สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถย่อยสลาย Polyhydroxybutyrate (PHB)

นายคันธง วงศ์วัฒนา
นายเดชา ศิลป์ศร

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2543

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 39886
วัน, เดือน, ปี 11 ก.ค. 2544
.b.....
i.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Screening and Isolation of PHB-degrading microorganisms

Mr. Kanthong Wongwattana
Mr. Decha Silsorn

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the
Requirement for the Degree of Bachelor of Science
Department of Applied Biology
Faculty of Science
King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang
2000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถย่อยสลาย Polyhydroxybutyrate (PHB)		
โดย	นายคันธง	วงศ์วัฒนา	รหัส 40053011
	นายเดชา	ศิลป์ศร	รหัส 40053023
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์		
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์กุลวดี ทองภูเบศร์		

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้นับโครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

---------- หัวหน้าภาควิชา

(ผศ.ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง)

คณะกรรมการสอบโครงงานพิเศษ

---------- ประธานกรรมการ

(รศ.ดร. ดุษณี ธนะบริพัฒน์)

---------- กรรมการ

(ผศ. ดวงใจ โอชัยกุล)

---------- กรรมการ

(อาจารย์กุลวดี ทองภูเบศร์)

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถย่อยสลาย Polyhydroxybutyrate (PHB)

นักศึกษา นายคันธง วงศ์วัฒนา

นายเดชา ศิลป์ศร

อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์กุลวดี ทองภูเบศร์

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

ปีการศึกษา 2543

บทคัดย่อ

จุลินทรีย์ 82 ไอโซเลต ที่แยกได้จากตัวอย่างดินและน้ำ 18 แหล่งบน Nutrient Agar (NA) เมื่อนำมาคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ย่อย PHB ได้ด้วยเทคนิค replica plating บน HB medium (3-hydroxybutyrate 0.5 เปอร์เซ็นต์) และ PHB medium (poly-β-hydroxybutyrate 0.5 เปอร์เซ็นต์) สามารถคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ได้ 45 ไอโซเลต และ 32 ไอโซเลต ตามลำดับ กลุ่มตัวอย่างที่คัดเลือกได้ในขั้นต้น นำมาคัดเลือกขั้นที่สองแบบต่อเนื่อง (sequential screening) ได้เชื้อจุลินทรีย์ 2 ชนิด คือ PHB-1 และ PHB-2 จากนั้นนำเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้มาบ่มใน PHB medium ที่อุณหภูมิห้อง ความเร็วในการเขย่า 200 รอบต่อนาที ตรวจวัดการเจริญโดยวิธีนับโคโลนีบน NA และวัดความเข้มข้นของ PHB โดยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟีพบว่าเชื้อ PHB-1 และ PHB-2 มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.112 ต่อชั่วโมง และ 0.153 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ ประสิทธิภาพในการย่อยสลาย PHB เปรียบเทียบจากเปอร์เซ็นต์ PHB ที่เหลือของ PHB-1และPHB-2 ในวันที่ 7 ของการย่อยสลาย พบว่ามี PHB เหลืออยู่เท่ากับ 58.5 และ 40.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกัน และแตกต่างกับตัวควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title Screening and Isolation of PHB-degrading Microorganisms

Name Mr.Kanthong Wongwattana

Mr.Decha Silsorn

Special Project Advisor Miss Kulwadee Tongpubesra

Department Applied Biology

Academic Year 2000

Abstract

From the bacterial isolation on nutrient agar (NA), 82 isolates were collected from 18 soil and water samples. The isolates were then screened on HB medium (0.5 percent 3-hydroxybutyrate) and PHB medium (0.5 percent poly-β-hydroxybutyrate) by replica plating technique. 45 isolates of HB-degrading bacteria , and 32 isolates of PHB-degrading bacteria were selected from this primary screening. Isolates PHB-1 and PHB-2, the most effective bacteria for PHB degradation, were eventually obtained after sequential screening on PHB medium, by the enrichment technique. Efficiency of PHB degradation was studied by incubating the selective culture in PHB medium. The cultivation was operated at room temperature, and shaking at 200 rpm. The growth of microorganism was measured by plate count technique on NA. PHB concentrations was analyzed by gas chromatography. The specific growth rates of PHB-1 and PHB-2 were 0.112 h^{-1} and 0.153 h^{-1}, respectively. At day 7 of degradation, PHB concentrations in medium containing PHB-1 and PHB-2 were 58.5 percent and 40.9 percent, respectively. The statistic comparisons of remaining PHB from 3 treatments of PHB medium (control, degradation by PHB-1 and degradation by PHB-2 indicated that each treatment was significantly different from the others, at 95 percent confidence.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.ดุษณี ธนะบริพัฒน์ ประธานกรรมการ ผศ.ดวงใจ โอชัยกุล กรรมการ และอาจารย์กุลวดี ทองภูเบศร์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ที่กรุณาให้คำแนะนำต่างๆ ตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษาวิจัย และช่วยตรวจแก้ไขโครงงานพิเศษในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ ฝ่ายธุรการ และ แม่บ้าน ประจำภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ช่วยอำนวยความสะดวกต่างๆ ตลอดระยะเวลาที่ทำโครงงานพิเศษ

ขอขอบพระคุณ ฝ่ายโสตทัศนศึกษา คณะครุศาสตร์อุตสาหกรรม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ช่วยเอื้อเฟื้อเครื่องฉายภาพ

ขอขอบพระคุณโรงงานอุตสาหกรรม ที่มีรายนามในโครงงานพิเศษนี้ที่ช่วยเอื้อเฟื้อตัวอย่างน้ำต่างๆ

ขอขอบพระคุณพี่ๆปริญญาโท ปี 2, เพื่อนๆ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ เพื่อนๆ ภาควิชาฟิสิกส์ประยุกต์ และน้องๆทุกท่านที่สละเวลาเพื่อให้ความช่วยเหลือต่างๆ และเป็นกำลังใจในการทำโครงงานพิเศษนี้

คณะผู้จัดทำ

เมษายน 2544

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อโครงงานพิเศษภาษาไทย	ก
บทคัดย่อโครงงานพิเศษภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญตาราง	ง
สารบัญรูป	จ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักเกณฑ์ที่เกี่ยวข้อง	3
บทที่ 3 การดำเนินการวิจัย	25
บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์	33
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	49
เอกสารอ้างอิง	50
ภาคผนวก	53

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 โครงสร้างทั่วไปของ poly-(β-hydroxyalkanoate)	6
2.2 โครงสร้างของ poly-(β-hydroxyalkanoate)	9
2.3 ภาพ PHB ที่สะสมอยู่ในเซลล์ของเชื้อ *Alcaligenes eutrophus*	11
2.4 วิธีการสังเคราะห์ PHBของเชื้อ *R. rubrum*, *A. eutrophus* และ *P. oleovorans*	13
2.5 วัฏจักรของ PHB	14
2.6 การสลายตัวโดยแสงของพอลิเมอร์ร่วมระหว่างเอทิลีนและคาร์บอนมอนอกไซด์	17
2.7 วิถีการย่อยสลายภายในเซลล์ของ PHB	22
3.1 แผนภาพการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์แบบต่อเนื่อง (sequential screening)	30
4.1 วิธีการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ขั้นต้นด้วยเทคนิค replica plating	34
4.2 ลักษณะโคโลนีของเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้จากการคัดเลือกอย่างต่อเนื่อง (sequential screening) บน NA	42
4.3 ลักษณะโคโลนีของเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้จากการคัดเลือกอย่างต่อเนื่อง (sequential screening) บน PHB medium	43
4.4 ลักษณะการติดสีแกรมของเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้จากการคัดเลือกอย่างต่อเนื่อง (sequential screening)	44
4.5 กราฟการเจริญของ PHB-1 และ PHB-2 ในอาหาร PHB medium (PHB 0.5 เปอร์เซ็นต์)	45
4.6 โครมาโตแกรมเปรียบเทียบปริมาณ PHB ที่เหลือในตัวควบคุมและน้ำหมักหลังจากการบ่ม 7 วัน	46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 มอนอเมอร์ของ polyhydroxyalkanoate ที่เกิดจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ	7
2.2 คุณสมบัติทั่วไปของ PHB เปรียบเทียบกับ Polypropylene	10
2.3 ตัวอย่างการนำ PHB ไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ	15
2.4 พลาสติกที่สลายตัวด้วยแสงทางการค้า	18
2.5 พลาสติกที่สลายตัวทางชีวภาพทางการค้า	19
2.6 ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลาย PHB ได้	20
2.7 แหล่งธรรมชาติที่พบจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลาย PHB ได้	21
2.8 จำนวนเซลล์ของแบคทีเรียในระบบนิเวศน์ต่างๆ	24
3.1 พารามิเตอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟี	32
4.1 แหล่งที่มาของตัวอย่างดิน และน้ำที่นำมาศึกษา	33
4.2 เชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อย 3-HB และ PHB ได้	34
4.3 จุลินทรีย์จากแหล่งต่างๆ ที่สามารถเจริญได้บนอาหาร NA, HB และ PHB medium	35
4.4 เชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากตัวอย่างดินและน้ำที่นำมาศึกษา	36
4.5 การเปรียบเทียบปริมาณ PHB ที่เหลือในตัวควบคุมและน้ำหมักหลังจากการบ่ม 7 วัน ของเชื้อ PHB-1 และ PHB-2	47
4.6 การเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ PHB ที่เหลือจากการย่อยสลายโดยเชื้อ PHB-1 และ PHB-2 หลังจากการบ่ม 7 วัน	48
ข.1 ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างการย้อมสีแกรม	54

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

จากอดีตถึงปัจจุบันนี้วัสดุอุปกรณ์ที่ทำจากพลาสติก หรือมีส่วนประกอบของพลาสติกเข้ามามีบทบาทสำคัญเป็นอย่างมากกับชีวิตความเป็นอยู่ของมนุษย์เรื่อยมา จนเป็นที่ต้องการของผู้บริโภคเป็นอย่างมาก ดังนั้นภาคอุตสาหกรรมจึงมีการพัฒนาเป็นอย่างมากในการที่จะผลิตพลาสติกออกมาในปริมาณที่สูงโดยการผลิตทางภาคอุตสาหกรรมนั้นใช้กระบวนการทางเคมีในการผลิตพลาสติกเหล่านี้ จากการที่ผลิตพลาสติกเป็นจำนวนมากจึงมีผลทำให้เกิดขยะที่เป็นพลาสติกนั้นขึ้นเป็นจำนวนมาก และจากกระบวนการผลิตทางเคมีจึงส่งผลให้พลาสติกเหล่านี้เป็นขยะที่ทำลายได้ยากและผลจากการทำลายพลาสติกเหล่านี้จะก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม เพราะฉะนั้นในปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ได้เล็งเห็นปัญหาที่เกิดขึ้น จึงหันมาสนใจที่จะพัฒนาการผลิตพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้โดยธรรมชาติไม่ก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม ด้วยเหตุนี้จึงเกิดพอลิเมอร์ชีวภาพขึ้นซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่สามารถย่อยสลายทางชีวภาพได้โดยจุลินทรีย์ เช่น การผลิต Polyhydroxyalkanoic acid (PHA) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ชีวภาพที่จัดอยู่ในกลุ่มไบโอพอลิเอสเทอร์ (Biopolyester) พอลิเมอร์ชีวภาพพื้นฐานที่จัดอยู่ใน Polyhydroxyalkanoic acid (PHA) คือ Polyhydroxybutyrate (PHB) โดยจุลินทรีย์บางชนิดสามารถย่อย PHB และเก็บไว้ภายในเซลล์ในสภาวะที่แหล่งอาหารถูกจำกัด เพื่อใช้พอลิเมอร์ ดังกล่าวเป็นแหล่งอาหาร (Hocking และ Marchessault,1994)

ด้วยคุณสมบัติของ PHB ที่ลักษณะคล้าย polypropylene แต่มีความยืดหยุ่นและมีความเปราะบางมากกว่า polypropylene รวมทั้งยังพบ PHB 100-200 monomer unit ในสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำและสิ่งมีชีวิตชั้นสูง (Lee,1995) ทำให้มีความต้องการใช้ PHB เพื่อเป็นพอลิเมอร์ชีวภาพทั้งยังมีแนวโน้มในการประยุกต์ใช้ทางด้านการแพทย์และที่สำคัญ PHB สามารถถูกย่อยสลายได้สมบูรณ์โดยจุลินทรีย์จึงเป็นการง่าย ที่เราจะคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายพอลิเมอร์ชีวภาพได้เองภายในประเทศซึ่งจะนำมาใช้ประโยชน์ภายในประเทศและยังสามารถขยายผลต่อไป เพื่อปรับปรุงพันธุ์จุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้สามารถสร้างพอลิเมอร์ชีวภาพได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยใช้ต้นทุนการผลิตต่ำกว่ากระบวนการทางเคมีจะทำให้เกิดผลดีต่อสิ่งแวดล้อม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1. เพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสำหรับการย่อยสลาย Polyhydroxybutyrate (PHB)
2. เพื่อวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลาย PHB ในตัวอย่างดินและน้ำ

ขอบเขตโครงงานพิเศษ

คัดเลือกจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายพอลิเมอร์ชีวภาพจากแหล่งดิน แหล่งน้ำตามธรรมชาติรวมถึงน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมโดยใช้ Selective media ที่มี PHB เป็นแหล่งอาหาร จากนั้นทำการวิเคราะห์ประสิทธิภาพของการย่อยสลายพอลิเมอร์ชีวภาพโดยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟี (Gas Chromotrography, GC)

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

จะได้จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายพอลิเมอร์ชีวภาพขึ้นเองภายในประเทศจากแหล่งธรรมชาติทำให้สามารถปรับปรุงสายพันธุ์ดังกล่าวให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นรวมทั้งยังสามารถพัฒนาให้จุลินทรีย์ผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักเกณฑ์ที่เกี่ยวข้อง

2.1 พลาสติก (พิชิต, 2538)

พลาสติกเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีพอลิเมอร์ชนิดต่างๆ เป็นองค์ประกอบ มีโครงสร้างโมเลกุลขนาดใหญ่มาก (Macromolecule) ประกอบด้วยธาตุสำคัญคือ คาร์บอน ไฮโดรเจน ออกซิเจน ไนโตรเจน คลอรีน ฟลูออรีน ฯลฯ พลาสติกส่วนมากมีแหล่งกำเนิดจากน้ำมันและก๊าซธรรมชาติ มีพลาสติกหลายชนิดที่มีเฉพาะธาตุไฮโดรเจนและคาร์บอนล้วนๆ ผสมอยู่

สมาคมวิศวกรพลาสติก (SPE) และสมาคมอุตสาหกรรมพลาสติก (SPI) แห่งสหรัฐอเมริกาได้ให้คำจำกัดความของพลาสติกไว้ดังนี้ พลาสติก คือ วัสดุที่ประกอบด้วยสารหลายอย่าง มีน้ำหนักโมเลกุลสูง คงรูปเมื่อผ่านกรรมวิธีการผลิต ลักษณะอ่อนตัวขณะทำการผลิต ซึ่งโดยมากใช้กรรมวิธีการผลิตด้วยความร้อน หรือแรงอัด หรือทั้งสองอย่าง ซึ่งพลาสติกแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ

1. เทอร์โมเซตติง (Thermosetting) หรือเทอร์โมเซต (Themoset) คือ พลาสติกที่มีรูปทรงถาวรเมื่อผ่านกรรมวิธีการผลิตโดยใช้ความร้อน (Heat) และแรงอัด (Pressure) หรือผ่านกรรมวิธีการผลิตประเภทหล่อพลาสติกเหลว (Casting) ที่ใช้สารเคมีผสมลงไปทำให้เกิดการแข็งตัว จะนำไปหลอมละลายนำกลับมาใช้ใหม่อีกไม่ได้ เปรียบเสมือนไข่เมื่อนำไปทำให้สุกแล้วจะทำให้เหลวเหมือนเดิมอีกไม่ได้ ในประเทศอังกฤษเรียกเทอร์โมเซตติงอีกชื่อหนึ่งว่า ดูโรพลาสติก (Duroplastic)
2. เทอร์โมพลาสติก (Thermoplastic) เป็นพลาสติกที่สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้อีกหลังจากนำไปหล่อทำเป็นผลิตภัณฑ์แล้วเปรียบเสมือนน้ำแข็ง เมื่อถูกความร้อนก็จะ4 ละลายกลายเป็นน้ำ และเมื่อทำให้เย็นน้ำจะแข็งตัว กลับเป็นน้ำแข็งได้อีกไม่มีที่สิ้นสุด เรียกว่า "Plastic With a Memory" เช่น Polyester, Polyamide, Polypropylene เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปัจจุบันได้มีการนำพลาสติกมาใช้ในชีวิตประจำวันเป็นจำนวนมาก ซึ่งก่อให้เกิดปัญหาการกำจัดพลาสติกที่ใช้แล้ว เนื่องมาจากพลาสติกที่ใช้กันส่วนมากเป็นพลาสติกที่ไม่สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติหรือย่อยสลายได้แต่ต้องใช้เวลานานมาก เช่น Polystyrene, Polyethylene, Polyvinyl chloride นอกจากพลาสติกเหล่านี้แล้วยังมีพลาสติกอีกกลุ่มหนึ่งที่สามารถย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติ เช่น Polyester, Polysaccharides, Polyamino acid ซึ่งพลาสติกชนิดนี้กำลังเป็นที่สนใจในปัจจุบันเป็นอย่างมาก เพราะถ้าสามารถนำพลาสติกชนิดนี้มาผลิตใช้ในทางการค้าได้ ก็จะทำให้ลดปัญหามลภาวะทางสิ่งแวดล้อมได้สูง (เกียรติศักดิ์, 2535)

2.2 พอลิเมอร์ (ไพโรจน์, 2540)

พอลิเมอร์ (Polymer) มีอยู่ทั่วไปรอบๆ ตัวเรา พอลิเมอร์เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของอาหาร (แป้ง โปรตีน), เครื่องนุ่งห่ม (ไหม ฝ้าย พอลิเอสเทอร์ ไนลอน), ที่อยู่อาศัย (ไม้ เซลลูโลส สี) และร่างกายของคนเรา (กรดนิวคลีอิก พอลิแซคคาไรด์ โปรตีน) พอลิเมอร์มาจากภาษากรีกโดยคำว่า poly แปลว่า มาก และ meres แปลว่า ส่วน ความหมายง่ายๆ ของพอลิเมอร์ซึ่งในภาษาไทยใช้คำว่า พอลิเมอร์ (ตามราชบัณฑิตยสถาน) คือ โมเลกุลที่มีสายโซ่ยาวซึ่งประกอบด้วยหน่วยซ้ำ (repeating unit) ของโครงสร้างที่เหมือนกันเป็นจำนวนมาก

พอลิเมอร์เป็นสารประกอบที่มีโมเลกุลใหญ่ซึ่งประกอบขึ้นด้วยพันธะโคเวเลนท์ของหน่วยโครงสร้างเล็กๆ ที่เรียกว่า มอนอเมอร์ (monomer) ในบางกรณีอาจจะเรียก หน่วยโครงสร้าง (structural unit) หรือเรียก หน่วยซ้ำ (repeating unit) ว่า monomer residue ซึ่งดูจะถูกต้องมากกว่าเพราะว่ามีการขจัดอะตอมออกมาจากหน่วยโครงสร้างอย่างง่ายในระหว่างกระบวนการเกิดพอลิเมอร์

สิ่งที่มีความจำเป็นสำหรับโมเลกุลเล็กๆ ที่จัดว่าเป็นมอนอเมอร์ หรือ building block คือการที่มีบริเวณที่จะเกิดพันธะเคมีได้ 2 แห่งหรือมากกว่า 2 แห่งซึ่งแต่ละตัวสามารถเชื่อมต่อกับมอนอเมอร์ตัวอื่นๆ เพื่อเกิดเป็นสายโซ่พอลิเมอร์ จำนวนหมู่ในโมเลกุลที่สามารถเกิดพันธะได้เรียกว่า ฟังก์ชันนาลิตี (functionality) มอนอเมอร์บางชนิด เช่น กรดไฮดรอกซี (HO-R-COOH) หรือไวนิลคลอไรด์ (CH_2=CHCl) เป็นสารที่มีหมู่ฟังก์ชัน 2 หมู่ (bifunctional compound) กรดไฮดรอกซีจะควบแน่นกับอีกโมเลกุลหนึ่งของกรดไฮดรอกซีผ่านหมู่ –OH และ –COOH เกิดพอลิเมอร์เส้นตรง (linear polymer)

พันธะคู่ของสารประกอบไวนิลก็เป็นสารที่มีหมู่ฟังก์ชัน 2 หมู่เช่นเดียวกัน เมื่อถูกกระตุ้นด้วยอนุมูลอิสระหรือด้วยไอออนทำให้เกิดพอลิเมอร์ มอนอเมอร์ที่มีหมู่ฟังก์ชัน 2 หมู่ทำให้เกิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พอลิเมอร์เส้นตรง แต่ถ้าเป็นมอนอเมอร์ที่มีหมู่ฟังก์ชันหลายหมู่ (polyfunctional monomer) ซึ่งเป็นสารที่มีบริเวณที่เกิดพันธะได้ 3 แห่ง หรือมากกว่า 3 แห่ง เช่น กลีเซอรอล ($HOCH_2CHOHCH_2OH$) จะเกิด พอลิเมอร์โซ่กิ่ง (branched polymer) โมเลกุลเหล่านี้อาจจะทำให้เกิดโครงสร้างตาข่ายสามมิติ (three-dimensional network) ซึ่งประกอบด้วยโซ่กิ่งและการเชื่อมข้ามพันธะ (crosslink)

พอลิเมอร์ที่เกิดขึ้นจากมอนอเมอร์ชนิดเดียวกัน เรียกว่า โฮโมพอลิเมอร์ (homopolymer) ปกติมักหมายถึงพอลิเมอร์ ถ้าสายโซ่ประกอบด้วยหน่วยมอนอเมอร์ที่แตกต่างกัน 2 ชนิด พอลิเมอร์ที่ได้เรียกว่า พอลิเมอร์ร่วม หรือโคพอลิเมอร์ (copolymer) ถ้าพอลิเมอร์แตกต่างกัน 3 ชนิดในสายโซ่เรียกว่า เทอร์พอลิเมอร์ (terpolymer)

พอลิเมอร์อาจแบ่งเป็นพอลิเมอร์ชีวภาพ (biopolymer) และพอลิเมอร์สังเคราะห์ (synthetic polymer) พอลิเมอร์สังเคราะห์ในยุคแรกๆ ได้จากพอลิเมอร์ที่มีอยู่ในธรรมชาติ เช่น เซลลูลอยด์ (เซลลูโลสไนเตรต), เรยอน (เซลลูโลสอะซีเตต) ในปัจจุบันมีพอลิเมอร์มากมาย เช่น Polyethylene, polystyrene, nylon เป็นต้น ซึ่งได้จากการสังเคราะห์เท่านั้น ในบางกรณีพอลิเมอร์ในธรรมชาติ เช่น ยางธรรมชาติ (Hevea rubber) มีโครงสร้างเป็น cis-1,4-polyisoprene นั้นในปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์สามารถสังเคราะห์ขึ้นได้

พอลิเมอร์ที่สามารถยืดออกได้มากที่อุณหภูมิห้องนำไปใช้เป็นอิลาสโตเมอร์ (elastomer) เช่น ยางธรรมชาติ นอกจากยางธรรมชาติแล้วยังมีอิลาสโตเมอร์สังเคราะห์อื่นๆ ได้แก่ ยางไนไตรล์ (nitrile rubber) ยางบิวไทล์ (butyl rubble) พอลิเมอร์อื่นๆ ที่มีลักษณะเป็นเส้นใย (fibre) ใช้ทำเสื้อผ้า เส้นใยสังเคราะห์ที่สำคัญ คือ ไนลอน และพอลิเอสเทอร์ใช้แทนเส้นใยที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติได้ดี เช่น ฝ้าย ไหม และขนสัตว์

นอกจากคำว่า พอลิเมอร์ วัสดุในทางอุตสาหกรรมที่ไม่จัดอยู่ในประเภทอิลาสโตเมอร์ และเส้นใยซึ่งได้มาจากพอลิเมอร์สังเคราะห์ เรียกว่า พลาสติก เรซินพลาสติกในทางการค้าบางชนิดอาจจะประกอบด้วยพอลิเมอร์ 2 ชนิด หรือมากกว่า 2 ชนิด นอกจากนี้มีการใส่สารตัวเติม (additive) และ ฟิลเลอร์ (filler) ต่างๆ เพื่อให้สมบัติบางประการดีขึ้น เช่น ความสามารถในการแปรรูป ทนต่อความร้อนหรือสิ่งแวดล้อม และมีสมบัติเชิงกลดีขึ้น

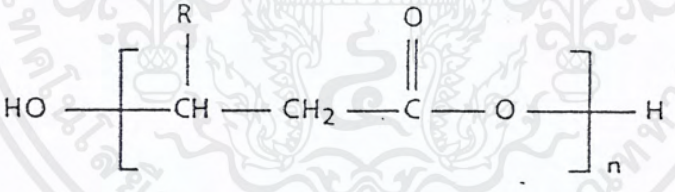
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 **พอลิเอสเทอร์ (Polyester)** (Griffin, 1994)

พอลิเอสเทอร์เป็นพอลิเมอร์ที่เกิดโดยการรวมตัวของพอลิไฮดริกอัลกอฮอล์ (Polyhydric alcohols) เช่น โพรพิลีนไกลคอล (Propyleneglycol), มาเลอิค (Maleic) หรือ ทาแรฟทาลิค (Terephthalic)

พอลิเอสเทอร์มีความถ่วงจำเพาะระหว่าง 1.1-1.5 ผิวหน้ามีความแข็งแรงพอสมควร ถูกแดดจะซีด ทนสภาพอากาศภายนอกได้ดี มีสีต่างๆ มากมาย และสามารถหดตัวได้เล็กน้อย พอลิเอสเทอร์เป็นฉนวนไฟฟ้าที่ดี ทนต่อกรดด่างชนิดอ่อนได้ ไม่ทนสารละลายชนิด Chlorinated Solvents เช่น คาร์บอนเตตระคลอไรด์ อะซีโทน ถ้าพอลิเอสเทอร์อยู่ในรูปไฟเบอร์กล๊าส จะทนร้อนได้ระหว่าง 250-350 องศาฟาเรนไฮต์ พอลิเอสเทอร์ที่นำไปหล่อเป็นผลิตภัณฑ์แล้วติดไฟได้ช้าและดับเองได้ (พิชิต, 2538)

พอลิเอสเทอร์ที่ได้มาจากแบคทีเรีย เรียกว่าไบโอพอลิเอสเทอร์ ส่วนมากจะมีมอนอเมอร์เป็นสารพวกกรดโฮดรอกซีอัลคาโนอิก (hydroxyalkanoic acid) โดยปกติมักจะเป็น β-hydroxyalkanoic acids ซึ่งมีโครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 2.1 พอลิเมอร์ในกลุ่มของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (Polyhydroxyalkanoate, PHA) เช่น Poly-β-hydroxybutyrate (PHB) สามารถผลิตได้จากแบคทีเรียตัวอย่างของมอนอเมอร์ในพอลิเมอร์กลุ่มนี้แสดงในตารางที่ 2.1



R = methyl; β-hydroxybutyrate *(HB)*

R = ethyl; β-hydroxyvalerate *(HV)*

R = propyl; β-hydroxycaproate *(HC)*

R = butyl; β-hydroxyheptanoate *(HH)*

R = pentyl; β-hydroxyoctanoate *(HO)*

R = hexyl; β-hydroxynonanoate *(HN)*

R = heptyl; β-hydroxydecanoate *(HD)*

R = octyl: β-hydroxyundecanoate *(HUD)*

รูปที่ 2.1 โครงสร้างทั่วไปของ poly-(β-hydroxyalkanoate)

ที่มา : Griffin (1994)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 มอนอเมอร์ของ Polyhydroxyalkanoate ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

โครงสร้างโซ่ข้าง –R	หน่วยหลัก	จุลินทรีย์	สารตั้งต้น
โซ่ข้างแบบอิ่มตัว	3-hydroxybutanoic acid(n=0)	*Alcaligens eutrophus*	glucose
	3-hydroxypentanoic acid(n=1)	*A. Eutrophus*	propionic acid
	3-hydroxyhexanoic acid(n=2)	*Rhodococcus rubsr*	hexnoate
	3-hydroxyheptanoic acid(n=3)	*Pseudomonas oleovorans*	heptanoate
	3-hydroxyoctanoic acid(n=4)	*Pseudomonas sp.*	gluconate
	3-hydroxynonanoic acid(n=5)	*Ps. oleovorans*	nonanoate
	3-hydroxydecanoic acid(n=6)	*Pseudomonas sp.*	gluconate
	3-hydroxyundecanoic acid(n=7)	*Ps. oleovornas*	decanoate
	3hydroxydodecanoic acid(n=8)	*Ps. putida*	oleic acid
ซ่ข้างแบบไม่อิ่มตัว			
	3-hydroxy-4-hexenoic acid(n=0)	*Ps. oleovorans*	3-hydroxy-6-octenoate
	3-hydroxy-6-octenoic acid(n=2)	*Ps. oleovorans*	3-hydroxy-7-octenoate
	3-hydroxy-4-pentenoic acid(n=0)	*Rhodococcus rubrum*	4-pentenoic acid
	3-hydroxy-5-hexenoic acid(n=1)	*Ps. oleovorans*	octene
	3-hydroxy-7-octenoic acid(n=3)	*Ps. oleovorans*	octene
	3-hydroxy-8-nonenoic acid(n=4)	*Ps. oleovorans*	nonene
	3-hydroxy-9-decenoic acid(n=5)	*Ps. oleovorans*	decene

ที่มา : Gerald (1995)

ตารางที่ 1 มอนอเมอร์ของ Polyhydroxyalkanoate ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ (ต่อ)

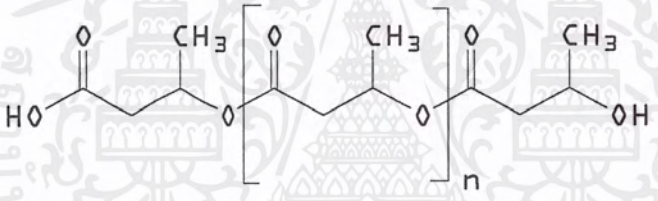
โครงสร้างโซ่ข้าง -R	หน่วยหลัก	จุลินทรีย์	สารตั้งต้น
โซ่ข้างแบบกิ่งก้าน			
	3-hydroxy-4-methylhexanoic acid(n=0)	*Ps. oleovorans*	octanoate/6-methyloctanoate
	3-hydroxy-6-methyloctanoic acid(n=2)	*Ps. oleovorans*	octanoate/6-methyloctanoate
	3-hydroxy-5-phenylpentanoic acid(n=1)	*Ps. oleovorans*	3-hydroxy-7-methyloctanoate
โซ่ข้างที่มีธาตุ			
ฮาโลเจน	3-hydroxy-7-methyloctanoic acid(n=3)	*Ps. oleovorans*	3-hydroxy-7-methyloctanoate
	3-hydroxy-6-bromohexanoic acid(n=2)	*Ps. oleovorans*	6-bromohexanoate/nonanoate
โซ่ข้างแบบวง			
	3-hydroxy-5-phenylpentanoic acid(n=1)	*Ps. oleovorans*	8-bromohexanoate/nonanoate
	3-hydroxy-5-phenylpentanoic acid(n=1)	*Ps. oleovorans*	5-phenylvleric acid
ไม่มีโซ่ข้าง			
	4-hydroxybutanoic acid	*Alcaligenes eutrophus*	4-hydroxybutanoic acid
	5-hydroxypentanoic acid	*A. eutrophus*	5-chloropentanoic acid

ที่มา : Gerald (1995)

2.4 Poly-β-hydroxybutyrate(PHB) (Griffin,1994)

ได้มีการกล่าวถึง Poly-β-hydroxybutyrate (PHB) ในทางจุลชีววิทยาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1901 โดยในปี ค.ศ. 1925 Maurice Lemoigne ในปี ค.ศ. 1925 เขากล่าวถึงส่วนประกอบที่คล้ายไขมันในรูปของกรานูล (granule) ในไซโตพลาสซึมของแบคทีเรีย โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ในการตรวจสอบ

ในปี ค.ศ. 1952 Kepes และ Peaud Lenoel ได้ศึกษาส่วนประกอบของพอลิเอสเทอร์ที่แยกได้โดย Lemoigne ซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของสายพอลิเอสเทอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลมาก ด้วยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส จะพบว่ามีหมู่ของ carboxylic acid ที่ปลายข้างหนึ่งของสายพอลิเอสเทอร์ และหมู่ของอัลกอฮอล์ที่ตำแหน่งอื่นๆ มีโครงสร้างแสดงในรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 โครงสร้างของ poly-(β-hydroxybutyrate)
ที่มา : Griffin (1994)

PHB เป็นวัตถุดิบในการทำเทอร์โมพลาสติก เนื่องจาก PHB เป็นเรซินที่มีความหนืดสูง และสามารถทำให้เป็นรูปร่างต่างๆได้ที่อุณหภูมิใกล้เคียงหรือมากกว่าจุดหลอมเหลว เมื่อเปรียบเทียบ คุณสมบัติระหว่าง PHB กับ Polypropylene (ตารางที่ 2.2) จะเห็นว่าพอลิเมอร์ทั้ง 2 ชนิด มีจุดหลอมเหลว ค่าการเกิดผลึก และอุณหภูมิการกลายเป็นแก้ว มีค่าใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ตาม PHB เปราะมากกว่า Polypropylene ความเปราะของ PHB ดูได้จากขนาดของผลึก และยังมีคุณสมบัติที่แตกต่างกันอีก คือ PHB มีความทนต่อตัวทำละลายได้น้อย แต่มีความทนต่อรังสีอัลตราไวโอเลตในธรรมชาติมากกว่า Polypropylene

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 คุณสมบัติทั่วไปของ PHB เปรียบเทียบกับ Polypropylene (PP)

คุณสมบัติ	PHB	PP
Crystalline melting point (^{o}C)	175	176
Crystallinity (%)	80	70
Molecular weight (daltons)	5×10^5	2×10^5
Glass transition temperature (^{o}C)	- 4	- 10
Density (g cm^{-3})	1.250	0.905
Flexural modulus (GPa)	4.0	1.7
Tensile strength (MPa)	40	38
Extension to break (%)	6	400
Ultraviolet resistance	good	poor
Solvent resistance	poor	good

ที่มา : Griffin (1994)

ได้มีการศึกษารายละเอียดเกี่ยวกับผลของอุณหภูมิต่อการสลาย PHB โดยใช้วิธีทำให้เป็นไอโดยให้ความร้อน เมื่อให้ความร้อนจาก 0 จนถึง 338 องศาเซลเซียส ภายใต้สูญญากาศ ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจาก PHB ได้แก่ กรดไอโซโครโทนิค (isocrotonic acid) 0.9 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก, กรดโครโทนิค (crotonic acid) 35.3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และ ไดเมอร์ (dimer) 41.2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก, ไตรเมอร์ (trimer) 12.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และเตตระเมอร์ (tetramer) 2.9 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ของ PHB เมื่อให้ความร้อนต่อไปจนถึง 500 องศาเซลเซียส จะได้ กาก 4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และยังเกิด คาร์บอนไดออกไซด์ (carbon dioxide), โพรพีน (propene), คีทีน (ketene) , อะซีทัลดีไฮด์ (acetaldehyde) และ เบตา-บิวทีโรแลคโทน (β-butyrolactone) ในกระบวนการนี้ด้วย

2.5 การสังเคราะห์ PHB ทางชีวภาพ (Biosynthesis of PHB) (Griffin, 1994)

มีแบคทีเรียที่อยู่ในสภาวะที่ใช้อากาศและไม่ใช้อากาศหลายชนิดที่สามารถสังเคราะห์ PHA หรือ PHB ไว้ภายในเซลล์ ซึ่งอยู่ในรูปซับไมครอน (sub-micron) เมื่ออยู่ภายใต้สภาวะที่มีการจำกัดแหล่งอาหารด้วยการให้แหล่งคาร์บอนให้พอเพียง เช่น ไนโตรเจน (Merrick และ Doudoroff, 1961)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (scanning electron micrograph, SEM) ในการดูเซลล์ของแบคทีเรีย จะเห็น PHB อยู่ในรูปกรานูล (Anderson และ Dawes, 1990) รูปร่างทรงกลมเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.5 ไมโครเมตร (รูปที่ 2.3) ปริมาณของ PHB ในเซลล์แบคทีเรีย จะอยู่ประมาณ 1-30 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง อย่างไรก็ตามภายใต้การควบคุมสภาวะในการหมัก โดยการจำกัดไนโตรเจนหรือออกซิเจน *Azotobacter* และ *Alcaligenes species* บางชนิดสามารถสะสมพอลิเมอร์ได้ถึง 90 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้งชีวภาพ และมีเชื้อบางชนิดที่สามารถเลี้ยงในสารพิษได้เช่น *Ralstonia eutropha* และ *Variovorax paradoxus* (Maskow, 1999)

รูปที่ 2.3 ภาพ PHB ที่สะสมอยู่ในเซลล์ของเชื้อ *Alcaligenes eutrophus*
ที่มา : http://perso.infonie.fr/snurve/biopolymers.htm

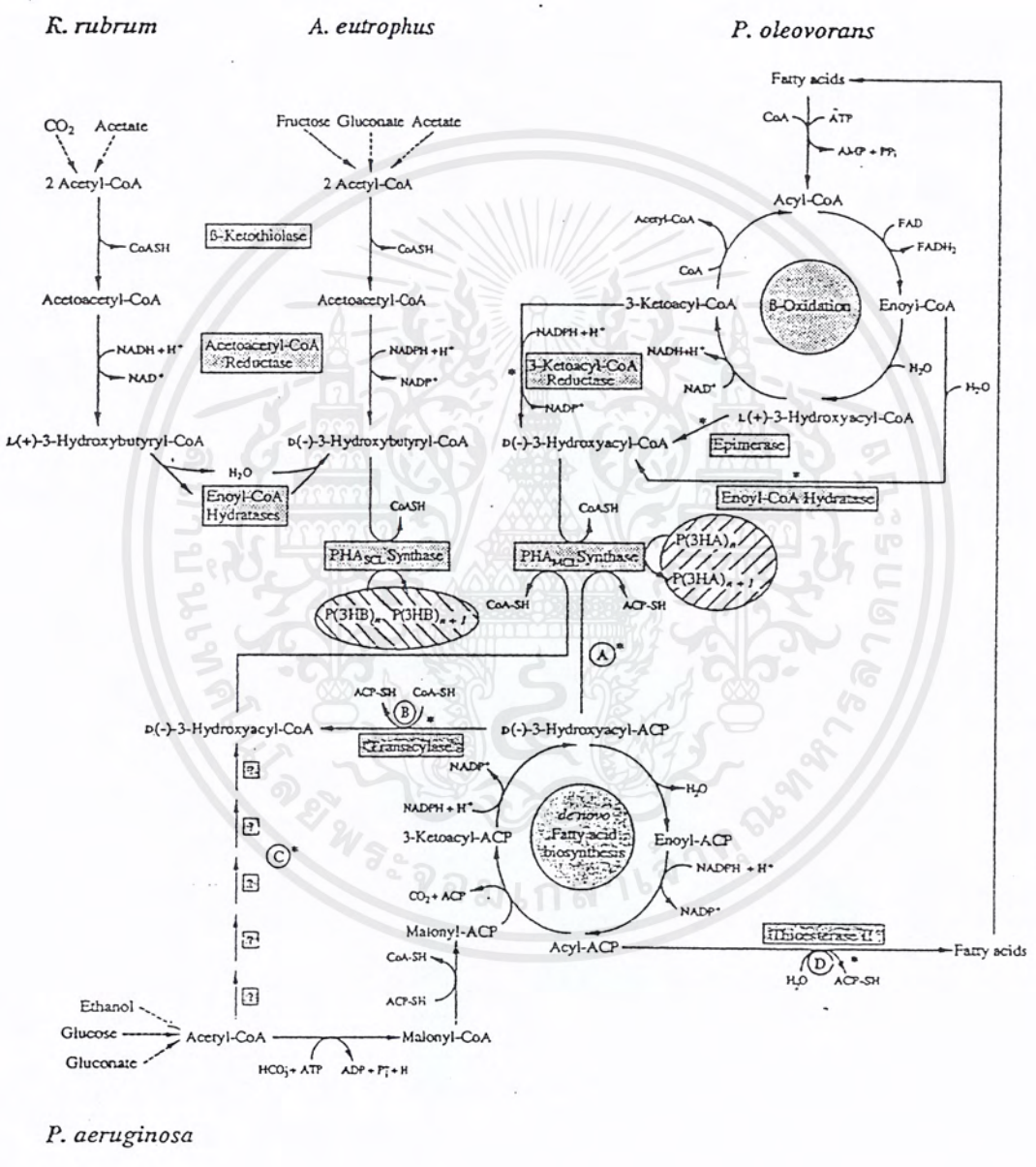
PHB ที่สะสมอยู่ในเซลล์เป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่ประกอบด้วย ไขมัน โปรตีน หรือ เกลือของพอลิเมอริกแอนไอออน (Polymeric anions) สามารถแยกออกมาเป็นพอลิเมอร์ที่เป็นโซ่สั้นๆ (130-200 หน่วย) จากเซลล์เมมเบรนของแบคทีเรีย และจากพืช และเนื้อเยื่อของสัตว์ ส่วนใหญ่จะพบ PHBน้อยมาก (ต่ำกว่า 0.01 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง) สารประกอบเชิงซ้อนของ PHB ที่ประกอบด้วย serum albumin มีความหนาแน่นของไลโปโปรตีนต่ำมาก

ได้มีการศึกษาหลายอย่างที่ทำให้รู้วิถีของกระบวนการสังเคราะห์ (metabolic synthesis) และ การย่อยสลาย (degradation) ของ PHB ในจุลินทรีย์ดังวิถีการสังเคราะห์ PHB แสดงในรูปที่ 2.4 เพื่อเป็นการยืนยันจึงมีการทดลองโดยใช้ ^{13}C ใส่ในสารตั้งต้น และ ^{14}C nuclear magnetic resonance (NMR) วิเคราะห์เพื่อแยก PHB การสร้างอะซีทิลโคเอนไซม์เอ (acetyl-CoA) ซึ่งผลิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากอาหารที่มี กลูโคส ฟรุกโทส ซูโครส เมทานอล กรดอะซิติก หรือสารผสมระหว่างคาร์บอนไดออกไซด์-ไฮโดรเจน เอนไซม์ β-ketothiolase จะเปลี่ยนอะซิทิลโคเอนไซม์เอ 2 โมเลกุล ไปเป็นอะซิโตอะซิทิลโคเอนไซม์เอ (acetoacetyl-CoA) คือการรีดิวซ์ไปเป็นอาร์-เบตา-ไฮดรอกซีบิวทีริลโคเอนไซม์เอ (R-β-hydroxybutyryl-CoA) โดย NADPH อิสระ และเอนไซม์ acetoacetyl-CoA reductase ขั้นตอนสุดท้ายของกระบวนการสังเคราะห์ทางชีวภาพ เป็นการทำงานของเอนไซม์ PHB syntase

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

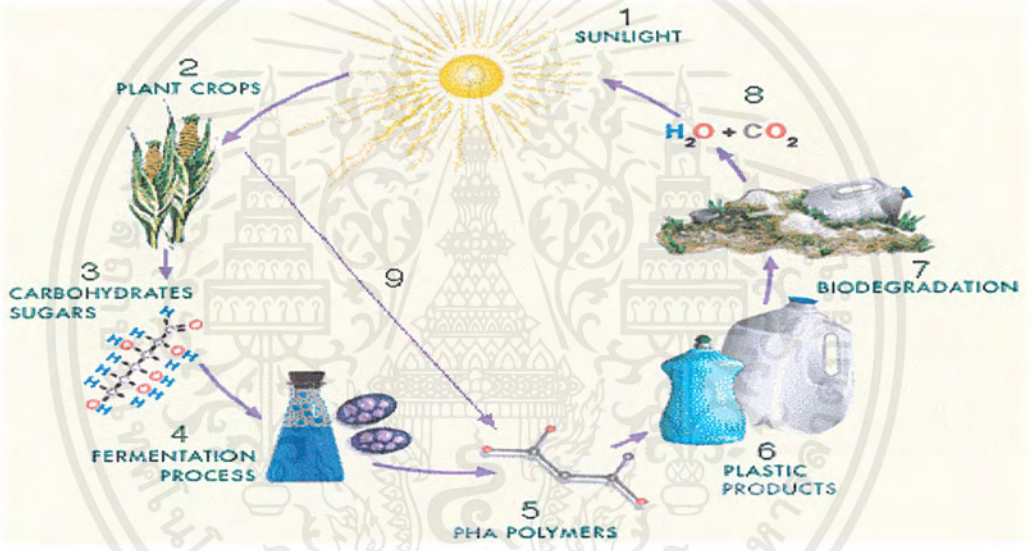


รูปที่ 2.4 วิถีการสังเคราะห์ PHB ของเชื้อ *R. rubrum*, *A. eutrophus* และ *P. oleovorans*

ที่มา : Rehn (1988)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การผลิต PHB โดยใช้จุลินทรีย์ เริ่มจากธัญพืชถูกเปลี่ยนเป็นน้ำตาลกลูโคส จากนั้นเข้าสู่ถังหมักซึ่งมีแบคทีเรียทำหน้าที่เปลี่ยนจากน้ำตาลกลูโคสเป็น PHB เพื่อนำไปแปรรูปผลิตภัณฑ์พลาสติก ภายหลังการใช้งาน PHB ถูกกำจัดได้ 3 ทาง คือ นำกลับมาใช้ใหม่ (recycled) นำไปถม (landfill) และถูกย่อยสลายโดยแบคทีเรีย (biodegrade) ได้เป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์กับน้ำสำหรับการสังเคราะห์แสงของพืชต่อไป วัฏจักร PHB สามารถสรุปได้ดังรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 วัฏจักรของ PHB

ที่มา : http://perso.infonie.fr/snurve/biopolymers.htm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 การนำ PHB ไปใช้ประโยชน์

ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่ได้จาก PHB (ตารางที่ 2.3) ในชื่อทางการค้าคือ BIOPOL ซึ่งจะนำไปทำขวดแชมพู ด้ามมีดโกน BIOPOLเคลือบกระดาษ หมุดตั้งลูกกอล์ฟ และตาข่ายดักปลา (Lee, 1998)

ตารางที่ 2.3 ตัวอย่างการนำ PHB ไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ

ประเภท	การนำไปใช้ประโยชน์
อุตสาหกรรมบรรจุภัณฑ์	-ขวด
	-ถุงพลาสติก
	-ฟิล์ม
	-บรรจุภัณฑ์ชิ้นเล็กๆ
	-เคลือบกระดาษ
เกษตรกรรม	-ฟิล์มคลุมต้นไม้
	-ท่อระบายน้ำ
อุตสาหกรรมประมง	-แหดักปลา
การแพทย์และเภสัชกรรม	-เย็บแผลในการศัลยกรรม ตกแต่งบาดแผล
	-สารหล่อลื่นสำหรับถุงมือแพทย์
	-หลอดเลือดเทียม
	-หลอดฉีดยา
	- ระบบขนส่งสารปรุงแต่ง
อุตสาหกรรมอาหาร	-อิมัลซิไฟเออร์
	- ตัวกรองบุหรี่
อุตสาหกรรมยาสูบ	- วัตถุดิบการทำสี
อุตสาหกรรมเคมี	- ขาตั้งลูกกอล์ฟ
อื่นๆ	- กระถางดอกไม้
	- แสตมป์

ที่มา : Rehn (1988)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลายประเทศในโลกได้มีการพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่ได้จาก PHAs และ PHB ในที่นี้มีเพียงบริษัท ZENECA ที่ผลิต P(3HB) และ P(3HB-co-3HV) ในระดับอุตสาหกรรม ผลิตภัณฑ์ที่ได้จาก P(3HB-co-3HV) มีชื่อทางการค้าว่า BIOPOL มีการผลิตประมาณ 1000 ตันต่อปี (Lee, 1998)

BIOPOL เป็นวัสดุทางการค้าเพียงตัวเดียวที่ได้จากการใช้แบคทีเรีย พอลิเมอร์ตัวนี้สามารถที่จะไปใช้ในกระบวนการต่างๆ และส่วนมากจะใช้ในการผลิตวัสดุที่ได้จากกระบวนการหลอมพลาสติก ตัวอย่างเช่น ขวดที่ได้จากการการเป่าพลาสติกเข้าแม่พิมพ์, ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการฉีดพลาสติก, ฟิล์ม และ ชีท โดยกระบวนการรีดพลาสติก (extrusion processes) และยังสามารถนำมาเคลือบกระดาษ และ บอร์ด เพื่อที่จะทำให้มีคุณสมบัติทนความร้อน ความชื้น และมีความแข็งแรง ทนทานมากขึ้น (Gerrald, 1995)

ในปี ค.ศ. 1990 บริษัท "Wella" เป็นบริษัทที่ทำผลิตภัณฑ์เกี่ยวกับเส้นผม ได้ริเริ่มการนำ PHB มาผลิตเป็นขวดยาสระผมเป็นรายแรก จากนั้น ขวดสำหรับเครื่องสำอางชนิดอื่นๆ ก็เริ่มถูกนำเข้าสู่ตลาดประเทศญี่ปุ่นรวมทั้งผลิตภัณฑ์อื่นๆด้วย อย่างไรก็ตาม ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากพอลิเอสเทอร์ ไม่ใช่เพียงภาชนะหรือถุงเท่านั้น PHBยังสามารถนำไปเคลือบผลิตภัณฑ์อื่นๆ เช่น ถ้วย กระดาษ กระดาษรองถาด หรือ บรรจุภัณฑ์สำหรับใส่อาหาร ส่วนประกอบของ PHB จะไปช่วยป้องกันกระดาษหรือแผ่นการ์ดไม่ให้เกิดความเสียหายจากความชื้นของอาหารที่บรรจุ หรือจากสิ่งแวดล้อม การทนต่อความชื้นเป็นคุณสมบัติที่เกิดจากการผสมระหว่างวัตถุดิบที่ไม่มีขั้วกับลามิเนต (laminated) ของ polyester Biopol เป็นชื่อทางการค้าภายใต้ข้อตกลงโดย the European และ U.S. FDA สำหรับใช้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีการสัมผัสกับอาหาร (Zeneca, 1993)

ในทางการแพทย์และเภสัชกรรม ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของ PHB ทำให้เกิดเป็นคีโตนบอดีในซีรัม ซึ่งเป็นสารตัวกลางในเมตาบอลิซึมของสัตว์และมนุษย์ ซึ่งไม่สามารถสรุปได้ว่า พอลิเอสเทอร์เป็นสารที่มีความเป็นพิษสูงต่อเนื้อเยื่อสัตว์ แต่มีความเป็นไปได้สูงที่พอลิเอสเทอร์จะไม่เกิดปัญหากับมนุษย์เพราะว่า ความเข้มข้นของ PHB ในซีรัมของมนุษย์มีปริมาณต่ำมาก ทำให้มีการใช้ PHB ในทางการแพทย์และเภสัชกรรม มีการใช้ PHB เพื่อผลิตเป็นตัวดูดซับและเย็บแผลในการศัลยกรรม (Grace, 1966) PHB จะถูกดูดซับอย่างช้าๆ และมีความเข้ากันได้กับร่างกายของมนุษย์ และยังใช้ซ่อมแซมเยื่อหุ้มหัวใจหลังจากมีการทำศัลยกรรมหัวใจ การใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์อื่นๆ ก็คือ มอนอเมอร์ (HB) เป็นสารอาหารที่ดีกว่ากลูโคส และยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้เข้าไปในหลอดเลือดระหว่างการทำศัลยกรรม ความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพของ PHB ได้ถูกนำมาใช้ประโยชน์โดย PHB มาผลิตเป็นบรรจุภัณฑ์ในการเก็บฮอร์โมนที่ควบคุมการตกไข่ของลิงตัวเมีย (Fraser, 1989)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ในทางเกษตรกรรมได้นำ PHB ไปผลิตเป็นฟิล์มคลุมดินรอบต้นไม้ ทำท่อต่อน้ำ และเป็นสารช่วยลดความเร็วเพื่อควบคุมการฉีดยาฆ่าแมลง, ยาฆ่าหญ้า, ปุ๋ย ซึ่งการใช้ประโยชน์เหล่านี้ไม่จำเป็นต้องใช้พอลิเอสเทอร์บริสุทธิ์มากเท่าในทางการแพทย์ และการบรรจุอาหาร (Rehm, 1988)

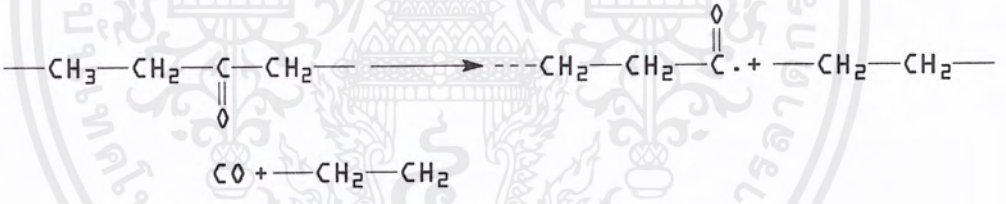
2.7 การสลายตัวของพลาสติก (เกียรติศักดิ์, 2535)

การสลายตัวของพอลิเมอร์สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด คือ

1. **การสลายตัวโดยใช้แสง** (Photodegradation)

การสลายตัวโดยใช้แสง เป็นวิธีที่อาศัยรังสีอัลตราไวโอเล็ตในแสงแดดเป็นตัวทำให้สายของ พอลิเมอร์แตกออกเป็นส่วนเล็กๆ พอลิเมอร์จะเสียสมบัติทางกายภาพ ทำให้ กรอบไม่แข็งแรง ในที่สุดก็จะสลายเป็นชิ้นเล็กชิ้นน้อยไป ตัวอย่างปฏิกิริยาในการสลายตัวโดยใช้แสงแสดงในรูปที่ 2.6 ซึ่งพอลิเมอร์ที่สามารถสลายตัวด้วยแสงได้ก็ถูกนำไปใช้ผลิตเป็นพลาสติกที่สามารถสลายตัวด้วยแสงแสดงดังตารางที่ 2.4

ปฏิกิริยาประเภท I (Norrish Type I Reaction)



ปฏิกิริยาประเภท II (Norrish Type II Reaction)

รูปที่ 2.6 การสลายตัวโดยแสงของพอลิเมอร์ร่วมระหว่างเอทิลีน และคาร์บอนมอนอกไซด์

ที่มา : เกียรติศักดิ์ (2535)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

39886

ตารางที่ 2.4 พลาสติกที่สลายตัวด้วยแสงทางการค้า

บริษัทที่ผลิต	ผลิตภัณฑ์	เรซิน	การใช้งาน
Ampacet	Poly-Grade	PE, PP	แผ่นฟิล์มโพลีเอททีลีน, บรรจุภัณฑ์ชนิดแข็ง
Enviromer Enterprise	Ecolyte Masterbatch	PE, PP PS	แผ่นฟิล์มเพื่อการเกษตร ถุงใส่ขยะ
Dow Chemical, Du pont, Union Carbide	E/CO	LDPE	Ring-loop connectors

ที่มา : เกียรติศักดิ์ (2535)

2.การย่อยสลายตัวทางชีวภาพ (Biodegradation)

การสลายตัวทางชีวภาพ มีกลไก และเงื่อนไขที่ต่างกัน การสลายตัวทางชีวภาพนั้น เกิดจากสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กมาก เช่น ฟังไจ (Fungi) หรือแบคทีเรีย ปล่อยเอนไซม์ ซึ่งเป็นสารเคมีออกมาย่อยสลาย การย่อยสลายทางชีวภาพ ได้ 2 วิธี คือ

1. ทำให้ตัวพลาสติกเองสามารถรับเอนไซม์ได้แล้วจึงเกิดการสลายตัวพลาสติกนี้เรียกว่าไบโอพอลิเมอร์ (Biopolymer) โดยบริษัท ICI ได้ผลิตพอลิเอสเทอร์ของ 3-hydroxybutanoic acid มีชื่อทางการค้าว่า Biopol ซึ่งผลิตได้จากน้ำตาลโดยใช้แบคทีเรีย และสามารถย่อยสลายได้โดยแบคทีเรียชนิดหนึ่งในดินชื่อว่า *Alcaligenes eutrophus* ได้เป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์กลับสู่อากาศ ไบโอพอลิเมอร์ที่ได้นำไปใช้ทำขวดแชมพู ถุงใส่ของ อุปกรณ์ทางการแพทย์ เป็นต้น

2. ใส่สารเติมแต่งที่สามารถย่อยสลายทางชีวภาพได้ (Additive based Polymer) เช่น ข้าวโพด ข้าว แป้ง ลงในพลาสติก เช่น Polyethylene, Polypropylene, Polystyrene เป็นต้น บริษัท St. Lawren Starch Co.,Ltd, Canada ได้ผลิตแป้งชนิดหนึ่งที่ปรับผิวให้เป็นส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic Surface) จากเดิมที่ผิวของแป้งเป็นส่วนที่ชอบน้ำ (Hydrophilic Surface) มีชื่อทางการค้าว่า "Ecostar System" การเกิดการสลายตัวเมื่อใส่ Ecostar system ลงในพลาสติก มีกลไกเกิดขึ้น 2 ขั้นตอน คือ

2.1 จุลินทรีย์จะเข้าจับเม็ดแป้งและแยกเม็ดแป้งออกจากพลาสติก ทำให้พลาสติกอ่อนลง และพื้นที่ผิวเพิ่มขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 โลหะ หรือน้ำที่มีอยู่ในดิน ทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ได้เปอร์ออกไซด์ (peroxide) เปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้น จะไปทำให้สายของพอลิเมอร์สั้นลง นั้นคือน้ำหนักโมเลกุลลดลง ทำให้จุลินทรีย์สามารถย่อยสลายพลาสติก ได้คาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำ

ปัจจัยที่มีผลต่อระยะเวลาในการย่อยสลายทางชีวภาพขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อมขณะนั้น เช่น ความชื้น อุณหภูมิ ปริมาณออกซิเจน ความเป็นกรด-เบส ชนิดของจุลินทรีย์ ที่สามารถปล่อยเอนไซม์ออกมาย่อยพลาสติก น้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ ชนิดของพลาสติก พื้นที่ผิว และความหนาของพลาสติก พอลิเมอร์ธรรมชาติใช้เวลาในการย่อยสลายเป็นวัน แต่พอลิเมอร์สังเคราะห์ใช้เวลาหลายปีในการสลายตัว ตัวอย่างพอลิเมอร์ที่สลายตัวทางชีวภาพดังตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 พลาสติกที่สลายตัวทางชีวภาพทางการค้า

บริษัทที่ผลิต	ผลิตภัณฑ์	เรซิน	การใช้งาน
Archer Doniels Midland	Poly Clean masterbatch	PE, PP, PS	ถุงใส่ขยะ, แผ่นฟิล์มที่ใช้สัมผัสอาหาร, ถุงช็อปปิ้ง
St. Lawerence Strach	Ecostar Masterbatch	PE	ถุงช็อปปิ้ง, งานเป่าขวด
Marborough Biopolymers Ltd.	Biopols	เทอร์โมพลาสติกพอลิเอสเทอร์	ผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์, งานเป่าขวด

ที่มา : เกียรติศักดิ์ (2535)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8 จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลาย PHB

จากการศึกษาต่างๆ เกี่ยวกับการย่อยสลายของ PHB ทางชีวภาพ ทำให้มีการค้นพบเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลาย PHB ได้ (ตารางที่ 2.6) ซึ่งพบได้ตามแหล่งต่างๆ ในธรรมชาติดังแสดงในตารางที่ 2.7

ตารางที่ 2.6 ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลาย PHB ได้

ประเภท	ชื่อเชื้อจุลินทรีย์
แบคทีเรีย	
- แกรมลบ	*Acidovorax facilis*
	Alcaligenes faecalis
	Comamonas tesrosteroni
	Ilyobacter delafieldii
	Pseudomonas fluorescens
	Pseudomonas lemoigeni
	Pseudomonas stutzeri
	Variovorax paradoxus
	Xanthomonas maltophilia
- แกรมบวก	*Bacillus megaterium*
	Arthrobacter viscosus
	Streptomyces sp.
รา	*Aspergillus fumigatus*
	Acremonium sp.
	Fusarium solani
	Paecilomyces marquandii
	Penicillium simplicissimum
	Eupenicillium sp.

ที่มา : Lee (1998); Vert (1989); Agarwal (1988)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.7 แหล่งธรรมชาติที่พบจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลาย PHB ได้

แหล่งธรรมชาติ	ชื่อเชื้อจุลินทรีย์
ดิน	*Acidovorax facilis* *Aspergillus fumigatus* *Comamonas* sp. *Pseudomonas lemoignei* *Variovorax paradoxus*
Activated sludge	*Alcaligenes faecalis* *Pseudomonas fluorescens*
Anaerobic sludge	*Ilyobacter del*afieldii
ทะเลสาบ	*Pseudomonas stutzeri*
ทะเล	*Comamonas tesrosteroni*

ที่มา : Lee (1998)

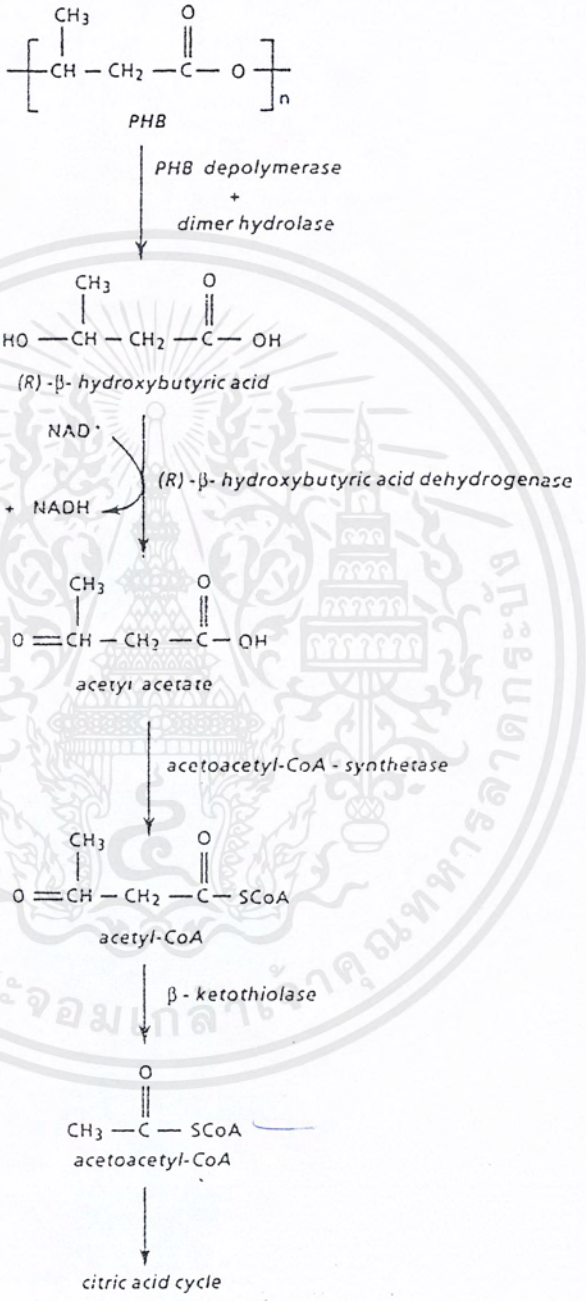
2.9 กลไกการย่อยสลาย PHB โดยจุลินทรีย์ (Griffin, 1994)

กลไกการย่อยสลายทางชีวภาพของ PHB แบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ การย่อยสลายภายในเซลล์ (intracellular biodegradation) และการย่อยสลายภายนอกเซลล์ (extracellular biodegradation) เมื่อผ่านกระบวนการย่อยสลายทั้ง 2 กลไกอย่างสมบูรณ์ จะได้คาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำออกมา ดังรายละเอียดต่อไปนี้

1. การย่อยสลายภายในเซลล์ (intracellular biodegradation)

PHBจะถูกย่อยสลายพอลิเมอร์โดยเอนไซม์ PHB-depolymerase หลังจากนั้นจะถูกเอนไซม์ dimer hydrolase เปลี่ยนรูปไปเป็นกรดอาร์-เบตา-ไฮดรอกซีบิวทีริก (R-β-hydroxybutyric) กรดตัวนี้จะถูกออกซิไดซ์โดยเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนส (dehydrogenase) ให้อะซิทิลอะซิเตต (acetylacetate) และจะถูกเอสเทอริไฟด์ (esterified) ไปเป็นอะซิทิลโคเอนไซม์เอ (acetyl-CoA) โดยปฏิกิริยารีโทร-ไคลเซน (retro-Claisen) โดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาเป็นเอนไซม์ β-ketothiolase เอนไซม์ตัวนี้จะถูกใช้เพียงครั้งเดียวทั้งในการสังเคราะห์ทางชีวภาพ และการย่อยสลายทางชีวภาพ ในระบบที่มีออกซิเจน อะซิทิลโคเอนไซม์เอสามารถที่จะเข้าวัฏจักรเครบส์ (Kreb's Cycle) ต่อไปได้ เพื่อให้ได้พลังงานออกมา วิถีของการย่อย PHB ภายในเซลล์แสดงได้ดังรูปที่ 2.7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.7 วิถีการย่อยสลายภายในเซลล์ของ PHB

ที่มา : Griffin (1994)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การย่อยสลายภายนอกเซลล์ (Extracellular biodegradation)

การย่อยสลายภายนอกเซลล์ทำโดยเชื้อจุลินทรีย์มีการหลั่งเอนไซม์ depolymerase สู่สิ่งแวดล้อม ตัวอย่างแบคทีเรียบางชนิดเช่น *Pseudomonas lemoignei* หรือ *Alcaligenes faecalis* T1 สามารถเจริญบน PHA ได้ โดยหลั่งเอนไซม์ depolymerase มาย่อยสลายพอลิเมอร์ไปเป็นสายที่สั้นเป็นโอลิโกเมอร์ (oligomers) หรือไดเมอร์ (dimers) ภายหลังจากย่อยแล้วโอลิโกเมอร์จะกลายไปเป็นมอนอเมอร์ในที่สุด เอนไซม์ depolymerase นี้สามารถแยกได้จากเชื้อ *Commamonas* sp. ผลผลิตหลักที่ได้จากปฏิกิริยา PHB hydrolysis โดยใช้เอนไซม์บริสุทธิ์ก็คือ β-hydroxybutyrate

เอนไซม์ depolymerase ที่ผลิตจากเชื้อ *P. lemoignei* เป็นเอนไซม์ที่หลั่งออกมานอกเซลล์ (exoenzyme) ซึ่งจะมีการหลั่งออกมาในช่วงที่จุลินทรีย์กำลังเจริญเติบโตจะมีจำนวนเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสโดยเอนไซม์ที่หลั่งออกมาก็คือ β-hydroxybutyric acid เอนไซม์ depolymerase สามารถจะไฮโดรไลซ์ PHB และ oligomers แต่ไม่สามารถย่อยไดเมอริกเอสเทอร์ (dimeric ester) ได้ จากการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกระบวนการไฮโดรไลซิสอาจสรุปได้ว่า เอนไซม์ depolymerase ทำปฏิกิริยากับหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) ได้ดีมากกว่าหมู่คาร์บอกซิล (carboxyl group) ที่ปลายของโอลิโกเมอร์ และ มักจะไปแตกหมู่เอสเทอร์ (ester groups) หรือ พันธะสามที่ปลายหมู่ไฮดรอกซิล

2.10 การย่อยสลาย PHB ในสิ่งแวดล้อม (Rehm, 1988)

การย่อยสลายของ PHB เกิดขึ้นอย่างหลากหลายในสิ่งแวดล้อม โดยพบว่าประมาณ 55 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อเห็ดราที่แยกได้ มีความสามารถในการย่อยสลาย PHB จำนวนเชื้อแบคทีเรียที่นับได้จากตัวอย่างในสิ่งแวดล้อม เช่น น้ำที่ซะออกจากบริเวณที่ทำการถมที่ (landfill leachates), ดินป่า, ดินฟาร์ม, ทรายข้างถนน และบ่อตกตะกอน เมื่อเปรียบเทียบการสร้างโคโลนีที่ทำให้เกิดเคลียร์โซนบนอาหารแข็ง ที่มี PHB เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า มีจุลินทรีย์ที่ใช้อากาศและสามารถย่อยสลาย PHB ได้เท่ากับ 0.2-11.4 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อที่แยกได้

จากจุลินทรีย์ 256 ชนิดที่แยกได้จากตัวอย่างในสิ่งแวดล้อม เพื่อนำมาทดสอบการย่อยสลายPHB พบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบ 105 สายพันธุ์ ส่วนมากจะเป็น *Acidovorax facilis* และ *Variovorax paradoxus* อยู่ในจีนัส *Bacillus* 36 สายพันธุ์, *Streptomyces* 68 สายพันธุ์ และเห็ดรา 86 สายพันธุ์ ซึ่งส่วนมากอยู่ในจีนัส *Penicillum* หรือ *Aspergillus fumigatus* (Mergaert,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1993) จากการศึกษาชี้ให้เห็นว่า จำนวนแบคทีเรียที่ใช้อากาศในการย่อยสลาย PHB ในระบบนิเวศที่มีความแตกต่างกัน แสดงดังตารางที่ 2.8

ตารางที่ 2.8 จำนวนเซลล์ของแบคทีเรียในระบบนิเวศน์ต่างๆ

ระบบนิเวศน์	จำนวนเซลล์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)
ตะกอนของเสีย (Sewage sludge)	$1.2x10^5$
ตะกอนจากทะเลสาบ (Sludge of fresh-water lake)	$3.8x10^3$
ดินสวน (Garden soil)	$9.2x10^5$
ดินทุ่งนา (field soil)	$1.3x10^6$
ปุ๋ย (compost)	$4.3x10^6$

ที่มา : Briese (1944)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
การดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์การทดลอง

3.1.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการคัดเลือกเชื้อ

1. ตะเกียงอัลกอฮอล์
2. ลวดเขี่ยเชื้อ (loop)
3. ไม้จิ้มฟัน
4. เครื่องแก้วชนิดต่างๆ
5. แผ่นสไลด์
6. แผ่นสไลด์หลุม
7. กระจกปิดสไลด์ (Cover glass)
8. กล้องจุลทรรศน์
9. กล้องจุลทรรศน์ที่มีอุปกรณ์ถ่ายภาพ
10. เครื่องชั่ง
11. ช้อนตักสาร
12. ไมโครปิเปตต์ (micropipette) และทิบ (tip) ขนาดต่างๆ
13. คิวเวท (cuvette)
14. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow)
15. ตู้อบ (hot air oven)
16. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)
17. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อไฟฟ้า (Autoclave)
18. เครื่องสเปกโตโฟโตมิเตอร์ (spectophotometer) Shimadzu รุ่น uv-1601

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัด และวิเคราะห์ปริมาณ PHB

1. หลอดทดลองฝาเกลียว
2. กรวยแยก
3. เตาแก๊ส
4. ring stand
5. เข็มฉีดตัวอย่าง
6. เครื่องวิเคราะห์ก๊าซโครมาโตกราฟี (Gas Chromatography, GC) Shimadzu รุ่น GC-17A
7. Capillary column ความยาว 30 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.53 มิลลิเมตร เคลือบด้วย DB-Wax หนา 1 ไมโครเมตร (J&W Scientific Co.)
8. ปิเปตต์วัดปริมาตร (volumetric pepette) ขนาด 1 มิลลิลิตร
9. ขวดวัดปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 100 มิลลิลิตร

3.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

3.2.1 สารเคมีที่ใช้ในการคัดเลือกเชื้อ

1. Polyhydroxybutyrate (PHB)
2. 3-hydroxybutyrate Sodium Salt (D-3HB)
3. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)
4. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต-3-ไฮเดรท ($K_2HPO_4.3H_2O$)
5. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)
6. แมกนีเซียมซัลเฟต-7-ไฮเดรท ($MgSO_4.7H_2O$)
7. แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)
8. อัลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (95% v/v C_5H_2OH)
9. ไอโอดีน (I_2)
10. โพแทสเซียมไอโอไดด์ (KI)
11. น้ำยาแกรมไอโอดีน
12. สารละลายคริสทัลไวโอเลต (Cystal violet)
13. สารละลายซาฟรานิน (Safranin)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.2 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดและวิเคราะห์ปริมาณ PHB

1. คลอโรฟอร์ม ($CHCl_3$)
2. กรดเบนโซอิก ($C_7H_6O_2$)
3. เมทานอล (CH_3OH)
4. กรดซัลฟิวริก 96 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (96% v/v H_2SO_4)
5. น้ำกลั่น 2 ครั้ง (double distilled water)

3.2.3 อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ

1. Nutrient agar (NA)
2. Nutrient broth (NB)
3. 3-HB medium ในปริมาตร 1 ลิตร ประกอบด้วย

- ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต-3-ไฮเดรท ($K_2HPO_4.3H_2O$)	0.6 กรัม
- โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.2 กรัม
- แมกนีเซียมซัลเฟต-7-ไฮเดรท ($MgSO_4.4H_2O$)	0.2 กรัม
- แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)	0.2 กรัม
- 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรทโซเดียมซอลท์ (D-3HB)	0.5 กรัม

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. PHB medium ในปริมาตร 1 ลิตร ประกอบด้วย

- ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต-3-ไฮเดรท ($K_2HPO_4.3H_2O$)	0.6 กรัม
- โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.2 กรัม
- แมกนีเซียมซัลเฟต-7-ไฮเดรท ($MgSO_4.4H_2O$)	0.2 กรัม
- แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)	0.2 กรัม
- โพลิไฮดรอกซีบิวทิเรท (PHB)	0.5 กรัม

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.4 สารละลายที่ใช้ในการทดลอง

1. สารละลาย A (กรดซัลฟิวริก 3 มิลลิลิตร, เมทานอล 97 มิลลิลิตร และกรดเบนโซอิก 100 มิลลิกรัม)
2. สารละลายมาตรฐาน PHB ประกอบด้วย PHB 20 มิลลิกรัม ในคลอโรฟอร์ม (chloroform) 3 มิลลิลิตร
3. สารละลายน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ประกอบด้วย โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 8.5 กรัม ในน้ำ 1 ลิตร

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การเก็บตัวอย่าง

1. ตัวอย่างที่เป็นน้ำและน้ำเสียจะเก็บโดยใช้ขวดเก็บตัวอย่างพลาสติกชนิดที่ทำจากโพลีเอทิลีน ปิดขวดให้แน่น ส่วนตัวอย่างที่เป็นดินจะเก็บใส่ถุงพลาสติกปิดปากถุงให้แน่นเช่นเดียวกัน
2. จดบันทึกวัน เวลา และตำแหน่งที่เก็บตัวอย่าง
3. นำตัวอย่างทั้งดิน และน้ำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4-10 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาทำการทดลองขั้นต่อไป

3.3.2 การคัดแยกจุลินทรีย์

1. ปิเปตต์น้ำตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในสารละลายน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ 9 มิลลิลิตร และทำการเจือจาง (dilution) ที่ระดับความเจือจาง 10^{-1} - 10^{-6} เท่า
2. ปิเปตต์สารละลายเจือจางที่ 10^{-3} - 10^{-5} แต่ละความเข้มข้น 0.1 มิลลิลิตร มา spread บน NA ในจานเพาะเชื้อ แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง
3. คัดแยกเชื้อที่ลักษณะต่างๆ กันจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา บันทึกผล
4. ทำให้เชื้อบริสุทธิ์โดยเทคนิค cross streak บน NA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง 24-48 ชั่วโมง แล้วเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ใน slant
5. ตรวจการติดสีแกรมโดยการนำจุลินทรีย์มาเลี้ยงบน NA บ่มที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง แล้วนำมาย้อมสีแกรม จดบันทึกผลที่ได้

ในกรณีตัวอย่างที่เป็นดินจะชั่งดิน 1 กรัมละลายในสารละลายน้ำเกลือ 9 มิลลิลิตร แล้วทำการเจือจางที่ 10^{-1} - 10^{-6} และทำตามขั้นตอนเหมือนตัวอย่างที่เป็นน้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.3 การคัดเลือกเชื้อที่ย่อย PHB ได้ขั้นต้น โดยวิธี replica plating

1. ใช้เข็มเขี่ยเชื้อที่บริสุทธิ์แล้วแต่ละชนิด เขี่ยลงใน HB medium บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24-28 ชั่วโมง
2. ใช้ไม้จิ้มฟันที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเขี่ยโคโลนีที่เจริญบน HB medium ลงใน PHB medium

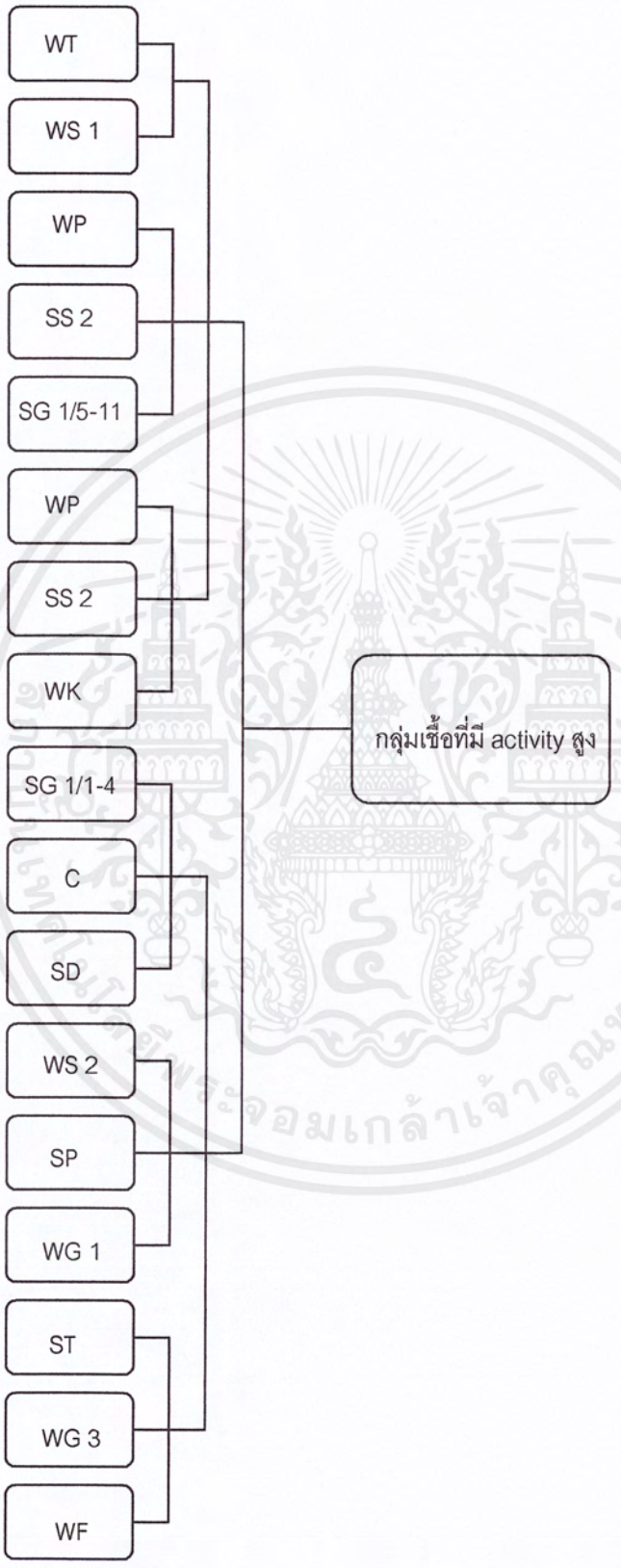
3.3.4 การคัดเลือกเชื้อที่ย่อย PHB ได้ขั้นที่สอง

1. ทำ Pre-culture โดยเขี่ยเชื้อจากแต่ละแหล่ง 1 ลูป ลงในอาหาร NB บ่ม 24 ชั่วโมง
2. นำเชื้อจาก Pre-culture ที่บ่มเลี้ยงแล้ว วัด OD_{600} ให้ได้เท่ากับ 0.5
3. นำ Pre-culture ของเชื้อที่แยกได้จากแหล่งเดียวกันเจือจางให้ได้ OD_{600}= 0.5 ถ่ายเชื้อทั้งกลุ่มลงใน PHB medium ขวดเดียวกันบ่มเชื้อผสม (mix culture) เป็นเวลา 7 วัน
4. นำเชื้อที่ได้ผสมกับเชื้อจากแหล่งอื่นๆ แล้วคัดเลือกอย่างต่อเนื่อง (Sequential screening) ดังแผนภาพในรูปที่ 3.1
5. แยกเชื้อผสมที่ได้ในขั้นสุดท้ายมาทำเป็นเชื้อบริสุทธิ์โดย cross streak บน NA บ่ม 24 ชั่วโมง สังเกตุลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการติดสีแกรม บันทึกผล แล้วเก็บรักษาใน slant

3.3.5 การศึกษาการเจริญเติบโต

1. เตรียม Pre-culture โดยเขี่ยเชื้อ 1 ลูปลงในอาหาร NB บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเจือจางให้ได้ OD_{600} เท่ากับ 0.5
2. ถ่ายเชื้อที่เจือจางได้ลงใน PHB medium 1 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรอาหาร
3. ทำการเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง และนำตัวอย่างที่ได้ไปนับจำนวนโคโลนีโดย spread ตัวอย่างบนอาหาร NA บ่ม 24 ชั่วโมง นับโคโลนีและจดบันทึกผล
4. เขียนกราฟการเจริญเติบโตแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเซลล์ (CFU/มิลลิลิตร) กับเวลา (ชั่วโมง) ของเชื้อบริสุทธิ์แต่ละชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.1 แผนภาพการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์แบบต่อเนื่อง (sequential screening)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.6 การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ในการย่อย PHB ได้ดีที่สุดโดยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟี

1. นำ PHB medium ที่เพาะเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์จำนวน 4 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองชนิดฝาเกลียว
2. เติมคลอโรฟอร์ม 3 มิลลิลิตร ปิดฝาให้แน่น แล้วนำไปแช่ในน้ำเดือดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง
3. ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วใช้กรวยแยก แยกชั้นที่เป็นคลอโรฟอร์ม เติมสารละลาย A
4. นำไปแช่ในน้ำเดือดเป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง แล้วทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
5. เติมน้ำกลั่น 1.5 มิลลิลิตร นำไปเขย่า แล้วใช้กรวยแยกแยกชั้นคลอโรฟอร์มที่ละลายอยู่
6. นำไปตรวจวิเคราะห์ปริมาณ PHB ที่เหลือในรูปเมทิลเอสเทอร์ (methyl ester) ด้วยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟี ซึ่งวิเคราะห์โดยใช้ GC-17A โดยใช้พารามิเตอร์ในตารางที่ 3.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1 พารามิเตอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟี

พารามิเตอร์	ค่าที่ใช้
Injection volumn	1 µl
Column Temperature	50 °C
Injector Temperature	200 °C
Detector Temperature	220 °C
Column Flow	3.37437 ml/min
Linear Velocity	24.4118 cm/s
Split Ratio	1:30
Operating Time	30 min
Program Temperature (4 steps)	1. 50 °C 1 min
	2. 8 °C/min,160 °C 5 min
	3. 200 °C 4 min
	4. 50 °C 3 min

3.3.7 หา normalized area ของ peak PHB ที่ได้จากสูตร

$$\text{normalized area ของ PHB} = \frac{\text{peak area ของ PHB}}{\text{peak area ของกรดเบนโซอิก}}$$

3.3.8 คำนวณปริมาณ PHB ที่ เหลือจากการย่อยสลายโดยใช้สูตร

$$\text{มวล PHB ที่เหลือในอาหาร 100 มิลลิลิตร (มิลลิกรัม)} = \frac{\text{20 มิลลิกรัม} \times A \times 100}{B \times 4}$$

เมื่อ A = normalized area ของ PHB ที่เหลือจากการย่อย

B = normalized area เฉลี่ยของ PHB มาตรฐาน จำนวน 20 มิลลิกรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและวิจารณ์

4.1 การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ย่อย PHB ได้

จากตัวอย่างดินและน้ำ 18 แหล่ง (ตารางที่ 4.1) ที่นำมาใช้ในการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อย PHB ได้นั้น สามารถคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์จากแหล่งดินและน้ำได้ 82 ไอโซเลต (isolate) มีจุลินทรีย์ที่เป็นแกรมบวก 19 ไอโซเลต คิดเป็น 23.17 เปอร์เซ็นต์ และแกรมลบ 63 ไอโซเลต คิดเป็น 76.83 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.2)

ตารางที่ 4.1 แหล่งที่มาของตัวอย่างดินและน้ำที่นำมาศึกษา

รหัส	แหล่งที่เก็บตัวอย่าง
WC	น้ำเสียจากโรงงานซี.พี. อินเตอร์ฟู้ด (ไทยแลนด์) จำกัด
WF	น้ำเสียจากโรงงานฟอกหนัง นิคมอุตสาหกรรมลาดกระบัง
WG1	น้ำทิ้งด้านหน้าโรงงาน GENCO จังหวัดระยอง
WG2	น้ำเสียจากกองกากของเสีย (landfill) โรงงาน GENCO จังหวัดระยอง
WG3	น้ำเสียจากบ่อบำบัดทางชีวภาพ โรงงาน GENCO จังหวัดระยอง
WK	น้ำจากสระข้างตึกกิจกรรม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าฯลาดกระบัง
WM	น้ำเสียจากโรงงาน มาลีสามพราน จำกัด
WP	น้ำเสียจากบ่อบำบัดชีวภาพ โรงงาน สยามคราฟ์อุตสาหกรรม จำกัด
WS1	น้ำทิ้งจากอาคารฝึกงานอุตสาหกรรมเคมีและพอลิเมอร์เทคโนโลยี สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าฯลาดกระบัง
WS2	น้ำจากบ่อใต้อาคารเรียนคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าฯลาดกระบัง
WT	น้ำเสียจากโรงงาน ธนากรผลิตน้ำมันพืช จำกัด
SD	ดินจากกองขยะลาดกระบัง ซอย อ่อนนุช 62
SG	ดินตะกอนในบ่อบำบัดชีวภาพ โรงงาน GENCO จังหวัดระยอง
SS1	ดินจากสระน้ำข้างตึกกิจกรรม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าฯลาดกระบัง
SS2	ดินจากสวนจตุจักร
ST	ดินจากหมู่บ้านสินธร บางกะปิ
SP	สลัดจ์จากโรงงาน สยามคราฟ์อุตสาหกรรม จำกัด
C	เชื้อปนเปื้อนระหว่างการวิจัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 เชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อย 3-HB และ PHB ได้

จำนวนจุลินทรีย์ที่แยกได้ (ไอโซเลต)	ชนิดอาหาร		
	NA	3-HB medium	PHB medium
จำนวนจุลินทรีย์ที่แยกได้	82	45	32
จำนวนจุลินทรีย์แกรมบวก	19	10	4
จำนวนจุลินทรีย์แกรมลบ	63	35	28

จุลินทรีย์ที่แยกได้จากตัวอย่างดินและน้ำนำมาคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อย 3-hydroxybutyrate (HB) ในอาหาร HB medium แล้วนำเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถใช้ HB เป็นแหล่งอาหารได้มาคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่ย่อย PHB ในอาหาร PHB medium โดยมี PHB เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงแหล่งเดียว (รูปที่ 4.1) ได้ผลดังตารางที่ 4.3 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์ทั้งหมดที่คัดแยกได้ 82 ไอโซเลต มีจุลินทรีย์ที่สามารถใช้ 3-HB เป็นแหล่งอาหารได้ 45 ไอโซเลต คิดเป็น 54.88 เปอร์เซ็นต์ เป็นจุลินทรีย์แกรมบวก 10 ไอโซเลต คิดเป็น 12.20 เปอร์เซ็นต์ และเป็นจุลินทรีย์แกรมลบ 35 ไอโซเลต คิดเป็น 42.68 เปอร์เซ็นต์ จากจุลินทรีย์ทั้งหมดที่คัดแยกได้มี จุลินทรีย์ที่สามารถย่อย PHB ได้ 32 ไอโซเลต คิดเป็น 39.02 เปอร์เซ็นต์ เป็นจุลินทรีย์แกรมบวก 4 ไอโซเลต คิดเป็น 4.89 เปอร์เซ็นต์ และเป็นจุลินทรีย์แกรมลบ 28 ไอโซเลต คิดเป็น 34.15 เปอร์เซ็นต์

PHB medium HB medium

รูปที่ 4.1 วิธีการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ขั้นต้นด้วยเทคนิค replica plating

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รายละเอียดของจำนวนจุลินทรีย์ที่ย่อย PHB ได้จากตัวอย่างแต่ละแหล่งแสดงในตารางที่ 4.3 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าตัวอย่างดินและน้ำ 10 ตัวอย่าง (WF, WG-1, WG-3, WK, WP, SD, SG, SS-2, ST และ C) มีจำนวนจุลินทรีย์ 50 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไปที่สามารถย่อย HB ได้ ในขณะที่ตัวอย่างดินและน้ำ 7 ตัวอย่าง (WF, WP, SD, SA, SS-2, ST และ C) ที่มีจำนวนจุลินทรีย์ 50 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป สามารถย่อย PHB ได้ จะพบในตัวอย่างดินมากกว่าตัวอย่างน้ำ จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์ที่สามารถย่อย HB ได้นั้น อาจไม่สามารถย่อย PHB ได้ อาจเนื่องมาจากจุลินทรีย์เหล่านั้นไม่มีเอนไซม์ depolymerase (Anderson และ Dawes, 1990)

ส่วนใหญ่เชื้อที่ย่อย HB และ PHB ได้นั้นจะมีลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์มีรูปร่างเป็นท่อนสั้น และกลมจำนวนใกล้เคียงกัน และติดสีแกรมลบเป็นส่วนใหญ่ รายละเอียดดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.3 จุลินทรีย์จากแหล่งต่างๆ ที่สามารถเจริญได้บนอาหาร NA, HB และ PHB medium

รหัส	จำนวนจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ (โคโลเนต)			เปอร์เซ็นต์จุลินทรีย์บน PHB medium
	NA	HB medium	PHB medium	
WC	3	0	0	0
WF	4	2	2	50
WG1	9	6	4	44.44
WG2	5	2	0	0
WG3	7	6	2	28.57
WK	3	3	1	33.33
WM	4	0	0	0
WP	4	3	3	75
WS1	3	1	1	33.33
WS2	3	1	1	33.33
WT	4	1	1	25
SD	2	1	1	50
SG	13	10	7	53.85
SS1	3	0	0	0
SS2	6	3	3	50
ST	5	4	4	80
SP	3	1	1	33.33
C	1	1	1	100

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง 4.4 เชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากตัวอย่างดินและน้ำที่ทำมาศึกษา

Code	ลักษณะโคโลนี					ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์		การย่อยสลาย	
	รูปร่าง	ผิวหน้า	สี	ความมันวาว	ขอบโคโลนี	รูปร่าง	สีแกรม	HB	PHB
WC-1	กลม	นูน	ขาวขุ่น	+	เรียบ	ท่อนสั้น	แดง	-	-
WC-2	กลม	แบน	ขาวขุ่น	+	โค้งเว้า	กลม	ม่วง	-	-
WC-3	กลม	นูน	ครีม	+	เรียบ	กลม	แดง	-	-
WF-1	กลม	แบน	เหลือง	-	เรียบ	กลม	ม่วง	+	+
WF-2	กลม	นูน	ครีม	+	เรียบ	กลม	แดง	+	+
WF-3	กลม	นูน	ใส	+	เรียบ	กลม	แดง	-	-
WF-4	กลม	นูน	ส้ม	+	หยัก	กลม	แดง	-	-
WG-1/1	กลม	นูน	แดง	+	เรียบ	แท่ง	แดง	+	+
WG-1/2	กลม	นูน	ชมพู	+	หยัก	แท่ง	แดง	+	-
WG-1/3	กลม	แบน	เหลืองเข้ม	+	เรียบ	แท่ง	แดง	+	+
WG-1/4	กลม	นูน	เหลืองใส	+	เรียบ	แท่ง	แดง	-	-
WG-1/5	กลม	นูน	ขาวขุ่น	+	เรียบ	ท่อนสั้น	แดง	+	+
WG-1/6	ไม่แน่นอน	แบน	ขาวอมเหลือง	+	โค้งเว้า	แท่ง	แดง	-	-
WG-1/7	ไม่แน่นอน	แบน	ขาวขุ่น	+	โค้งเว้า	ท่อนสั้น	ม่วง	+	-

ตารางที่ 4.4 เชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากตัวอย่างดินและน้ำที่ทำมาศึกษา (ต่อ)

Code	ลักษณะโคโลนี					ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์		การย่อยสลาย	
	รูปร่าง	ผิวหน้า	สี	ความมันวาว	ขอบโคโลนี	รูปร่าง	สีแกรม	HB	PHB
WG-1/8	กลม	ย่น	ส้ม	-	โค้งเว้า	กลม	ม่วง	-	-
WG-1/9	กลม	นูน	ขาวขุ่น	+	เรียบ	แท่ง	ม่วง	+	+
WG-2/1	กลม	นูน	เหลือง	+	เรียบ	กลม	ม่วง	+	-
WG-2/2	กลม	นูน	ขาวอมชมพู	+	เรียบ	แท่ง	แดง	-	-
WG-2/3	กลม	นูน	ใส	+	เรียบ	กลม	ม่วง	-	-
WG-2/4	กลม	นูน	ขาวอมส้ม	+	เรียบ	กลม	ม่วง	-	-
WG-2/5	กลม	นูน	ขาวขุ่น	+	เรียบ	ท่อนสั้น	แดง	+	-
WG-3/1	กลม	นูน	เหลืองอมส้ม	+	เรียบ	แท่ง	แดง	+	-
WG-3/2	ไม่แน่นอน	ย่น	ชมพู	-	หยัก	ท่อนสั้น	ม่วง	+	-
WG-3/3	กลม	นูน	ขาวขุ่น	+	เรียบ	ท่อนสั้น	แดง	+	-
WG-3/4	กลม	นูน	เหลือง	+	เรียบ	กลม	แดง	+	-
WG-3/5	กลม	นูน	ขาวขุ่น	+	เรียบ	กลม	แดง	+	+
WG-3/6		แบน	ขาวอมเหลือง	-	โค้งเว้า	แท่ง	แดง	-	-

ตารางที่ 4.4 เชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากตัวอย่างดินและน้ำที่ทำมาศึกษา (ต่อ)

Code	ลักษณะโคโลนี					ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์		การย่อยสลาย	
	รูปร่าง	ผิวหน้า	สี	ความมันวาว	ขอบโคโลนี	รูปร่าง	สีแกรม	HB	PHB
WG-3/7	ไม่แน่นอน	แบน	ขาวอมเหลือง	+	โค้งเว้า	กลม	แดง	+	+
WK-1	กลม	แบน	ขาวขุ่น	+	โค้งเว้า	ท่อนสั้น	แดง	+	-
WK-2	กลม	นูน	ขาวขุ่น	+	เรียบ	ท่อนสั้น	ม่วง	+	+
WK-3	จุดเล็กๆ	นูน	ขาวขุ่น	+	เรียบ	ท่อนสั้น	แดง	+	-
WM-1	ไม่แน่นอน	แบน	ขาวขุ่น	-	โค้งเว้า	แท่ง	แดง	-	-
WM-2	กลม	นูน	เหลืองใส	+	โค้งเว้า	แท่ง	แดง	-	-
WM-3	กลม	นูน	ขาวอมเหลือง	+	เรียบ	ท่อนสั้น	แดง	-	-
WM-4	กลม	นูน	ขาวอมส้ม	+	เรียบ	แท่ง	แดง	-	-
WP-1	กลม	นูน	ขาวขุ่น	+	เรียบ	กลม	แดง	-	-
WP-2	กลม	นูน	เหลือง	+	เรียบ	แท่ง	แดง	+	+
WP-3	ไม่แน่นอน	ย่น	ส้ม	-	หยัก	ท่อนสั้น	แดง	+	+
WP-4	กลม	นูน	เหลืองใส	+	เรียบ	ท่อนยาว	ม่วง	+	+
WS-1/1	กลม	นูน	ขาวขุ่น	+	เรียบ	กลม	แดง	+	+

ตารางที่ 4.4 เชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากตัวอย่างดินและน้ำที่ทำมาศึกษา (ต่อ)

Code	ลักษณะโคโลนี					ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์		การย่อยสลาย	
	รูปร่าง	ผิวหน้า	สี	ความมันวาว	ขอบโคโลนี	รูปร่าง	สีแกรม	HB	PHB
WS-1/2	กลม	นูน	เหลือง	+	เรียบ	กลม	แดง	-	-
WS-1/3	กลม	นูน	ขาวขุ่น	+	เรียบ	กลม	แดง	-	-
WS-2/1	ไม่แน่นอน	แบน	ขาวอมส้ม	+	โค้งเว้า	ท่อนสั้น	แดง	-	-
WS-2/2	กลม	นูน	ขาวขุ่น	-	เรียบ	ท่อนสั้น	แดง	-	-
WS-2/3	กลม	นูน	ขาวขุ่น	+	เรียบ	ท่อนสั้น	แดง	+	+
WT-1	กลม	นูน	ขาวอมเหลือง	+	เรียบ	กลม	แดง	+	+
WT-2	กลม	แบน	ใส	-	เรียบ	ท่อนสั้น	แดง	-	-
WT-3	กลม	นูน	ขาวขุ่น	+	เรียบ	ท่อนสั้น	แดง	-	-
WT-4	กลม	แบน	ขาวขุ่น	-	เรียบ	แท่ง	แดง	-	-
SD-1	กลม	นูน	ใส	-	เรียบ	กลม	ม่วง	-	-
SD-2	ไม่แน่นอน	แบน	ขาวขุ่น	+	โค้งเว้า	ท่อนสั้น	แดง	+	+
SG-1	กลม	นูน	ขาวขุ่น	+	เรียบ	กลม	แดง	+	+
SG-2	ไม่แน่นอน	แบน	ขาวขุ่น	-	โค้งเว้า	กลม	แดง	+	+
SG-3	ไม่แน่นอน	แบน	ขาวขุ่น	+	โค้งเว้า	กลม	แดง	+	+

ตารางที่ 4.4 เชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากตัวอย่างดินและน้ำที่ทำมาศึกษา (ต่อ)

Code	ลักษณะโคโลนี					ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์		การย่อยสลาย	
	รูปร่าง	ผิวหน้า	สี	ความมันวาว	ขอบโคโลนี	รูปร่าง	สีแกรม	HB	PHB
SG-4	กลม	นูน	ขาวขุ่น	+	เรียบ	กลม	แดง	+	+
SG-5	กลม	นูน	เหลือง	+	เรียบ	ท่อนสั้น	แดง	+	+
SG-6	กลม	นูน	ใส	+	เรียบ	กลม	แดง	-	-
SG-7	กลม	นูน	เหลือง	+	เรียบ	กลม	ม่วง	+	-
SG-8	กลม	นูน	เหลืองเข้ม	+	เรียบ	กลม	ม่วง	+	-
SG-9	กลม	นูน	ชมพูอมส้ม	+	หยัก	กลม	ม่วง	-	-
SG-10	ไม่แน่นอน	แบน	ส้ม	-	โค้งเว้า	ท่อนสั้น	แดง	+	+
SG-11	ไม่แน่นอน	แบน	ชมพู	-	โค้งเว้า	กลม	ม่วง	-	-
SG-12	ไม่แน่นอน	แบน	ขาวขุ่น	+	โค้งเว้า	ท่อนสั้น	แดง	+	+
SG-13	ไม่แน่นอน	แบน	ส้ม	-	หยัก	กลม	ม่วง	+	-
SP-1	กลม	นูน	เหลืองใส	+	เรียบ	แท่ง	แดง	+	+
SP-2	กลม	นูน	ขาวขุ่น	+	เรียบ	กลม	แดง	-	-
SP-3	กลม	นูน	ครีม	-	เรียบ	กลม	ม่วง	-	-
SS-1/1	กลม	นูน	ขาวขุ่น	+	เรียบ	แท่ง	แดง	-	-

ตารางที่ 4.4 เชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากตัวอย่างดินและน้ำที่ทำมาศึกษา (ต่อ)

Code	ลักษณะโคโลนี					ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์		การย่อยสลาย	
	รูปร่าง	ผิวหน้า	สี	ความมันวาว	ขอบโคโลนี	รูปร่าง	สีแกรม	HB	PHB
SS-1/2	จุดเล็กๆ	นูน	ขาวขุ่น	+	เรียบ	ท่อนสั้น	แดง	-	-
SS-1/3	ไม่แน่นอน	แบน	ขาวขุ่น	-	โค้งเว้า	แท่ง	ม่วง	-	-
SS-2/1	กลม	นูน	ขาวขุ่น	-	เรียบ	ท่อนสั้น	แดง	+	+
SS-2/2	กลม	นูน	ขาวขุ่น	-	เรียบ	ท่อนสั้น	แดง	+	+
SS-2/3	กลม	นูน	ส้ม	-	เรียบ	แท่ง	แดง	-	-
SS-2/4	กลม	นูน	เหลืองขุ่น	+	เรียบ	แท่ง	แดง	-	-
SS-2/5	กลม	นูน	น้ำตาล	+	เรียบ	แท่ง	แดง	-	-
SS-2/6	ไม่แน่นอน	แบน	ขาว	-	โค้งเว้า	แท่ง	แดง	+	+
ST-1	กลม	นูน	ขาวขุ่น	-	เรียบ	กลม	แดง	+	+
ST-2	ไม่แน่นอน	แบน	ขาวขุ่น	+	โค้งเว้า	กลม	แดง	+	+
ST-3	กลม	นูน	ขาวขุ่น	-	เรียบ	ท่อนสั้น	แดง	+	+
ST-4	กลม	นูน	ส้ม	+	เรียบ	กลม	แดง	-	-
ST-5	กลม	แบน	ขาวขุ่น	+	เรียบ	ท่อนสั้น	แดง	+	+
C-1	กลม	นูน	ชมพู	+	เรียบ	ท่อนสั้น	แดง	+	+

4.2 การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อย PHB ได้ขั้นที่สอง

เมื่อนำเชื้อจุลินทรีย์ที่ผ่านการคัดเลือกแบบต่อเนื่อง (sequential screening) มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยการ cross streak บน NA จะเหลือเชื้อ 2 ชนิดคือ PHB-1 และ PHB-2 ซึ่งเชื้อทั้งสองมีลักษณะโคโลนี ดังแสดงในรูปที่ 4.2 แล้วทำการยืนยันผลของการย่อยสลาย PHB โดยนำเชื้อบริสุทธิ์ไป cross streak บน PHB medium ซึ่งมีลักษณะโคโลนีดังรูปที่ 4.3 และเมื่อนำไปย้อมแกรมพบว่า PHB-1 เป็นแกรมบวก ส่วน PHB-2 เป็นแกรมลบ ลักษณะเซลล์ที่ติดสีแกรมแสดงดังรูปที่ 4.4

A B

รูปที่ 4.2 ลักษณะโคโลนีของเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้จากการคัดเลือกอย่างต่อเนื่อง (sequential screening) บน NA

A = PHB-1

B = PHB-2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

A

B

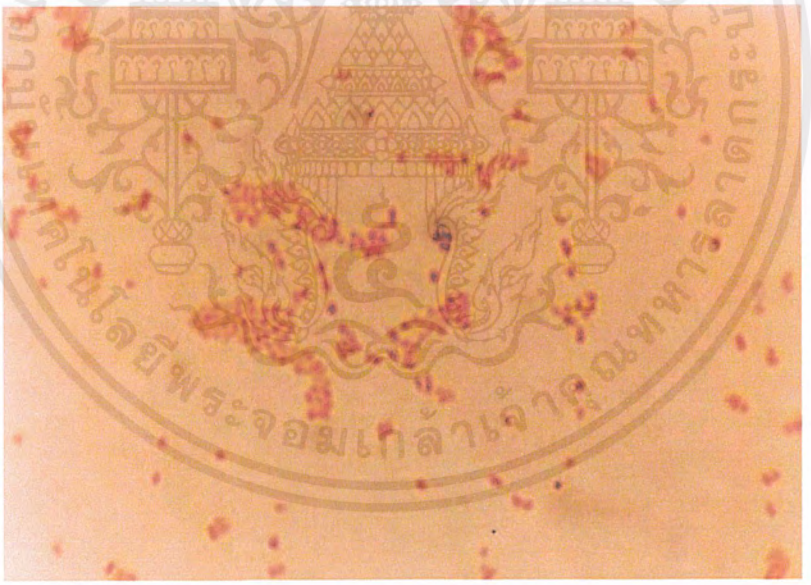
รูปที่ 4.3 ลักษณะโคโลนีของเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้จากการคัดเลือกอย่างต่อเนื่อง (sequential screening) บน PHB medium

A = PHB-1

B = PHB-2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

A



B

รูปที่ 4.4 ลักษณะการติดสีแกรมของเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้จากการคัดเลือกอย่างต่อเนื่อง (sequential screening)

A = PHB-1

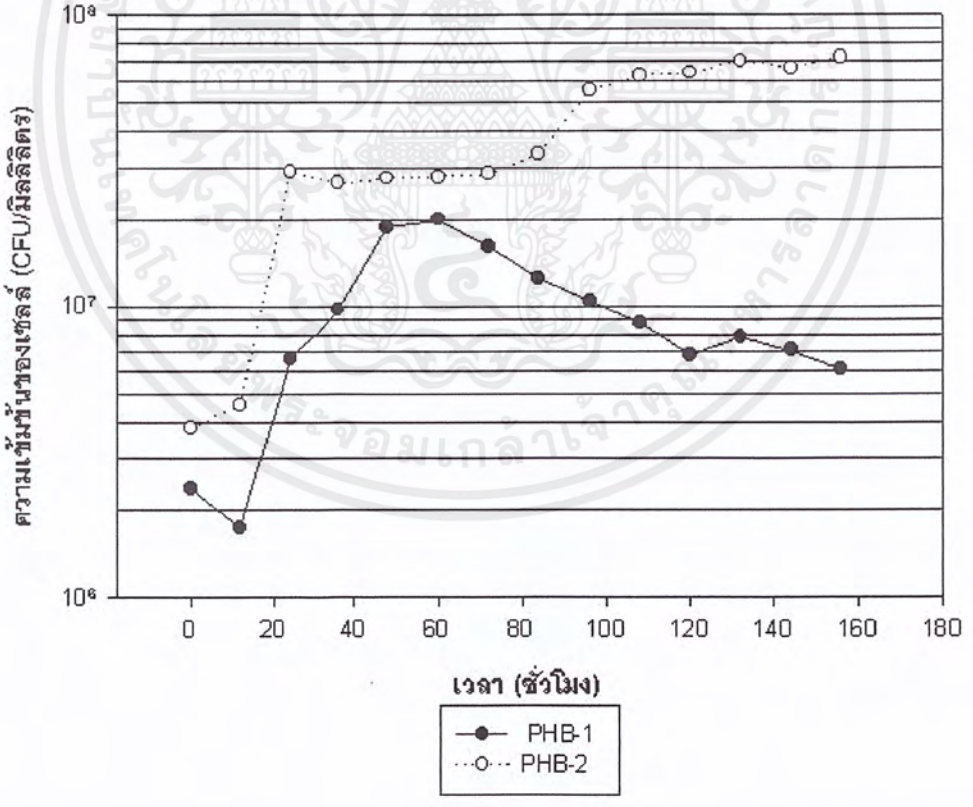
B = PHB-2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อย PHB ได้แบบต่อเนื่อง แสดงให้เห็นว่า PHB-1 และ PHB-2 ที่คัดเลือกได้เนื่องจากสามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วเกิดภาวะแข่งขัน (competition) กับจุลินทรีย์อื่น ๆ เพื่อแย่ง PHB เป็นแหล่งอาหาร (มาริสา, 2540) ดังนั้นจุลินทรีย์ดังกล่าวจึงควรเป็นจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลาย PHB ได้สูงสุด

4.3 ศึกษาการเจริญเติบโตและการย่อย PHB ของเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้

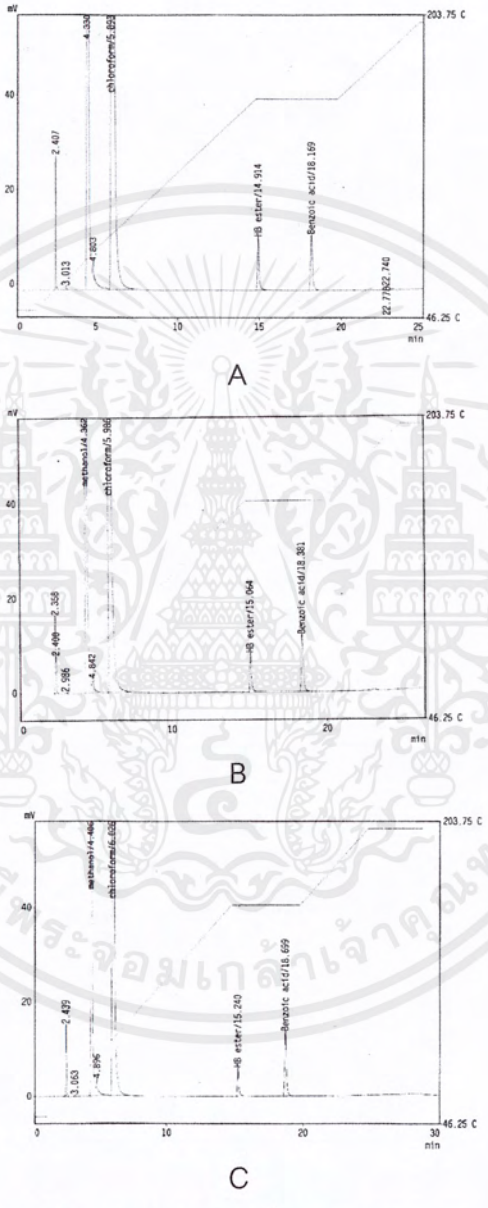
เมื่อนำ PHB-1 และ PHB-2 ซึ่งมีความสามารถในการย่อย PHB เพื่อเป็นแหล่งอาหารมาเพาะเลี้ยงในอาหาร PHB medium ซึ่งมี PHB 0.5 เปอร์เซ็นต์ โดยบ่มที่อุณหภูมิห้องและเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที พบว่ามีรูปแบบการเจริญ (growth pattern) ดังรูปที่ 4.5 ซึ่งเมื่อคำนวณอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (μmax) พบว่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดของ PHB-1 และ PHB-2 เท่ากับ 0.112 และ 0.153 ต่อชั่วโมงตามลำดับ



รูปที่ 4.5 กราฟการเจริญของ PHB-1 และ PHB-2 ในอาหาร PHB medium (PHB 0.5 เปอร์เซ็นต์)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อนำน้ำหมักหลังจากการบ่มเชื้อ 7 วันมาวิเคราะห์หาประสิทธิภาพการย่อย PHB ของ PHB-1 และ PHB-2 ด้วยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟี เพื่อหาปริมาณ PHB ที่เหลือโดยเปรียบเทียบกับตัวควบคุม (control) ที่ไม่มีเชื้อจุลินทรีย์ สามารถแสดงได้ดังรูปที่ 4.6 และ ตารางที่ 4.5



รูปที่ 4.6 โครมาโตแกรมเปรียบเทียบปริมาณ PHB ที่เหลือในตัวควบคุมและน้ำหมักหลังจากการบ่ม 7 วัน

A = โครมาโตแกรมปริมาณ PHB ที่เหลือในตัวควบคุม

B = โครมาโตแกรมปริมาณ PHB ทีเหลือในน้ำหมักหลังจากการบ่มเชื้อ PHB-1

C = โครมาโตแกรมปริมาณ PHB ที่เหลือในน้ำหมักหลังจากการบ่มเชื้อ PHB-2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 การเปรียบเทียบปริมาณ PHB ที่เหลือในตัวควบคุมและน้ำหมักหลังจากการบ่ม 7 วัน ของเชื้อ PHB-1 และ PHB-2

ตัวอย่าง	ซ้ำ	noemalized area	ปริมาณ PHB ที่เหลือ (มิลลิกรัมต่อน้ำหมัก 100 มิลลิลิตร)
ตัวควบคุม	1	0.786	452.78
	2	0.736	423.98
	3	0.755	434.90
PHB-1	1	0.555	319.75
	2	0.433	249.43
	3	0.350	201.63
PHB-2	1	0.342	197.00
	2	0.259	149.00
	3	0.330	190.00

เมื่อนำข้อมูลปริมาณ PHB ที่เหลือมาเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ PHB ที่เหลือแล้วนำมาวิเคราะห์ผลทางสถิติได้ผลดังตารางที่ 4.6

จากการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ PHB-1,PHB-2 และตัวควบคุม ในการย่อยสลาย PHB โดยเปรียบเทียบจากเปอร์เซ็นต์ PHB ที่เหลือ พบว่าความสามารถในการย่อย PHB มีค่าแตกต่างกันอย่างนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเปรียบเทียบ PHB-1 และ PHB-2 พบว่ามีความสามารถในการย่อยสลาย PHB มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์เช่นเดียวกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 การเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ PHB ที่เหลือจากการย่อยสลายโดยเชื้อ PHB-1 และ PHB-2 หลังจากการบ่ม 7 วัน

ตัวอย่าง	เปอร์เซ็นต์ PHB ที่เหลือจากการย่อย
ตัวควบคุม	100[a]
PHB-1	58.5[b]
PHB-2	40.9[c]

ค่าเฉลี่ยใดที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติโดยใช้วิธี Student-Newman-Keuls Method ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการทดลองคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อย PHB ได้ พบว่าสามารถคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ได้ 82 ไอโซเลต เป็นจุลินทรีย์แกรมบวก 19 ไอโซเลต (23.17 เปอร์เซ็นต์) เป็นจุลินทรีย์แกรมลบ 68 ไอโซเลต (76.83 เปอร์เซ็นต์) จุลินทรีย์ที่คัดแยกได้สามารถย่อย HB ได้ 45 ไอโซเลต (54.88 เปอร์เซ็นต์) เป็นจุลินทรีย์แกรมบวก 10 ไอโซเลต (12.20 เปอร์เซ็นต์) จุลินทรีย์แกรมลบ 35 ไอโซเลต (42.68 เปอร์เซ็นต์) และสามารถคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อย PHB ได้ 32 ไอโซเลต (39.02 เปอร์เซ็นต์) เป็นจุลินทรีย์แกรมบวก 4 ไอโซเลต (4.89 เปอร์เซ็นต์) และเป็นจุลินทรีย์แกรมลบ 28 ไอโซเลต (34.15 เปอร์เซ็นต์) เมื่อนำกลุ่มเชื้อดังกล่าวมาคัดเลือกแบบต่อเนื่องสามารถคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลาย PHB ได้สูงสุดคือ PHB-1 และ PHB-2 โดยอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดของ PHB2 เท่ากับ 0.153 ต่อชั่วโมง มากกว่า PHB-1 ซึ่งเท่ากับ 0.112 ต่อชั่วโมง เมื่อนำเชื้อทั้งสองชนิดมาหาประสิทธิภาพของการย่อยสลาย PHB พบว่า PHB-2 ย่อยสลายได้เหลือ 40.9 เปอร์เซ็นต์ และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ กับ PHB-1 ซึ่งย่อยสลายได้เหลือ 58.5 เปอร์เซ็นต์ เชื้อทั้งสองชนิดนี้มีประสิทธิภาพในการย่อยสลาย PHB ได้ โดยสังเกตจากเปอร์เซ็นต์ PHB ที่เหลือซึ่งแตกต่างกันทางสถิติกับตัวควบคุมอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากมีการศึกษาพบว่าเชื้อที่ย่อยสลาย PHB ได้ มีความสามารถในการสร้าง PHB เป็นอาหารสะสมภายในเซลล์ (Anderson และ Dawes, 1990) ดังนั้นควรนำเชื้อ PHB-1 และ PHB-2 มาศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHB เพื่อนำไปสู่การผลิตพลาสติกชีวภาพต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

เกียรติศักดิ์ คูหา "พลาสติกย่อยสลายได้" วารสารพลาสติก ปีที่ 9 ฉบับที่ 2 (2535) : 29-36

ชลธิชา นุ่มหอม พอลิเมอร์ พิมพ์ครั้งที่ 1 หน้า 3-79, สำนักพิมพ์ พรศิวการพิมพ์, กรุงเทพมหานคร, 2538

บัญญัติ สุขศรีงาม จุลชีววิทยา เล่ม 1 พิมพ์ครั้งที่ 4, หน้า 208-237, สำนักพิมพ์ โอเดียนสโตร์, กรุงเทพมหานคร, 2525

พิชิต เลี่ยมพิพัฒน์ พลาสติก พิมพ์ครั้งที่ 12, หน้า 8-158, สำนักพิมพ์ ป สัมพันธ์พาณิชย์, กรุงเทพมหานคร, 2538

ไพโรจน์ กลิ่นพิทักษ์ "ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับพอลิเมอร์" เคมีพอลิเมอร์ พิมพ์ครั้งที่ , หน้า 1-34, สำนักพิมพ์ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี, ปัตตานี, 2541

มาริสา จาตุพรพิพัฒน์ "Microbial interference" เอกสารประกอบการสอนวิชาจุลชีววิทยาสิ่งแวดล้อม, 2540

Agarwal, G.P., L. de Boer, H. Brandl, L. Dijkhuizen, R. C. Fuller, and R. A. Gross, In Microbial Bioproducts, pp.77-93, Springer-Verlag, New York, 1998.

Anderson, A.J. and E.A. Dawes. Occurrence, Metabolism, Metabori role, and Industial Use of Bacterial Polyhydroxyalkanoates. Microbial Rev. 54:450-472, 1990.

Atlas, M.R. Handbook of Microbiological Media, pp. 718-719, CRC press,Inc., Florida, 1993.

Brandl, H., G.A. Richard, R.W. Lenz, and R. C. Fuller. Plastics from Bacteria and for Bacteria: Poly(β-Hydroxyalkanoates) as Natural, Biocompatible and Biodegradable Polyesters In Microbial Bioproducts. (Agarwal, G.P., L. de Boer, H. Brandl, L. Dijkhuizen, R.C. Fuller, R.A. Gross, H. Hoke, A.Laufer, R.W. Lenz, R. Muller, and Ch. Syldatk eds.) pp. 77-93, Springer-Verlag Berlag Berlin, Heidelberg, 1990.

Braunegg, G., B. Sonnleitner, and R.M. Lafferty. A rapid gas chromatographic Method for The determination of Poly-β-Hydroxybutyric Acid in Microbial Biomass.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Eur. J. Appl. Microbiol. 6:29-37, 1978.

Comeau, Y, K.J. Hall, and W.K. Oldham. Determination of Poly-β-hydroxybutyrate and Poly-β-Hydroxybutyrate in Activated Sludge by Gas-Liquid Chromatography. Appl. Environ. Microbiol. 54:2325-2327, 1988.

Dawes, E.A. Novel Biodegradable Microbial Polymers, NATO ASI series, series E Applied science, Vol. 186, pp. 17-448, Klumer Acadamic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1990.

Gerald, S. Degradable Polymers, principles and application, pp.88-111, Chapman and Hall, New York, 1995.

Glazer, A.N. and H. Nikaido Microbial : Endamental of applied microbiology, pp.283-295, W.lt. Freeman Company, New York, 1994.

Hamid, S.H., M.B. Amin, and A. Maadhah. Handbook of Polymer Degradation, pp.335-364, Marcel Dekker, Inc., New York, 1992.

Hocking, J. and R.H. Marchessault. Biopolyester. In Chemistry and Technology of Biodegradable Polymers. (Griffin, Q.F.L. ed.) pp. 48-96, Chapman and Hall, London, 1994.

Jendrossek, D., A. Schirmer, and H. G. Schlegel. biodegradation of polyhydroxyalkanoic acid. Appl. Microbial. Biotechnol. 46:451-463,1996.

Kepes, A. and C. P. Lenoel. Bull. Soc. Chim. Bio., No.34, pp. 563-57, 1952.

Law, J.H. and R.A. Slepecky. Assay of Poly-β-hydroxybutyric acid. J. Bacteriol. 82:33-36, 1961.

Lee, S. Y. Bacterial Polyhydoxyalkanoates. Biotechnol. Bioeng. 49:1-14, 1996.

Lee, S. Y. and J. I. Choi. Polyhydroxyalkanoates : Biodegradable Polymer. In Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. (Pemain, A.L. and J.E. Davies eds.) pp. 616-627, American Society for Microbiology, Washington D.C., 1999 .

Lemoigne, M. C. R. Acad. Sci., 180:1539, 1925.

Lemoigne, M. Ann. Inst. Pasteur, 39:144, 1925.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Maskow, T. and W. Babel. Calorimetrically recognized maximum yieldof poly-3-hydroxybutyrrate (PHB) continuously synthesized from toxic substrates. Biotechnol. 77: 247-153, 2000.

Rehm, H. J. and G. Reead. "Products of Primary Metabolism" Biotechnology, Vol. 6 pp.403-464, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, Germany, 1998.

Vert, M., J. Feijen, A. Albertsson, G. Scott, and E. Cjiellini. In Biodegradable Polymers and Plastics, pp.95-296, Royal Society of Chemistry, 1987.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
การเตรียมสารย้อมแกรมแบคทีเรีย

1. Gram's crystal violet

   สารละลาย A

crystal violet	2.0	กรัม
เอทิลอัลกอฮอล์ (95 เปอร์เซ็นต์)	20.0	กรัม

   สารละลาย B

ammonium oxalate	0.8	กรัม
น้ำกลั่น	80	มิลลิลิตร

   นำสารละลาย A และ B ผสมกัน นำไปกรองเพื่อแยกส่วนที่เป็นตะกอนออก ก่อนนำไปใช้

2. Gram's iodine

Iodine	1.0	กรัม
KI	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	300	มิลลิลิตร

   (เติมไอโอดีน หลังจาก KI ละลายน้ำหมดแล้ว)

3. Gram's alcohol

เอทิลอัลกอฮอล์ (95 เปอร์เซ็นต์)	98	มิลลิลิตร
acetone	2	มิลลิลิตร

4. Gram's safranin

Safranin O (2.5 เปอร์เซ็นต์ safranin ใน 95 เปอร์เซ็นต์ เอทิลอัลกอฮอล์)	10	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข
วิธีการย้อมสีแกรมแบคทีเรีย

1. เกลี่ย (smear) เชื้อที่ต้องการย้อมบนสไลด์ที่ล้างสะอาดทิ้งให้แห้งแล้ว fix โดยผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้ง การ fix เพื่อให้เซลล์แห้งยึดติดแน่นกับสไลด์
2. หยดสี crystal violet บนเชื้อที่เกลี่ยนาน 1-2 นาที แล้วเทสีทิ้ง
3. หยดสารละลายไอโอดีนบนเชื้อที่เกลี่ยนาน 2 นาที แล้วเททิ้ง สารละลายไอโอดีนจะช่วยให้เซลล์ติดสีย้อมได้ดียิ่งขึ้น
4. นำแบคทีเรียมาล้างสี (decolorized) ด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ จนกระทั่งไม่มีสีของ crystal violet ละลายปนออกมา จึงล้างด้วยน้ำ
5. หยดสี safranin บนเชื้อที่เกลี่ย นาน 15-20 นาที ล้างน้ำ ซับให้แห้งแล้วตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

จากการย้อมสีแกรมนี้จะพบว่า แบคทีเรียแกรมบวกติดสีม่วงของ crystal violet และแบคทีเรียแกรมลบติดสีแดงของ safranin ซึ่งผลการเปลี่ยนแปลงในการย้อมสีดังสรุปในตาราง ข.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

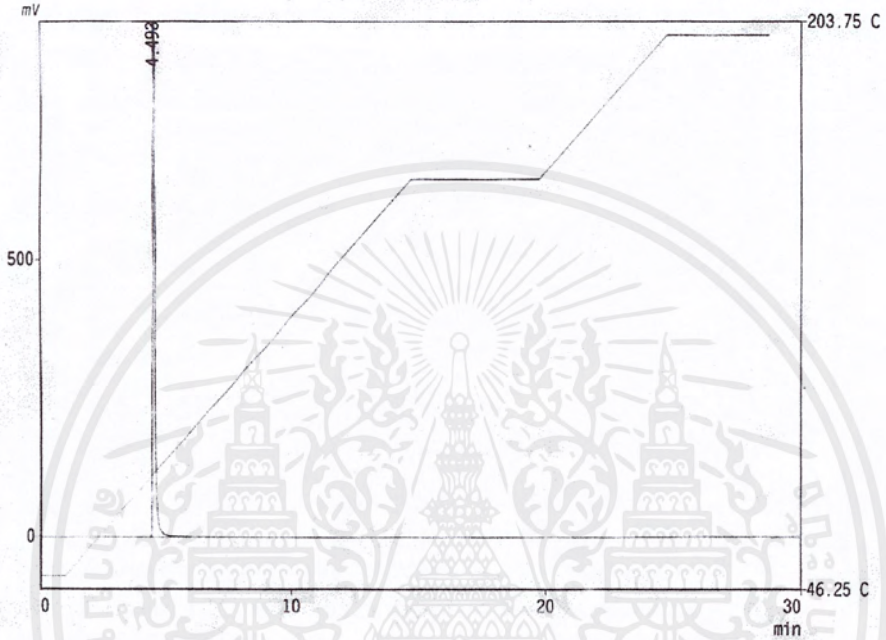
ตาราง ข.1 ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างการย้อมสีแกรม

สีและสารละลายที่ใช้	ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น	
	แบคทีเรียแกรมบวก	แบคทีเรียแกรมลบ
1. crystal violet	เซลล์ติดสีม่วง	เซลล์ติดสีม่วง
2. สารละลายไอโอดีน	สารละลายไอโอดีนจะรวมกับ crystal violet เป็นสารประกอบที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ภายในเซลล์ เซลล์ยังติดสีม่วง	สารละลายไอโอดีนจะรวมกับ crystal violet เป็นสารประกอบที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ภายในเซลล์ยังติดสีม่วง
3. เอทิลอัลกอฮอล์	ไซโตพลาสซึมและผนังเซลล์มีขนาดเล็กสารประกอบของสีซึ่งโมเลกุลขนาดใหญ่ไม่สามารถละลายออกได้ เซลล์จึงติดสีม่วง	สารพวกไขมันที่ผนังเซลล์ถูกละลายออกไป ทำให้รูของผนังเซลล์มีขนาดใหญ่ขึ้น สารประกอบของสีจึงสามารถละลายออกจากเซลล์ได้ เซลล์ไม่ติดสี
4. safranin	เซลล์ไม่ทำปฏิกิริยากับสีน้ำเซลล์ติดสีม่วงตามเดิม	เซลล์ติดสีแดงของ safranin

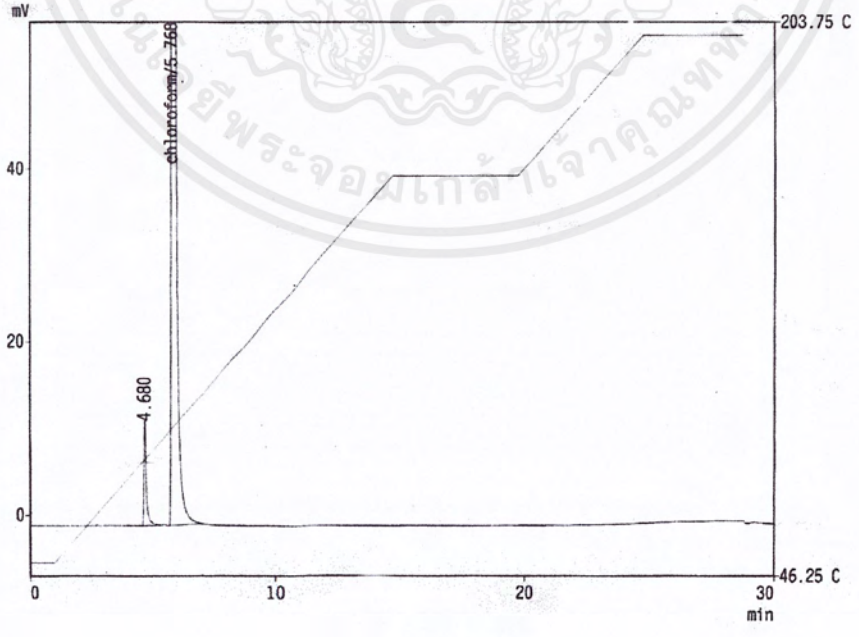
ที่มา : บัญญัติ (2525)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค
โครมาโตแกรมแสดง retention time ของสารที่ใช้ในการวิเคราะห์

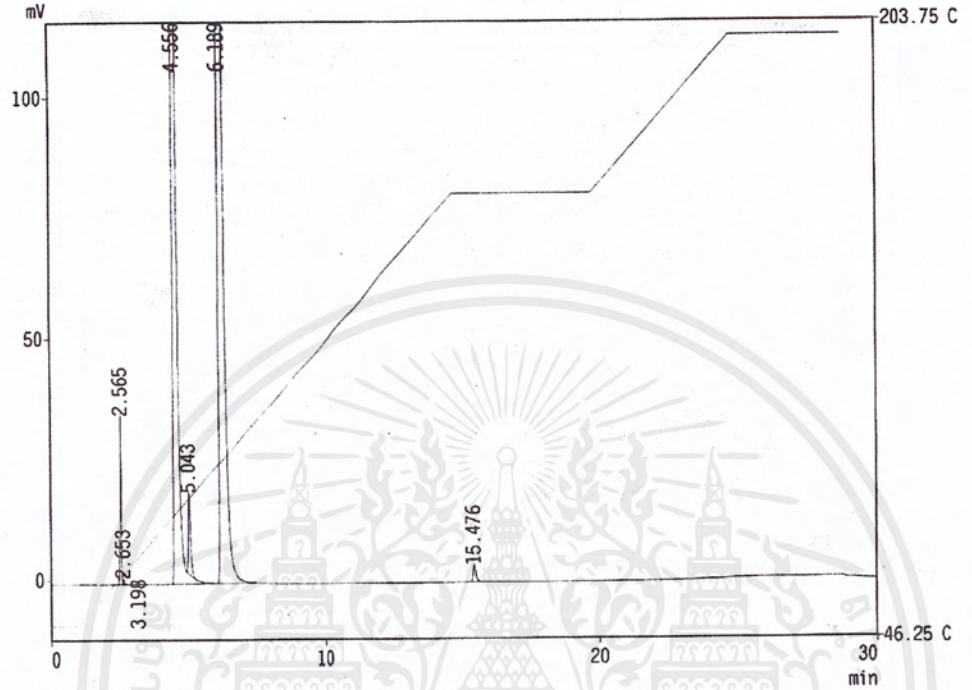


methanol

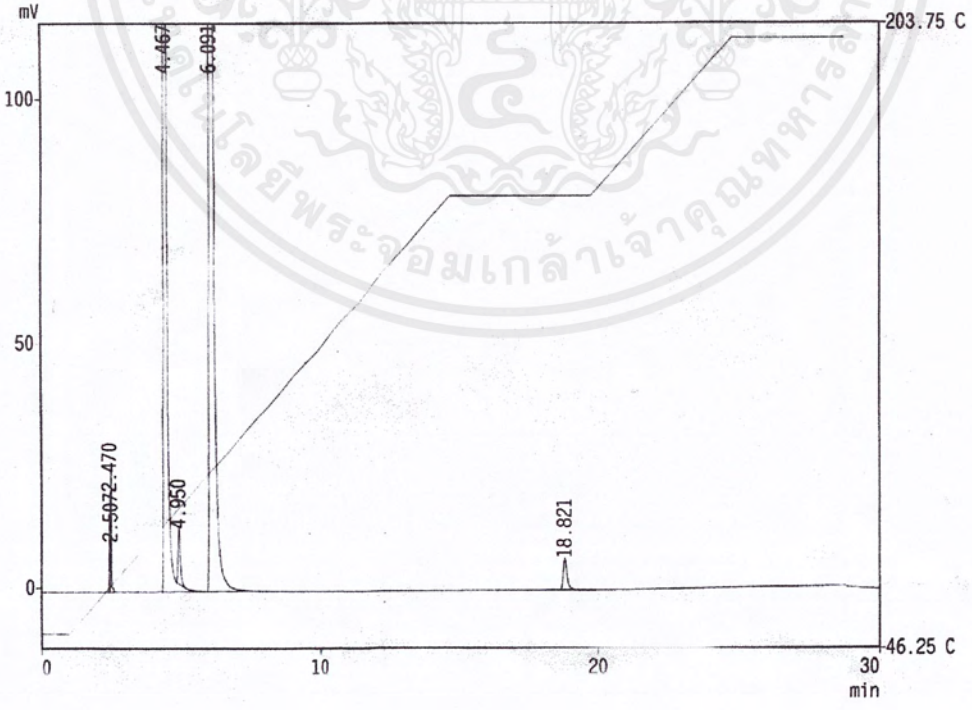


chloroform

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



methyl ester



benzoic acid

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

ผลการวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรม Sigma stat

ตามวิธี Student-Newman-Keuls Method

Tuesday, March 06, 2001, 18:05:14

One Way Analysis of Variance

Normality Test: Passed (P = 0.2887)

Equal Variance Test: Passed (P = 0.2269)

Group	N	Missing
control	3	0
PHB1	3	0
PHB2	3	0

Group	Mean	Std Dev	SEM
control	100.0	0.00	0.00
PHB1	58.5	13.11	7.57
PHB2	40.9	5.90	3.40

Power of performed test with alpha = 0.0500: 1.0000

Source of Variance	DF	SS	MS
Between Treatments	2	5528.5	2764.2
Residual	6	413.4	68.9
Total	8	5941.9	

Source of Variance	F	P
Between Treatments	40.1	0.0003
Residual		
Total		

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = 0.000337).

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Student-Newman-Keuls Method) :

Comparison	Diff of Means	p	q
control vs PHB2	59.1	3	12.33
control vs PHB1	41.5	2	8.67
PHB1 vs PHB2	17.6	2	3.67

Comparison	P<0.05
control vs PHB2	Yes
control vs PHB1	Yes
PHB1 vs PHB2	Yes

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้