการสะสม PHA มากที่สุด รองลงมาคือตัวแปรเชิงกำลังสอง AA ปัจจัยที่ส่งผลต่อการสะสม PHA ลำดับที่ 3 คือ FFA ตามด้วย BB ตัวแปรเชิงตอบโต้ AC ที่แสดงถึงความมีอิทธิพลต่อกันของปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตกับอุณหภูมิที่ใช้บ่ม และปัจจัยสุดท้ายที่มีอิทธิพลคือ อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม เรียงลำดับจากมากไปน้อย ในขณะที่ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต AB และ BC นั้นไม่มีอิทธิพลต่อการสะสม PHA จึงอาจกล่าวได้ว่าปัจจัยเชิงกำลังสองนั้นมีอิทธิพลเป็นอย่างมากในการผลิต PHA จากน้ำมันพืชสำหรับทอดที่ใช้แล้วด้วย *Bacillus megaterium* โดยเฉพาะ CC

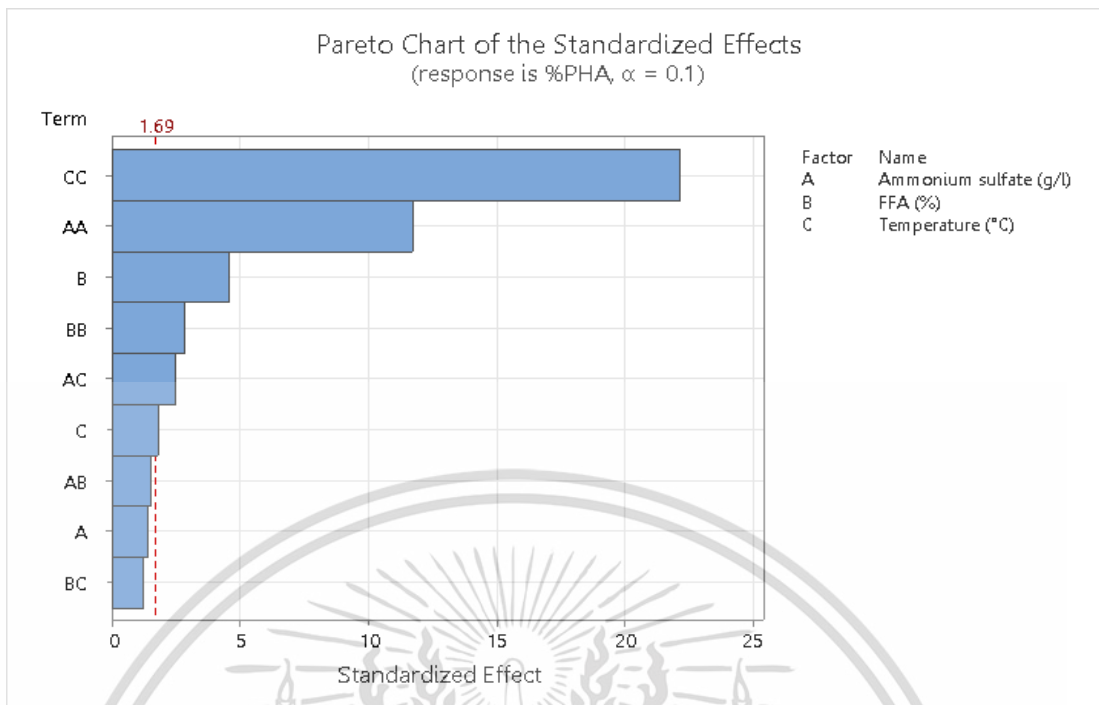


รูปที่ 4.4 แผนภาพพารेटโแสดงค่าอิทธิพลของปัจจัยที่ได้ standardized แล้วต่อการผลิต CDM (กรัม/ลิตร)



รูปที่ 4.5 แผนภาพพารेटโแสดงค่าอิทธิพลของปัจจัยที่ได้ standardized แล้วต่อการผลิต PHA (กรัม/ลิตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 แผนภาพพารेटโต้แสดงค่าอิทธิพลของปัจจัยที่ได้ standardized แล้วต่อการสะสม PHA (%)

จากการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม MINITAB v.21 โดยกำหนดตัวแปรคือ ปริมาณกรดไขมันอิสระ ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต และอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มที่แตกต่างกันตามตารางที่ 3.1 โดยควบคุมเวลาในการบ่ม และความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนในการทดลอง วิเคราะห์ผลการทดลองด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง (Response surface methodology, RSM) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % เพื่อนำมาใช้ในการสร้างแบบจำลอง ซึ่งแบบจำลองที่ได้จากการใช้วิธีทางสถิติที่เขียนด้วยรหัสแทนตัวแปรสำหรับการทำนายการผลิต CDM, ปริมาณ PHA ที่ผลิตได้ และการสะสมของ PHA หลังจากมีการตัดตัวแปรที่ไม่มีอิทธิพลออกไปจากสมการ ทำให้เหลือแต่ตัวแปรที่มีอิทธิพลต่อการผลิตนั้นจะแสดงในตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 แสดงสมการแบบจำลองจากการใช้วิธีทางสถิติ

สมการแบบจำลอง	
CDM (กรัม/ลิตร)	$= -20.922 + 0.455A + 0.782B + 1.1811C - 0.0848A^2 - 0.3431B^2 - 0.016709C^2$
PHA (กรัม/ลิตร)	$= -13.022 + 0.3669A + 0.592B + 0.7273C - 0.07250A^2 - 0.2528B^2 - 0.0103C^2$
PHA (%)	$= -447.9 + 21.81B + 26.78C - 4.962A^2 - 4.85B^2 - 0.3755C^2 - 0.2005AC$

A คือปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต (กรัม/ลิตร), B คือ FFA (%) และ C คืออุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม (°C) เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิต PHA จากน้ำมันพืชสำหรับทอดที่ใช้แล้วด้วย *Bacillus megaterium*

สภาวะที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิต PHA จากน้ำมันพืชสำหรับทอดที่ใช้แล้วด้วย *Bacillus megaterium* โดยปัจจัยที่ศึกษา ได้แก่ ปริมาณกรดไขมันอิสระ ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต และ อุณหภูมิในการบ่ม ด้วยการหมักในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ระยะเวลาการหมัก 72 ชั่วโมง ความเร็วในการเขย่า 150 รอบ/นาที ความเข้มข้นของน้ำมันทอดใช้แล้วคือ 20 กรัม/ลิตร ถูกวิเคราะห์ด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง (Response surface methodology, RSM) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ที่จะแสดงให้เห็นถึงค่าทำนายที่ได้รับจากสมการแบบจำลอง โดยได้สภาวะดังนี้ ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต 2.03 (กรัม/ลิตร), FFA 1.1 % และอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม 35 °C โดยมีค่าทำนายคือ CDM 0.76 กรัม/ลิตร, ปริมาณ PHA 0.44 กรัม/ลิตร และการสะสม PHA ที่ 58.60 % ดังนั้นเพื่อทดสอบความถูกต้องของสภาวะที่เหมาะสม จึงมีการทำการทดลองด้วยสภาวะดังกล่าวเพื่อเปรียบเทียบกับค่าทำนายว่ามีความเบี่ยงเบนมากเท่าใด ดังแสดงในตาราง 4.7 จะพบว่าค่าที่ได้จากการทดลองกับค่าทำนายนั้นมีความเบี่ยงเบนไม่มาก ทำให้ค่าที่ได้จากการทดลองนั้นมีความใกล้เคียงกับค่าที่ทำนายด้วย RSM เป็นการยืนยันว่าสมการทำนายแบบจำลองนั้นสามารถใช้งานได้จริง โดยค่าที่ได้จากการทดลองคือ CDM 0.73 กรัม/ลิตร, ปริมาณ PHA 0.40 กรัม/ลิตร และการสะสม PHA ที่ 54.09 % ซึ่งมีค่าคลาดเคลื่อน 4.11, 10.00 และ 8.34 % ตามลำดับ

นอกจากนี้ยังได้มีการนำสภาวะที่เหมาะสมที่สุดมาปรับเปลี่ยนน้ำมันสำหรับทอดที่ใช้แล้วให้เป็นน้ำมันทอดที่ใช้จริง โดยเก็บตัวอย่างน้ำมันที่ใช้แล้วจากร้านอาหารที่ขายของทอดเป็นหลัก โดยน้ำมันที่เก็บตัวอย่างมาได้จะเป็นน้ำมันที่ผ่านการทอดอาหารที่มีโปรตีนสูงอย่างไก่ทอด และน้ำมันที่ผ่านการทอดอาหารที่อุดมไปด้วยแป้งอย่างขนมไข่นกกระทาที่มีส่วนผสมหลักเป็นมันเทศ แป้งมัน และน้ำตาล เพื่อทดสอบสมการทำนายแบบจำลอง โดยได้ผลลัพธ์ในน้ำมันที่ใช้ทอดไก่คือ CDM 0.80 กรัม/ลิตร, ปริมาณ PHA 0.37 กรัม/ลิตร และการสะสม PHA ที่ 46.10 % ซึ่งจากการวิเคราะห์ตามวิธีการมาตรฐานด้วย NaOH พบว่าตัวอย่างน้ำมันมี FFA อยู่ที่ 1.1 % เมื่อใช้การวิเคราะห์ด้วย RSM แล้วจะได้ค่าทำนาย เมื่อเปรียบเทียบแล้ว น้ำมันใช้แล้วจากการทอดไก่นั้นมีค่าเบี่ยงเบนที่สูงมาก ดังนี้ ค่าคลาดเคลื่อน 5.00, 18.92 และ 27.11 % ตามลำดับ ความผิดพลาดที่เกิดขึ้นจากการทดลองนี้อาจมีผลเนื่องจากปัจจัยบางอย่างที่ส่งผลต่อการผลิต PHA ที่แม้จะมีปริมาณ FFA ที่เท่ากัน แต่ชนิดของอาหารที่ทอด รวมถึงชนิดของน้ำมันที่แตกต่างกัน เช่น น้ำมันปาล์ม น้ำมันมะกอก น้ำมันถั่วเหลือง เป็นต้น จะมีส่วนประกอบของไขมันอิสระที่ต่างกัน ซึ่งปริมาณของกรดไขมันมีผลต่อลักษณะทางกายภาพของน้ำมันใช้แล้ว กรดไขมันไม่อิ่มตัวจะอยู่ในรูปแบบของเหลวภายใต้อุณหภูมิห้อง จึงสามารถถูกย่อย และเคลื่อนย้ายด้วยการถ่ายโอนมวลได้ง่ายกว่า (Riedel et al., 2015) ทำให้สามารถเจริญเติบโตได้ดีกว่าดังเช่นผลของ CDM ของการใช้ไขมันไก่ทอดที่ได้ผลผลิตมากกว่าค่าจากการทำนาย ไม่เพียงแต่ชนิดของน้ำมันเท่านั้น แหล่งคาร์บอนที่มีลักษณะต่างกันอย่างยกตัวอย่างเช่น น้ำมัน

สำหรับทอดใช้แล้ว หรือน้ำมันจากไขมันสัตว์ที่มีกรดไขมันสูง ก็ให้ผลผลิต PHA ที่แตกต่างกันเนื่องจากองค์ประกอบของกรดไขมันที่ต่างกัน (Anita et al., 2020) Cruz et al. (2016) เปรียบเทียบผลผลิต PHA โดยใช้สายพันธุ์แบคทีเรียต่างๆ ในสารตั้งต้นไขมันต่างๆ เช่น UFO น้ำมันมะกอก จากการทำไบโอดีเซล ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า *P. resinovorans* และ *C. necator DSM 428* มีผลผลิตการสะสม PHA สูงสุดที่ 0.29 และ 0.90 กรัม PHA/กรัม สารตั้งต้นน้ำมัน ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำมันมะกอก นอกจากนี้ยังพบว่ามีการใช้ไขมันสูงสุดที่ 8.9 และ 8.3 กรัม/ลิตร ของน้ำมันมะกอก เนื่องจากมี FFA สูง (64% โดยน้ำหนัก) ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า FFA ทั้งหมดลดลงตามเวลา ซึ่งบ่งชี้ว่าการบริโภค FFA นำไปสู่ผลผลิต PHA สูง (Park and Kim, 2011) ส่วนประกอบของอาหารเช่น ไข่ ที่มีโปรตีนสูง อาจส่งผลต่อปริมาณไนโตรเจน และชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่มีในอาหาร รวมถึงเครื่องปรุงและเครื่องเทศต่างๆ ที่อาจส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของน้ำมันที่เกิดระหว่างกระบวนการทอด Mohanrasu et al. (2020) กล่าวว่า *Bacillus megaterium* สามารถใช้แหล่งไนโตรเจนหลากหลายชนิดในการผลิต PHA โดยพบว่าการใช้แหล่งไนโตรเจนต่างๆ ส่งผลให้การผลิต PHA เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ พบว่าการผลิต PHB สูงสุดที่ 2.96 กรัม/ลิตรได้ เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน รองลงมาคือโปรตีนเปปโทน, โกลซีน, โพแทสเซียมไนเตรต, ยูเรีย และแอมโมเนียมคลอไรด์ รวมถึงเศษของอาหารที่หลงเหลือหลังจากการทอดก็สามารถส่งผลต่อการผลิต PHA ได้เช่นเดียวกัน (Verlinden et al., 2011)

ตารางที่ 4.7 แสดงการเปรียบเทียบระหว่างค่าที่ได้จากการทำนายด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนองและค่าที่ได้จากการทำการทดลองที่สภาวะที่เหมาะสม

สภาวะ	CDM (กรัม/ลิตร)			PHA (กรัม/ลิตร)			การสะสม PHA (%)		
	ค่าทำนาย ^a	การทดลอง ^b	ค่าคลาดเคลื่อน (%) ^c	ค่าทำนาย ^a	การทดลอง ^b	ค่าคลาดเคลื่อน (%) ^c	ค่าทำนาย ^a	การทดลอง ^b	ค่าคลาดเคลื่อน (%) ^c
Optimal	A = 2.03 กรัม/ลิตร			0.44	0.40	10.00	58.60	54.09	8.34
	B = 1.1 %								
	C = 35 °C								
UFO ไก่ทอด	A = 2.03 กรัม/ลิตร			0.44	0.37	18.92	58.60	46.10	27.11
	B = 1.1 %								
	C = 35 °C								

A คือปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต (กรัม/ลิตร), B คือ FFA (%) และ C คืออุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม (°C)

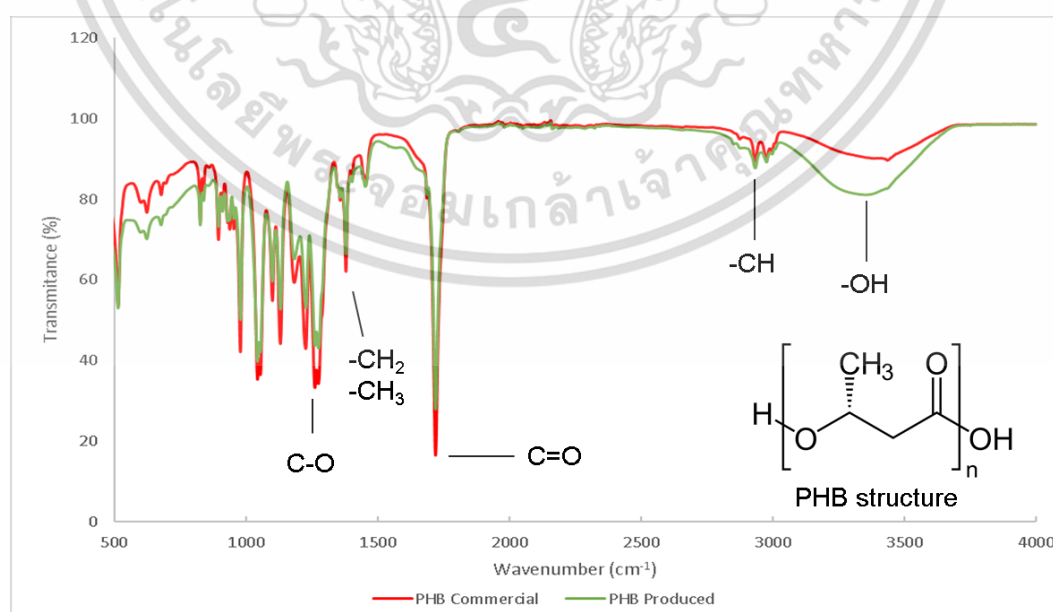
^a คือค่าที่ได้จากการทำนายด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง (Response surface methodology, RSM) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

^b คือค่าที่ได้จากการทำการทดลอง

^c คือค่าคลาดเคลื่อน (%) = (ค่าทำนาย - ค่าทดลอง) / ค่าทดลอง x 100

4.4 การศึกษาลักษณะสมบัติของ PHA ด้วยวิธี Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR)

ผลของการศึกษาลักษณะสมบัติของพอลิเมอร์ด้วยวิธี FTIR (Spectrum two, Perkin Elmer, USA) ด้วยสเปกตรัมอินฟราเรดในช่วง $400 - 4000$ เซนติเมตร⁻¹ และรีโซลูชัน (resolution) ที่ 4 เซนติเมตร⁻¹ ด้วย 32 แสแกนนั้น จะถูกแสดงด้วยจุดสูงสุด (peak) ของกราฟแทนโครงสร้างทางเคมีในรูปแบบของหมู่ฟังก์ชันของตัวอย่าง ดังรูปที่ 4.4 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าพอลิเมอร์ที่ได้จากการทดลองนั้นเป็นพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรท (Polyhydroxybutyrate, PHB) ซึ่งจัดเป็นพอลิเมอร์สายสั้นที่อยู่ในกลุ่มพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต (PHA) ที่มีโครงสร้างทางเคมีที่ประกอบด้วยหมู่เอสเทอร์ (Ester) และหมู่เมทิล (Methyl) จัดเป็นสารประเภทอะลิฟาติกพอลิเอสเทอร์ (Aliphatic polyester) โดยจุดสูงสุดที่ความยาวคลื่น 2975 เซนติเมตร⁻¹ และ 2933 เซนติเมตร⁻¹ ซึ่งแสดงถึงหมู่ฟังก์ชัน $-CH_3$ และ $-CH_2$ เป็นตัวแทนของหมู่เมทิล และหมู่เมทิลีนที่อยู่ในโครงสร้างของ PHB จุดสูงสุดที่ความยาวคลื่น 1720 เซนติเมตร⁻¹ นั้นหมายถึงหมู่ฟังก์ชันอะลิฟาติกเอสเทอร์คาร์บอนิล (aliphatic ester carbonyl group) หรือ $C=O$ ที่เป็นโครงสร้างสำคัญใน PHB หมู่ฟังก์ชัน $C-O$ หรือกลุ่มเอสเทอร์นั้นถูกพบอยู่ที่ความยาวคลื่น 1276 เซนติเมตร⁻¹ นอกจากนี้ยังพบ หมู่ฟังก์ชันมีเทน (methane group) หรือ $-CH$ และหมู่ฟังก์ชันไฮดรอกซิล หรือ $-OH$ ที่ความยาวคลื่น 1379 เซนติเมตร⁻¹ และ 3435 เซนติเมตร⁻¹ จากกลุ่มฟังก์ชันที่กล่าวมานั้นสามารถพิสูจน์ได้ว่าพอลิเมอร์ที่เกิดจากงานวิจัยนี้คือ PHB ที่มีกลุ่มฟังก์ชันที่พบที่ความยาวคลื่นต่างๆ ใกล้เคียงกับผลวิเคราะห์ PHB ของ Ranjna S. et al. (2021) อีกทั้งเมื่อเปรียบเทียบระหว่าง PHB ที่ได้จากการทดลองกับ PHB ทางการค้าพบว่ามีค่าใกล้เคียงกันเป็นอย่างมาก



รูปที่ 4.7 ผลของการวิเคราะห์ลักษณะสมบัติด้วยวิธี FTIR ของ PHB ที่ได้จากการทดลอง และ PHB

ทางการค้า เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

ปริมาณกรดไขมันอิสระ ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต และอุณหภูมิในการบ่มนั้นมียุทธพลที่ส่งผลกระทบต่อการผลิต PHA จากน้ำมันพืชสำหรับทอดที่ใช้แล้วด้วย *Bacillus megaterium* TISTR1875 ด้วยการออกแบบการทดลองโดยใช้วิธี Box-Behnken designs และวิเคราะห์ผลการทดลองด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง ทำให้ได้สภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (polyhydroxyalkanoate, PHA) คือสภาวะปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต 2.03 (กรัม/ลิตร), ปริมาณกรดไขมันอิสระ (free fatty acid, FFA) 1.1 % และอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม 35 °C และได้รับสมการทำนายของการผลิตน้ำหนักเซลล์แห้งทั้งหมด (total cell dry mass, CDM) (กรัม/ลิตร) โดยปัจจัยที่มีผลอย่างมากต่อการผลิต CDM นั้นคือปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต และอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม ที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($p < 0.05$) ส่วน FFA นั้นส่งผลอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 90 % ($p < 0.1$) สมการที่ใช้ในการทำนาย CDM นั้นเหมาะสมในการนำมาใช้งาน เนื่องจาก ค่า adjusted R² นั้นเท่ากับ 94.0 % แสดงถึงความแม่นยำในการใช้งานแบบทดลอง สำหรับแบบจำลองของปริมาณ PHA (กรัม/ลิตร) นั้นให้ผลทางสถิติใกล้เคียงกันกับแบบจำลองของ CDM (กรัม/ลิตร) โดยปัจจัยที่มีผลอย่างมากต่อปริมาณ PHA คือ FFA และอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม ที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ส่วนปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต นั้นส่งผลอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 90 % ($p < 0.1$) ค่า adjusted R² ของแบบทดลองนั้นเท่ากับ 95.8 % ที่แสดงให้เห็นถึงความน่าเชื่อถือของสมการ และสำหรับแบบจำลองของการสะสม PHA มีค่า adjusted R² นั้นเท่ากับ 93.4 % ปัจจัยที่มีผลต่อการสะสม PHA ได้แก่ FFA ที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ส่วนปัจจัยที่ไม่มีผลต่อการสะสม PHA คือ ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่มี $p > 0.05$ (0.162) ผลจากการวิเคราะห์ FTIR พบว่าพอลิเมอร์ที่ได้รับจากการทดลองนี้คือพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรท (Polyhydroxybutyrate, PHB) จากผลของงานวิจัยนี้ทำให้เห็นถึงการนำวัสดุเหลือใช้ในอุตสาหกรรมอย่างเช่นน้ำมันสำหรับทอดที่ใช้แล้วที่มีราคาถูกมาใช้ประโยชน์เพื่อลดต้นทุนการผลิต PHA ที่ค่อนข้างสูง เพื่อให้มีความนิยมในการนำพลาสติกชีวภาพที่ย่อยสลายตามธรรมชาติอย่าง PHA มากขึ้น เนื่องจากการผลิตที่คุ้มค่าทางเศรษฐกิจ อีกทั้งยังสร้างสมการแบบจำลองเพื่อทำนายผลผลิตที่ได้จากการผลิต PHA ที่มีความแม่นยำสูง เพื่อช่วยให้การพัฒนาการนำน้ำมันพืชสำหรับทอดที่ใช้แล้วมาใช้ในระดับอุตสาหกรรมในอนาคต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

- A. García, D. Segura, G. Espín, E. Galindo, T. Castillo, and C. Peña, 2014. High production of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) by an *Azotobacter vinelandii* mutant altered in PHB regulation using a fed-batch fermentation process. *Biochemical Engineering Journal*, vol. 82, pp. 117–123.
- Allen, S.A., Clark, W., McCaffery, J.M., Cai, Z., Lanctot, A., Slininger, P.J., Liu, Z.L., Gorsich, S.W., 2010. Furfural induces reactive oxygen species accumulation and cellular damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels* 3 (1), 2.
- Anbukarasu, Preetam & Sauvageau, Dominic & Elias, Anastasia, 2015. Tuning the properties of polyhydroxybutyrate films using acetic acid via solvent casting. *Scientific Reports*. 5. 17884. 10.1038/srep17884.
- Anita Talan, Rajwinder Kaur, Rajeshwar D. Tyagi, P. Drogui, 2020. Bioconversion of oily waste to polyhydroxyalkanoates: Sustainable technology with circular bioeconomy approach and multidimensional impacts. *Bioresource Technology Reports* 11, 100496.
- Anjum, A., Zuber, M., Zia, K.M., Noreen, A., Anjum, M.N., Tabasum, S., 2016. Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHA) and its copolymers: a review of recent advancements. *Int. J. Biol. Macromol.* 89, 161–174.
- AOAC. 1990. AOAC official method 940.28. Fatty acids (free) in crude and refined oils. Official methods of analysis of AOAC international. Washington, DC: AOAC International.
- Ázar, R.I.L., Morgan, T., dos Santos, A.C.F., de Aquino, Ximenes E., Ladisch, M.R., Guimarães, V.M., 2018. Deactivation and activation of lignocellulose degrading enzymes in the presence of laccase. *Enzym. Microb. Technol.* 109, 25–30.
- B. Wang, R. R. Sharma-Shivappa, J. W. Olson, and S. A. Khan, 2013. Production of polyhydroxybutyrate (PHB) by *Alcaligenes latus* using sugarbeet juice. *Industrial Crops and Products*, vol. 43, pp. 802–811.

- Bellissimi, E., Van Dijken, J.P., Pronk, J.T., Van Maris, A.J., 2009. Effects of acetic acid on the kinetics of xylose fermentation by an engineered, xylose-isomerase-based *Saccharomyces cerevisiae* strain. *FEMS Yeast Res.* 9 (3), 358–364.
- Boskou, D., Elmadfa, I., 1999. Frying oil characteristics in frying of food.
- Choe, E., Min, D., 2007. Chemistry of deep-fat frying oils. *J. Food Sci.* 72 (5), R77–R86.
- Cruz, M.V., Freitas, F., Paiva, A., Mano, F., Dionísio, M., Ramos, A.N., Reis, M.A.M., 2016a. Valorisation of fatty acids-containing wastes and by-products into short- and medium-chain length polyhydroxyalkanoates. *Nat. Biotechnol.* 33, 206–215.
- D. Z. Bucci, L. B. B. Tavares, and I. Sell, 2005. PHB packaging for the storage of food products. *Polymer Testing*, vol. 24, no. 5, pp. 564–571.
- G. Q. Chen, 2009. A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio-and materials industry. *Chemical Society Reviews*, vol. 38, no. 8, pp. 2434–2446.
- Hoffmann, N., Amara, A.A., Beermann, B.B., Qi, Q., Hinz, H.J., Rehm, B.H., 2002. Biochemical characterization of the *Pseudomonas putida* 3-hydroxyacyl ACP: CoA transacylase, which diverts intermediates of fatty acid de novo biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 277 (45), 42926–42936.
- Kamilah, H., Tsuge, T., Yang, T.A., Sudesh, K., 2013. Waste cooking oil as substrate for biosynthesis of poly (3-hydroxybutyrate) and poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate): turning waste into a value-added product. *Malaysian Journal of Microbiology* 9 (1), 51–59.
- Kaur, R., Tyagi, R.D., Zhang, X., 2019. Review on pulp and paper activated sludge pretreatment, inhibitory effects and detoxification strategies for biovalorization. *Environmental Research* 109094.
- Khanna, S., Srivastava, A.K., 2005. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochem.* 40 (2), 607–619.
- Kim, D., 2018. Physico-chemical conversion of lignocellulose: inhibitor effects and detoxification strategies: a mini review. *Molecules* 23 (2), 309.

Koller, M., Braunegg, G., 2015. Biomediated production of structurally diverse poly (hydroxyalkanoates) from surplus streams of the animal processing industry. *Polimery* 60.

Koller, M., Braunegg, G., 2018. Advanced approaches to produce polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters in a sustainable and economic fashion. *The EuroBiotech Journal* 2 (2), 89–103.

Koller, M., Maršálek, L., de Sousa Dias, M.M., Braunegg, G., 2017. Producing microbial polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters in a sustainable manner. *New Biotechnol.* 37, 24–38.

Kourmentza, C., Plácido, J., Venetsaneas, N., Burniol-Figols, A., Varrone, C., Gavala, H.N., Reis, M.A., 2017. Recent advances and challenges towards sustainable polyhydroxyalkanoate (PHA) production. *Bioengineering* 4 (2), 55.

Kulkarni, M.G., Dalai, A.K., 2006. Waste cooking oil an economical source for biodiesel: a review. *Ind. Eng. Chem. Res.* 45 (9), 2901–2913.

L. Shang, M. Jiang, and H. N. Chang, 2003. Poly (3-hydroxy-butyrates) synthesis in fed-batch culture of *Ralstonia eutropha* with phosphate limitation under different glucose concentration. *Biotechnology Letter*, vol. 25, no. 17, pp. 1415–1419.

Lemoigne, M., 1926. Produits de deshydratation et de polymerisation de L'acide β -oxybutyrique. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 8, 770–782.

Lyra Colombi, B., Silva Zanoni, P.R., Benathar Ballod Tavares, L., 2018. Effect of phenolic compounds on bioconversion of glucose to ethanol by yeast *Saccharomyces cerevisiae* PE-2. *Can. J. Chem. Eng.* 96 (7), 1444–1450.

Mannu, A., Vlahopoulou, G., Urgeghe, P., Ferro, M., Del Caro, A., Taras, A., Garroni, S., Rourke, J.P., Cabizza, R., Petretto, G.L., 2019. Variation of the chemical composition of waste cooking oils upon bentonite filtration. *Resources* 8 (2), 108.

Mohanrasu, R. Guru Raj Rao, G.H. Dinesh, Kunyu Zhang, G. Siva Prakash, Dong-Po Song, Sudhakar Muniyasamy, Arivalagan Pugazhendhi, J. Jeyakanthan, A. Arun.,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2020. Optimization of media components and culture conditions for polyhydroxyalkanoates production by *Bacillus megaterium*. *Fuel*. 271, 117522.
- Obruca, S., Benesova, P., Marsalek, L., Marova, I., 2015. Use of lignocellulosic materials for PHA production. *Chem. Biochem. Eng. Q.* 29 (2), 135–144.
- Obruca, S., Sedlacek, P., Koller, M., Kucera, D., Pernicova, I., 2018. Involvement of polyhydroxyalkanoates in stress resistance of microbial cells: biotechnological consequences and applications. *Biotechnol. Adv.* 36 (3), 856–870.
- P. Eiamsa-ard, 2017. Polyhydroxyalkanoate: Bioplastic from bacteria. *The Journal of KMUTNB.*, vol. 27, no. 1, pp. 147–158 (in Thai).
- Park, D.H., Kim, B.S., 2011. Production of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by *Ralstonia eutropha* from soybean oil. *Nat. Biotechnol.* 28, 719–724.
- Philip S, Keshavarz T, Roy I., 2007. Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. *J Chem Technol Biotechnol* 82:233–247. doi:10.1002/jctb.1667.
- R. D. Ashby, D. K. Solaiman, and T. A. Foglia, 2002. The synthesis of short- and medium-chainlength poly(hydroxyalkanoates) mixtures from glucose or alkanolic acid grown *Pseudomonas oleovorans*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, vol. 28, pp. 147–153.
- R. Davis, R. Kataria, F. Cerrone, T. Woods, S. Kenny, and A. O'Donovan, et al., 2013. “Conversion of grass biomass into fermentable sugars and its utilization for medium chain length polyhydroxyalkanoate (mcl-PHA) production by *Pseudomonas strains*,” *Bioresource Technology*, vol.150, pp. 202–209.
- Radhika, D., Murugesan, A., 2012. Bioproduction, statistical optimization and characterization of microbial plastic (poly 3-hydroxy butyrate) employing various hydrolysates of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) as sole carbon source. *Bioresour. Technol.* 121, 83–92.

- Ranjna S., Jai P. P., Ayon T., Aparna A., Sadhan K. C., Raveendran S., 2021. An environmentally sustainable green process for the utilization of damaged wheat grains for poly-3-hydroxybutyrate production. *Environmental Technology & Innovation*. 21, 101271
- Riedel, S.L., Jahns, S., Koenig, S., Bock, M.C.E., Brigham, C.J., Bader, J., Stahl, U., 2015. Polyhydroxyalkanoates production with *Ralstonia eutropha* from low quality waste animal fats. *J. Biotechnol.* 214, 119–127.
- S. Obruca, I. Marova, O. Snajdar, L. Mravcova, Z. Svoboda, 2010. Production of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Cupriavidus necator* from waste rapeseed oil using propanol as a precursor of 3-hydroxyvalerate. *Biotechnology Letters*, vol. 32, no. 12, pp. 1925– 1932.
- Sangkharak, K., Khaithongkaeo, P., Chuaikhunupakarn, T., Choonut, A., Prasertsan, P., 2020. The production of polyhydroxyalkanoate from waste cooking oil and its application in biofuel production. *Biomass Conversion and Biorefinery* 1–14.
- Sivagnanam S., Peter L., Ramachandran S., Arivalagan P., Balu K., Antonieta R., Govindarajan R. and Pablo C., 2021. Polyhydroxybutyrate production from ultrasound-aided alkaline pretreated finger millet straw using *Bacillus megaterium* strain CAM12. *Bioresource Technology*. 325, 124632.
- Steinbüchel, A., Valentin, H.E., 1995. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiol. Lett.* 128 (3), 219–228.
- Sudesh, K., Abe, H., Doi, Y., 2000. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Prog. Polym. Sci.* 25 (10), 1503–1555.
- Tabee, E., Jägerstad, M., Dutta, P.C., 2009. Frying quality characteristics of French fries prepared in refined olive oil and palm olein. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 86 (9), 885–893.
- Talebian-Kiakalaieh, A., Amin, N.A.S., Mazaheri, H., 2013. A review on novel processes of biodiesel production from waste cooking oil. *Appl. Energy* 104, 683–710.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Tan, G.-Y., Chen, C.-L., Li, L., Ge, L., Wang, L., Razaad, I., Li, Y., Zhao, L., Mo, Y., Wang, J.-Y., 2014. Start a research on biopolymer polyhydroxyalkanoate (PHA): a review. *Polymers* 6 (3), 706–754.
- Ullah, Z., Bustam, M.A., Man, Z., 2014. Characterization of waste palm cooking oil for biodiesel production. *International Journal of Chemical Engineering and Applications* 5 (2), 134.
- Ullah, Z., Bustam, M.A., Man, Z., 2015. Biodiesel production from waste cooking oil by acidic ionic liquid as a catalyst. *Renew. Energy* 77, 521–526.
- Vastano, M., Corrado, I., Sannia, G., Solaiman, D.K., Pezzella, C., 2019. Conversion of no/low value waste frying oils into biodiesel and polyhydroxyalkanoates. *Sci. Rep.* 9 (1), 1–8.
- Verlinden, R.A., Hill, D.J., Kenward, M.A., Williams, C.D., Piotrowska-Seget, Z., Radecka, I.K., 2011. Production of polyhydroxyalkanoates from waste frying oil by *Cupriavidus necator*. *AMB Express* 1 (1), 11.
- Wu, C.M., Chen, S.Y., 1992. Volatile compounds in oils after deep frying or stir frying and subsequent storage. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 69 (9), 858–865.
- X. Gao, J. C. Chen, Q. Wu, and G. C. Chen, 2011. Polyhydroxyalkanoates as a source of chemicals, polymers, and biofuels, *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 22, no. 6, pp. 768–774.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

ข้อมูลผลการทดลองการผลิต PHA

ตารางที่ ก.1 ข้อมูลผลการทดลองการผลิต PHA ที่สภาวะแตกต่างกัน

ปริมาณแอมโมเนียม ซัลเฟต (กรัม/ลิตร)	FFA (%)	อุณหภูมิใน การบ่ม (°C)	CDM (กรัม/ลิตร)	ปริมาณ PHA (กรัม/ลิตร)	การสะสม PHA (%)
1.0	1.0	30	0.18	0.08	42.20
1.0	1.0	30	0.16	0.08	47.37
1.0	1.0	30	0.17	0.07	41.18
2.0	0.5	30	0.19	0.09	47.41
2.0	0.5	30	0.23	0.10	44.93
2.0	0.5	30	0.21	0.10	45.67
2.0	1.5	30	0.23	0.12	51.09
2.0	1.5	30	0.18	0.09	49.55
2.0	1.5	30	0.30	0.15	49.72
3.0	1.0	30	0.25	0.11	45.27
3.0	1.0	30	0.27	0.12	45.06
3.0	1.0	30	0.27	0.13	48.15
1.0	0.5	35	0.61	0.32	52.05
1.0	0.5	35	0.51	0.26	51.31
1.0	0.5	35	0.47	0.24	51.60
1.0	1.5	35	0.57	0.31	55.00
1.0	1.5	35	0.58	0.32	55.04
1.0	1.5	35	0.65	0.36	55.13
2.0	1.0	35	0.74	0.44	59.95
2.0	1.0	35	0.80	0.47	59.54
2.0	1.0	35	0.74	0.43	58.33
2.0	1.0	35	0.71	0.42	59.58
2.0	1.0	35	0.75	0.43	57.43
2.0	1.0	35	0.83	0.48	57.88

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาร่วมกัน ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

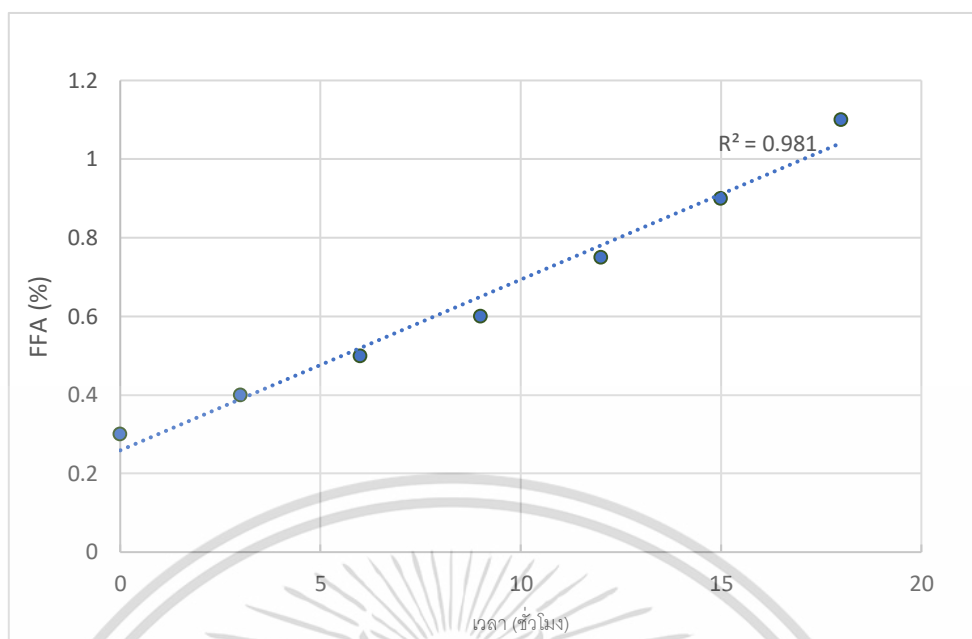
ตารางที่ ก.1 ข้อมูลผลการทดลองการผลิต PHA ที่สภาวะแตกต่างกัน (ต่อ)

ปริมาณแอมโมเนียม ซัลเฟต (กรัม/ลิตร)	FFA (%)	อุณหภูมิใน การบ่ม (°C)	CDM (กรัม/ลิตร)	ปริมาณ PHA (กรัม/ลิตร)	การสะสม PHA (%)
2.0	1.0	35	0.69	0.41	59.04
2.0	1.0	35	0.76	0.43	55.77
2.0	1.0	35	0.78	0.45	58.24
3.0	0.5	35	0.61	0.31	50.82
3.0	0.5	35	0.60	0.31	51.52
3.0	0.5	35	0.55	0.27	49.70
3.0	1.5	35	0.44	0.23	52.65
3.0	1.5	35	0.69	0.35	50.24
3.0	1.5	35	0.75	0.39	51.89
1.0	1.0	40	0.29	0.13	43.18
1.0	1.0	40	0.24	0.11	44.83
1.0	1.0	40	0.26	0.12	43.95
2.0	0.5	40	0.27	0.12	45.91
2.0	0.5	40	0.27	0.13	46.34
2.0	0.5	40	0.28	0.13	47.31
2.0	1.5	40	0.27	0.13	47.88
2.0	1.5	40	0.30	0.15	48.88
2.0	1.5	40	0.30	0.15	49.16
3.0	1.0	40	0.36	0.15	42.52
3.0	1.0	40	0.27	0.11	42.50
3.0	1.0	40	0.33	0.14	42.64

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก.2 ข้อมูลผลการทดลองการผลิต PHA ที่สภาวะเหมาะสมด้วยแหล่งอาหารที่ต่างกัน

ชนิดน้ำมัน	ปริมาณแอมโมเนียม ซัลเฟต (กรัม/ลิตร)	FFA (%)	อุณหภูมิในการบ่ม (°C)	CDM (กรัม/ลิตร)	ปริมาณ PHA (กรัม/ ลิตร)	การสะสม PHA (%)
น้ำมันใช้แล้ว (ควบคุม)	2.03	1.1	35	0.74	0.41	54.61
	2.03	1.1	35	0.72	0.39	54.63
	2.03	1.1	35	0.74	0.39	53.05
น้ำมันใช้แล้วจากไก่ทอด	2.03	1.1	35	0.92	0.40	43.12
	2.03	1.1	35	0.65	0.30	45.90
	2.03	1.1	35	0.82	0.41	49.29



รูปที่ ก.1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกรดไขมันอิสระ (free fatty acid, FFA) กับเวลาในการให้ความร้อนน้ำมันพืชบริสุทธิ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล นายวัชรกร โตจำสี
 ที่อยู่ 429/62 ซอยประชาอุทิศ 69 ถนนประชาอุทิศ แขวงบางมด เขตทุ่งครุ
 กรุงเทพมหานคร 10140
 ประวัติการศึกษา 2561 วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมแปรรูปอาหาร
 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ประสบการณ์การทำงานและความเชี่ยวชาญ

ปริญญาโท Non-destructive qualities determination of rambutan by
 Hyperspectral imaging technique

การประชุมวิชาการ 16th Thai Society of Agricultural Engineering International
 Conference, Thailand, 26th-27th July, 2023

งานวิจัยเรื่อง Effect of free fatty acid to polyhydroxyalkanoates
 production from used frying oil by *Bacillus megaterium*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้