

ดีวัลคาโนเซชันของยางธรรมชาติวัลคาโนซีโดยแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินที่ปนเปื้อนซัลเฟอร์ใน
ประเทศไทย



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2561
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DEVULCANIZATION OF VULCANIZED NATURAL RUBBER BY BACTERIA ISOLATED FROM
SULFUR-CONTAMINATED SOIL IN THAILAND



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Biotechnology
Field of Study of Biotechnology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2018
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ดีวัลคาโนเซชันของยางธรรมชาติวัลคาไนซ์โดยแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินที่ปนเปื้อนซัลเฟอร์ในประเทศไทย
โดย	น.ส.เบญจา แก้วเพชร
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริลักษณ์ พุ่มประดับ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร.สีหนาท ประสงค์สุข

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ประเสริฐ เรียบร้อยเจริญ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริลักษณ์ พุ่มประดับ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร.สีหนาท ประสงค์สุข)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุชาดา จันทร์ประทีป นภาธร)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.อิทธิพล แจ่มชัด)

เบญจา แก้วเพชร : ดีวัลคาไนเซชันของยางธรรมชาติวัลคาไนซ์โดยแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินที่ปนเปื้อนซัลเฟอร์ในประเทศไทย. (DEVULCANIZATION OF VULCANIZED NATURAL RUBBER BY BACTERIA ISOLATED FROM SULFUR-CONTAMINATED SOIL IN THAILAND) อ.ที่ปรึกษาหลัก : รศ. ดร.ศิริลักษณ์ พุ่มประดับ, อ.ที่ปรึกษาร่วม : รศ. ดร.สีหนาท ประสงค์สุข

กระบวนการดีวัลคาไนเซชันด้วยวิธีทางชีวภาพเป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถแก้ปัญหาขยะจากยาง มีข้อดีคือมีความเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมและต้นทุนต่ำ ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์คัดแยกแบคทีเรียจากแหล่งดินที่ปนเปื้อนซัลเฟอร์ในประเทศไทย เพื่อนำมาใช้ในกระบวนการดีวัลคาไนเซชันทำให้ได้ยางรีเคลม (reclaim rubber) หรือยางดีวัลคาไนซ์ (devulcanized rubber) ผลการคัดแยกพบว่า *Bacillus cereus* มีประสิทธิภาพในการสลายพันธะซัลเฟอร์ใน dibenzothiophene ได้เท่ากับ 88.1±0.1% และเมื่อนำ *B. cereus* ไปทดสอบการสลายพันธะซัลเฟอร์ในยางธรรมชาติวัลคาไนซ์ทั้ง 3 สูตร (ระบบธรรมดา (conventional vulcanization: CV) ระบบกึ่งประสิทธิภาพ (semi-efficient vulcanization: Semi-EV) และระบบประสิทธิภาพ (efficient vulcanization: EV)) พบว่าในยางธรรมชาติวัลคาไนซ์สูตร CV ให้ค่าการลดลงของซัลเฟอร์สูงสุด (27.1±0.4) ภายใต้ภาวะที่พีเอช 7 อุณหภูมิห้อง (30±2°C) เป็นเวลา 30 วัน ค่าความหนาแน่นของพันธะเชื่อมขวางของยางดีวัลคาไนซ์มีค่าลดลง 70.2% ส่งผลให้สัดส่วนเจลมีค่าลดลง นอกจากนี้ศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการดีวัลคาไนเซชัน ได้แก่ ขนาดของอนุภาคยาง พีเอชและอุณหภูมิ เพื่อหาภาวะที่เหมาะสมในกระบวนการดีวัลคาไนเซชัน ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการกำจัดซัลเฟอร์ในยางดีวัลคาไนซ์ขนาดเล็ก (Ø=0.3-0.4 มิลลิเมตร) สูงกว่ายางดีวัลคาไนซ์ขนาดใหญ่ (Ø=2.0-2.7 มิลลิเมตร) ภาวะที่เหมาะสมของการดีวัลคาไนซ์ของ *B. cereus* คือที่พีเอช 5 ณ อุณหภูมิห้อง (30±2°C) เป็นเวลา 20 วัน ให้เปอร์เซ็นต์การลดลงของซัลเฟอร์เท่ากับ 64.3±0.1 เมื่อนำยาง GTR ไปบ่มร่วมกับ *B. cereus* พบว่าปริมาณของซัลเฟอร์มีค่าลดลง 40.2±0.2% สุดท้ายนำยางดีวัลคาไนซ์ที่อัตราส่วนแตกต่างกันตั้งแต่ 5-20 ส่วนในร้อยส่วนของยาง (phr) ไปผสมกับยางบริสุทธิ์ พบว่าเมื่อปริมาณของยางดีวัลคาไนซ์เพิ่มขึ้นส่งผลให้ค่าทนแรงดึงสูงสุด (tensile strength) และระยะยืดที่จุดขาด (elongation at break) ของยางดีวัลคาไนซ์มีค่าลดลง ในขณะที่ความแข็ง (hardness) มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ดังนั้นยางดีวัลคาไนซ์ที่ได้จากกระบวนการดีวัลคาไนเซชันด้วย *B. cereus* สามารถนำไปใช้เป็นวัตถุดิบตั้งต้นในกระบวนการวัลคาไนเซชันได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2561

ลายมือชื่อนิสิต
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5772281923 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORD: Bacillus cereus, Devulcanization, Revulcanization, Conventional vulcanization (CV),
Semi-efficient vulcanization (Semi-EV), Efficient vulcanization (EV)

Benja Keawpetch : DEVULCANIZATION OF VULCANIZED NATURAL RUBBER BY BACTERIA
ISOLATED FROM SULFUR-CONTAMINATED SOIL IN THAILAND. Advisor: Assoc. Prof. Sirilux
Poompradub, Ph.D. Co-advisor: Assoc. Prof. Sehanat Prasongsuk, Ph.D.

Biological devulcanization is one of alternative methods to solve the problem of rubber waste. The advantage of this process is environmentally friendly and low cost. Thus, this research aims to isolate the desulfurized bacteria from sulfur-contaminated soil areas in Thailand for biological devulcanization, leading to obtain reclaim rubber or devulcanized rubber for recycle process. *Bacillus cereus* showed the efficiency to desulfurize dibenzothiophene at $88.1 \pm 0.1\%$. Then, *B. cereus* was devulcanized natural rubber vulcanizates (NRV) with different curing systems; (conventional vulcanization: CV), (semi-efficient vulcanization: Semi-EV) and (efficient vulcanization: EV)). It was found that NRV with the CV system showed the highest of sulfur removal (27.1 ± 0.4) at under pH 7 at room temperature ($30 \pm 2^\circ\text{C}$) for 30 days of devulcanization time. The crosslink density of devulcanized rubber was decreased to 70.2%, resulting in the decreased gel fraction. Moreover, the effect of particle size, pH and temperature were studied in order to optimize the devulcanized condition. The results showed that the sulfur removal in small particle ($\text{Ø}=0.3\text{-}0.4$ mm) of devulcanized rubber was higher than that in the large particle ($\text{Ø}=2.0\text{-}2.7$ mm) of devulcanized rubber. The optimized condition of *B. cereus* for devulcanization was under pH 5 at room temperature ($30 \pm 2^\circ\text{C}$) for 20 days. Under this condition, the percentage of sulfur removal of the devulcanized rubber was $64.3 \pm 0.1\%$. The ground tire rubber (GTR) was also devulcanized by *B. cereus*. As a result, the sulfur content of devulcanized GTR was decreased ($40.2 \pm 0.2\%$). Finally, the different devulcanized rubber ratios (5-20 parts by weight per hundred parts of rubber: phr) were mixed with virgin rubber. It was found that by increasing devulcanized rubber, the tensile strength and elongation at break of revulcanized rubber were decreased, while the hardness was increased. Therefore, the devulcanized rubber obtained from devulcanization by *B. cereus* could be used as raw material on vulcanization process.

Field of Study: Biotechnology

Academic Year: 2018

Student's Signature

Advisor's Signature

Co-advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี โดยการอนุเคราะห์จากหลายฝ่าย ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริลักษณ์ พุ่มประดับ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์เป็นอย่างสูงที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษาและช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์และถูกต้องยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.สีหนาท ประสงค์สุข อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา และตรวจแก้ต้นฉบับวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องครบถ้วน

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ประเสริฐ เรียบร้อยเจริญ หัวหน้าภาควิชาเคมีเทคนิค ที่กรุณาเป็นประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และตรวจแก้ต้นฉบับวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.สุชาติ จันทร์ประทีป นภทร ที่กรุณาเป็นกรรมการ สอบวิทยานิพนธ์ และตรวจแก้ต้นฉบับวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.อิทธิพล แจ่มชัด ที่กรุณาเป็นกรรมการ (ผู้ทรงคุณวุฒิ จากภายนอก) ในการสอบวิทยานิพนธ์ และตรวจแก้ต้นฉบับวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาจากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย เพื่อเฉลิมฉลองวโรกาสที่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวภูมิพลอดุลยเดชทรงเจริญ พระชนมายุครบ 72 พรรษา และทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

ขอขอบพระคุณสมาชิกในหน่วยปฏิบัติการวิจัยยาง สมาชิกในหน่วยปฏิบัติการวิจัยการใช้ ประโยชน์จากชีวมวลพืช บุคลากรในหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาเคมีเทคนิค ภาควิชา พฤษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ทุกท่าน

สุดท้ายนี้ ข้าพเจ้าขอกราบระลึกถึงพระคุณของบิดา มารดา ผู้วางรากฐานให้โอกาสทางการ ศึกษา และให้การสนับสนุนช่วยเหลือและเป็นกำลังใจที่ติดลอดมา จนกระทั่งวิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วง ด้วยดี

เบญจา แก้วเพชร

สารบัญ

	หน้า
.....	ค
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญรูปภาพ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ฐ
คำย่อ.....	ท
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 มูลเหตุจูงใจหรือแนวเหตุผล.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัยนี้.....	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 ชนิดของยาง.....	4
2.1.1 ยางธรรมชาติ (natural rubber).....	4
2.1.1.1 สมบัติของยางธรรมชาติ.....	5
2.1.2 ยางสังเคราะห์ (synthetic rubber).....	7
2.1.2.1 ยางสังเคราะห์พอลิไอโซพรีน (synthetic polyisoprene หรือ IR).....	7
2.1.2.2 ยางสไตรีนบิวทาไดอีน (styrene-butadiene rubber หรือ SBR).....	8

2.1.2.3	ยางไนไตรล์ (nitrile or acrylonitrile-butadiene rubber หรือ NBR)	9
2.1.2.4	ยางเอธิลีนพรอพิลีนไดอีน (ethylene-propylene diene monomer หรือ EPDM).....	10
2.1.3	ยางรีเคลม.....	11
2.1.3.1	ข้อดีของยางรีเคลม.....	12
2.1.3.2	ข้อเสียของยางรีเคลม	12
2.2	กระบวนการวัลคาไนเซชัน.....	13
2.2.1	ระบบธรรมดา (conventional vulcanization).....	13
2.2.2	ระบบประสิทธิภาพ (efficient vulcanization).....	13
2.2.3	ระบบกึ่งประสิทธิภาพ (semi-efficient vulcanization).....	14
2.3	กระบวนการดีวัลคาไนเซชัน.....	15
2.3.1	กระบวนการดีวัลคาไนเซชันโดยวิธีทางกายภาพ (physical devulcanization).....	16
2.3.2	กระบวนการดีวัลคาไนเซชันโดยวิธีทางเคมี (chemical devulcanization).....	17
2.3.3	กระบวนการดีวัลคาไนเซชันโดยวิธีทางชีวภาพ (biological devulcanization)	17
2.4	งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	18
บทที่ 3	วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง.....	20
3.1	สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย	20
3.2	อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย	22
3.3	วิธีดำเนินงานวิจัย	24
3.3.1	การคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถสลายพันธะซัลเฟอร์จากดินในประเทศไทย	24
3.3.1.1	การเก็บตัวอย่างดิน	24
3.3.1.2	การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	24
3.3.1.3	การคัดแยกแบคทีเรีย	25
3.3.2	การทดสอบประสิทธิภาพการสลายพันธะซัลเฟอร์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้	26

3.3.3	การจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียที่คัดแยกได้.....	26
3.3.3.1	การสกัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย	26
3.3.3.2	การตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอเบื้องต้นด้วยเทคนิคอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส	27
3.3.3.3	การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแบคทีเรียด้วยเทคนิคพีซีอาร์.....	27
3.3.3.4	การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์.....	28
3.3.4	การเตรียมยางธรรมชาติวัลคาไนซ์ 3 ระบบ	28
3.3.5	ศึกษาปัจจัยของยางที่มีผลต่อการตีวัลคาไนซ์ของแบคทีเรียไอโซเลต LF3.....	29
3.3.5.1	ศึกษาผลของชนิดพันธะซัลเฟอร์ในยางที่มีผลต่อการตีวัลคาไนซ์ของแบคทีเรีย ไอโซเลต LF3.....	29
3.3.5.2	ศึกษาผลของขนาดอนุภาคยางที่มีผลต่อการตีวัลคาไนซ์ของแบคทีเรีย ไอโซเลต LF3.....	29
3.3.5.3	ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการสลายพันธะซัลเฟอร์ของแบคทีเรียไอโซเลต LF3	29
3.3.6	พิสูจน์เอกลักษณ์และทดสอบสมบัติของยางธรรมชาติวัลคาไนซ์ก่อนและหลัง กระบวนการตีวัลคาไนซ์.....	30
3.3.6.1	สมบัติทางกายภาพ (physical properties).....	30
3.3.6.2	สมบัติทางเคมี (chemical properties).....	31
3.3.7	ศึกษาผลการตีวัลคาไนซ์ในยาง GTR ด้วยแบคทีเรียไอโซเลต LF3 ภายใต้ภาวะที่ เหมาะสมที่สุด	33
3.3.8	ศึกษาสมบัติของยางธรรมชาติวัลคาไนซ์.....	33
3.3.8.1	ศึกษาสมบัติการคงรูปและเชิงกลของยางธรรมชาติวัลคาไนซ์.....	33
3.3.8.2	ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของยางธรรมชาติวัลคาไนซ์.....	33
บทที่ 4	ผลการวิจัยและการอภิปรายผล	34
4.1	ผลการคัดแยกแบคทีเรียจากแหล่งดินที่ปนเปื้อนซัลเฟอร์ในประเทศไทย	34

4.2 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการสลายพันธะซัลเฟอร์ใน DBT ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้.....	34
4.3 ผลการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสลายพันธะซัลเฟอร์ใน DBT ของแบคทีเรียไอโซเลต LF3	37
4.4 ผลการจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียไอโซเลต LF3.....	39
4.5 ผลของชนิดพันธะซัลเฟอร์ในยางต่อประสิทธิภาพการดีวัลคาไนซ์ของ <i>B. cereus</i>	41
4.5.1 ผลการวัดปริมาณซัลเฟอร์ในยางก่อน-หลังกระบวนการดีวัลคาไนเซชันด้วยเทคนิค บอมบ์แคลอรีเมตรี.....	41
4.5.2 ผลการวิเคราะห์ปริมาณร้อยละองค์ประกอบของธาตุในยางก่อน-หลังกระบวนการดีวัลคาไนเซชัน.....	42
4.5.3 ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีของยางก่อน-หลังกระบวนการดีวัลคาไนเซชัน	45
4.5.4 ผลการวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีด้วยเทคนิค XPS.....	46
4.5.6 ผลการวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพของยางก่อน – หลังกระบวนการดีวัลคาไนเซชัน.....	46
4.6 ผลของขนาดอนุภาคยางต่อประสิทธิภาพการดีวัลคาไนซ์ของ <i>B. cereus</i>	47
4.7 ผลของพีเอชและอุณหภูมิต่อประสิทธิภาพการดีวัลคาไนซ์ของ <i>B. cereus</i>	49
4.8 ผลการดีวัลคาไนซ์ในยาง GTR ด้วย <i>B. cereus</i> ภายใต้ภาวะที่เหมาะสม	50
4.9 ผลของสมบัติการคงรูปของยางธรรมชาติวัลคาไนซ์และรีวัลคาไนซ์	51
4.10 ผลของสมบัติเชิงกลและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของยางธรรมชาติวัลคาไนซ์และรีวัลคาไนซ์	53
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย.....	56
5.1 การคัดแยกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการสลายพันธะซัลเฟอร์	56
5.2 ผลของการดีวัลคาไนเซชันด้วย <i>B. cereus</i>	56
5.3 ข้อเสนอแนะ.....	56
บรรณานุกรม.....	58
ภาคผนวก.....	67
ประวัติผู้เขียน.....	71



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญรูปลูกภาพ

	หน้า
รูปที่ 2.1	ต้นยางพารา..... 4
รูปที่ 2.2	น้ำยางข้น (ซ้าย) และยางดิบแห้ง (ขวา) 5
รูปที่ 2.3	โครงสร้างทางเคมีของ cis-1,4-polyisoprene ทำหน้าที่เป็นมोनอเมอร์ในยางธรรมชาติ 6
รูปที่ 2.4	ผลิตภัณฑ์จากยางธรรมชาติ..... 6
รูปที่ 2.5	ปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันชนิด Ziegler-Natta ในการสังเคราะห์ยางพอลิไอโซพรีน 7
รูปที่ 2.6	ลูกนมยางและอุปกรณ์การแพทย์บางชนิดที่ผลิตจากยางพอลิไอโซพรีน..... 8
รูปที่ 2.7	โครงสร้างทางเคมีของยางสไตรีนบิวทาไดอีน 9
รูปที่ 2.8	พื้นยางรองพรม พื้นรองเท้า ยางหุ้มลูกกอล์ฟ ที่ผลิตจากยางสไตรีนบิวทาไดอีน 9
รูปที่ 2.9	โครงสร้างทางเคมีของยางไนไตรล์..... 9
รูปที่ 2.10	ตัวอย่างเสริมความแข็งแรง ที่ผลิตจากยางไนไตรล์ 10
รูปที่ 2.11	โครงสร้างทางเคมีของยางเอธิลีนพรอพิลีนไดอีน 11
รูปที่ 2.12	สายเคเบิล สายไฟ ยางซีลขอบประตูรถยนต์จากยางเอธิลีนพรอพิลีนไดอีน 11
รูปที่ 2.13	ประเภทของพันธะเชื่อมขวางของซัลเฟอร์ที่เกิดขึ้นภายในโมเลกุลของยางผ่านกระบวนการวัลคาไนเซชัน (a) ซัลเฟอร์อะตอมเดี่ยว (b) ซัลเฟอร์อะตอมคู่ และ (c) ซัลเฟอร์หลายอะตอม..... 14
รูปที่ 2.14	โครงสร้างโมเลกุลของยางวัลคาไนซ์ ยางดีวัลคาไนซ์และยางรีวัลคาไนซ์ที่ได้จากกระบวนการวัลคาไนเซชัน ดีวัลคาไนเซชัน และรีวัลคาไนเซชัน ตามลำดับ 16
รูปที่ 2.15	ขั้นตอนการรีเคลมยางโดยกระบวนการทางกายภาพโดยใช้เครื่องอัดรีดแบบสกรูเดี่ยว (single screw extruder) 17

รูปที่ 4.1	โครมาโทแกรมของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อย DBT ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ (a) DBT (b) DBTO (c) DBTO ₂ 38
รูปที่ 4.2	เปอร์เซ็นต์การลดลงของปริมาณซัลเฟอร์ในยางทั้ง 3 สูตร ได้แก่ CV, Semi-EV และ EV หลังจากบ่มร่วมกับ <i>B. cereus</i> เป็นเวลา 30 วัน ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ยการทดลอง 3 ซ้ำ บาร์แสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน..... 42
รูปที่ 4.3	ปริมาณร้อยละองค์ประกอบของธาตุในยางก่อนและหลังกระบวนการดีวัลคาไนเซชันด้วย <i>B. cereus</i> เป็นเวลา 20 วัน (a) คาร์บอน (b) ไนโตรเจน (c) ไฮโดรเจน (d) ซัลเฟอร์ ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ยการทดลอง 3 ซ้ำ บาร์แสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน 44
รูปที่ 4.4	สมบัติทางกายภาพของยางสูตร CV ก่อนและหลังกระบวนการดีวัลคาไนเซชันด้วย <i>B. cereus</i> เป็นเวลา 20 วัน (a) ความหนาแน่นของพันธะเชื่อมขวางซัลเฟอร์ในโมเลกุลของยาง เมื่อทำการวัดทุก ๆ 5 วัน (b) สัดส่วนโซล-เจล (sol-gel fraction) (c) น้ำหนักโมเลกุลของยาง..... 48
รูปที่ 4.5	เปอร์เซ็นต์ของปริมาณซัลเฟอร์ที่ลดลงเมื่อบ่มยางกับ <i>B. Cereus</i> ที่ภาวะแตกต่างกันเป็นเวลา 20 วัน (a) พีเอช 7 ณ อุณหภูมิ 30 40 และ 50°C (b) ณ อุณหภูมิ 30°C ที่พีเอช 5 7 และ 9 ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ยการทดลอง 3 ซ้ำ บาร์แสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน..... 50
รูปที่ 4.6	ปริมาณของซัลเฟอร์และค่าสัดส่วนโซล (sol fraction) ในยางสูตร CV และ GTR ก่อนและหลังกระบวนการดีวัลคาไนเซชันด้วย <i>B. cereus</i> เป็นเวลา 20 วัน ที่พีเอช 5 ณ อุณหภูมิห้อง (30±2°C) ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ยการทดลอง 3 ซ้ำ บาร์แสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน..... 51
รูปที่ 4.7	กราฟการคงรูปของยางวัลคาไนซ์และยางรีวัลคาไนซ์ 52
รูปที่ 4.8	สมบัติเชิงกลของยางวัลคาไนซ์และยางรีวัลคาไนซ์ (a) ค่าทนแรงดึงสูงสุด (b) ระยะยืดที่จุดขาด (c) และค่าความแข็ง ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ยการทดลอง 5 ซ้ำ บาร์แสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน..... 54
รูปที่ 4.9	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพื้นผิวในยางวัลคาไนซ์และยางรีวัลคาไนซ์ (a) CV (b) RV1 (c) RV2 (d) RV3 และ (e) RV4 55

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1	สูตรยางคอมพาวนด์ของยางวัลคาไนซ์ทั้ง 3 ระบบ..... 15
ตารางที่ 2.2	สมบัติของยางที่ผ่านกระบวนการวัลคาไนเซชันทั้ง 3 ระบบ..... 16
ตารางที่ 3.1	สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย 20
ตารางที่ 3.2	อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับงานวิจัย..... 22
ตารางที่ 3.3	Primer สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ 16S rRNA..... 27
ตารางที่ 3.4	สูตรในการเตรียมยางคอมพาวนด์และยางรีวัลคาไนซ์ในหน่วย part by weight per hundred part of rubber (phr) 28
ตารางที่ 4.1	ลักษณะของดินที่เก็บจากบริเวณพื้นที่ปนเปื้อนซัลเฟอร์..... 35
ตารางที่ 4.2	แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากบริเวณพื้นที่ปนเปื้อนซัลเฟอร์ 36
ตารางที่ 4.3	เปอร์เซ็นต์การลดลงของซัลเฟอร์ในสารละลาย DBT โดยแบคทีเรียที่คัดแยกได้ ... 37
ตารางที่ 4.4	ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลต LF3..... 40
ตารางที่ 4.5	เปอร์เซ็นต์ความคล้ายของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลต LF3..... 41
ตารางที่ 4.6	พื้นที่ฟีกของหมูฟังกซ์ชันของยางสูตร CV ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงหลังกระบวนการดีวัลคาไนเซชันด้วย <i>B. cereus</i> เป็นเวลา 20 วัน..... 45
ตารางที่ 4.7	เปอร์เซ็นต์พื้นที่ของพันธะซัลเฟอร์แต่ละชนิดในยางก่อนและหลังกระบวนการดีวัลคาไนเซชันด้วย <i>B. cereus</i> เป็นเวลา 20 วัน..... 46
ตารางที่ 4.8	เปอร์เซ็นต์การลดลงของปริมาณซัลเฟอร์ในยางทั้งสองขนาด หลังผ่านกระบวนการดีวัลคาไนเซชัน เมื่อทำการวัดทุก ๆ 5 วัน จนครบ 20 วัน ภายใต้ภาวะที่พีเอชเท่ากับ 7 ณ อุณหภูมิห้อง ($30\pm 2^{\circ}\text{C}$)..... 49
ตารางที่ 4.9	ลักษณะการคงรูปของยางวัลคาไนซ์และยางรีวัลคาไนซ์ 52

คำย่อ

°C	องศาเซลเซียส
NVR	ยางธรรมชาติวัลคาไนซ์
DVR	ยางธรรมชาติวัลคาไนซ์
RV	ยางธรรมชาติวัลคาไนซ์
GTR	ยางรถยนต์ที่ผ่านการบดแล้ว
CV	ระบบธรรมดา
Semi-EV	ระบบกึ่งประสิทธิภาพ
EV	ระบบประสิทธิภาพ
FTIR	Fourier transform infrared spectroscopy
XPS	X-ray photoelectron spectroscopy
GPC	Gel permeation chromatography
phr	Part by weight per hundred part of rubber

บทที่ 1

บทนำ

1.1 มูลเหตุจูงใจหรือแนวเหตุผล

ยางธรรมชาตินับว่าเป็นวัตถุดิบหลักที่ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตยางรถยนต์ หรือชิ้นส่วนประกอบของยานพาหนะต่าง ๆ เนื่องจากมีสมบัติเฉพาะตัวที่โดดเด่น ได้แก่ ความยืดหยุ่น ความทนทานต่อความร้อน ความเหนียวและความแข็ง แต่อย่างไรก็ตาม ยางธรรมชาติไม่สามารถนำมาใช้งานได้โดยตรง จำเป็นต้องผ่านกระบวนการทางเคมีที่เรียกว่า วัลคาไนเซชัน (vulcanization) [1] ส่งผลให้โครงสร้างของยางธรรมชาติเกิดเป็นร่างแหสามมิติโดยมีพันธะซัลเฟอร์เชื่อมขวางอยู่ในโมเลกุลของยาง เมื่อยางหมดอายุการใช้งานลงไม่สามารถหลอมเพื่อนำกลับมาขึ้นรูปซ้ำได้อีก และยากต่อการย่อยสลายตามธรรมชาติ [2] ปริมาณขยะจากยางจึงมีแนวโน้มสูงขึ้นในทุกปี ส่งผลกระทบทางด้านมลภาวะสิ่งแวดล้อม [3] ดังนั้นการนำยางที่หมดอายุการใช้งานลงแล้วหรือเศษยางที่เหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตกลับมาใช้ใหม่ หรือการรีไซเคิล (recycle) โดยผ่านกระบวนการที่เรียกว่า “ดีวัลคาไนเซชัน” (devulcanization) [2, 4] ที่มีการสลายพันธะเชื่อมขวางซัลเฟอร์ภายในโมเลกุลของยางหรือเสมือนเป็นปฏิกิริยาย้อนกลับของกระบวนการวัลคาไนเซชัน โดยมีการแตกสลายของโครงสร้างหลักในโมเลกุลน้อยที่สุดเพื่อให้ยางดังกล่าวมีสมบัติใกล้เคียงกับยางบริสุทธิ์ (virgin rubber) หรือเรียกว่า ยางรีเคลม (reclaim rubber) หรือยางดีวัลคาไนซ์ (devulcanized rubber) ซึ่งการใช้ยางดีวัลคาไนซ์ จะช่วยลดระยะเวลาในการวัลคาไนซ์ เนื่องจากในยางดีวัลคาไนซ์ยังคงมีสารเคมีหรือส่วนที่ว่องไวต่อปฏิกิริยาหลงเหลืออยู่ในโมเลกุลของยาง นอกจากนี้ยังเป็นการลดปัญหาขยะจากยางที่จะก่อให้เกิดปัญหาทางสิ่งแวดล้อมตามมา โดยการนำเศษยางที่หมดอายุการใช้งานลงแล้วกลับมาใช้ใหม่เพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับยาง ดังนั้น การทำให้โครงสร้างของยางธรรมชาติก่อนผ่านการขึ้นรูปกลับคืนมาโดยกระบวนการดีวัลคาไนเซชันสามารถแบ่งได้ 3 วิธี ได้แก่ วิธีทางกายภาพทางเคมีและทางชีวภาพ [5-12] สำหรับวิธีทางกายภาพเป็นวิธีการที่อาศัยพลังงานภายนอกหรือแรงเชิงกลเข้ามาช่วยในการสลายพันธะเชื่อมขวางซัลเฟอร์ในโมเลกุล ซึ่งโครงสร้างสายโซ่หลักของยางอาจถูกทำลายลงเนื่องจากการตัดพันธะแบบสุ่ม (random scission) ในโครงสร้างของยาง ส่วนวิธีทางเคมีอาศัยการทำปฏิกิริยาเคมีของสารรีเคลม (reclaiming agent) ที่เข้าทำปฏิกิริยาบริเวณพันธะซัลเฟอร์อย่างจำเพาะเจาะจง แต่เนื่องจากวิธีการนี้มีการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์เพื่อให้ยางเกิดการบวมพอง และใช้สารรีเคลมในการทำปฏิกิริยา ดังนั้น ยางหลังผ่านกระบวนการดีวัลคาไนเซชัน จำเป็นต้องกำจัดสารรีเคลมหรือตัวทำละลายอินทรีย์ออกจากโมเลกุลของยาง ซึ่งทำให้เกิดความยุ่งยากในการกำจัดสารเคมีและอาจเกิดอันตรายจากการใช้สารเคมีอีกด้วย

การดีวัลคาไนเซชันด้วยวิธีทางชีวภาพนั้นนับเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจเนื่องจากกระบวนการนี้มีความเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ลดการใช้สารเคมีที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพและต้นทุนต่ำ โดยอาศัยการทำงานของจุลินทรีย์ที่สามารถสลายพันธะเชื่อมขวางของซัลเฟอร์ภายในโมเลกุลของยาง ดังนั้นงานวิจัยนี้สนใจเลือกกระบวนการดังกล่าวในการลดปริมาณขยะจากยางและผลกระทบทางด้านสิ่งแวดล้อม แต่ด้วยข้อจำกัดบางประการของการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และประสิทธิภาพในการสลายพันธะเชื่อมขวางของซัลเฟอร์ที่อาจถูกยับยั้งโดยสารเคมีที่ใช้ในกระบวนการวัลคาไนเซชันทำให้กระบวนการดีวัลคาไนเซชันมีประสิทธิภาพไม่ดีเท่าที่ควร ดังนั้นการค้นหาและคัดแยกแบคทีเรียจึงมีความสำคัญ เพราะนอกจากจะได้แบคทีเรียที่มีความหลากหลายไปใช้ในกระบวนการดีวัลคาไนเซชันแล้ว ยังเป็นการใช้ทรัพยากรทางด้านจุลินทรีย์ให้เกิดประโยชน์ ซึ่งการนำจุลินทรีย์มาใช้ในการดีวัลคาไนเซชันในประเทศไทยนั้น ยังมีการรายงานไม่มากนัก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นค้นหาและคัดแยกแบคทีเรียจากแหล่งดินในประเทศไทยที่มีการปนเปื้อนซัลเฟอร์ เช่น เหมืองถ่านหินน้ำพุร้อน เป็นต้น การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการสลายพันธะซัลเฟอร์โดยใช้ dibenzothiophene (DBT) เป็นแหล่งซัลเฟอร์ให้กับแบคทีเรีย เพื่อนำแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการสลายพันธะซัลเฟอร์มาศึกษาผลการสลายพันธะเชื่อมขวางของซัลเฟอร์ในยางธรรมชาติวัลคาไนซ์ทั้ง 3 ระบบ ได้แก่ ระบบธรรมดา (conventional vulcanization หรือ CV) ระบบประสิทธิภาพ (efficient vulcanization หรือ EV) และ ระบบกึ่งประสิทธิภาพ (semi-efficient vulcanization หรือ Semi-EV) [1, 13] การหาภาวะที่เหมาะสมในการสลายพันธะเชื่อมขวางของซัลเฟอร์ในยางธรรมชาติวัลคาไนซ์ของแบคทีเรียโดยศึกษา 3 ปัจจัย ได้แก่ ขนาดของอนุภาคยาง พีเอช (pH) และอุณหภูมิ ยางที่ผ่านกระบวนการดีวัลคาไนเซชันถูกนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์และทดสอบสมบัติต่าง ๆ ได้แก่ สมบัติทางเคมี สมบัติทางกายภาพ และสมบัติเชิงกล สุดท้ายศึกษาผลของการดีวัลคาไนซ์ในยางรถยนต์ที่ผ่านการบดแล้ว (ground tire rubber หรือ GTR) ภายใต้ภาวะที่เหมาะสมต่อการดีวัลคาไนซ์ของแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการสลายพันธะเชื่อมขวางของซัลเฟอร์ที่ดีที่สุด ตลอดจนนำยางดีวัลคาไนซ์ไปผสมกับยางธรรมชาติในสัดส่วนต่าง ๆ เพื่อศึกษาสมบัติการคงรูปและเชิงกลต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1.2.1 คัดแยกแบคทีเรียจากดินในประเทศไทยเพื่อใช้ในการสลายพันธะซัลเฟอร์ในยาง
- 1.2.2 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการสลายพันธะซัลเฟอร์ด้วยแบคทีเรียที่คัดแยกได้
- 1.2.3 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการดีวัลคาไนซ์ในยางด้วยแบคทีเรียที่คัดแยกได้

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

- 1.3.1 ศึกษาค้นคว้างานวิจัยที่เกี่ยวข้อง
- 1.3.2 คัดแยกแบคทีเรียที่สามารถสลายพันธะซัลเฟอร์จากดินในประเทศไทย
- 1.3.3 เปรียบเทียบยางธรรมชาติวัลคาไนซ์ 3 ระบบ ได้แก่ ระบบธรรมดา (conventional vulcanization หรือ CV) ระบบประสิทธิภาพ (efficient vulcanization หรือ EV) และระบบกึ่งประสิทธิภาพ (semi-efficient vulcanization หรือ Semi-EV)
- 1.3.4 ศึกษาปัจจัยของยางที่มีผลต่อการวัลคาไนซ์ด้วยแบคทีเรียที่คัดแยกได้ ได้แก่ ชนิดของพันธะซัลเฟอร์ในยาง ขนาดของอนุภาคยาง พีเอชและอุณหภูมิในกระบวนการวัลคาไนซ์
- 1.3.5 พิสูจน์เอกลักษณ์และทดสอบสมบัติของยางธรรมชาติวัลคาไนซ์ก่อนและหลังกระบวนการวัลคาไนซ์
- 1.3.6 ศึกษาผลการวัลคาไนซ์ในยาง GTR ด้วยแบคทีเรียที่คัดแยกได้ภายใต้ภาวะที่เหมาะสมที่สุด
- 1.3.7 ศึกษาสมบัติของยางธรรมชาติวัลคาไนซ์ ได้แก่ สมบัติการคงรูป สมบัติเชิงกล (ค่าทนแรงดึงสูงสุด (tensile strength) ระยะยืดที่จุดขาด (elongation at break) และค่าความแข็ง (hardness)) และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของยางธรรมชาติวัลคาไนซ์
- 1.3.8 วิเคราะห์ข้อมูล สรุปผล เผยแพร่ผลงานและเขียนวิทยานิพนธ์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัยนี้

ได้แบคทีเรียสำหรับใช้ในการสลายพันธะเชื่อมขวางของซัลเฟอร์ในยางธรรมชาติวัลคาไนซ์ด้วยวิธีทางชีวภาพ เพื่อเป็นแนวทางในการนำยางที่หมดอายุการใช้งานลงแล้วนำกลับมาใช้ใหม่ได้ และส่งเสริมอุตสาหกรรมยางรีไซเคิลในประเทศไทย ทำให้ใช้วัสดุอย่างได้อย่างคุ้มค่าและลดปริมาณขยะยาง

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ชนิดของยาง

ในกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ที่ใช้ยางเป็นวัตถุดิบหลักจำเป็นต้องเลือกใช้ชนิดของยาง และสูตรยางให้เหมาะสมตามสมบัติและคุณภาพของผลิตภัณฑ์ยางที่ต้องการ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องเข้าใจสมบัติของยางชนิดต่าง ๆ ก่อนที่จะนำมาใช้ในกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์ยาง ชนิดของยางแบ่งได้ 3 ชนิด ได้แก่ ยางธรรมชาติ (natural rubber หรือ NR) ยางสังเคราะห์ (synthetic rubber) และยางรีเคลม (reclaim rubber) [2, 4, 14-17]

2.1.1 ยางธรรมชาติ (natural rubber)

ยางธรรมชาติที่ถูกนำไปใช้ในทางการค้าได้จากต้นยางพาราซึ่งมีชื่อเรียกทางพฤกษศาสตร์ว่า *Hevea brasiliensis* (รูปที่ 2.1) มีถิ่นกำเนิดอยู่ในอเมริกาใต้ และได้มีผู้นำมาปลูกในทวีปเอเชียและแอฟริกา สำหรับในประเทศไทยนั้นยางพาราจัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทยนิยมปลูกกันมากทางภาคใต้ เมื่อต้นยางโตได้ที่แล้ว (อายุประมาณ 6 - 7 ปี) สามารถเก็บน้ำยางจากต้นได้โดยการกรีดเปลือก (tapping) ของลำต้น ทำให้น้ำยางไหลซึมออกมา น้ำยางที่ได้จากต้นยางจะเปลี่ยนแปลงไปตามฤดูกาล สภาพดินฟ้าอากาศ ชนิดของดิน สภาวะแวดล้อมของแปลงปลูกยาง พันธุ์ยาง การกรีด อายุต้นยาง การใช้สารเคมีเร่งน้ำยางและปัจจัยอื่น ๆ น้ำยางที่ได้จะถูกนำไปผ่านกระบวนการต่าง ๆ เพื่อเปลี่ยนให้เป็นยางดิบแห้ง (dry rubber) หรือน้ำยางข้น (concentrated latex) (รูปที่ 2.2) เพื่อนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตและแปรรูปในอุตสาหกรรม [18-21]



รูปที่ 2.1 ต้นยางพารา (ถ่ายโดย น.ส.เบญจา แก้วเพชร เมื่อวันที่ 23 พฤศจิกายน 2561)



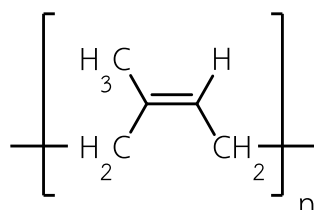
รูปที่ 2.2 น้ำยางข้น (ซ้าย) และยางดิบแห้ง (ขวา)

(ถ่ายโดย น.ส.เบญจมา แก้วเพชร เมื่อวันที่ 23 พฤศจิกายน 2561)

2.1.1.1 สมบัติของยางธรรมชาติ

โครงสร้างของยางธรรมชาติ มีองค์ประกอบหลัก คือ สายโซ่โมเลกุลของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีพันธะไม่อิ่มตัวหรือพันธะคู่ (unsaturated or double bonds) ที่เรียกว่า ซิสพอลิไอโซพรีน (cis-1,4-polyisoprene) ทำหน้าที่เป็นมอนอเมอร์ (รูปที่ 2.3) โดยมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 200,000-500,000 [15, 22] น้ำยางประกอบด้วย 2 ส่วนคือส่วนที่เป็นยาง (Dry rubber content, DRC) และส่วนที่ไม่ใช่ยาง (Non-rubber content; NRC) ปริมาณเล็กน้อย ได้แก่ โปรตีน น้ำตาล กรดไขมัน และแร่ธาตุบางชนิด เช่น ฟอสฟอรัส เหล็ก ทองแดง โพแทสเซียม เป็นต้น [23]

ยางธรรมชาติมีสมบัติเด่น คือ มีความยืดหยุ่น (elasticity) สูง ทั้งที่อุณหภูมิห้อง และที่อุณหภูมิต่ำ ความเหนียวติดกัน (tack) ในสภาพที่ยังไม่คงรูปดีเยี่ยม ความทนต่อแรงดึงสูงสุด (tensile strength) สูงมากโดยไม่ต้องเติมสารตัวเติมเสริมแรง ความทนต่อการฉีกขาด (tear strength) สูงมากทั้งที่อุณหภูมิต่ำและที่อุณหภูมิสูง มีสมบัติเชิงพลวัต (dynamic properties) ที่ดี การสูญเสียพลังงานในรูปของความร้อนต่ำระหว่างการใช้งาน ความต้านทานต่อการล้าตัว (fatigue resistance) และความต้านทานต่อการขัดถู (abrasion resistance) สูง จากสมบัติดังกล่าวส่งผลให้ยางธรรมชาติจัดเป็นยางเอนกประสงค์ที่สามารถนำไปใช้ในการผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ มากมาย เช่น ถุงมือยาง ถุงยางอนามัย ลูกโป่ง ยางรัดของ ท่อยาง สายพานลำเลียง ยางกระเปาะน้ำร้อน ยางล้อรถบรรทุก ยางล้อรถยก ยางล้อเครื่องบิน หรือใช้ผสมกับยางสังเคราะห์ในการผลิตยางล้อรถยนต์ เป็นต้น [13, 18-20, 22, 24] (รูปที่ 2.4)



cis-1,4-polyisoprene

รูปที่ 2.3 โครงสร้างทางเคมีของ cis-1,4-polyisoprene

สำหรับข้อดีของยางธรรมชาติ ได้แก่ ไม่ทนต่อโอโซน ความร้อน แสงแดด จะทำให้ยางธรรมชาติเกิดการแตกหักได้ เนื่องจากสายโซ่โมเลกุลของยางธรรมชาติมีพันธะที่ไม่อิ่มตัว ทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับออกซิเจนและโอโซน โดยมีโลหะ (เช่น เหล็ก แมงกานีส ทองแดง เป็นต้น) ความร้อน แสง และความเครียด (strain) ในเนื้อยางเป็นตัวเร่งให้ยางเสื่อมสภาพเร็วขึ้น เมื่อตั้งทิ้งไว้หรือขณะใช้งาน ซึ่งสามารถแก้ไขปัญหาดังกล่าวได้โดยการเติมสารแอนติออกซิแดนท์ (antioxidant) และสารแอนติไซแนนท์ (antizonant) เข้าไปในยางเพื่อยืดอายุการใช้งานหรือการเก็บรักษา [20, 22] สำหรับสมบัติทางกายภาพ (physical properties) ของยางธรรมชาตินั้น อาจมีการเปลี่ยนแปลงไปบ้างเล็กน้อยจากการมีสารที่ไม่ใช่ยางปะปนอยู่ นอกจากนี้ความทนน้ำมันของยางธรรมชาติมีค่าต่ำมาก เนื่องจากยางธรรมชาติสามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว เช่น เบนซีน (benzene) เฮกเซน (hexane) โทลูอีน (toluene) และสารเคมีอื่น ๆ [18, 25]



รูปที่ 2.4 ผลิตภัณฑ์จากยางธรรมชาติ

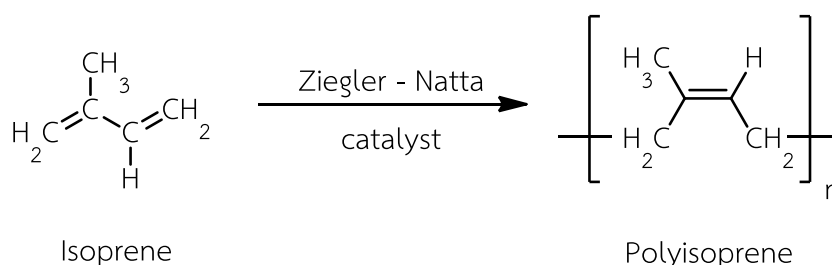
(แหล่งที่มา : <http://yousense.info/6465677261646174696f6e/degradation-of-nonvulcanized-natural-rubber-renewable.html>)

2.1.2 ยางสังเคราะห์ (synthetic rubber)

ยางสังเคราะห์เป็นผลิตภัณฑ์ยางที่สังเคราะห์ขึ้นเพื่อเลียนแบบยางธรรมชาติ โดยอาศัยปฏิกิริยาทางเคมีที่เรียกว่า ปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชัน (polymerization) [26] ของมอนอเมอร์ (monomer) ที่เป็นผลผลิตพลอยได้จากกระบวนการกลั่นปิโตรเลียม โดยยางสังเคราะห์แต่ละชนิดจะมีการผสมมอนอเมอร์ชนิดเดียวหรือหลายชนิด ที่เรียกว่า โคโพลิเมอร์ (Copolymer) ในสัดส่วนที่ต่างกัน เพื่อให้ได้ยางสังเคราะห์ที่มีสมบัติทางกายภาพ ทางกล และทางเคมีตามที่ต้องการ โดยยางสังเคราะห์จะมีข้อดีกว่ายางธรรมชาติที่ คือ ทนทานต่อการขีดถูและการสึกกร่อน (abrasion resistance) ที่ดีกว่า มีความเสถียรทางความร้อน (thermal stability) ที่สูงกว่าจึงทำให้ยางสังเคราะห์เสื่อมสภาพได้ช้ากว่ายางธรรมชาติ สำหรับชนิดยางสังเคราะห์จะแบ่งตามชนิดของมอนอเมอร์ที่เข้ามาทำปฏิกิริยากัน [17, 27-29]

2.1.2.1 ยางสังเคราะห์พอลิไอโซพรีน (synthetic polyisoprene หรือ IR)

ยางพอลิไอโซพรีน เป็นยางที่เกิดจากการสังเคราะห์จากไอโซพรีนมอนอเมอร์ (isoprene monomer) โดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันชนิด Ziegler-Natta [30] และได้ตั้งชื่อชนิดนี้ว่า “synthetic natural rubber” (รูปที่ 2.5) ซึ่งยางสังเคราะห์ที่ได้จะมีโครงสร้างทางเคมี และสมบัติอื่น ๆ เหมือนกับยางธรรมชาติ [31] ดังนั้นจึงสามารถใช้ยางพอลิไอโซพรีนแทนยางธรรมชาติในการผลิตผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ได้ แต่เมื่อเปรียบเทียบกับยางธรรมชาติแล้ว พบว่ายางพอลิไอโซพรีนมีสมบัติเชิงกล เช่น ความทนต่อแรงดึงและความทนต่อการฉีกขาดต่ำกว่าเล็กน้อย และมีราคาสูงกว่ายางธรรมชาติอีกด้วย อย่างไรก็ตามข้อดีของยางพอลิไอโซพรีนคือ ยางจะมีคุณภาพสม่ำเสมอกว่า มีสิ่งเจือปนน้อยกว่า และมีสีขาวสวย ในบางครั้งจึงนิยมใช้ยางพอลิไอโซพรีนแทนยางธรรมชาติในการผลิตจุกนมยางและอุปกรณ์การแพทย์บางชนิด [32] (รูปที่ 2.6)



รูปที่ 2.5 ปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันชนิด Ziegler-Natta ในการสังเคราะห์ยางพอลิไอโซพรีน

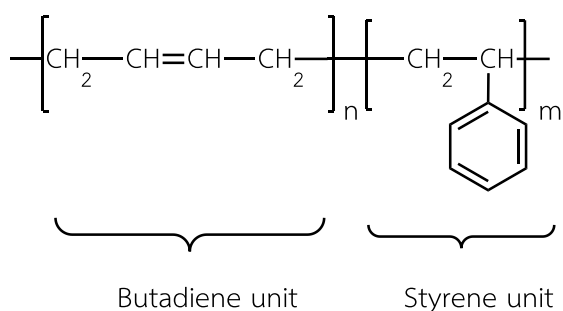


รูปที่ 2.6 จุกนมยางและอุปกรณ์การแพทย์บางชนิดที่ผลิตจากยางพอลิไอโซพรีน

(แหล่งที่มา: <https://www.motherhood.co.th/en/sales?n=100&p=10>)

2.1.2.2 ยางสไตรีนบิวทาไดอิน (styrene-butadiene rubber หรือ SBR)

ยางสไตรีนบิวทาไดอิน เป็นยางที่สังเคราะห์จากมอนอเมอร์ของสไตรีนและบิวทาไดอิน (รูปที่ 2.7) จัดเป็นยางสังเคราะห์เอนกประสงค์ที่สำคัญและใช้กันมากที่สุดในโรงงานอุตสาหกรรม [33] เพราะเป็นยางที่ใช้งานได้ทั่วไปเช่นเดียวกับยางธรรมชาติและยาง IR สามารถผลิตผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ได้อย่างกว้างขวาง มีคุณภาพสม่ำเสมอ และราคาค่อนข้างคงที่ มอนอเมอร์ของสไตรีนและบิวทาไดอินอยู่คละกันอย่างไม่เป็นระเบียบ ทำให้มีลักษณะคล้ายยาง (rubberlike) และจากความไม่สม่ำเสมอของโครงสร้าง จึงไม่สามารถเกิดผลึกได้เมื่อนำไปดึงให้ยืดออก ดังนั้นยางสไตรีนบิวทาไดอิน เมื่อผ่านการวัลคาไนซ์แล้วจะมีความทนต่อแรงดึง ความทนต่อการฉีกขาด ค่อนข้างต่ำ การกระเด็งกระดอน หรือความยืดหยุ่นต่ำกว่ายางธรรมชาติมาก เมื่อถูกใช้งานในเชิงพลวัต จะทำให้ยางมีความร้อนสะสมสูง [34, 35] ดังนั้น ยางชนิดนี้จึงไม่เหมาะที่จะใช้ในการผลิตยางล้อรถบรรทุกที่มีขนาดใหญ่เพราะความร้อนสะสมที่เกิดขึ้นอาจสูงมากพอที่จะทำให้ยางเกิดการระเบิดได้ นอกจากนี้ จำเป็นต้องเติมสารเสริมแรง (reinforcement) เช่น เขม่าดำ (carbon black) หรือซิลิกา (silica) [36] เข้าไปเพื่อเพิ่มสมบัติความทนต่อแรงดึงให้กับยาง สำหรับการนำยางสไตรีนบิวทาไดอินไปใช้งานนั้นส่วนใหญ่จะใช้ทำยางรถยนต์และยางรถบรรทุกเล็ก โดยใช้ยางธรรมชาติเข้าไปผสมด้วย นอกจากนี้ยังใช้ทำสายพาน พื้นรองเท้า ท่อยางและใช้หุ้มลูกกอล์ฟ หรือใช้ในรูปของน้ำยางเพื่อใช้ทำพื้นยางรองพรม เป็นต้น [37, 38] (รูปที่ 2.8)



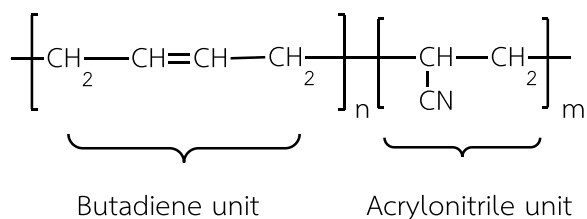
รูปที่ 2.7 โครงสร้างทางเคมีของยางสไตรีนบิวทาไดอิน



รูปที่ 2.8 พื้นยางรองพรม พื้นรองเท้า ยางหุ้มลูกกอล์ฟ ที่ผลิตจากยางสไตรีนบิวทาไดอิน
(แหล่งที่มา: <http://www.bigstar.co.th/products/2/EVA-Sheet/>)

2.1.2.3 ยางไนไตรล์ (nitrile or acrylonitrile-butadiene rubber หรือ NBR)

ยางไนไตรล์เป็นยางที่สังเคราะห์จากมอนอเมอร์ของอะคริโลไนไตรล์และบิวทาไดอิน [39] (รูปที่ 2.9) มีสมบัติเด่น คือ ทนต่อน้ำมันปิโตรเลียมและตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วต่าง ๆ ได้ดี ทนต่อการเสื่อมสภาพอันเนื่องมาจากความร้อน ออกซิเจน และโอโซนสูงกว่ายางธรรมชาติและยางสไตรีนบิวทาไดอิน เป็นยางที่มีความต้านทานต่อการขีดถูที่สูงมาก จึงใช้อย่างกว้างขวางในงานซีลบุหรือเคลือบ ท่อยางเสริมความแข็งแรง (hose liners) สายพานลำเลียง (รูปที่ 2.10) สำหรับข้อต่อยคือเมื่อผ่านการวัลคาไนซ์ ยางจะมีความยืดหยุ่น ความทนต่อแรงดึง และความทนต่อการฉีกขาดค่อนข้างต่ำ [37, 40]



รูปที่ 2.9 โครงสร้างทางเคมีของยางไนไตรล์

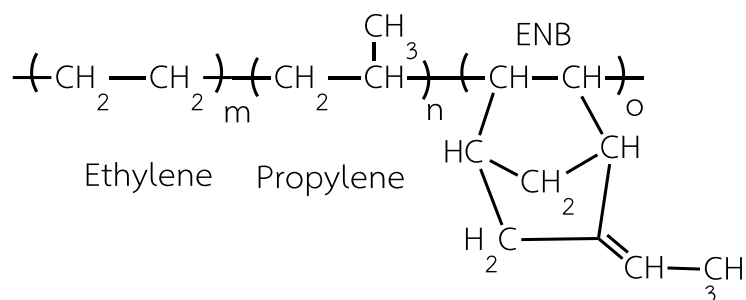


รูปที่ 2.10 ท่อยางเสริมความแข็งแรง ที่ผลิตจากยางไนไตรล์

(แหล่งที่มา: <http://milkingmachineliners.ie/%C2%BDx-30m-braided-hose-e52-00-inc-vat/>)

2.1.2.4 ยางเอธิลีนพรอพิลีนไดอีน (ethylene-propylene diene monomer หรือ EPDM)

โครงสร้างของยางเอธิลีนพรอพิลีนไดอีน เกิดจากการสังเคราะห์พอลิเมอร์โดยเริ่มจากการทำปฏิกิริยาโคพอลิเมอร์ไรเซชัน (copolymerization) ระหว่างมอนอเมอร์ของเอธิลีน (ethylene) กับพรอพิลีน (propylene) ได้พอลิเมอร์ที่มีลักษณะการจัดเรียงตัวของโมเลกุลแบบอสัณฐาน (amorphous) สมบัติเป็นยางเรียกว่ายางเอธิลีนพรอพิลีน (ethylene-propylene monomer หรือ EPM) [41] เนื่องจากโมเลกุลของยางชนิดนี้ไม่มีส่วนที่ไม่อิมิตัวหรือไม่มีพันธะคู่ ดังนั้น ยางชนิดนี้จึงมีสมบัติเด่นในด้านความทนทานต่อการเสื่อมสภาพอันเนื่องมาจากแสงแดด ออกซิเจน ความร้อน โอโซน และสารเคมี อย่างไรก็ตาม ข้อเสียหลักของยางชนิดนี้ก็คือไม่สามารถใช้ซัลเฟอร์ในการคงรูปได้ (เพราะไม่มีพันธะคู่อยู่ในโมเลกุล) [42] การทำให้ยางคงรูปจึงต้องใช้เพอร์ออกไซด์ (peroxide) เท่านั้นปัจจุบันจึงได้มีการพัฒนายางชนิดใหม่โดยการเติมมอนอเมอร์ตัวที่สามคือ ไดอีน ลงไปเล็กน้อยในระหว่างการเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชัน ทำให้ยางที่ได้มีส่วนที่ไม่อิมิตัวอยู่ในสายโมเลกุล ยางจึงสามารถคงรูปได้ด้วยซัลเฟอร์และเรียกกยางชนิดนี้ว่ายาง EPDM [43] (รูปที่ 2.11) การใช้ประโยชน์จากยาง EPDM ส่วนใหญ่ในการผลิตสายเคเบิล สายไฟ ยางซีลขอบหน้าต่าง ขอบประตูรถยนต์ เป็นต้น [44] (รูปที่ 2.12)



รูปที่ 2.11 โครงสร้างทางเคมีของยางเอธิลีนพรอพิลีนไดอีน



รูปที่ 2.12 สายเคเบิล สายไฟ ยางซีลขอบประตูรถยนต์จากยางเอธิลีนพรอพิลีนไดอีน
(แหล่งที่มา: <http://twckeng.igetweb.com/index.php?mo=3&art=42213200>)

2.1.3 ยางรีเคลม

ผลิตภัณฑ์ยางมีการใช้งานอย่างกว้างขวางมาเป็นระยะเวลาอันยาวนาน เนื่องจากสมบัติเฉพาะตัวที่โดดเด่นจึงสามารถนำไปผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ที่หลากหลาย แต่อย่างไรก็ตามเมื่อหมดอายุการใช้งานลงแล้วจะไม่สามารถนำกลับมาใช้งานใหม่ได้ ทำให้ผลิตภัณฑ์จากยางที่หมดอายุการใช้งานกลายเป็นขยะที่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมที่ยากต่อการกำจัด [45, 46] จึงมีความพยายามที่จะนำเศษยาง ยางรถยนต์ ยางในรถยนต์หรือยางรองเท้าที่ชำรุด และผลิตภัณฑ์ยางที่ไร้ประโยชน์ กลับมาทำให้มีโครงสร้างใกล้เคียงกับยางบริสุทธิ์ (virgin rubber) โดยการทำลายโครงสร้างตาข่ายสามมิติที่เชื่อมต่อโดยซัลเฟอร์ในโครงสร้างของยางที่ผ่านกระบวนการวัลคาไนเซชันแล้ว [1, 47] ให้สามารถนำกลับมาขึ้นรูปใหม่ได้ ยางที่ได้ในขั้นนี้ เรียกว่า ยางรีเคลม [48, 49] หรือยางปรับสภาพใหม่ ยางรีเคลมจึงเป็นวัตถุดิบที่สำคัญในอุตสาหกรรมยาง โดยสามารถนำยางรีเคลมไปผสมกับยางบริสุทธิ์เพื่อขึ้นรูปใหม่ หรือใช้ยางรีเคลม เป็นสารเติมแต่งเพื่อเพิ่มความแข็งแรงให้กับผลิตภัณฑ์ยาง

การทำยางรีเคลม ส่วนใหญ่ทำโดยใช้สารเคมีและความร้อนเข้าไปในเศษยางที่ผ่านการบด ทำให้การเชื่อมขวางระหว่างโมเลกุลถูกทำลาย หรือเรียกว่าการเกิดกระบวนการดีวัลคาไนเซชัน (devulcanization) วัตถุประสงค์หลักในการทำยางรีเคลม คือการทำให้เกิดกระบวนการ

ดีวัลคาโนเซชันให้มากที่สุด แต่ในขณะเดียวกันก็จำเป็นที่จะต้องทำให้เกิดการแตกสลายในสายโซ่โพลีเมอร์ (depolymerization) น้อยที่สุด เพื่อให้ยางรีเคิลมมีสมบัติเหมือนยางตั้งต้นหรือยางบริสุทธิ์ จากนั้นจะนำยางรีเคิลมที่ได้ไปบดผสมกับยางธรรมชาติหรือยางสังเคราะห์และนำยางคอมพาวนด์ที่ได้ไปขึ้นรูปใหม่ อย่างไรก็ตามยางรีเคิลมที่ถูกนำมาวัลคาไนซ์ใหม่จะมีสมบัติเชิงกลที่ด้อยกว่ายางบริสุทธิ์ [48, 49] ดังนั้น อัตราส่วนการผสมระหว่างยางรีเคิลมกับยางบริสุทธิ์จะส่งผลให้ผลิตภัณฑ์ยางมีสมบัติที่แตกต่างกัน ดังนั้น การนำไปใช้งานจึงจำเป็นต้องหาอัตราส่วนที่เหมาะสมเพื่อให้ผลิตภัณฑ์ยางมีสมบัติเชิงกลหรือสมบัติอื่น ๆ ที่เหมาะสมสำหรับนำไปใช้งาน ซึ่งสามารถสรุปข้อดีและข้อเสียของยางรีเคิลมได้ดังนี้

2.1.3.1 ข้อดีของยางรีเคิลม

- ราคาต่ำกว่ายางบริสุทธิ์และค่อนข้างคงที่
- สามารถผสมกับสารเคมีเข้าเป็นเนื้อเดียวกันได้รวดเร็ว เพราะเคยผ่านการผสมมาแล้วครั้งหนึ่ง
- เมื่อผสมกับสารเคมีต่าง ๆ จะเกิดความร้อนน้อย จึงสามารถใส่เขม่าดำ (carbon black) ในปริมาณมากได้ รวมทั้งสารเสริมแรงอื่น ๆ อีกด้วย
- เพิ่มประสิทธิภาพและอัตราเร็วในการขึ้นรูป ด้วยวิธีการอัดรีดและรีดแผ่น จึงผลิตได้ปริมาณมากในระยะเวลาอันสั้น ทำให้ลดการใช้พลังงานไฟฟ้า
- สารประกอบที่ยังไม่ได้วัลคาไนซ์จะมีเสถียรภาพดี ทำให้หมดปัญหาเรื่องการหดตัวและการบวมตัว
- ยางรีเคิลมจะวัลคาไนซ์ได้เร็วกว่ายางบริสุทธิ์ ทำให้ใช้สารเร่งวัลคาไนซ์น้อยลง [50-52]

2.1.3.2 ข้อเสียของยางรีเคิลม

- ยางรีเคิลมจะมีความต้านทานการขีดถูต่ำกว่ายางบริสุทธิ์ ดังนั้นในงานบางอย่าง เช่น การทำดอกยางรถยนต์ จึงไม่นิยมใช้ยางรีเคิลม
- ยางรีเคิลมส่วนใหญ่มีสีคล้ำหรือดำ จึงไม่เหมาะสมกับผลิตภัณฑ์ที่ต้องใช้สารสีผสม
- ความสามารถในการหักงอต่ำ จึงทำให้เกิดรอยแตกได้ง่าย [50-52]

2.2 กระบวนการวัลคาไนเซชัน

กระบวนการวัลคาไนเซชันเป็นกระบวนการสำคัญที่ใช้ในการขึ้นรูปผลิตภัณฑ์ยาง โดยอาศัยปฏิกิริยาทางเคมีทำให้เกิดพันธะเชื่อมขวางของซัลเฟอร์ภายในโมเลกุลของยาง ทำให้ยางมีโครงสร้างโมเลกุลแบบตาข่ายสามมิติ หรือเรียกว่าการเกิดการเชื่อมโยง (crosslinks) อันเป็นผลทำให้ยางเกิดการเปลี่ยนสภาพจากนิ่ม ไหลได้ง่าย และไม่มีเสถียรภาพของรูปทรงไปเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีความยืดหยุ่นและคงรูปถาวร [1, 53, 54] สำหรับสารเคมีหลักที่ใช้ในกระบวนการวัลคาไนเซชันประกอบไปด้วย สารวัลคาไนซ์ เช่น ซัลเฟอร์ เปอร์ออกไซด์ สารตัวเร่ง เช่น n-cyclohexyl-2-benzothiazole sulfenamide 2-mercaptobenzothiazole และสารกระตุ้นปฏิกิริยา เช่น ซิงค์ออกไซด์ กรดสเตียริก [17, 27, 36, 54-56] โดยสัดส่วนของซัลเฟอร์และสารตัวเร่งจะเป็นตัวกำหนดชนิดของพันธะซัลเฟอร์ที่เกิดขึ้นภายในโมเลกุลของยาง เช่น พันธะที่มีซัลเฟอร์อะตอมเดี่ยว (monosulfidic bonds) อะตอมคู่ (disulfidic bonds) และหลายอะตอม (polysulfidic bonds) (รูปที่ 2.13) [1, 53, 54, 57] ระบบการวัลคาไนเซชันสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ระบบ ตามชนิดของพันธะซัลเฟอร์ที่เชื่อมขวางภายในโมเลกุลของยาง ได้แก่

2.2.1 ระบบธรรมดา (conventional vulcanization)

ระบบธรรมดาคือระบบที่ใช้ปริมาณซัลเฟอร์ที่มาก ประมาณ 2.0-3.5 โดยน้ำหนักเมื่อเทียบกับยาง 100 ส่วน (part by weight per hundred part of rubber หรือ phr) และใช้สารตัวเร่งที่น้อย ประมาณ 0.4-1.2 phr ทำให้ได้พันธะที่มีซัลเฟอร์หลายอะตอมเชื่อมขวางภายในโมเลกุลของยาง ส่งผลให้ยางวัลคาไนซ์ที่ได้มีความยืดหยุ่นสูง มีสมบัติเชิงกลพลวัต และสมบัติเชิงกลที่ดี เช่น ค่าทนแรงดึงสูงสุด ระยะยืดที่จุดขาด เป็นต้น แต่อย่างที่ได้อาจไม่ทนทานต่อการเสื่อมสภาพ ดังนั้นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากระบบนี้ เช่น ยางรัดของ ถูมือยาง เป็นต้น [1, 53, 54, 57]

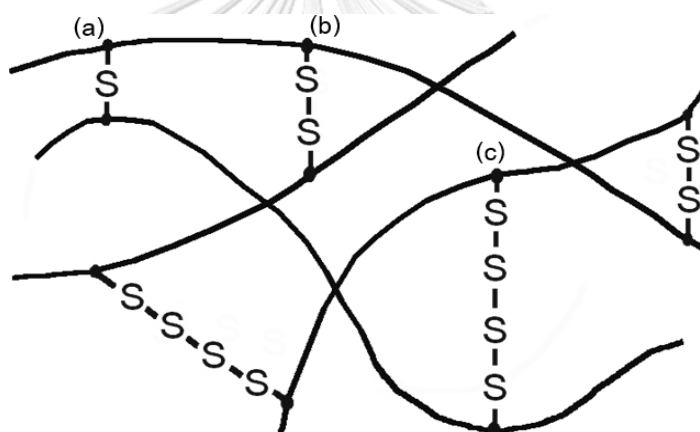
2.2.2 ระบบประสิทธิภาพ (efficient vulcanization)

สำหรับระบบนี้จะใช้สัดส่วนของซัลเฟอร์ที่น้อย ประมาณ 0.4-0.8 phr และสารตัวเร่งที่มาก ประมาณ 2.5-5.0 phr จึงทำให้ได้พันธะที่มีซัลเฟอร์อะตอมเดี่ยวเชื่อมขวางภายในโมเลกุลของยาง ทำให้ยางที่ผ่านการคงรูปด้วยระบบนี้ มีความทนทานต่อความร้อนที่ดี มีค่าการเสียรูปหลังการกด (compression set) ต่ำ และมีค่าความต้านทานต่อการเสื่อมสภาพเมื่ออบคงรูปเป็นเวลานาน (reversion resistance) ดีกว่าระบบอื่น แต่มีสมบัติเชิงกลและสมบัติเชิงกลพลวัตไม่ดีเท่าระบบ

ธรรมดา จึงเหมาะต่อผลิตภัณฑ์ประเภทที่ทนความร้อนสูง เช่น ฉนวนไฟฟ้า ยางกระเปาะน้ำร้อน เป็นต้น [1, 53, 54, 57]

2.2.3 ระบบกึ่งประสิทธิภาพ (semi-efficient vulcanization)

ระบบกึ่งประสิทธิภาพเป็นระบบที่ใช้สัดส่วนของซัลเฟอร์และสารตัวเร่งปฏิกิริยาในปริมาณใกล้เคียงกัน โดยมีปริมาณซัลเฟอร์ ประมาณ 1.0-2.0 phr ร่วมกับสารตัวเร่ง ประมาณ 1.2-2.5 phr ดังนั้นพันธะเชื่อมขวางภายในโมเลกุลของยางจะอยู่ในรูปของพันธะซัลเฟอร์อะตอมเดี่ยวและอะตอมคู่ ทำให้คุณสมบัติของยางวัลคาไนซ์ที่ได้อยู่กึ่งกลางระหว่างระบบธรรมดาและระบบประสิทธิภาพ กล่าวคือ มีความยืดหยุ่นและความทนทานต่อความร้อนที่ดี จึงเหมาะต่อการผลิตผลิตภัณฑ์ประเภท ยางรถยนต์ ยางรถบรรทุก เป็นต้น [1, 53, 54, 57]



รูปที่ 2.13 ประเภทของพันธะเชื่อมขวางของซัลเฟอร์ที่เกิดขึ้นภายในโมเลกุลของยางผ่านกระบวนการวัลคาไนเซชัน (a) ซัลเฟอร์อะตอมเดี่ยว (b) ซัลเฟอร์อะตอมคู่ และ (c) ซัลเฟอร์หลายอะตอม

ตารางที่ 2.1 แสดงสูตรยางคอมพาวด์ของยางวัลคาไนซ์ทั้ง 3 ระบบ โดยระบบที่มีปริมาณของซัลเฟอร์มากที่สุด คือ ระบบธรรมดา รองลงมาคือระบบกึ่งประสิทธิภาพ และระบบประสิทธิภาพตามลำดับ ส่วนปริมาณของสารตัวเร่งที่มีมากที่สุด คือในระบบประสิทธิภาพ รองลงมาคือระบบกึ่งประสิทธิภาพ และระบบธรรมดา ตามลำดับ [53] สัดส่วนของปริมาณซัลเฟอร์และสารตัวเร่งจะส่งผลให้ชนิดและปริมาณของพันธะซัลเฟอร์ในแต่ละระบบแตกต่างกัน (ตารางที่ 2.2) กล่าวคือ ในระบบธรรมดามีพันธะที่มีซัลเฟอร์หลายอะตอมและอะตอมคู่ในปริมาณมากที่สุด ระบบประสิทธิภาพจะมีพันธะซัลเฟอร์อะตอมเดี่ยวมากที่สุด และระบบกึ่งประสิทธิภาพจะมีปริมาณของพันธะที่มีซัลเฟอร์

หลายอะตอม อะตอมคู่ และพันธะซัลเฟอร์อะตอมเดี่ยวปริมาณใกล้เคียงกัน นอกจากนี้ยังส่งผลให้มีสมบัติอื่น ๆ แตกต่างกันได้แก่ cyclic sulfide concentration, low-temperature crystallization, heat aging resistance, reversion resistance และ compression set [17, 24, 27-29, 36, 54-56, 58]

2.3 กระบวนการวัลคาไนเซชัน

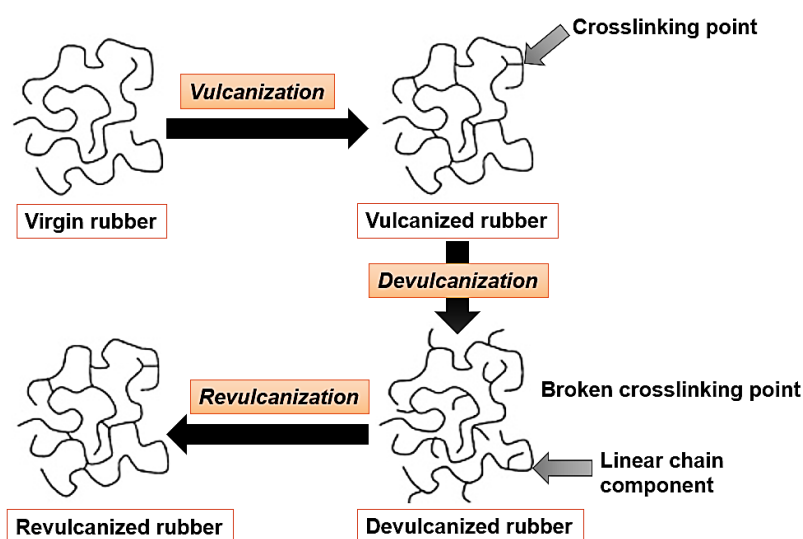
ยางเมื่อผ่านกระบวนการวัลคาไนเซชันแล้วจะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีการคงรูปถาวรและจัดจำแนกอยู่ในกลุ่มพอลิเมอร์ประเภทเทอร์โมเซต ซึ่งไม่สามารถนำไปหลอมด้วยความร้อนเพื่อนำกลับมาใช้ใหม่ได้อีกครั้ง ทำให้ผลิตภัณฑ์ยางหมดอายุการใช้งานลงจะกลายเป็นขยะที่ยากต่อการกำจัดและย่อยสลาย โดยธรรมชาติดังนั้นการนำยางที่หมดอายุการใช้งานลงแล้วหรือเศษยางที่เหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตกลับมาใช้ใหม่ หรือการรีไซเคิล (recycle) โดยผ่านกระบวนการที่เรียกว่า “ดีวัลคาไนเซชัน” [2, 4, 50, 51] ที่มีการสลายพันธะเชื่อมขวางซัลเฟอร์ภายในโมเลกุลของยางหรือเสมือนเป็นปฏิกิริยาย้อนกลับของกระบวนการวัลคาไนเซชัน โดยมีการแตกสลายของโครงสร้างหลักในโมเลกุลน้อยที่สุดเพื่อให้ยางดังกล่าวมีสมบัติใกล้เคียงกับยางบริสุทธิ์ (virgin rubber) จากนั้นสามารถนำยางที่ผ่านกระบวนการดีวัลคาไนเซชันกลับมาขึ้นรูปใหม่ได้อีกครั้ง โดยผ่านกระบวนการรีวัลคาไนเซชัน และเรียกผลิตภัณฑ์ดังกล่าวว่า “ยางรีวัลคาไนซ์ (revulcanized rubber)” ดังแสดงในรูปที่ 2.1 [2] สำหรับกระบวนการดีวัลคาไนเซชัน สามารถแบ่งได้ 3 วิธี ดังนี้

ตารางที่ 2.1 สูตรยางคอมพาวนด์ของยางวัลคาไนซ์ทั้ง 3 ระบบ [1, 8, 54]

Vulcanization system	Sulfur (S) (phr)	Accelerator (A) (phr)	Ratio of A/S
CV	2.0-3.5	1.2-0.4	1.0-0.6
Semi-EV	1.0-1.7	2.5-1.2	0.7-2.5
EV	0.4-0.8	5.0-2.0	2.5-1.2

ตารางที่ 2.2 สมบัติของยางที่ผ่านกระบวนการวัลคาไนเซชันทั้ง 3 ระบบ [1, 8, 54]

Property	CV	Semi-EV	EV
Poly and disulfide crosslink (%)	95	50	20
Monosulfide crosslink (%)	5	50	80
Cyclic sulfide concentration	High	Medium	Low
Low-temperature crystallization	High	Medium	Low
Heat aging resistance	Low	Medium	High
Reversion resistance	Low	Medium	High
Compression set, 22 hr at 70 (%)	30	20	10

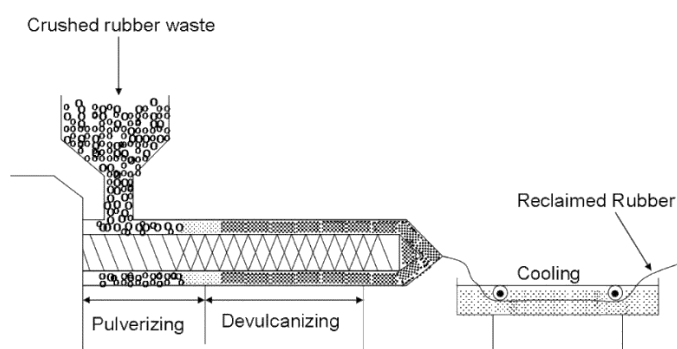


รูปที่ 2.14 โครงสร้างโมเลกุลของยางวัลคาไนซ์ ยางดีวัลคาไนซ์และยางรีวัลคาไนซ์ที่ได้จากกระบวนการวัลคาไนเซชัน ดีวัลคาไนเซชัน และรีวัลคาไนเซชัน ตามลำดับ

2.3.1 กระบวนการดีวัลคาไนเซชันโดยวิธีทางกายภาพ (physical devulcanization)

เป็นกระบวนการที่ใช้พลังงานจากภายนอกเข้ามาช่วยในการทำลายพันธะเชื่อมขวางของซัลเฟอร์ เช่น พลังงานจากคลื่นไมโครเวฟ (microwave) [12] พลังงานจากรังสีอัลตราซาวด์ (ultrasound) [59] พลังงานดังกล่าวสามารถทำลายพันธะเชื่อมขวางของซัลเฟอร์ภายในโมเลกุลของ

ยางตามความถี่และระดับพลังงานที่เหมาะสม นอกจากนี้ยังรวมถึงการใช้แรงเชิงกลจากอุปกรณ์ต่าง ๆ เข้าช่วยเพื่อให้ยางมีขนาดและน้ำหนักโมเลกุลลดลง เช่น เครื่องบดผสมสองรูปกลิ้ง (two roll mill) และเครื่องอัดรีดแบบสกรูเดี่ยว (single screw extruder) เป็นต้น (รูปที่ 2.15) ซึ่งประสิทธิภาพของกระบวนการนี้ขึ้นอยู่กับเทคโนโลยีที่นำมาใช้ [3, 5, 8, 12, 60-62]



รูปที่ 2.15 ขั้นตอนการรีเคลมยางโดยกระบวนการทางกายภาพโดยใช้เครื่องอัดรีดแบบสกรูเดี่ยว (single screw extruder)

2.3.2 กระบวนการตีวัลคาไนเซชันโดยวิธีทางเคมี (chemical devulcanization)

เป็นวิธีที่อาศัยการเกิดปฏิกิริยาทางเคมีระหว่างพันธะเชื่อมขวางของซัลเฟอร์ภายในโมเลกุลของยางและสารรีเคลม (reclaiming agent) โดยนำยางไปแช่ในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น โทลูอีน เบนซีน เป็นต้น เพื่อให้ยางเกิดการบวมพองและง่ายต่อการซึมผ่านของสารรีเคลม เช่น สารประกอบอินทรีย์ไดซัลไฟด์ เมอร์แคปแทน [8, 63-65] เป็นต้น ที่เข้าทำปฏิกิริยาทางเคมีเพื่อสลายพันธะเชื่อมขวางของซัลเฟอร์ภายในโมเลกุลของยางอย่างจำเพาะเจาะจงตามชนิดของพันธะซัลเฟอร์ที่แตกต่างกันของระบบการวัลคาไนเซชัน [64, 66] แต่อย่างไรก็ตามข้อเสียของวิธีการนี้คือ จำเป็นต้องกำจัดสารรีเคลมและตัวทำละลายออกจากโมเลกุลของยาง

2.3.3 กระบวนการตีวัลคาไนเซชันโดยวิธีทางชีวภาพ (biological devulcanization)

อาศัยการทำงานของเอนไซม์จากจุลินทรีย์ที่สามารถสลายพันธะเชื่อมขวางของซัลเฟอร์ โดยเกิดผ่านกระบวนการเมตาบอลิซึม (metabolism) ของจุลินทรีย์ที่ใช้ซัลเฟอร์เป็นแหล่งพลังงาน และการเจริญเติบโต ซึ่งมีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการสลายพันธะเชื่อมขวางของซัลเฟอร์ (desulfurizing enzyme) เช่น เอนไซม์ในกลุ่ม desulfinase monooxygenase sulfurlyase เป็นต้น [2, 6, 9, 10, 67-71] โดยประสิทธิภาพในการสลายพันธะเชื่อมขวางของซัลเฟอร์นั้น ขึ้นอยู่กับการทำงานของจุลินทรีย์ จึงอาจมีข้อจำกัดในเรื่องของสารเคมีที่ใช้ในกระบวนการวัลคาไนเซชันที่มีผล

ไปยับยั้งการเจริญเติบโตและลดประสิทธิภาพการดีวัลคาไนเซชันของจุลินทรีย์ แต่ข้อดีของกระบวนการนี้คือ มีความเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมและลดการใช้สารเคมีที่เป็นอันตราย ดังนั้นงานวิจัยนี้สนใจเลือกกระบวนการนี้ในการลดปริมาณขยะจากยางและลดของเสียที่ก่อให้เกิดผลกระทบต่อทางด้านสิ่งแวดล้อม

2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Steinbuchel และคณะ [72] ศึกษาผลของแบคทีเรีย *Sulfolobus acidocaldarius* ต่อประสิทธิภาพการดีวัลคาไนซ์ในยางรถยนต์ โดยแบคทีเรียชนิดนี้จัดอยู่ในกลุ่มที่ชอบอุณหภูมิสูง (thermophilic bacteria) ทำให้อุณหภูมิที่ใช้ในกระบวนการดีวัลคาไนซ์อยู่ในช่วง 65-70°C ยางที่ได้หลังผ่านกระบวนการดีวัลคาไนซ์ เมื่อนำมาขึ้นรูปใหม่ พบว่ายางรีวัลคาไนซ์ที่ผสมระหว่างยางดีวัลคาไนซ์และยางธรรมชาติในอัตราส่วน 15:85 ให้ค่าทนแรงดึงสูงสุดและระยะยืดที่จุดขาดเพิ่มขึ้น 15% เมื่อเทียบกับยางที่ไม่ผ่านการดีวัลคาไนซ์ผสมกับยางธรรมชาติในอัตราส่วนเดียวกัน

Li และคณะ [11] ศึกษาประสิทธิภาพการสลายพันธะเชื่อมขวางของซัลเฟอร์ในยางรถยนต์โดยใช้แบคทีเรียในกลุ่ม *Acidithiobacillus* ที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีในภาวะที่เป็นกรดสูง (acidophilic bacteria) ถูกคัดแยกจากดินบริเวณเหมืองเหล็ก ประเทศจีน เมื่อนำแบคทีเรียไปบ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อที่พีเอชประมาณ 2.5 ร่วมกับยาง GTR หลังผ่านกระบวนการดีวัลคาไนซ์เป็นเวลา 30 วัน พบว่าปริมาณซัลเฟอร์ลดลงจากเดิม 52.8% สมบัติเชิงกล เช่น ค่าทนแรงดึงสูงสุดและระยะยืดที่จุดขาดของยางรีวัลคาไนซ์ ที่มีการผสมระหว่างยางดีวัลคาไนซ์และยางบริสุทธิ์ในอัตราส่วน 10:90 มีค่าสูงที่สุดเมื่อเทียบกับอัตราส่วนอื่น ๆ

Hu และคณะ [9] ศึกษาผลของแบคทีเรียชนิด *Gordonia amicalisa* ในกระบวนการดีวัลคาไนซ์ของยางสังเคราะห์ชนิดไอโซพรีนและสไตรีนบิวตาไดอีนที่มีประสิทธิภาพในการเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์ของแบคทีเรียที่ใช้ในการสลายพันธะเชื่อมขวางของซัลเฟอร์แตกต่างกัน พบว่ายางสไตรีนบิวตาไดอีน หลังผ่านกระบวนการดีวัลคาไนซ์มีปริมาณซัลเฟอร์ลดลง 22.9% การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) พบว่ายางสไตรีนบิวตาไดอีนมีการดูดกลืนแสงที่ลดลงในบริเวณของพันธะซัลเฟอร์อะตอมเดี่ยว (S-C) และพบค่าที่เพิ่มขึ้นในบริเวณพันธะระหว่างซัลเฟอร์และออกซิเจน (S-O) บ่งชี้ให้เห็นว่า แบคทีเรียสามารถเปลี่ยนพันธะเชื่อมขวางของซัลเฟอร์ไปอยู่ในรูปของซัลฟอกไซด์ ซัลโฟน ซัลโฟเนต และซัลเฟตหลังผ่านกระบวนการเมตาบอลิซึม ส่วนในยางไอโซพรีนไม่พบการลดลงของปริมาณซัลเฟอร์

Sato และคณะ [73] ศึกษาผลของการใช้กลุ่มราเนาขาว *Ceriporiopsis subvermispora* ต่อการดีวัลคาไนซ์ในยางธรรมชาติเป็นเวลา 200 วัน ยางหลังผ่านกระบวนการดีวัลคาไนซ์ชั้นแสดงปริมาณซัลเฟอร์ลดลง 29% จากการวิเคราะห์ร้อยละองค์ประกอบของธาตุ (elemental analysis) และการหาค่าพลังงานยึดเหนี่ยว (binding energy) ต่าง ๆ ด้วยเทคนิค X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) พบว่าพลังงานยึดเหนี่ยวของพันธะเชื่อมขวางของซัลเฟอร์อะตอมเดี่ยว (S-C) มีค่าลดลง 69% และปรากฏช่วงของพลังงานยึดเหนี่ยวของพันธะระหว่างอะตอมของซัลเฟอร์และออกซิเจน (S-O) เกิดขึ้นหลังกระบวนการดีวัลคาไนซ์ชั้นผ่านไป 150 วัน

Ghaviapanjeh และคณะ [74] ศึกษาผลของการใช้แบคทีเรียในสกุล *Thiobacillus*, *Gordonia*, *Nocardia*, *Amycolaptopsis* และ *Pseudomonas* ต่อการดีวัลคาไนซ์ในยาง GTR เป็นเวลา 20 วัน โดยมีปริมาณของยาง GTR เท่ากับ 5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าหลังผ่านกระบวนการดีวัลคาไนซ์ชั้น แบคทีเรียสายพันธุ์ *T. ferroxidans* DSMZ 583 สามารถลดปริมาณซัลเฟอร์ในยางได้ 27% จากนั้นจึงนำแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ไปศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการดีวัลคาไนซ์ พบว่าปัจจัยที่ส่งผลอย่างมีนัยสำคัญคือ ขนาดและปริมาณของยาง

Tatangelo และคณะ [75] ศึกษาผลของการใช้แบคทีเรียสายพันธุ์ *G. desulfuricans* DSM 44462 ต่อการดีวัลคาไนซ์ในยางธรรมชาติดีวัลคาไนซ์ โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 7 และอุณหภูมิเท่ากับ 30°C นอกจากนี้ได้ทำการศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการการดีวัลคาไนซ์ ได้แก่ ความเข้มข้นของกลูโคส ความเข้มข้นของ DBT เริ่มต้น ค่า optical density หรือ OD เริ่มต้น พบว่าปัจจัยดังกล่าวมีผลต่อประสิทธิภาพการดีวัลคาไนซ์

บทที่ 3
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

3.1 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

สารเคมีที่ใช้สำหรับงานวิจัยรายละเอียดดัง ตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

สารเคมี	เกรด	บริษัท/ประเทศ
1. Magnesium chloride ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	A.R.	Carlo Erba, Italy
2. Ammonium chloride (NH_4Cl)	A.R.	Merck, Germany
3. Ammonium hydroxide (NH_4OH)	A.R.	Fisher Scientific, UK
4. Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	A.R.	Ajex Finechem, New Zealand
5. Beef extract	Laboratory	Himedia, India
6. Dibenzothiophene (DBT)	A.R.	Sigma-Aldrich Inc., USA
7. Barium chloride ($BaCl_2 \cdot 2H_2O$)	A.R.	Ajex Finechem, New Zealand
8. Sodium chloride (NaCl)	A.R.	Ajex Finechem, New Zealand
9. Sodium carbonate anhydrous (Na_2CO_3)	A.R.	Qrec, New Zealand
10. Glucose	A.R.	Sigma-Aldrich Inc., USA
11. Yeast extract	Laboratory	Himedia, India
12. Peptone	Laboratory	Himedia, India
13. Hydrochloric acid (HCl)	A.R.	Fisher Scientific, UK
14. Isopropanol	A.R.	Fisher Scientific, UK

ตารางที่ 3.1 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย (ต่อ)

สารเคมี	เกรด	บริษัท/ประเทศ
15. Methyl orange	A.R.	Ajex Finechem, New Zealand
16. Absolute ethanol	A.R.	Merck, Germany
17. Toluene	A.R.	Merck, Germany
18. Tetrahydrofuran (THF)	A.R.	Merck, Germany
19. MyTag™ DNA Polymerases	Molecular biology	Bioline, UK
20. Primers (27F and 1492R)	Molecular biology	Bioneer, USA
21. Tris-base	Molecular biology	Vivantis, USA
22. Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Molecular biology	Vivantis, USA
23. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Molecular biology	Vivantis, USA
24. Phenol solution	Molecular biology	Sigma-Aldrich Inc., USA
25. Ethyl acetate	Chromatography	Merck, Germany
26. Natural rubber STR 5L	Commercial	Pan Innovation Ltd., Thailand
27. Stearic acid	Commercial	Pan Innovation Ltd., Thailand
28. Active Zinc oxide (ZnO)	Commercial	Pan Innovation Ltd., Thailand

ตารางที่ 3.1 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย (ต่อ)

สารเคมี	เกรด	บริษัท/ประเทศ
29. Sulfur	Commercial	Pan Innovation Ltd., Thailand
30. N-Cyclohexylbenzothiazole-2-sulphenamide (CBS)	Commercial	Pan Innovation Ltd., Thailand

3.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับงานวิจัยรายละเอียดดัง ตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับงานวิจัย

อุปกรณ์	บริษัท/รุ่น/ประเทศ
1. หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)	Sturdy industrial/Model SA-500K, Taiwan
2. ไมโครปิเปต (auto-micropipette)	LioPette, Thailand
3. เครื่องเขย่า (incubator shaker)	Vision Scientific/Model VS-8480SFN, Korea
4. ตู้เขี่ยเชื้อ (laminar air flow)	ISSOC/Model BVT 123, Thailand
5. เครื่องกวนสารละลายแบบให้ความร้อน (hot plate boiler and stirrer)	IKA/Model C-MAC HS10, USA
6. เครื่องพีซีอาร์ (PCR machine)	MJ Research/Model Peltier PTC-100™ Thermal Cyclers, USA
7. เครื่องปั่นเหวี่ยง (microcentrifuge)	Denville Scientific/Model Denville 260D, USA
8. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (ultracentrifuge)	Ultracentrifuge: Beckman/Model Optima XL-100K, USA
9. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดเบส (pH meter)	Sartorius/Model PP-50, Germany

ตารางที่ 3.2 อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับงานวิจัย (ต่อ)

อุปกรณ์	บริษัท/รุ่น/ประเทศ
10. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)	UNICO/Model UV-2800, USA
11. เครื่องผสมสารละลาย (vortex mixture)	Scientific industries/Model Genie 2, USA
12. เครื่องชั่ง (weight balance)	Mettler Toledo/Model AB104-S, USA
13. เครื่องบดผสม 2 ลูกกลิ้ง (two-roll mill)	Labtech/Model RM150W, USA
14. เครื่องอัดขึ้นรูป (compression molding)	Wabash/Model G30H-15-CX, USA
15. รีโอมิเตอร์ชนิดแบบคายนที่เคลื่อนที่ (moving die rheometer: MDR)	TechPro/Model rheoTECH MD+, USA
16. เครื่องวัดความแข็ง (hardness tester)	Wallace/Model H17A, UK
17. บอมบ์แคลอริมิเตอร์ (bomb calorimeter)	Parr/Model 6200, USA
18. เครื่องทดสอบแรงดึง (universal testing machine)	INSTRON/Model 3366, USA
19. ตู้อบสุญญากาศ (vacuum oven)	MMM/Model Vacucell 55 R, Germany
20. เตาเผา (muffle Furnace)	Protherm/Model alserteknik, Turkey
21. X-ray photoelectron spectrometer (XPS)	Kratos/Model AXIS Ultra DLD, UK
22. แก๊สโครมาโทกราฟี (gas chromatograph: GC)	Agilent/Model 7890B, Japan
23. เครื่องวิเคราะห์ธาตุ (elemental analyzer)	Thermo Scientific/Model FLASH 2000, USA
24. Gel permeation chromatograph (GPC)	Waters/Model 2414, MA
25. Fourier transform infrared spectrometer (FTIR)	Perkin Elmer/Model spectrum one, USA

ตารางที่ 3.2 อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับงานวิจัย (ต่อ)

อุปกรณ์	บริษัท/รุ่น/ประเทศ
26. Gas Chromatograph-Mass Spectrometer/Mass Spectrometer (GC-MS/MS)	Agilent/Model 7890B/ 7000C GC/MS Triple Quad, Japan
27. ถ้วยกระเบื้อง (porcelain crucible)	Glassco, India
28. กรวยกรองบุชเนอร์ (Buchner funnel)	Glassco, India
29. กระดาษกรอง (filter paper No.1 และ 42 (ashless))	Whatman, USA
30. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning Electron Microscopy: SEM)	JEOL/Model JSM-6480LV, Japan

3.3 วิธีดำเนินงานวิจัย

3.3.1 การคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถสลายพันธะซัลเฟอร์จากดินในประเทศไทย

3.3.1.1 การเก็บตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินในบริเวณต่าง ๆ อย่างละ 100 กรัม จากแหล่งดินในประเทศไทยที่มีการปนเปื้อนของซัลเฟอร์ ได้แก่ เหมืองถ่านหินแม่เมาะ (จังหวัดลำปาง) น้ำพุร้อนแจ้ซ้อน (จังหวัดลำปาง) บริเวณพื้นที่การเกษตร (จังหวัดชัยนาทและปทุมธานี) กองถ่านหิน (จังหวัดชลบุรี) และโรงไฟฟ้าถ่านหิน (จังหวัดปราจีนบุรี) จำนวนทั้งหมด 6 สถานที่จาก 5 จังหวัด นำตัวอย่างดินใส่ในถุงพลาสติกที่ผ่านการฆ่าเชื้อ เมื่อใส่ตัวอย่างดินแล้วปิดปากถุงมิดชิดและเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 4°C ก่อนนำมาคัดแยกแบคทีเรีย

3.3.1.2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สำหรับเพิ่มจำนวนแบคทีเรีย (enrichment culture) คืออาหารเหลวสูตร Luria-Bertani (LB) มีส่วนประกอบและปริมาณของสาร ได้แก่ peptone 10.0 กรัม yeast extract 5.0 กรัม และ NaCl 5.0 กรัม นำส่วนผสมทั้งหมดมาละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับพีเอช

ให้เท่ากับ 7 ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เท่ากับ 1000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมได้ ไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเหลวสูตร sulfur free basal salt medium (BSM) ใช้สำหรับการคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถสลายพันธะซัลเฟอร์ที่มีการเติมสารละลายของ DBT เพื่อเป็นแหล่งซัลเฟอร์ให้กับแบคทีเรีย [68, 76] เตรียมได้โดยนำ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 8.0 กรัม $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.2 กรัม NH_4Cl 2.0 กรัม KH_2PO_4 4.0 กรัม มาละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับพีเอชให้เท่ากับ 7 เติมน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมได้ไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที หลังจากทำให้อาหารปราศจากเชื้อแล้วนั้น จะนำมาเติมสารละลาย DBT ซึ่งใช้เป็นแหล่งซัลเฟอร์ให้กับแบคทีเรียสามารถเตรียมได้โดยการนำ DBT ละลายใน ethanol 95% ให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 50 มิลลิโมลาร์ กรองผ่าน syringe filter ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.45 ไมโครเมตรเพื่อทำให้ปราศจากเชื้อ สุดท้ายนำสารละลาย DBT ที่ได้ไปเติมในอาหารสูตร BSM ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.2 มิลลิโมลาร์ เพื่อใช้ในขั้นตอนการคัดแยกแบคทีเรียต่อไป

3.3.1.3 การคัดแยกแบคทีเรีย

การคัดแยกแบคทีเรียเริ่มจากการเพิ่มจำนวนแบคทีเรีย โดยนำตัวอย่างดิน 0.1 กรัม มาละลายในน้ำเกลือ (NaCl) 5.0 มิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้น 0.85% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เขย่าให้เข้ากันบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้จากการตกตะกอนไปเปิดลงในอาหารเหลวสูตร Luria-Bertani (LB) broth บ่มแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเหลวสูตร LB เป็นเวลา 1 วัน จากนั้นจึงถ่ายเชื้อแบคทีเรียลงในอาหารสูตร sulfur free basal salt medium (BSM) ที่มีความเข้มข้นของ DBT เท่ากับ 0.2 มิลลิโมลาร์ บ่มแบคทีเรียเป็นเวลา 5 วัน แล้วนำสารละลายที่ได้มาเจือจางความเข้มข้นในน้ำเกลือ เปิดตัวอย่างที่เจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้เทคนิค spread plate และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 วัน เลือกเชื้อแบคทีเรียที่เจริญและแยกเป็นโคโลนีเดี่ยว และนำเชื้อที่ได้มาทำการ streak plate บนอาหารเพื่อแยกเชื้อบริสุทธิ์ ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) เบื้องต้น จากนั้นเก็บเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้เป็น stock culture เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3.3.2 การทดสอบประสิทธิภาพการสลายพันธะซัลเฟอร์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

นำอาหารสูตร sulfur free basal salt medium (BSM) ที่มีความเข้มข้นของ DBT เท่ากับ 0.2 มิลลิโมลาร์ (เตรียมได้จากข้อ 3.3.1.2) ปิเปตสารละลายเซลล์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากข้อ 3.3.1.3 ให้มีค่าความขุ่นเริ่มต้น (OD) เท่ากับ 0.1 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร บ่มเชื้อเป็นเวลา 7 วัน ณ อุณหภูมิห้อง ($30 \pm 2^\circ\text{C}$) ที่ภาวะเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ออกและนำส่วนใสปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปรับพีเอชของส่วนใสที่ได้ให้เท่ากับ 2.2 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 6 โมลาร์ แล้วเติม ethyl acetate ปริมาตร 4 มิลลิลิตรลงในสารละลายนำไปปั่นเหวี่ยง แล้วปิเปตเฉพาะส่วนใสในชั้นของ ethyl acetate ที่มี DBT ละลายอยู่เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณความเข้มข้นของ DBT ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟฟี ยี่ห้อ Agilent รุ่น 7890GC ประเทศญี่ปุ่น โดยชนิดของคอลัมน์ที่ใช้ คือ HP-5 ขนาด 30 เมตร x 0.25 มิลลิเมตร x 0.25 ไมโครเมตรและใช้ตัวตรวจวัดสัญญาณชนิด flame ionization detector (FID) สำหรับอุณหภูมิที่ใช้ในการวิเคราะห์เริ่มจาก 75°C ถึง 270°C กำหนดให้มีอัตราการเพิ่มของอุณหภูมิเท่ากับ 20°C ต่อนาที และมีอัตราการไหลของแก๊สไนโตรเจนเท่ากับ 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที

3.3.3 การจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียที่คัดแยกได้

จากการทดลองที่ 3.3.2 พบว่าแบคทีเรียไอโซเลต LF3 มีประสิทธิภาพในการสลายพันธะซัลเฟอร์ใน DBT สูงที่สุด ดังนั้นจึงนำแบคทีเรียดังกล่าวมาจัดจำแนกเพื่อระบุสายพันธุ์ ตามขั้นตอนดังนี้

3.3.3.1 การสกัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย

- 1) นำเซลล์แบคทีเรียไอโซเลต LF3 ที่เลี้ยงในอาหารสูตร LB เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยนำส่วนที่แขวนลอยในอาหารปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร มาเทใส่ในหลอด Eppendorf นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 2 นาที เทส่วนใสทิ้ง
- 2) ปิเปตสารละลายบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 567 ไมโครลิตร ลงในหลอด Eppendorf ที่มีสารละลายเซลล์แบคทีเรียผสมให้เข้ากันแล้วเติม 10% SDS 100 ไมโครลิตร ตามด้วย RNase ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร นำสารละลายไปบ่มที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 30 นาทีในอ่างน้ำร้อน
- 3) ปิเปต phenol/chloroform ในอัตราส่วน 1:1 ของสารละลายลงในหลอดผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 2 นาที ดูเฉพาะส่วนใสชั้นบนสุด (aqueous phase) ให้ได้ปริมาณมากที่สุดมาใส่ในหลอด Eppendorf อันใหม่

4) ปิเปต sodium acetate ความเข้มข้น 3 โมลาร์ ในอัตราส่วน 1:10 ของสารละลายสารละลายเซลล์ตามด้วย isopropanol ปริมาตรเท่ากับสารละลายที่ได้ในหลอด บ่มที่อุณหภูมิ -20°C ประมาณ 1 ชั่วโมง เพื่อให้ดีเอ็นเอตกตะกอนแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 2 นาที เทส่วนใสทิ้ง

5) ล้างตะกอนดีเอ็นเอโดยเติม 70% ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 2 นาที เทส่วนใสทิ้ง ตั้งไว้ให้แห้งประมาณ 15 นาที

6) ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อทำพีซีอาร์ต่อไป

3.3.3.2 การตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอเบื้องต้นด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส

เตรียมเจลความเข้มข้น 1% (กรัมต่อปริมาตร) ในสารละลายบัฟเฟอร์ TBE (ภาคผนวก) และให้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำแผ่นเจลไปย้อมด้วยสีย้อม ethidium bromide ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร เป็นเวลา 10 นาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่น นำแผ่นเจลไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV light)

3.3.3.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแบคทีเรียด้วยเทคนิคพีซีอาร์

1) การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ 16S rRNA ทำโดยใช้ primer 27F และ 1492R แสดงดังตารางที่ 3.3 สำหรับชุดปฏิกิริยามีส่วนประกอบที่มีปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร (ภาคผนวก) นำชุดปฏิกิริยาที่ใส่ในหลอดพีซีอาร์ ขนาด 200 ไมโครลิตร บ่มในเครื่องพีซีอาร์และทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสทั้งหมด 35 รอบ ตามภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส (ภาคผนวก)

2) ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสโดยใช้เทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส ตามที่ระบุไว้ในข้อที่ 3.3.3.2

ตารางที่ 3.3 Primer สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ 16S rRNA

Primer name	Nucleotide sequencing	Reference
1492R	5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'	[77]
27F	5'-AGAGTTTGTATCMTGGCTCAG-3'	[78]

3.3.3.4 การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์

ส่งผลิตภัณฑ์จากการทำพีซีอาร์ ไปทำการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท Bioneer สาธารณรัฐเกาหลี โดยเทคนิค automated DNA sequencing เพื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ของบริเวณ 16S rRNA ไปเปรียบเทียบกับเปอร์เซ็นต์ความคล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูลใน Genbank โดยใช้โปรแกรม Blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) แล้วนำลำดับที่คล้ายคลึงกันมากที่สุดมาทำ Pairwise alignment (http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/nucleotide.html)

3.3.4 การเตรียมยางธรรมชาติวัลคาไนซ์ 3 ระบบ

เตรียมยางธรรมชาติวัลคาไนซ์ตามสูตรยางคอมปาวด์ในตารางที่ 3.4 โดยเตรียมทั้งหมด 3 ระบบ ได้แก่ CV Semi-EV และ EV โดยขึ้นรูปแผ่นยางที่อุณหภูมิ 150°C โดยใช้เข้าพิมพ์ที่มีความหนา 2 มิลลิเมตร ขนาด 15 x 15 เซนติเมตร นำแผ่นยางที่ผ่านการขึ้นรูปแล้วไปบดด้วยเครื่องบดผสมสองลูกกลิ้งให้ได้ยางที่มีลักษณะเป็นผงแล้วร่อนด้วยตะแกรงที่มีขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.0-2.7 มิลลิเมตร จากนั้นนำผงยางที่ได้ไปทำให้ปราศจากเชื้อและละลายสิ่งเจือปนในยาง โดยการแช่ยางผงในสารละลาย ethanol ที่ความเข้มข้น 70% โดยปริมาตรต่อปริมาตร เป็นเวลา 1 วัน แล้วนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60°C ทิ้งไว้ให้เย็นเก็บในตู้ดูดความชื้นเพื่อนำไปใช้ในกระบวนการวัลคาไนซ์ขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 3.4 สูตรในการเตรียมยางคอมปาวด์และยางวัลคาไนซ์ในหน่วย part by weight per hundred part of rubber (phr)

Ingredient (phr)	Sample code						
	CV	Semi-EV	EV	RV ³ 1	RV2	RV3	RV4
NR ¹ (STR 5L)	100.0	100.0	100.0	95.0	90.0	85.0	80.0
DVR ²	-	-	-	5.0	10.0	15.0	20.0
Active ZnO	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Stearic acid	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
Sulfur	3.0	1.9	0.8	3.0	3.0	3.0	3.0
CBS	1.0	2.0	3.0	1.0	1.0	1.0	1.0

¹ Natural rubber; ² Devulcanized rubber; ³ Revulcanized rubber

3.3.5 ศึกษาปัจจัยของยางที่มีผลต่อการตีวัลคาไนซ์ของแบคทีเรียไอโซเลต LF3

3.3.5.1 ศึกษาผลของชนิดพันธะซัลเฟอร์ในยางที่มีผลต่อการตีวัลคาไนซ์ของแบคทีเรียไอโซเลต LF3

นำแบคทีเรียไอโซเลต LF3 ที่มีประสิทธิภาพในการสลายพันธะซัลเฟอร์สูงที่สุดที่ได้จากข้อ 3.3.2 บ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BSM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเติมยาง 2.5 กรัม ที่เตรียมได้จากข้อ 3.3.4 ได้แก่ ยางผงวัลคาไนซ์สูตร CV, Semi-EV และ EV ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร ทำการบ่มเป็นเวลา 30 วัน ณ อุณหภูมิห้อง ($30\pm 2^{\circ}\text{C}$) ที่ภาวะเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที จากนั้นนำยางผงที่ได้ไปกรองเพื่อแยกออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อล้างด้วยน้ำกลั่นและนำไปอบให้แห้งเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ผลต่อไป

3.3.5.2 ศึกษาผลของขนาดอนุภาคยางที่มีผลต่อการตีวัลคาไนซ์ของแบคทีเรียไอโซเลต LF3

เลือกชนิดของยางที่แบคทีเรียไอโซเลต LF3 สามารถสลายพันธะซัลเฟอร์ได้ดีที่สุด จากการทดลองที่ 3.3.5.1 ซึ่งได้แก่สูตร CV นำยางผงวัลคาไนซ์ดังกล่าวมาคัดแยกขนาดทั้งหมด 2 ขนาด ได้แก่ ขนาดเล็ก ($\text{D} = 0.3\text{-}0.4$ มิลลิเมตร) และขนาดใหญ่ ($\text{D} = 2.0\text{-}2.7$ มิลลิเมตร) นำแบคทีเรียไอโซเลต LF3 บ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BSM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเติมยาง 2.5 กรัม ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร ทำการบ่มเป็นเวลา 20 วัน ณ อุณหภูมิห้อง ($30\pm 2^{\circ}\text{C}$) ที่ภาวะเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที จากนั้นนำยางผงที่ได้ไปกรองเพื่อแยกออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อล้างด้วยน้ำกลั่นและนำไปอบให้แห้งเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ผลต่อไป

3.3.5.3 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการสลายพันธะซัลเฟอร์ของแบคทีเรียไอโซเลต LF3

ศึกษาปัจจัย 2 ปัจจัยที่มีผลต่อการสลายพันธะซัลเฟอร์ของแบคทีเรียไอโซเลต LF3 ได้แก่ พีเอชและอุณหภูมิ ทำการแปรผันค่าพีเอช 3 ระดับ ได้แก่ 5, 7 และ 9 และอุณหภูมิ 3 ระดับ ได้แก่ 30 40 และ 50°C เลือกชนิดของยางและขนาดของอนุภาคยางที่แบคทีเรียไอโซเลต LF3 สามารถสลายพันธะซัลเฟอร์ได้ดีที่สุด จากการทดลองที่ 3.3.5.1 และ 3.3.5.2 ซึ่งได้แก่สูตร CV ที่มีอนุภาคขนาดเล็ก ($\text{D} = 0.3\text{-}0.4$ มิลลิเมตร) นำยางผงวัลคาไนซ์ดังกล่าวปริมาณ 2.5 กรัม เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BSM ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่มีแบคทีเรียไอโซเลต LF3 ที่ผ่านการบ่มแล้วเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการบ่มเป็นเวลา 20 วัน ที่ภาวะเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที

จากนั้นนำยางผงที่ได้ไปกรองเพื่อแยกออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อล้างด้วยน้ำกลั่นและนำไปอบให้แห้งเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ผลต่อไป

3.3.6 พิสูจน์เอกลักษณ์และทดสอบสมบัติของยางธรรมชาติวัลคาไนซ์ก่อนและหลังกระบวนการตีวัลคาไนเซชัน

3.3.6.1 สมบัติทางกายภาพ (physical properties)

1) วัดค่าความหนาแน่นของพันธะเชื่อมขวาง (crosslink density) [79]

ซึ่งตัวอย่างยางประมาณ 0.4 กรัม จากนั้นนำตัวอย่างแช่ในตัวทำละลายโทลูอีนในขวดแบบปิดและเก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดนำตัวอย่างที่เกิดการบวมพองมาซับด้วยกระดาษกรองให้แห้งแล้วนำมาชั่งน้ำหนัก จากนั้นนำตัวอย่างไปอบในตู้อบสุญญากาศที่อุณหภูมิ 80°C จนน้ำหนักคงที่

ค่าความหนาแน่นของพันธะเชื่อมโยง สามารถคำนวณได้จากสมการที่ 3.1 ของ Flory-Rehner [80] ดังนี้

$$\nu = \frac{-[\ln(1-\nu_r) + \nu_r + \chi\nu_r^2]}{\nu_0[\nu_r^{1/3} - (\nu_r/2)]} \quad (3.1)$$

ν คือ ค่าความหนาแน่นของพันธะเชื่อมขวาง (mol/cm^3)

ν_r คือ สัดส่วนปริมาตรของยาง (volume fraction)

ν_0 คือ ปริมาตรโมลาร์ของโทลูอีน (molar volume) มีค่าเท่ากับ $106.2 \text{ cm}^3/\text{mol}$ [81]

χ คือ ค่าพารามิเตอร์ของการเกิดอันตรกิริยาระหว่างยางกับสารละลาย (rubber-solvent interaction parameter) มีค่าเท่ากับ 0.393 [81]

ค่าสัดส่วนปริมาตรของยาง สามารถคำนวณได้จากสมการที่ (3.2) [80] ดังต่อไปนี้

$$\nu_r = \left(\frac{w_2(\delta_r)^{-1}}{w_2(\delta_r)^{-1} + (w_1 - w_2)(\delta_s)^{-1}} \right) \quad (3.2)$$

δ_r คือ ค่าความหนาแน่นของยางเท่ากับ 0.939 กรัม/ลูกบาศก์เซนติเมตร

- δ_s คือ ค่าความหนาแน่นของตัวทำละลายตามลำดับ ค่าความหนาแน่นของโทลูอีนเท่ากับ 0.886 กรัม/ลูกบาศก์เซนติเมตร
- W_1 คือ น้ำหนักของตัวอย่างหลังจากแช่ในตัวทำละลายโทลูอีน และ
- W_2 คือ น้ำหนักของตัวอย่างหลังจากแช่ในตัวทำละลายโทลูอีนแล้วนำไปอบในตู้อบสุญญากาศที่ อุณหภูมิ 80 จนน้ำหนักคงที่

2) วิเคราะห์สัดส่วนโซล-เจล (sol-gel fraction) ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ระดับของการ ดีวัลคาไนเซชัน (degree of devulcanization)

การวิเคราะห์สัดส่วนโซลเจลสามารถคำนวณได้จากสมการที่ 3.3 และ 3.4

$$\text{สัดส่วนโซล (sol fraction, \%)} = \frac{W_0 - W_2}{W_0} \times 100 \quad (3.3)$$

$$\text{สัดส่วนเจล (gel fraction, \%)} = 100 - \text{sol fraction (\%)} \quad (3.4)$$

- W_0 คือ น้ำหนักตัวอย่างแห้งก่อนแช่ในโทลูอีน และ
- W_2 คือ น้ำหนักของตัวอย่างหลังจากแช่ในตัวทำละลายโทลูอีนแล้วนำไปอบในตู้อบสุญญากาศที่ อุณหภูมิ 80 จนน้ำหนักคงที่

3) วิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของยางด้วยเทคนิค gel permeation chromatography (GPC)

การวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของยาง ก่อนและหลังกระบวนการ ดีวัลคาไนเซชัน ทำได้โดยการนำตัวอย่างไปละลายในตัวทำละลายเตตระไฮโดรฟูแรน (tetrahydrofuran: THF) ให้ได้ความเข้มข้นประมาณ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไป วิเคราะห์ด้วยเครื่อง GPC ที่มีตัวตรวจวัดสัญญาณความแตกต่างของดัชนีหักเห (refractive index: RI) ชนิดของคอลัมน์ที่ใช้คือ Styragel HR5E ขนาด 7.8 × 300 มิลลิเมตร กำหนดอัตราการไหล เท่ากับ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที นำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ พอลิสไตรีน (polystyrene) [82]

3.3.6.2 สมบัติทางเคมี (chemical properties)

วัดปริมาณซัลเฟอร์ในยางด้วยเทคนิคบอมบ์แคลอรีเมตรีตามมาตรฐาน ASTM D3177 เพื่อวิเคราะห์ปริมาณซัลเฟอร์ในตัวอย่างยางก่อนและหลังกระบวนการดีวัลคาไนเซชัน

โดยเริ่มจากชั่งตัวอย่างยางประมาณ 0.8 กรัม แล้วนำไปเผาในเครื่องบอมบ์แคลอริมิเตอร์โดยใช้ ออกซิเจนเป็นเชื้อเพลิงในการเผาไหม้ ซัลเฟอร์ที่เป็นองค์ประกอบในตัวอย่างยางจะถูกเผาไหม้ เกิด การออกซิไดซ์กลายเป็นซัลเฟอร์ไตรออกไซด์ (sulfur trioxide) และรวมตัวกับน้ำในเครื่องบอมบ์ แคลอริมิเตอร์กลายเป็นกรดซัลฟิวริก จากนั้นจึงนำกรดซัลฟิวริกที่ได้ชะล้างด้วยสารละลาย methyl orange โดยให้ได้ปริมาตรของสารละลายที่จะไปวิเคราะห์ประมาณ 200 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ ไปปรับค่าพีเอชให้มีค่าเท่ากับ 7 ด้วยสารละลาย sodium carbonate ความเข้มข้น 2 โมลาร์และ สารละลาย ammonium hydroxide 1 โมลาร์ ต้มสารละลายพอเดือดกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 แล้วนำสารละลายที่ผ่านการกรอง ต้มพอเดือดหยดกรดไฮโดรคลอริก (1:9) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และตามด้วย barium chloride ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปต้มอีกครั้งให้ เดือดเป็นเวลา 15 นาที ตั้งสารละลายทิ้งไว้ทั้งคืนเพื่อให้ซัลเฟตทำปฏิกิริยากับ barium chloride และตะกอนเป็น barium sulfate นำสารละลายที่มีตะกอนสีขาวของ barium sulfate กรอง สูญญากาศ และหยดสารละลาย silver nitrate ความเข้มข้น 0.025 โมลาร์ ลงในสารละลายที่ผ่าน การกรอง เพื่อตรวจสอบปริมาณกรดไฮโดรคลอริกที่หลงเหลืออยู่ให้หมดไป นำกระดาษกรองใส่ถ้วย กระเบื้องที่ชั่งน้ำหนักแล้ว เเผาที่อุณหภูมิ 850°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาชั่งน้ำหนัก เพื่อ คำนวณปริมาณของซัลเฟอร์ในตัวอย่างยาง (ภาคผนวก)

ตรวจสอบชนิดหมู่ฟังก์ชันของโครงสร้างภายในโมเลกุลของยางก่อนและหลัง กระบวนการดีวัลคาไนเซชันโดยสังเกตจากหมู่ฟังก์ชันภายในโครงสร้างที่เปลี่ยนแปลงไป ด้วยเทคนิค FTIR ในช่วงเลขคลื่น 400-4000 cm^{-1} ที่ความละเอียด 4 cm^{-1} ด้วยเครื่อง FTIR ยี่ห้อ Perkin Elmer รุ่น spectrum one transform infrared spectroscope (USA)

วัดปริมาณร้อยละองค์ประกอบของธาตุคาร์บอน ไฮโดรเจน ไนโตรเจน และซัลเฟอร์ในยาง ด้วยเครื่องวิเคราะห์ธาตุ ยี่ห้อ Thermo Scientific รุ่น FLASH 2000 (USA) นำตัวอย่างยางประมาณ 1-3 มิลลิกรัม ใส่ลงในแคปซูลจากนั้นเติมตัวออกซิไดซ์ ได้แก่ vanadium pentoxide (V_2O_5) แล้วนำตัวอย่างใส่ลงในเครื่องเพื่อทำการวิเคราะห์ ภายใต้ภาวะที่มีแก๊สออกซิเจน อุณหภูมิ 975°C เป็นเวลา 12 นาที

วิเคราะห์ชนิด จำนวนธาตุองค์ประกอบ โครงสร้างทางเคมี และชนิดของพันธะ ทางเคมีที่เป็นองค์ประกอบบนพื้นผิวของยางก่อนและหลังกระบวนการดีวัลคาไนเซชัน ด้วยเครื่อง XPS ยี่ห้อ Kratos รุ่น AXIS Ultra DLD (UK) สแกนด้วยความละเอียดสูงสุด (narrow-high resolution scan)

3.3.7 ศึกษาผลการตีวัลคาไนซ์ในยาง GTR ด้วยแบคทีเรียไอโซเลต LF3 ภายใต้ภาวะที่เหมาะสมที่สุด

นำยาง GTR ที่ได้จากในอุตสาหกรรมมาตัดแยกขนาดด้วยตะแกรงที่มีขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางในช่วง 0.3-0.4 มิลลิเมตร โดยเติมลงไปในการเลี้ยงเชื้อ ที่มีแบคทีเรียไอโซเลต LF3 ที่เจริญเติบโตแล้วเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการบ่มภายใต้ภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากผลการทดลองในข้อ 3.3.5.3 โดยมีพีเอชเท่ากับ 5 อุณหภูมิ 30°C บ่มเป็นเวลา 20 วัน จากนั้นนำยาง GTR ที่ผ่านการบ่มแล้วไปตรวจสอบสมบัติทางเคมีและทางกายภาพ

3.3.8 ศึกษาสมบัติของยางธรรมชาติรีวัลคาไนซ์

3.3.8.1 ศึกษาสมบัติการคงรูปและเชิงกลของยางธรรมชาติรีวัลคาไนซ์

ผสมยางตีวัลคาไนซ์กับยางธรรมชาติในอัตราส่วนต่าง ๆ ตามตารางที่ 3.4 นำยางคอมพาวนด์ที่ได้ไปศึกษาลักษณะการคงรูป (cure characteristic) โดยขึ้นรูปแผ่นยางที่อุณหภูมิ 150°C จากนั้นนำยางรีวัลคาไนซ์ที่ได้ไปทดสอบสมบัติเชิงกล ได้แก่ ค่าทนแรงดึงสูงสุด (tensile strength) ระยะยืดที่จุดขาด (elongation at break) ตามมาตรฐาน ASTM D412 โดยเตรียมตัวอย่างเป็นรูป dumbbell แบบ die C และค่าความแข็ง (hardness) ตามมาตรฐาน ASTM D2240

3.3.8.2 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของยางธรรมชาติรีวัลคาไนซ์

โดยนำตัวอย่างยางรีวัลคาไนซ์ตัดให้ได้ขนาดประมาณ 0.5 × 0.5 เซนติเมตร วางบนแท่งติดตัวอย่าง (stub) แล้วเคลือบผิวด้วยทอง จากนั้นตัวอย่างไปส่งภายใต้กล้องอิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscopy: SEM)

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ผลการคัดแยกแบคทีเรียจากแหล่งดินที่ปนเปื้อนซัลเฟอร์ในประเทศไทย

เก็บตัวอย่างดินจากบริเวณที่มีการปนเปื้อนซัลเฟอร์ในประเทศไทย ทั้งหมด 6 แหล่งจาก 5 จังหวัด พบว่า สามารถคัดแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 21 ไอโซเลต รายละเอียดดังตารางที่ 4.1 จะเห็นได้ว่าลักษณะดินส่วนใหญ่เป็นดินร่วน และมีความเป็นกรดอ่อน เนื่องจากมีธาตุซัลเฟอร์ปนเปื้อนอยู่นอกจากนี้อาจสังเกตได้จากลักษณะดินที่มีสีเหลืองหรือน้ำตาลอ่อน และมีกลิ่นเหม็น จากแหล่งดินที่ปนเปื้อนทั้งหมด 6 แหล่ง เมื่อนำมาคัดแยกแบคทีเรียโดยใช้ DBT เป็นแหล่งซัลเฟอร์โดยมีค่าความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ พบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 21 ไอโซเลต รายละเอียดดังตารางที่ 4.2 จากการศึกษาพบว่า แหล่งดินจากโรงไฟฟ้าถ่านหินสามารถคัดแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 3 ไอโซเลต กองถ่านหินได้ทั้งหมด 3 ไอโซเลต บ่อน้ำพุร้อนแจ้ซ้อนได้ทั้งหมด ได้ทั้งหมด 3 ไอโซเลต เหมืองแม่เมาะ ได้ทั้งหมด 5 ไอโซเลต พื้นที่ทางการเกษตร จังหวัดปทุมธานี ได้ทั้งหมด 4 ไอโซเลต และพื้นที่ทางการเกษตร จังหวัดชัยนาท ได้ทั้งหมด 3 ไอโซเลต จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวของแต่ละไอโซเลต มาศึกษาลักษณะของโคโลนี พบว่ามีสีที่แตกต่างกัน ได้แก่ สีขาว สีชมพู สีส้ม สีเหลือง และสีครีม โดยลักษณะของโคโลนีมีรูปร่างกลมทั้งหมด และมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.5-1.0 มิลลิเมตร ซึ่งแบคทีเรียที่คัดแยกได้จะนำไปทดสอบประสิทธิภาพการย่อยซัลเฟอร์ในขั้นตอนต่อไป

4.2 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการสลายพันธะซัลเฟอร์ใน DBT ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

เมื่อนำแบคทีเรียทั้งหมด 21 ไอโซเลตที่คัดแยกได้จากผลการทดลองที่ 4.1 มาทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายพันธะซัลเฟอร์ โดยเลี้ยงในอาหารที่มีส่วนประกอบของสารละลาย DBT ที่ทำหน้าที่เป็นแหล่งซัลเฟอร์ให้กับแบคทีเรีย หลังผ่านการบ่มเป็นเวลา 7 วัน ณ อุณหภูมิ 30°C ที่พีเอชเท่ากับ 7 เมื่อนำสารละลายที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อไปวิเคราะห์หาปริมาณความเข้มข้นของ DBT ที่ลดลงด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี พบว่า มีแบคทีเรียทั้งหมด 12 ไอโซเลตให้ค่าการลดลงของปริมาณ DBT มากกว่าร้อยละ 50 จากความเข้มข้นของ DBT เริ่มต้นเท่ากับ 0.2 มิลลิโมลาร์ ซึ่งสามารถคำนวณปริมาณที่ลดลงของค่าความเข้มข้นของ DBT เป็นเปอร์เซ็นต์ของปริมาณซัลเฟอร์ที่ลดลง ดังแสดงในตารางที่ 4.3 จากผลการทดสอบทางสถิติ พบว่าเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายของพันธะซัลเฟอร์ของแบคทีเรียไอโซเลต LF3 มีค่าสูงที่สุด เท่ากับ $88.1 \pm 0.1\%$ ซึ่งแตกต่างจากแบคทีเรีย

ไอโซเลตอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญ จากนั้นจึงนำสารละลายได้จากการเลี้ยงเชื้อไปวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น
เกิดจากขั้นระหว่างการย่อยสลายของพันธะซัลเฟอร์ใน DBT ด้วยเทคนิค GC-MS เพื่อตรวจสอบ
กระบวนการเมตาบอลิซึมของแบคทีเรียที่เกิดขึ้น

ตารางที่ 4.1 ลักษณะของดินที่เก็บจากบริเวณพื้นที่ปนเปื้อนซัลเฟอร์

แหล่งดิน	จังหวัด	ลักษณะดิน
โรงไฟฟ้าถ่านหิน	ปราจีนบุรี	เป็นดินร่วนปนทราย โดยเก็บจากบริเวณรอบ ๆ โรงไฟฟ้าถ่านหิน มีค่า pH เท่ากับ 6
กองถ่านหิน	ชลบุรี	เป็นดินร่วมผสมกับเศษถ่านหิน ซึ่งได้จากการนำ เศษถ่านหินที่เหลือทิ้งจากเรือขนส่งสินค้ามีค่า pH เท่ากับ 7
พื้นที่ทางการเกษตร	ปทุมธานี	เป็นดินร่วน มีความเป็นกรดประมาณ pH 4 โดยได้รับตัวอย่างดินจากกรมพัฒนาที่ดิน
	ชัยนาท	เป็นดินร่วน มีความเป็นกรดประมาณ pH 5 โดยได้รับตัวอย่างดินจากกรมพัฒนาที่ดิน
เหมืองแม่เมาะ และ บ่อน้ำพุร้อนแจ้ซ้อน	ลำปาง	ดินจากบริเวณเหมืองแม่เมาะมีลักษณะเป็นดิน เหนียว ส่วนดินจากบริเวณบ่อน้ำพุร้อนดินจะมีสี น้ำตาลเหลือง มีลักษณะเนื้อเป็นดินทรายและมี กลิ่นเหม็น มีค่า pH เท่ากับ 5

ตารางที่ 4.2 แบบที่เรียที่คัดแยกได้จากบริเวณพื้นที่ปนเปื้อนซัลเฟอร์

แหล่งดิน	จังหวัด	ไอโซเลต	ลักษณะโคโลนี	
			สี	เส้นผ่าศูนย์กลาง (มม.)
โรงไฟฟ้าถ่านหิน	ปราจีนบุรี	NPS1	ชมพู	1.0
		NPS2	ขาว	1.0
		NPS3	ขาว	1.0
กองถ่านหิน	ชลบุรี	LF1	ส้ม	1.0
		LF2	ขาว	1.0
		LF3	ขาว	1.0
บ่อน้ำพุร้อนแจ้ซ้อน	ลำปาง	HSP1	ขาว	0.5
		HSP2	ขาว	1.0
		HSP3	เหลือง	1.0
เหมืองแม่เมาะ	ลำปาง	MM1	ขาว	1.5
		MM2	ขาว	1.0
		MM3	ครีม	1.0
		MM4	ขาว	0.5
		MM5	ขาว	1.0
พื้นที่ทางการเกษตร	ปทุมธานี	AL5801	ขาว	1.0
		AL5802	ขาว	1.5
		AL5803	ขาว	1.5
		AL5804	เหลือง	1.0
พื้นที่ทางการเกษตร	ชัยนาท	AL5571	ขาว	1.0
		AL5572	ขาว	1.0
		AL5573	ขาว	0.5

ตารางที่ 4.3 เปอร์เซ็นต์การลดลงของซัลเฟอร์ในสารละลาย DBT โดยแบคทีเรียที่คัดแยกได้

Isolated bacteria	DBT concentration ($\times 10^{-2}$ mM)	Sulfur removal* (%)
LF3	2.38	88.1 \pm 0.1 ^a
NPS1	3.92	80.4 \pm 0.3 ^b
HSP1	3.94	80.3 \pm 0.3 ^b
AL5773	4.51	77.4 \pm 0.1 ^c
NPS2	4.89	75.5 \pm 0.2 ^{cd}
AL5804	5.14	74.3 \pm 0.6 ^d
MM5	5.78	71.1 \pm 0.3 ^e
LF1	5.99	70.0 \pm 0.1 ^e
MM2	6.22	68.9 \pm 0.2 ^e
LF2	6.90	65.5 \pm 0.1 ^f
AL5771	8.01	59.4 \pm 0.3 ^g
HSP2	8.65	56.6 \pm 0.6 ^h

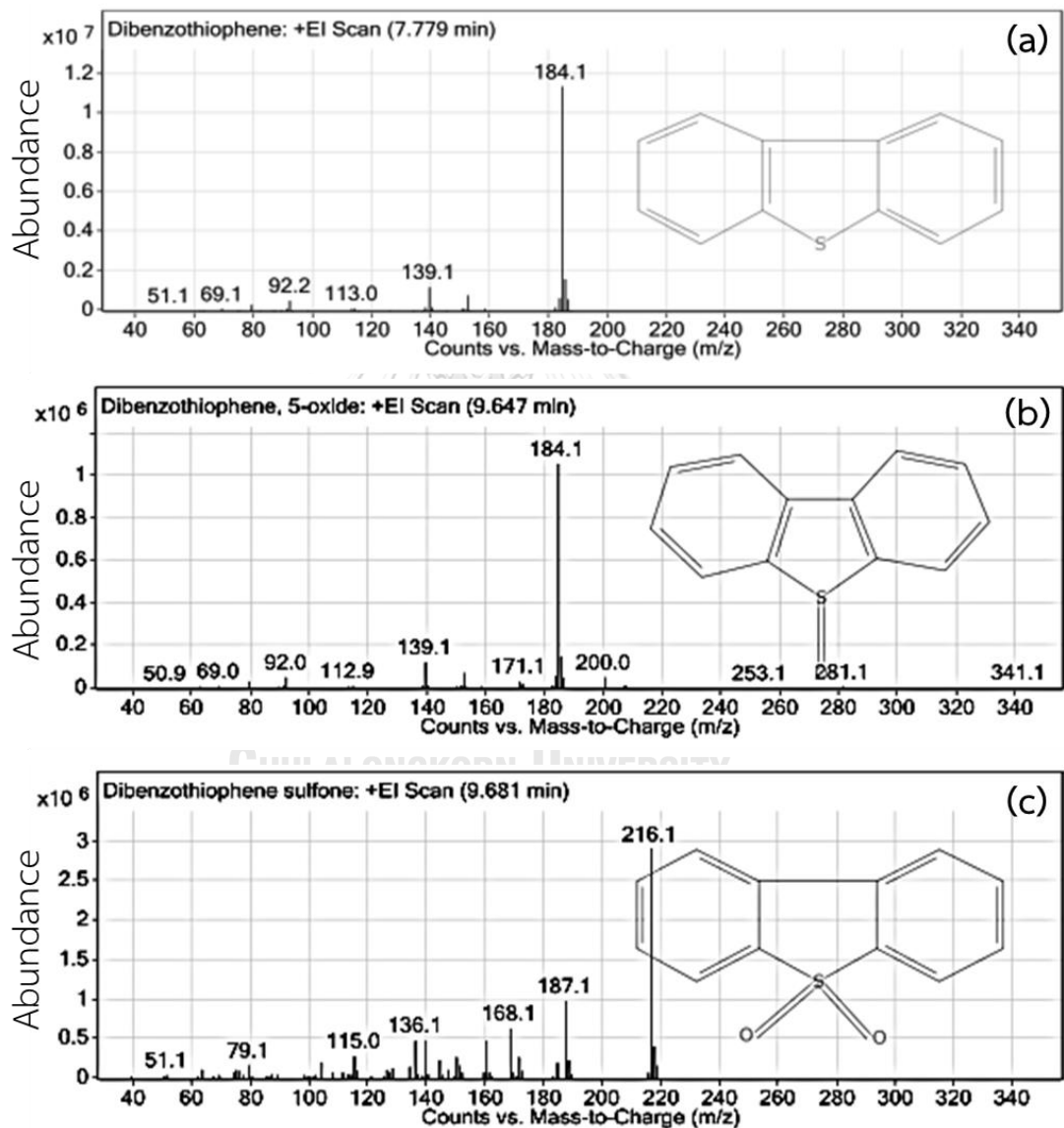
*Percentage of degradation was presented as mean standard deviation from triplicates (N=3). Different superscript lowercase letters in the same column indicate that the values are significantly different (ANOVA and DMRT, $P < 0.05$).

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3 ผลการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสลายพันธะซัลเฟอร์ใน DBT ของแบคทีเรียไอโซเลต LF3

เมื่อนำสารละลายที่ได้จากการย่อยสลาย DBT ของแบคทีเรียไอโซเลต LF3 ที่ผ่านการบ่มเป็นเวลา 7 วัน ณ อุณหภูมิ 30°C มาทำการวิเคราะห์เพื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค GC-MS พบว่า สารที่เกิดขึ้นคือ dibenzothiophene-5-oxide (DBTO) มีค่ามวลต่อประจุ (m/z) เท่ากับ 200 และ dibenzothiophene sulfone (DBTO₂) มีค่ามวลต่อประจุ เท่ากับ 216 (รูปที่ 4.1) โดยสารดังกล่าวเป็นอนุพันธ์ที่เกิดจากย่อยสลาย DBT ที่เกิดผ่านกระบวนการเมตาบอลิซึมของแบคทีเรียในวิถีที่เรียกว่า 4S (4S pathway) โดยวิถีดังกล่าว แสดงถึงความจำเพาะเจาะจงในการสลายพันธะซัลเฟอร์ของแบคทีเรียเนื่องจากทำปฏิกิริยาเฉพาะพันธะซัลเฟอร์ โดยปฏิกิริยาออกซิเดชันที่อาศัยเอนไซม์ oxygenase ในการเติมออกซิเจนตรงบริเวณพันธะซัลเฟอร์ในโมเลกุลของ DBT ให้ได้เป็น DBTO และ

DBTO₂ ตามลำดับ นอกจากนี้ยังอาศัยเอนไซม์ desulfinase เพื่อทำปฏิกิริยาในโครงสร้างของ DBTO₂ ในตำแหน่งของซัลเฟอร์ที่สร้างพันธะกับออกซิเจน (sulfur-oxygen based groups) [68, 69, 76] เพื่อให้ซัลเฟอร์หลุดออกจากโมเลกุลของ DBT ในรูปของซัลเฟตไอออนซึ่งสามารถตรวจสอบซัลเฟตที่เกิดขึ้นโดยนำสารละลายที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อไปทำปฏิกิริยากับ barium chloride ให้ได้เป็นตะกอนของ barium sulfate ที่ทำให้สารละลายเกิดความขุ่น



รูปที่ 4.1 โครมาโทแกรมของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อย DBT ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ (a) DBT (b) DBTO (c) DBTO₂

4.4 ผลการจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียโอโซเลต LF3

เมื่อนำแบคทีเรียโอโซเลต LF3 ที่คัดแยกได้จากกองถ่ายหิน บริเวณเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี เมื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายพืชรหัสเซลล์เฟอร์ใน DBT พบว่าให้เปอร์เซ็นต์การลดลงของเซลล์เฟอร์สูงสุด ดังนั้นจึงนำแบคทีเรียโอโซเลต LF3 มาจัดจำแนกสายพันธุ์ โดยการสกัดดีเอ็นเอ และนำดีเอ็นเอที่ได้มาเพิ่มปริมาณบริเวณ 16S rRNA โดยใช้ primer 1492R และ 27F ด้วยปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอร์เรส มีขนาดประมาณ 1500 คู่เบส ซึ่งตรงกับขนาดของ 16S rRNA ที่มีรายงานในแบคทีเรียชนิดอื่น และใน *B. cereus* ที่เคยมีการรายงาน ซึ่งสามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ 16S rRNA ของแบคทีเรียโอโซเลต LF3 ได้ เนื่องจากบริเวณนี้มีความอนุรักษ์สูง มีจำนวนหลายซ้ำในจีโนม ซึ่งง่ายต่อการเพิ่มจำนวน และบริเวณนี้ความแปรปรวนสูงในระดับชนิด (species) แต่มีความแปรปรวนต่ำในระดับสกุล (genus) ซึ่งการใช้ primer 1492R และ 27F มีความจำเพาะและนิยมใช้ศึกษา (universal primer) จากนั้นจึงนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอร์เรส ไปทำ automated DNA sequencing ทำให้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียโอโซเลต LF3 แสดงดังตารางที่ 4.4 นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปตรวจสอบหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA เพื่อเปรียบเทียบความคล้ายจากข้อมูลใน Genbank โดยใช้โปรแกรม Blastn แล้วเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์ที่คล้ายคลึงกันมากที่สุดมาทำ pairwise alignment โดยพบว่าบริเวณ 16S rRNA มีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายกับ *Bacillus cereus* 5 สายพันธุ์ (ตารางที่ 4.5) ได้แก่ *B. cereus* strain ATCC 14579, *B. cereus* strain JCM 2152, *B. cereus* strain CCM, 2010, *B. cereus* strain NBRC 15305 และ *B. cereus* strain IAM 12605 เท่ากับ 94 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงสามารถจัดจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียโอโซเลต LF3 อยู่ในสายพันธุ์ *B. cereus*

ตารางที่ 4.4 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลต LF3

Isolate	Nucleotide sequencing
LF3	<p>TCGGGGCGGCGTGCTATACATGCAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGA AGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAA CTCCGGGAAACCGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCATGGTTCGAAATTGA AAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAG GTAACGGCTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACAC TGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTACGGAATCTTCCGCA ATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGCTTTCGGGTCGTA AAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTA CCTAACCGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGG CAAGCGTTATCCGGAATTATCGGGCGTAAAGCGGCGGCCCCAGGTGGTTTTCTTAAG TTCTGATGTGAAAGCCACCGGGCTCCAACCCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGA CCTTGGAGGTGCAGAAAGAGGAAAGTGAATTTCCATTGTGTGTAGCGGTGAAATGC GTAGAGGATTATGGAGGAACCACAGTGGGCGAAAGCCGACTTTTCTGGTCTGTAAC TGACCACTGAAGGCGGAAAGCGTGGGGAGGCAACAAGGATTAGATAACCCTGGT AGTCCAACCCGTAAACGGATGAGGGCTAAGTTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTAGTT GCTAAAGTAACGCCATAAGCACTCCGCCCGGGGAGTACGGCCGCCAGGCCTGAAAC TCAAAGAAATGAAGGGGGCCCCACCAGCGGTTGAGCCATGGTGGTTTAATTTGAG CAACGCGAAGAACCCTACACGGTCTGACATCCTTCTGACCACCCTAGAGATAAGGCT CTCTCCTTTGGGAGCAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCCAGCTCGGGTCCTG GAAATGTTGGATTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGGATTCTAGTTGCACTCATT TAATTGGCCATCTAAGGTGACCGCGGTGACCAACCGGAGGAAGGTGGGGATAGAT CAGTCAAATGTCCTCGACTGCTCAACAGTTCCATGACGTGCAACTGCGACGCAGTACC CCCGGGGTACCATGGACGGTACAAAGAAGTGCAAGGCCCGAGGGGGAGGTTATTTT ATAAAACCTTTTCCGTTTGGATTGTTGGGTGCAAATTGCCTACCTGAAGCCGGAATC GCTTGTATCGGGATCAGCCTGCCGCGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACCCC CCCCCTACCCCCGAGAGTTTGAACCCCCGAAGTCGGTGGGGTAACCCTTTGGAGC CAGCCACATCATACAAAATCTGCGCTTGTAG</p>

ตารางที่ 4.5 เปรอ์เซ็นต์ความคล้ายของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลต LF3

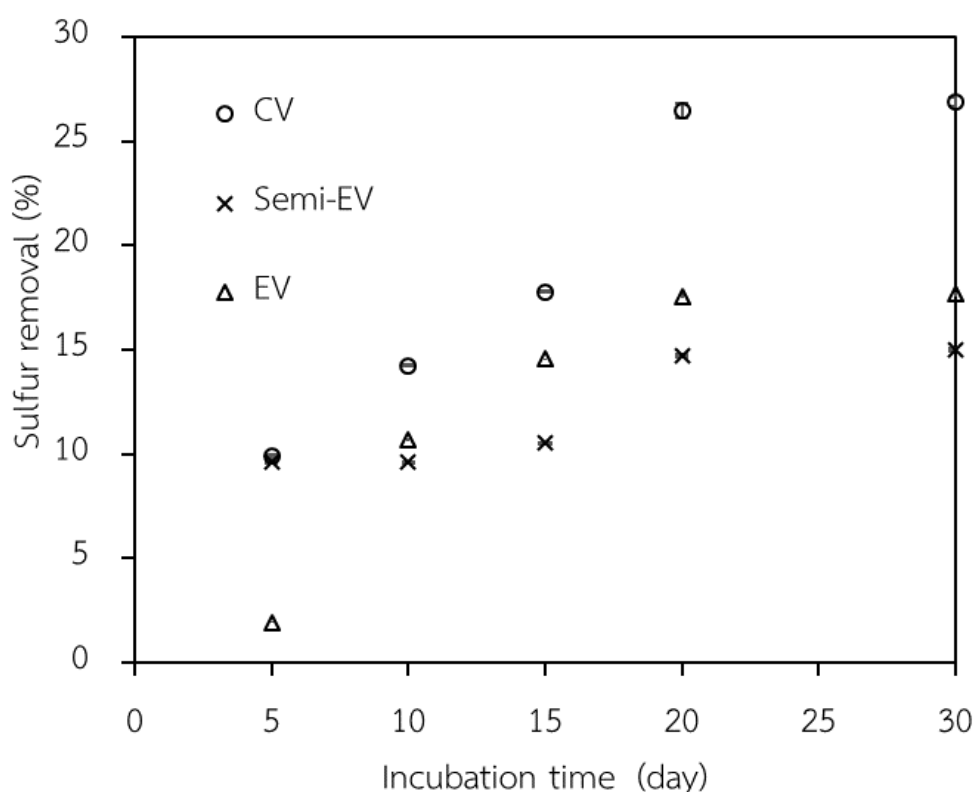
Accession number	Strain	Similarity to the isolate LF3 (%)
NR 074540.1	<i>B. cereus</i> strain ATCC 14579	94
NR 113266.1	<i>B. cereus</i> strain JCM 2152	94
NR 115714.1	<i>B. cereus</i> strain CCM 2010	94
NR 112630.1	<i>B. cereus</i> strain NBRC 15305	94
NR 115526.1	<i>B. cereus</i> strain IAM 12605	94

4.5 ผลของชนิดพันธะซัลเฟอร์ในยางต่อประสิทธิภาพการตีวัลคาไนซ์ของ *B. cereus*

4.5.1 ผลการวัดปริมาณซัลเฟอร์ในยางก่อน-หลังกระบวนการตีวัลคาไนซ์ในเซชันด้วยเทคนิคบอมบ์แคลอริเมทรี

เมื่อนำ *B. cereus* มาเลี้ยงในอาหารสูตร BSM ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงเติมยางที่ปราศจากเชื้อ 2.5 กรัม ที่เตรียมได้จากข้อ 3.3.3 ได้แกยางผงวัลคาไนซ์สูตร CV, Semi-EV หรือ EV ทำการบ่มเป็นเวลา 30 วัน ณ อุณหภูมิห้อง ($30\pm 2^{\circ}\text{C}$) ที่ภาวะเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที นำยางผงที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณซัลเฟอร์ด้วยเทคนิคบอมบ์แคลอริเมทรีโดยวัดผลทุก ๆ 5 วัน พบว่า เมื่อเวลาผ่านไปปริมาณของซัลเฟอร์ในยางทุกสูตรมีแนวโน้มลดลงดังแสดงใน รูปที่ 4.2 ในยางแต่ละสูตรจะให้เปอร์เซ็นต์การลดลงของซัลเฟอร์ที่แตกต่างกัน โดยยางสูตร CV มีเปอร์เซ็นต์การลดลงของซัลเฟอร์สูงที่สุด (27.1 ± 0.4) รองลงมาคือสูตร EV (17.7 ± 0.1) และสูตร Semi-EV (15.2 ± 0.1) ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่ายางแต่ละสูตรมีผลต่อประสิทธิภาพการตีวัลคาไนซ์ของ *B. cereus* เนื่องจากการวัลคาไนซ์ของยางแต่ละสูตรแสดงชนิดของพันธะซัลเฟอร์ที่แตกต่างกัน สำหรับยางสูตร CV จะมีองค์ประกอบหลักคือ พันธะซัลเฟอร์หลายอะตอม (polysulfide bond) มีค่าพลังงานพันธะน้อยกว่า 64 กิโลแคลอรีต่อโมล ส่วนในยางสูตร Semi-EV มีองค์ประกอบหลักคือ พันธะซัลเฟอร์สองอะตอม (disulfide bond) มีค่าพลังงานพันธะเท่ากับ 64 กิโลแคลอรีต่อโมล และสูตร EV มีองค์ประกอบหลัก คือพันธะซัลเฟอร์อะตอมเดียว มีค่าพลังงานพันธะเท่ากับ 68 กิโลแคลอรีต่อโมล [57] นอกจากนี้พันธะที่มีซัลเฟอร์หลายอะตอมจะเป็น

การเชื่อมแบบสายยาว ส่งผลให้ความยาวของพันธะเชื่อมขวางซัลเฟอร์ในโมเลกุลของยางสูตร CV ที่มีความยืดหยุ่น (flexible) หรือบิดงอได้มากกว่า ทำให้เกิดช่องว่างในโมเลกุลของยางซึ่งส่งผลให้แบคทีเรียสามารถหลั่งเอนไซม์เข้าไปทำปฏิกิริยาในโมเลกุลของยางได้ง่ายขึ้น [10] อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาผลการลดลงของปริมาณซัลเฟอร์ พบว่าเริ่มคงที่ ณ วันที่ 20 ของการบ่มซึ่งให้ผลที่ไม่แตกต่างกับวันที่ 30 ดังนั้นจึงใช้เวลาในการบ่มอย่างสำหรับการทดลองครั้งต่อไปเพียง 20 วัน

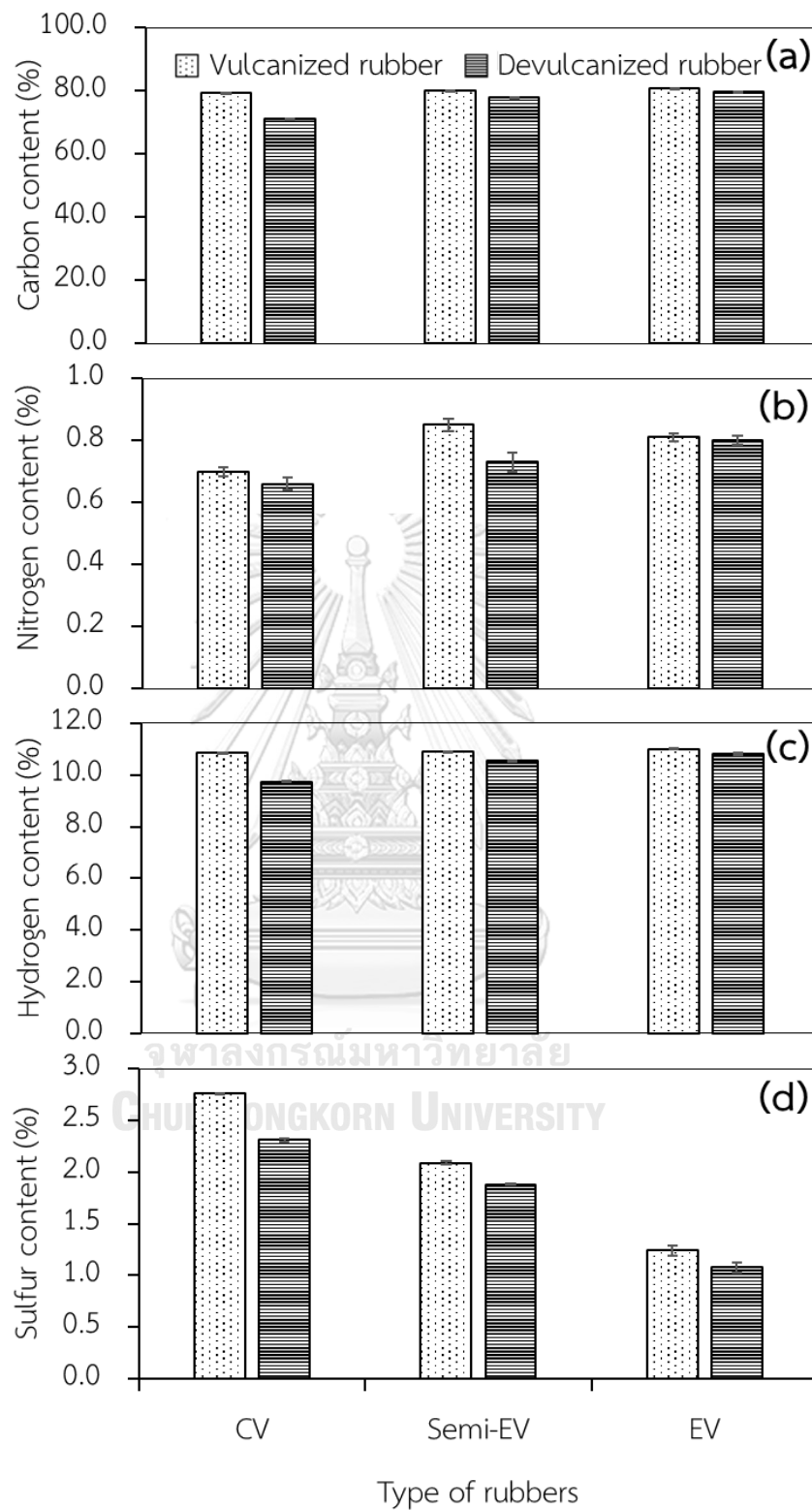


รูปที่ 4.2 เปรียบเทียบการลดลงของปริมาณซัลเฟอร์ในยางทั้ง 3 สูตร ได้แก่ CV, Semi-EV และ EV หลังจากบ่มร่วมกับ *B. cereus* เป็นเวลา 30 วัน ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ยการทดลอง 3 ซ้ำ บาร์แสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

4.5.2 ผลการวิเคราะห์ปริมาณร้อยละประกอบของธาตุในยางก่อน-หลังกระบวนการตีวัลคาไนเซชัน

รูปที่ 4.3 แสดงปริมาณองค์ประกอบของธาตุ 4 ธาตุ ได้แก่ คาร์บอน ไนโตรเจน ไฮโดรเจน และซัลเฟอร์ ในยางทั้ง 3 สูตร (CV, Semi-EV และ EV) ของยางก่อนและหลังกระบวนการ

ดีวัลคาโนเซชัน เมื่อพิจารณาองค์ประกอบของธาตุก่อนกระบวนการดีวัลคาโนเซชันในยวทั้ง 3 สูตร พบว่ามีแนวโน้มสัดส่วนองค์ประกอบของธาตุที่เหมือนกันคือ มีปริมาณของธาตุคาร์บอนเป็นองค์ประกอบในโมเลกุลของยวมากที่สุด เนื่องจากคาร์บอนเป็นองค์ประกอบในโครงสร้างสายโซ่หลักของยว รองลงมาคือ ไฮโดรเจน ซัลเฟอร์ และไนโตรเจน ตามลำดับ เมื่อผ่านกระบวนการดีวัลคาโนเซชันด้วย *B. cereus* เป็นเวลา 20 วัน พบว่าปริมาณของธาตุทั้ง 4 ธาตุมีค่าลดลง แสดงให้เห็นว่า *B. cereus* สามารถใช้องค์ประกอบของธาตุต่าง ๆ ในยววัลคาโนซ์เป็นสารอาหารสำหรับการเจริญเติบโต นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณของธาตุซัลเฟอร์ในยวทั้ง 3 สูตรมีเปอร์เซ็นต์การลดลงสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับธาตุอื่น ๆ โดยเฉพาะในสูตรยวที่ขึ้นรูปด้วยระบบ CV ให้เปอร์เซ็นต์การลดลงของปริมาณซัลเฟอร์สูงที่สุด มีค่าเท่ากับ 16.36 รองลงมาคือ EV และ Semi-EV เท่ากับ 10.05 และ 12.90 ตามลำดับ เนื่องจากในยววัลคาโนซ์มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบทำให้แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการสลายพันธะซัลเฟอร์ สามารถใช้ซัลเฟอร์ในยววัลคาโนซ์เป็นสารอาหารในการเจริญเติบโตได้ [6] โดยเฉพาะในยวสูตร CV ที่มีสัดส่วนของธาตุซัลเฟอร์มากที่สุด และมีองค์ประกอบของชนิดพันธะซัลเฟอร์เป็นแบบซัลเฟอร์หลายอะตอม ทำให้เอนไซม์ที่หลั่งโดยแบคทีเรียสามารถทำปฏิกิริยาสลายพันธะเชื่อมขวางของซัลเฟอร์ได้ง่ายส่งผลให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายพันธะซัลเฟอร์ในยววัลคาโนซ์ด้วย *B. cereus* ของยวสูตร CV สูงที่สุด ซึ่งให้ผลที่สอดคล้องกับการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การลดลงของซัลเฟอร์ด้วยเทคนิคอมป์แคลอรีเมทรี (รูปที่ 4.2) ดังนั้น จึงเลือกยวสูตร CV มาใช้ในการศึกษาในขั้นต่อไป



รูปที่ 4.3 ปริมาณร้อยละองค์ประกอบของธาตุในยางก่อนและหลังกระบวนการดีวัลคาไนเซชันด้วย *B. cereus* เป็นเวลา 20 วัน (a) คาร์บอน (b) ไนโตรเจน (c) ไฮโดรเจน (d) ซัลเฟอร์ ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ยการทดลอง 3 ซ้ำ บาร์แสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

4.5.3 ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีของยางก่อน-หลังกระบวนการดีวัลคาไนเซชัน

เมื่อนำยางสูตร CV ก่อนและหลังกระบวนการดีวัลคาไนเซชันด้วย *B. cereus* เป็นเวลา 20 วัน มาศึกษาโครงสร้างทางเคมีในโมเลกุลของยางเพื่อตรวจสอบหมู่ฟังก์ชันของยางที่เปลี่ยนแปลงไปหลังกระบวนการดีวัลคาไนเซชันด้วยเทคนิค FTIR พบว่าปรากฏเลขคลื่นที่สำคัญในอินฟราเรดสเปกตรัมของยางธรรมชาติวัลคาไนซ์ที่สูตรโครงสร้างทางเคมี คือ cis-1,4-polyisoprene ได้แก่ ตำแหน่งเลขคลื่น 2960–2850 cm^{-1} เป็นชนิดพันธะ C-H saturated ตำแหน่งเลขคลื่น 1662 cm^{-1} เป็นชนิดพันธะ C=C deformations [9] ตำแหน่งเลขคลื่น 1540 cm^{-1} เป็นชนิดพันธะ methyl-assisted conjugated double bonds [6, 9-11, 71, 83] ตำแหน่งเลขคลื่น 1450 cm^{-1} และ 1380 cm^{-1} เป็นชนิดพันธะ CH_2 deformation [11] ตำแหน่งเลขคลื่น 835 cm^{-1} เป็นชนิดพันธะ C-H bending [83] และตำแหน่งเลขคลื่น 755 cm^{-1} เป็นชนิดพันธะ C-S stretching ของพันธะเชื่อมขวางซัลเฟอร์ที่ปรากฏในยางหลังกระบวนการวัลคาไนเซชัน [60] และเมื่อเปรียบเทียบกับยางหลังผ่านกระบวนการวัลคาไนเซชัน เป็นเวลา 20 วัน พบว่าโครงสร้างของยางสูตร CV ปรากฏเลขคลื่นในตำแหน่ง 1088 cm^{-1} ซึ่งเป็นชนิดพันธะ S=O stretching [6, 9-11, 71] เมื่อวัดพื้นที่ฟีก (peak area) พบว่ามีค่าเท่ากับ 8.08 (ตารางที่ 4.6) แสดงให้เห็นว่ามีปฏิกิริยาออกซิเดชันเกิดขึ้นในกระบวนการดีวัลคาไนเซชัน โดย *B. cereus* หลังเอนไซม์ที่สามารถออกซิไดซ์พันธะซัลเฟอร์ในโมเลกุลของยางผ่านกระบวนการเมตาบอลิซึม ทำให้เกิดพันธะระหว่างซัลเฟอร์กับออกซิเจนในโมเลกุลของยางซึ่งได้แก่ กลุ่มของ sulfoxide sulfone และ sulfate [6, 9-11, 71] นอกจากนี้ยังพบว่าตำแหน่งของชนิดพันธะ methyl-assisted conjugated double bonds มีพื้นที่ฟีกลดลง ซึ่งก่อนกระบวนการดีวัลคาไนเซชันมีค่าเท่ากับ 21.34 แต่หลังกระบวนการดีวัลคาไนเซชันมีค่าเท่ากับ 10.35

ตารางที่ 4.6 พื้นที่ฟีกของหมู่ฟังก์ชันของยางสูตร CV ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงหลังกระบวนการดีวัลคาไนเซชันด้วย *B. cereus* เป็นเวลา 20 วัน

Wave number (cm^{-1})	Type of bonding	Peak area (a.u.)	
		Before devulcanization	After Devulcanization at 20 d
1088	S=O stretching	-	8.08
1540	methyl-assisted conjugated double bonds	21.34	10.35

4.5.4 ผลการวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีด้วยเทคนิค XPS

จากการวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีในยางสูตร CV เพื่อเปรียบเทียบชนิดและพลังงานยึดเหนี่ยว (binding energy) ที่เปลี่ยนแปลงในตำแหน่งของพันธะซัลเฟอร์ในโมเลกุลของยางก่อนและหลังกระบวนการดีวัลคาไนเซชันเป็นเวลา 20 วัน พบว่ายางสูตร CV ก่อนกระบวนการดีวัลคาไนเซชันมีองค์ประกอบของชนิดพันธะซัลเฟอร์สองชนิด ได้แก่ ซัลเฟอร์กับคาร์บอน (S-C) ที่มีพลังงานยึดเหนี่ยว เท่ากับ 162.3 eV และซัลเฟอร์กับซัลเฟอร์ (S-S) มีพลังงานยึดเหนี่ยว เท่ากับ 163.7 eV [73] ดังแสดงในตารางที่ 4.7 และเมื่อผ่านกระบวนการดีวัลคาไนเซชันเป็นเวลา 20 วัน พื้นที่ของฟีกในบริเวณของพันธะ S-C และ S-S มีค่าลดลงจากเดิม นอกจากนี้ปรากฏตำแหน่งของพันธะระหว่างซัลเฟอร์กับออกซิเจน (S-O) ซึ่งมีค่าพลังงานยึดเหนี่ยว เท่ากับ 165.7 eV [73] สามารถอธิบายกลไกการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในกระบวนการเมตาบอลิซึมของ *B. cereus* ที่ปรากฏตำแหน่งของพันธะ S-O หลังกระบวนการดีวัลคาไนเซชันซึ่งสอดคล้องกับวิถี 4S (4S pathway) ตามที่ Romine และ Romine [84] รายงานการเปลี่ยนแปลงของยาง GTR เมื่อบ่มร่วมกับแบคทีเรียชนิด *Thiobacillus ferrooxidans* และ *T. thiooxidans* นอกจากนี้ Hu และคณะ [9] ศึกษาผลของแบคทีเรียชนิด *Gordonia amicalisa* ในกระบวนการดีวัลคาไนเซชันของยางสังเคราะห์ชนิดไอโซพรีนและสไตรีนบิวทาไดอีนซึ่งพบว่าพื้นที่ในบริเวณพันธะ S-O มีค่าเพิ่มขึ้นซึ่งเป็นกลไกตามวิถี 4S ตามที่ได้กล่าวมา

ตารางที่ 4.7 เปอร์เซ็นต์พื้นที่ของพันธะซัลเฟอร์แต่ละชนิดในยางก่อนและหลังกระบวนการดีวัลคาไนเซชันด้วย *B. cereus* เป็นเวลา 20 วัน

Type of sulfide Bonds	Binding energy (eV)	Area (%)	
		Vulcanized rubber (CV)	Devulcanized rubber (CV)
S-C	162.3	30.1	29.5
S-S	163.7	69.9	18.6
S-O	165.7	-	51.9

4.5.6 ผลการวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพของยางก่อน - หลังกระบวนการดีวัลคาไนเซชัน

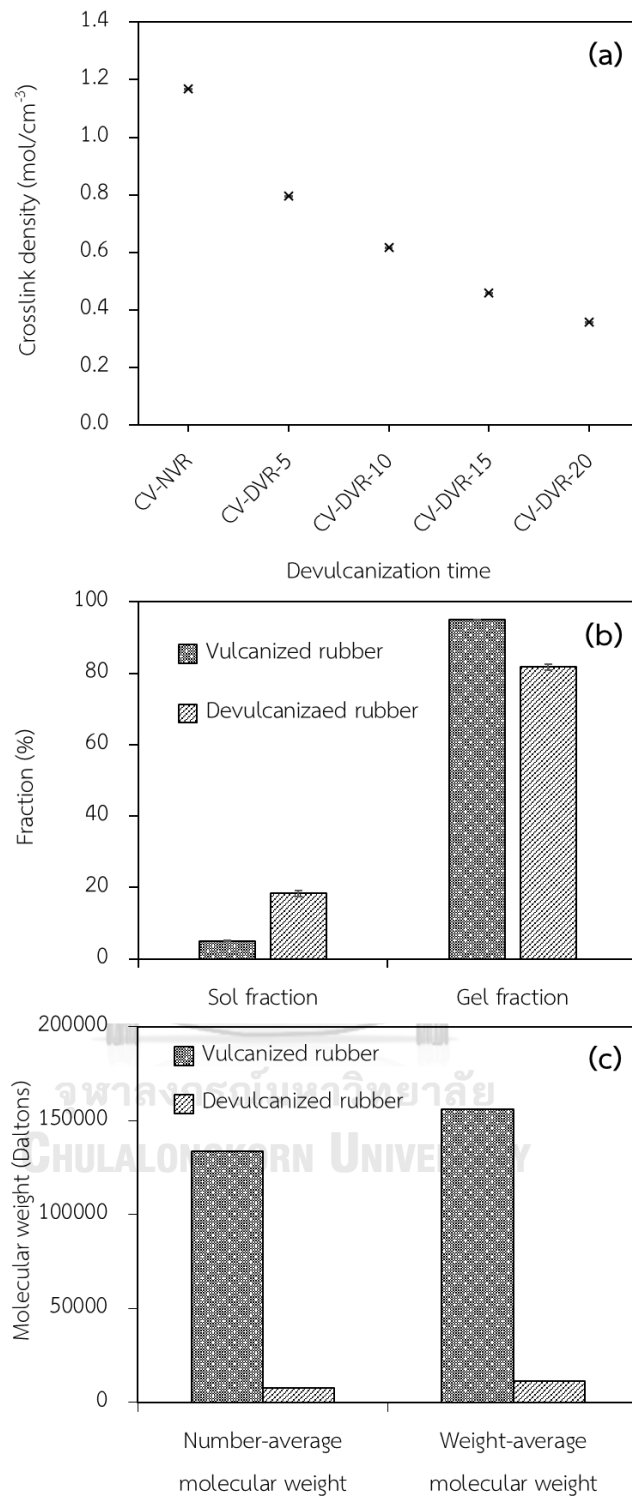
การวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพของยางเป็นอีกวิธีหนึ่งซึ่งช่วยตรวจสอบโครงสร้างโมเลกุลเพื่อเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของยางก่อนและหลังกระบวนการดีวัลคาไนเซชันด้วย *B. cereus* เป็นเวลา 20 วัน ได้แก่ การหาค่าความหนาแน่นของพันธะเชื่อมขวางซัลเฟอร์ในยางและการวิเคราะห์สัดส่วนโซล-เจลซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ระดับการดีวัลคาไนเซชัน เมื่อนำยางสูตร CV มาวิเคราะห์หาปริมาณความหนาแน่นของพันธะเชื่อมขวางซัลเฟอร์โดยทำการวัดทุก ๆ 5 วัน จนครบ 20 วัน พบว่า

ปริมาณความหนาแน่นของพันธะเชื่อมขวางซัลเฟอร์มีแนวโน้มลดลง (รูปที่ 4.4 (a)) คิดเป็น 70.2 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวิเคราะห์สัดส่วนโซล-เจล (รูปที่ 4.4 (b)) พบว่าหลังผ่านกระบวนการดีวัลคาไนเซชันค่าสัดส่วนเจลมีแนวโน้มลดลงในทางตรงกันข้ามกับสัดส่วนโซลที่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น เนื่องจากในกระบวนการดีวัลคาไนเซชันของ *B. cereus* มีการทำลายพันธะซัลเฟอร์ที่เชื่อมขวางระหว่างโมเลกุลของยาง ทำให้ค่าความหนาแน่นของพันธะลดลงและสายโซ่โมเลกุลของยางสั้นลง ส่งผลให้ส่วนโซลเพิ่มขึ้นเมื่อละลายในตัวทำละลายโทลูอีน

เมื่อนำยางไปวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลโดยเทคนิค GPC พบว่า หลังผ่านกระบวนการดีวัลคาไนเซชันน้ำหนักโมเลกุลของยางมีค่าลดลง (รูปที่ 4.4(c)) และค่าของ polydispersity index (PDI) เพิ่มขึ้นจาก 1.17 เป็น 1.49 แสดงถึงค่าการกระจายของขนาดสายโซ่โมเลกุล สามารถอธิบายได้ว่า หลังผ่านกระบวนการดีวัลคาไนเซชัน เป็นเวลา 20 วัน โครงสร้างสายโซ่ของโมเลกุลยางถูกทำลายลง ส่งผลให้สายโซ่ของยางมีขนาดสั้นลงและน้ำหนักโมเลกุลมีค่าลดลง

4.6 ผลของขนาดอนุภาคยางต่อประสิทธิภาพการดีวัลคาไนซ์ของ *B. cereus*

เมื่อนำยางสูตร CV มาศึกษาผลของขนาดของอนุภาคยางในกระบวนการดีวัลคาไนเซชันของแบคทีเรีย *B. cereus* โดยศึกษาทั้งหมด 2 ขนาด ได้แก่ ขนาดใหญ่ (2.0-2.7 มิลลิเมตร) และขนาดเล็ก (0.3-0.4 มิลลิเมตร) ที่พีเอชเท่ากับ 7 ณ อุณหภูมิห้อง ($30 \pm 2^{\circ}\text{C}$) เป็นเวลา 20 วัน เมื่อครบกำหนดจึงนำยางไปวิเคราะห์หาปริมาณซัลเฟอร์ที่ลดลงด้วยเทคนิคคอมบ์แคลลอร์ิเมทรี โดยวัดผลทุก ๆ 5 วัน พบว่าเมื่อเวลาผ่านไปปริมาณซัลเฟอร์ในยางมีแนวโน้มลดลง ดังตารางที่ 4.8 โดยในยางขนาดอนุภาคเล็กมีเปอร์เซ็นต์การลดลงของซัลเฟอร์มากกว่าขนาดอนุภาคใหญ่แสดงให้เห็นว่าขนาดของอนุภาคยางมีผลต่อประสิทธิภาพการดีวัลคาไนเซชัน โดยขนาดอนุภาคเล็กจะมีพื้นที่ผิวมากกว่าขนาดอนุภาคใหญ่ ทำให้เอนไซม์ของแบคทีเรียสามารถเข้าทำปฏิกิริยาได้ดีขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับผลงานวิจัยที่ผ่านมาของ [9] ที่ใช้ขนาดของอนุภาคยางอยู่ในช่วง 40-100 ไมโครเมตร ซึ่งเป็นขนาดที่ได้จากกระบวนการบด (grinding process) จากอุตสาหกรรม



รูปที่ 4.4 สมบัติทางกายภาพของยางสูตร CV ก่อนและหลังกระบวนการดีวัลคาไนเซชันด้วย *B. cereus* เป็นเวลา 20 วัน (a) ความหนาแน่นของพันธะเชื่อมขวางซัลเฟอร์ในโมเลกุลของยาง เมื่อทำการวัดทุก ๆ 5 วัน (b) สัดส่วนโซล-เจล (sol-gel fraction) (c) น้ำหนักโมเลกุลของยาง

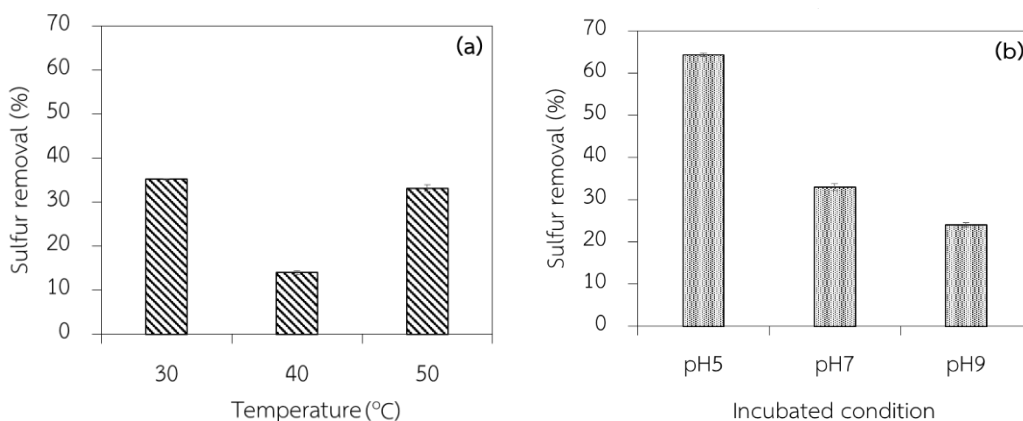
ตารางที่ 4.8 เปอร์เซ็นต์การลดลงของปริมาณซัลเฟอร์ในยางทั้งสองขนาด หลังผ่านกระบวนการตีวัลคาไนเซชัน เมื่อทำการวัดทุก ๆ 5 วัน จนครบ 20 วัน ภายใต้ภาวะที่พีเอชเท่ากับ 7 ณ อุณหภูมิห้อง ($30\pm 2^{\circ}\text{C}$)

Devulcanization time (day)	Sulfur removal (%)	
	Particle size 420-297 micron	Particle size 2580-2000 micron
	5	14.89 \pm 2.35
10	23.87 \pm 0.49	18.19 \pm 3.81
15	25.20 \pm 0.97	24.67 \pm 1.08
20	32.14 \pm 0.84	27.35 \pm 0.79

*Percentage of sulfur removal was presented as mean standard deviation from triplicates (N=3). The values are significantly different (ANOVA and DMRT, $P < 0.05$).

4.7 ผลของพีเอชและอุณหภูมิต่อประสิทธิภาพการตีวัลคาไนซ์ของ *B. cereus*

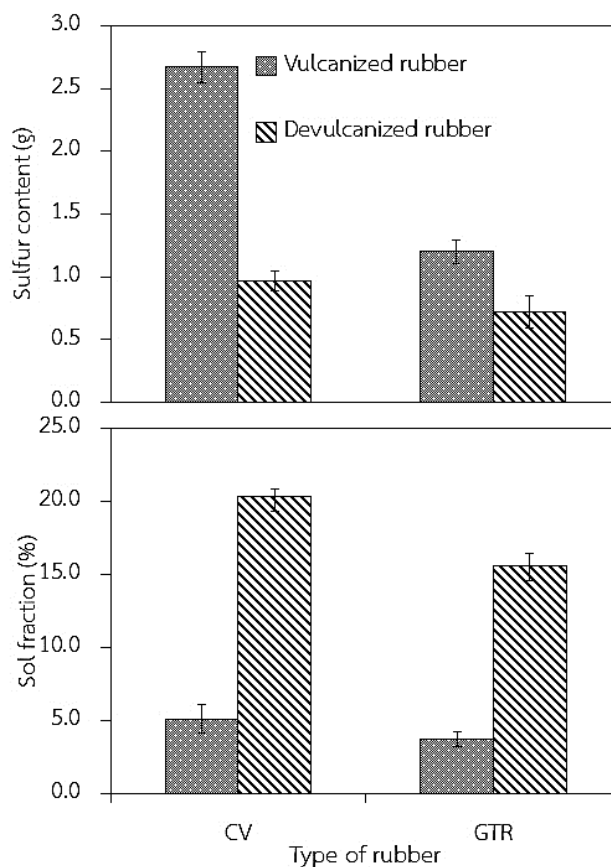
พีเอชและอุณหภูมิเป็นปัจจัยหนึ่งที่สามารถส่งผลต่อการเจริญเติบโตและการทำงานของเอนไซม์ของแบคทีเรียที่ใช้กระบวนการตีวัลคาไนเซชัน ดังนั้นจึงทำการแปรผันอุณหภูมิ 3 ระดับ ได้แก่ 30 40 และ 50°C ที่พีเอช 7 ทำการบ่มเป็นเวลา 20 วัน ที่ภาวะเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที จากนั้นนำยางที่ได้จากกระบวนการตีวัลคาไนเซชันมาวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การลดลงของปริมาณซัลเฟอร์ ดังแสดงใน รูปที่ 4.5 (a) จากการศึกษาพบว่า ที่พีเอช 7 ณ อุณหภูมิที่ 30 40 และ 50°C เปอร์เซ็นต์การลดลงของซัลเฟอร์มีค่าแตกต่างกัน โดยเฉพาะที่อุณหภูมิ 30°C พบว่าให้เปอร์เซ็นต์การลดลงสูงสุด ดังนั้นจึงใช้ภาวะอุณหภูมิ 30°C ในการทดลองต่อไป โดยทำการแปรผันค่าพีเอช 3 ระดับ ได้แก่ 5 7 และ 9 พบว่า เมื่อค่าพีเอชลดลง เปอร์เซ็นต์การลดลงของซัลเฟอร์จะมีแนวโน้มสูงขึ้น (รูปที่ 4.5 (b)) โดยที่พีเอช 5 ณ อุณหภูมิ 30°C *B. cereus* ให้เปอร์เซ็นต์การลดลงของซัลเฟอร์สูงที่สุดมีค่าเท่ากับ 64.3 ± 0.1 แสดงให้เห็นว่าพีเอชและอุณหภูมิมิมีผลต่อประสิทธิภาพการตีวัลคาไนเซชัน และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการตีวัลคาไนเซชันของ *B. cereus* สามารถทำงานได้ดีภายใต้ภาวะที่เหมาะสมที่พีเอช 5 ณ อุณหภูมิ 30°C สอดคล้องกับการรายงานของ Watkins และคณะ [85] และ Konishi และคณะ [86] ที่ได้ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการสลายพันธะซัลเฟอร์จะมีภาวะที่เหมาะสมที่อุณหภูมิประมาณ 35°C และค่าพีเอชประมาณ 6 หรือมีความเป็นกรดเล็กน้อย



รูปที่ 4.5 เปรอ์เซ็นต์ของปริมาณซัลเฟอร์ที่ลดลงเมื่อบ่มอย่างกับ *B. Cereus* ที่ภาวะแตกต่างกันเป็นเวลา 20 วัน (a) พีเอช 7 ณ อุณหภูมิ 30 40 และ 50°C (b) ณ อุณหภูมิ 30°C ที่พีเอช 5 7 และ 9 ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ยการทดลอง 3 ซ้ำ บาร์แสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

4.8 ผลการดีวัลคาไนซ์ในยาง GTR ด้วย *B. cereus* ภายใต้ภาวะที่เหมาะสม

รูปที่ 4.6 แสดงปริมาณของซัลเฟอร์และสัดส่วนโซลในยางสูตร CV และยาง GTR ก่อนและหลังกระบวนการดีวัลคาไนเซชัน เมื่อบ่มร่วมกับ *B. cereus* ในภาวะที่พีเอชเท่ากับ 5 อุณหภูมิห้อง ($30 \pm 2^\circ\text{C}$) เป็นเวลา 20 วัน พบว่า ยาง GTR มีปริมาณของซัลเฟอร์ลดลงเท่ากับ $40.2 \pm 0.2\%$ แสดงให้เห็นว่า *B. cereus* สามารถดีวัลคาไนซ์ ยาง GTR ได้ และเมื่อพิจารณาค่าสัดส่วนโซล พบว่ามีค่าเพิ่มขึ้นหลังจากกระบวนการดีวัลคาไนเซชัน เนื่องจากพันธะเชื่อมขวางซัลเฟอร์ถูกทำลายลง แต่เมื่อเปรียบเทียบกับยางดีวัลคาไนซ์สูตร CV พบว่ามีปริมาณของซัลเฟอร์ที่ลดลงและการเพิ่มขึ้นของสัดส่วนโซลต่ำกว่ายางดีวัลคาไนซ์สูตร CV ซึ่งเป็นผลจากสารปนเปื้อนในยาง GTR ที่มีอัตราส่วนผสมของสารเคมีสูงกว่าในยางสูตร CV ในปริมาณของน้ำหนักยางที่เท่ากัน ได้แก่ สารตัวเติม (filler) เหมำดำ (carbon black) ที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย หรือมีชนิดของยางประเภทอื่น ๆ ที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการดีวัลคาไนซ์ของ *B. cereus* [9-11, 71]



รูปที่ 4.6 ปริมาณของซัลเฟอร์และค่าสัดส่วนโซล (sol fraction) ในยางสูตร CV และ GTR ก่อนและหลังกระบวนการดีวัลคาไนเซชันด้วย *B. cereus* เป็นเวลา 20 วัน ที่พีเอช 5 ณ อุณหภูมิห้อง ($30 \pm 2^{\circ}\text{C}$) ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ยการทดลอง 3 ซ้ำ บาร์แสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

4.9 ผลของสมบัติการคงรูปของยางธรรมชาติวัลคาไนซ์และรีวัลคาไนซ์

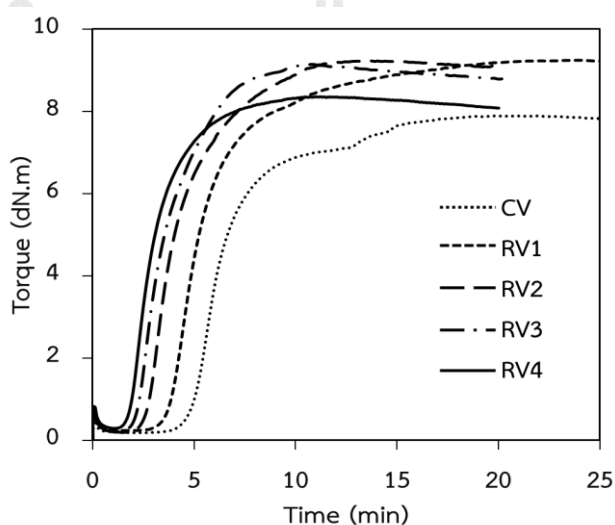
นำยางดีวัลคาไนซ์สูตร CV ขนาดอนุภาคเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.3-0.4 มิลลิเมตร ที่ได้จากกระบวนการดีวัลคาไนเซชันด้วย *B. cereus* เป็นเวลา 20 วัน พีเอชเท่ากับ 5 ณ อุณหภูมิห้อง ($30 \pm 2^{\circ}\text{C}$) ไปผสมกับยางธรรมชาติร่วมกับสารเคมีที่ใช้ในการขึ้นรูปดังตารางที่ 3.4 ทั้งหมด 4 สูตร ได้แก่ RV1 RV2 RV3 และ RV4 ขึ้นรูปยางคอมพาวนด์ที่ได้ที่อุณหภูมิ 150°C จากผลการศึกษา ลักษณะการคงรูปของยางคอมพาวนด์ที่ได้ ดังตารางที่ 4.9 สรุปลักษณะการคงรูปและในรูปที่ 4.7 พบการเปลี่ยนแปลงของกราฟ 3 ช่วงดังนี้ ขึ้นเริ่มต้นของปฏิกิริยาเริ่มจากการทำให้ยางนิ่มลงโดยให้ยางได้รับความร้อนส่งผลให้ค่าแรงบิด (torque) ลดลงในช่วงแรก จนเมื่ออุณหภูมิของยางเริ่มเข้าสู่สมดุล ความหนืดของยางจะมีค่าต่ำสุด (Minimum torque: M_L) และจะมีค่าคงที่อยู่ ณ จุดนี้เป็นระยะเวลา

หนึ่งก่อนที่จะเริ่มการเกิดวัลคาไนซ์ เรียกระยะเวลาดังกล่าวว่า ระยะเวลาดสกอร์ช (scorch time) และเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของระยะเวลาสกอร์ชในยางวัลคาไนซ์และยางวัลคาไนซ์ พบว่าเมื่อปริมาณของยางวัลคาไนซ์เพิ่มขึ้นส่งผลให้ระยะเวลาสกอร์ชลดลง เนื่องจากในยางวัลคาไนซ์ที่ผ่านการบ่มด้วย *B. cereus* มีสารเคมีหลงเหลืออยู่ในเนื้อยางทำให้มีส่วนที่ว่องไวต่อการเกิดพันธะเชื่อมขวางซัลเฟอร์ภายในโมเลกุลของยางคงเหลือ เมื่อมีการให้ความร้อนซ้ำอีกครั้งส่งผลให้ปฏิกิริยาวัลคาไนซ์เกิดขึ้นได้เร็วกว่าเดิม หลังจากนั้นความชันของกราฟจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว แสดงว่าเกิดพันธะเชื่อมขวางซัลเฟอร์ในโมเลกุลของยางทำให้ความหนืดของยางเริ่มสูงขึ้นส่งผลให้แรงบิดเริ่มสูงขึ้นตามเวลา ซึ่งอัตราการความเร็วของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ ได้แก่ อุณหภูมิ ชนิดยาง และระบบของสารที่ใช้ทำให้ยางคงรูป เมื่อปฏิกิริยาวัลคาไนซ์เกิดขึ้นสมบูรณ์ค่าแรงบิดจะคงที่ [49, 79, 83]

ตารางที่ 4.9 ลักษณะการคงรูปของยางวัลคาไนซ์และยางวัลคาไนซ์

Cure characteristic	CV	RV1	RV2	RV3	RV4
M_H^1 (dN.m)	7.80±0.11	9.36±0.21	9.18±0.09	8.90±0.26	8.36±0.17
M_L^2 (dN.m)	0.37±0.05	0.49±0.07	0.52±0.06	0.53±0.06	0.54±0.04
t_{s2}^3 (min)	5.53±0.04	4.30±0.10	3.23±0.05	2.67±0.04	2.28±0.06
t_{c90}^4 (min)	11.96±0.93	10.46±0.14	8.08±0.04	6.27±0.27	5.58±0.33

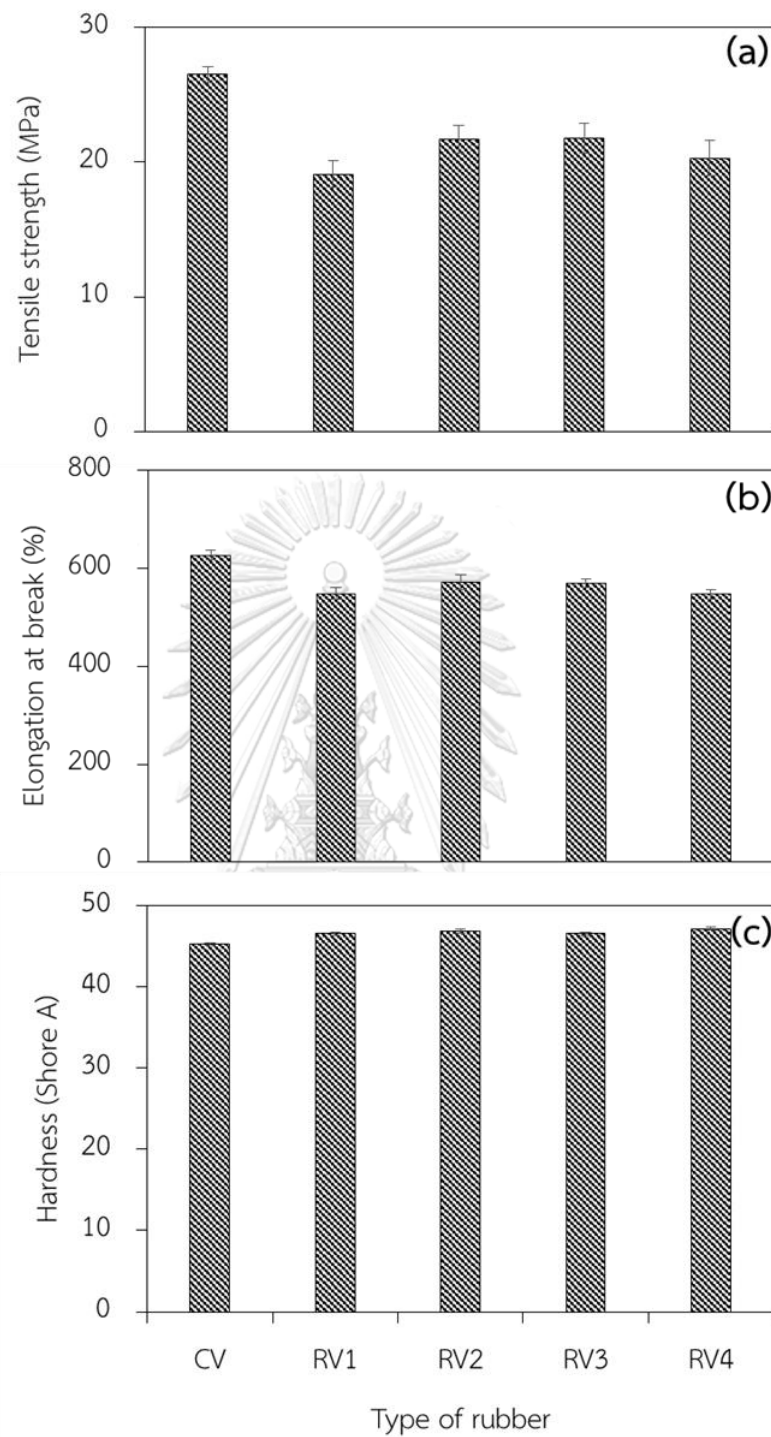
¹Minimum torque ²Maximum torque ³Scorch time is the time taken for a two-unit rise above the minimum torque. ⁴Optimum cure time is the time taken for attaining 90% of the maximum torque.



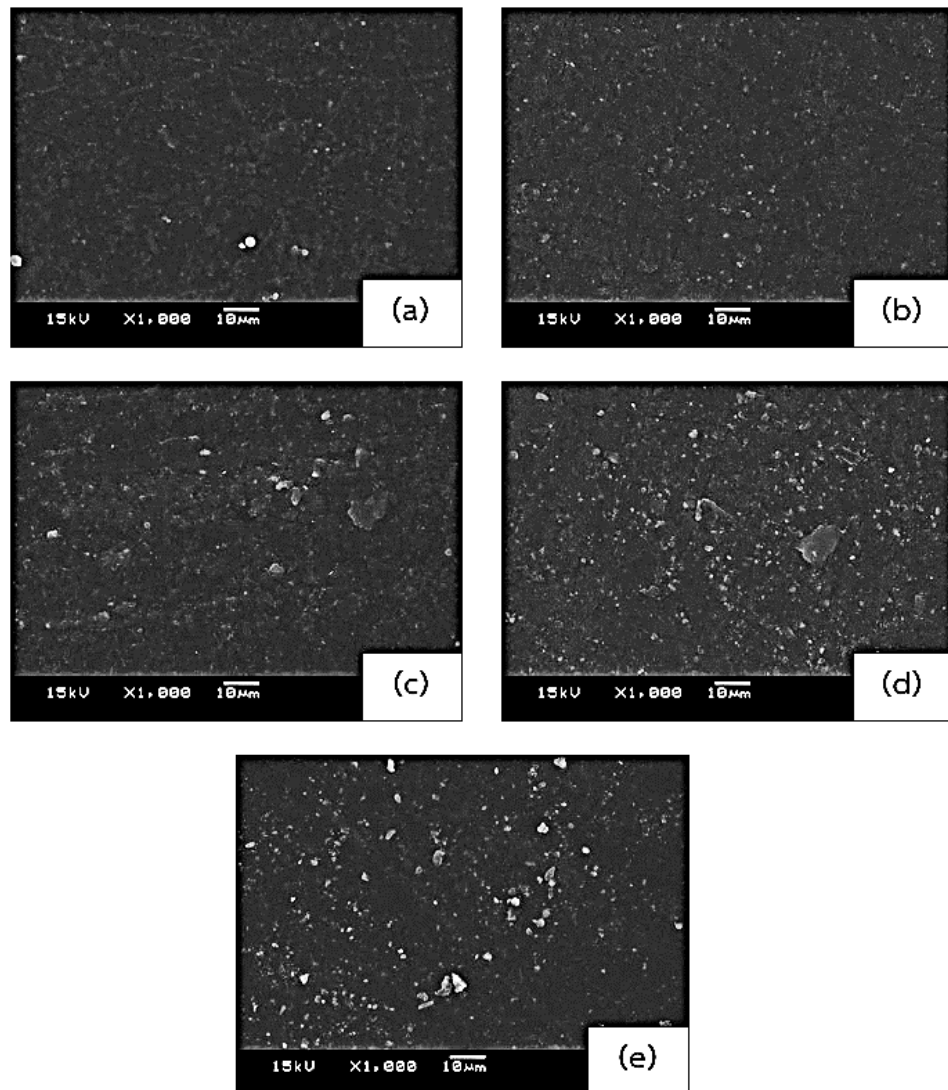
รูปที่ 4.7 กราฟการคงรูปของยางวัลคาไนซ์และยางวัลคาไนซ์

4.10 ผลของสมบัติเชิงกลและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของยางธรรมชาติวัลคาไนซ์และรีวัลคาไนซ์

หลังจากนั้นนำยางที่ได้จากการขึ้นรูปที่ระยะเวลาการวัลคาไนซ์ที่เหมาะสม (t_{c90}) ของแต่ละสูตรยางตามตารางที่ 3.4 มาทดสอบสมบัติเชิงกล ได้แก่ ค่าทนแรงดึงสูงสุด (tensile strength) ระยะเวลายืดที่จุดขาด (elongation at break) และความแข็ง (hardness) ของยางวัลคาไนซ์และยางรีวัลคาไนซ์ที่อัตราส่วนต่าง ๆ ดังแสดงในรูปที่ 4.8 พบว่ายางรีวัลคาไนซ์มีค่าทนแรงดึงสูงสุดและระยะเวลายืดที่จุดขาดต่ำกว่ายางวัลคาไนซ์ เมื่อผสมยางดีวัลคาไนซ์ในอัตราส่วนต่าง ๆ พบว่าค่าทนแรงดึงสูงสุดและค่าความแข็งมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ในขณะที่ค่าของระยะเวลายืดที่จุดขาดมีการเปลี่ยนแปลงที่ไม่แตกต่างกันมากนัก แต่อย่างไรก็ตามค่าทนแรงดึงสูงสุดจะลดลง เมื่อสัดส่วนในการผสมของยางดีวัลคาไนซ์เพิ่มขึ้นในสัดส่วน 80:20 (RV4) ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องมาจากการกระจายตัวของยางดีวัลคาไนซ์ในยางธรรมชาติบริสุทธิ์เกิดการเกาะกลุ่มกัน (aggregate) เพิ่มขึ้น ส่งผลให้สมบัติเชิงกลด้อยลง ดังแสดงในรูปที่ 4.9 แต่อย่างไรก็ตาม พบว่า การเติมยางดีวัลคาไนซ์ส่งผลให้ค่าความแข็งของยางรีวัลคาไนซ์เพิ่มขึ้น ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องมาจากการเติมส่วนที่แข็ง (hard segment) ของยางดีวัลคาไนซ์ลงไปในส่วนที่อ่อน (soft segment) ของยางธรรมชาติบริสุทธิ์ [11, 49] จากข้อมูลข้างต้นสามารถสรุปได้ว่ายางดีวัลคาไนซ์ที่เตรียมได้สามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบผสมกับยางธรรมชาติบริสุทธิ์ในกระบวนการขึ้นรูป เพื่อลดปริมาณของยางบริสุทธิ์ลงทำให้ลดต้นทุนในกระบวนการผลิตได้



รูปที่ 4.8 สมบัติเชิงกลของยางวัลคาไนซ์และยางรีวัลคาไนซ์ (a) ค่าทนแรงดึงสูงสุด (b) ระยะยืดที่จุดขาด (c) และค่าความแข็ง ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ยการทดลอง 5 ซ้ำ บาร์แสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน



รูปที่ 4.9 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพื้นผิวในยางวัลคาไนซ์และยางรีวัลคาไนซ์ (a) CV (b) RV1 (c) RV2 (d) RV3 และ (e) RV4

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

5.1 การตัดแยกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการสลายพันธะซัลเฟอร์

แบคทีเรียไอโซเลต LF3 ที่ตัดแยกได้จากกองถ่านหินจากเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี เมื่อนำมาบ่มที่พีเอช 7 อุณหภูมิห้อง ($30\pm 2^{\circ}\text{C}$) เป็นเวลา 7 วัน พบว่ามีประสิทธิภาพในการสลายพันธะซัลเฟอร์ใน DBT เท่ากับ $88.1\pm 0.1\%$ จากนั้นนำแบคทีเรียไอโซเลต LF3 ไปจัดจำแนกสายพันธุ์ด้วยเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล พบว่า มีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายกับ *Bacillus cereus* 5 สายพันธุ์ เท่ากับ 94% ดังนั้นสามารถจัดจำแนกแบคทีเรียไอโซเลต LF3 อยู่ในสายพันธุ์ *B. cereus*

5.2 ผลของการดิวัลคาโนเซชันด้วย *B. cereus*

B. cereus สามารถย่อยสลายพันธะซัลเฟอร์ในยางสูตร CV โดยให้ค่าการลดลงของปริมาณซัลเฟอร์สูงที่สุดเท่ากับ 26.7 ± 0.2 เมื่อบ่มที่พีเอช 7 อุณหภูมิห้อง ($30\pm 2^{\circ}\text{C}$) เป็นเวลา 20 วัน และพบการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีของยางหลังกระบวนการดิวัลคาโนเซชันด้วยเทคนิค XPS และ FTIR ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับวิธี 4S ในกระบวนการเมตาบอลิซึมของแบคทีเรีย จากนั้นทดสอบผลของขนาดอนุภาคยางพบว่า *B. cereus* สามารถดิวัลคาโนเซชันที่มีขนาดเล็ก (0.3-0.4 มิลลิเมตร) ได้ดีกว่าขนาดใหญ่ (2.0-2.7 มิลลิเมตร) และจากหาภาวะที่เหมาะสมในกระบวนการดิวัลคาโนเซชัน พบว่าที่พีเอช 5 อุณหภูมิห้อง ($30\pm 2^{\circ}\text{C}$) ให้ค่าการลดลงของปริมาณซัลเฟอร์สูงที่สุดกับ $64.3\pm 0.1\%$ นำยาง GTR มาบ่มร่วมกับ *B. cereus* ที่ภาวะที่เหมาะสม พบว่าให้ค่าการลดลงของปริมาณซัลเฟอร์เท่ากับ $40.2\pm 0.2\%$ สุดท้ายนำยางดิวัลคาโนเซชันที่ได้ไปผสมกับยางบริสุทธิ์ที่อัตราส่วนต่าง ๆ พบว่าเมื่อผสมยางดิวัลคาโนเซชันเพิ่มขึ้นทำให้ลดเวลาในกระบวนการรีวัลคาโนเซชัน และเมื่อนำไปทดสอบสมบัติเชิงกลพบว่าเมื่อผสมยางดิวัลคาโนเซชันในอัตราส่วน 80:20 ส่งผลให้สมบัติเชิงกลของยางรีวัลคาโนเซชันแตกต่างจากยางวัลคาโนเซชันเพียง 10%

5.3 ข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อกระบวนการดิวัลคาโนเซชัน อาจจำเป็นต้องศึกษาปัจจัยอื่นเพิ่มเติม ดังนี้

- 1) ชนิดของยาง ได้แก่ กลุ่มยางสังเคราะห์ เนื่องจากมีโครงสร้างที่แตกต่างจากยางธรรมชาติซึ่งอาจส่งผลต่อการทำปฏิกิริยาจากเอนไซม์ของแบคทีเรียและการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในยางแต่ละชนิด

- 2) การหาปริมาณที่เหมาะสมของยางในกระบวนการดีวัลคาไนเซชัน เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการดีวัลคาไนซ์ของแบคทีเรียและให้ได้ปริมาณยางดีวัลคาไนซ์ที่เหมาะสมและมากที่สุดหลังจากกระบวนการดีวัลคาไนเซชัน
- 3) การหาปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรียตั้งต้นที่พอเหมาะ จากร้อยละ 5 เป็นร้อยละ 10 หรือ 15 โดยปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งอาจช่วยลดเวลาในกระบวนการดีวัลคาไนเซชันให้สั้นลงและเพิ่มประสิทธิภาพการดีวัลคาไนซ์ของแบคทีเรียให้ดียิ่งขึ้น



บรรณานุกรม

- [1] Coran, A.Y. Chapter 7 - Vulcanization. in The Science and Technology of Rubber (Fourth Edition), pp. 337-381. Boston: Academic Press, 2013.
- [2] Adhikari, B., De, D., and Maiti, S. Reclamation and recycling of waste rubber. Progress in Polymer Science 25(7) (2000): 909-948.
- [3] Mangili, I., et al. Mechanical and rheological properties of natural rubber compounds containing devulcanized ground tire rubber from several methods. Polymer Degradation and Stability 121 (2015): 369-377.
- [4] Asaro, L., Gratton, M., Seghar, S., and Ait Hocine, N. Recycling of rubber wastes by devulcanization. Resources, Conservation and Recycling 133 (2018): 250-262.
- [5] Aoudia, K., Azem, S., Ait Hocine, N., Gratton, M., Pettarin, V., and Seghar, S. Recycling of waste tire rubber: Microwave devulcanization and incorporation in a thermoset resin. Waste Management 60 (2017): 471-481.
- [6] Cui, X., Zhao, S., and Wang, B. Microbial desulfurization for ground tire rubber by mixed consortium-Sphingomonas sp. and Gordonia sp. Polymer Degradation and Stability 128 (2016): 165-171.
- [7] de Sousa, F.D.B., Scuracchio, C.H., Hu, G.-H., and Hoppe, S. Devulcanization of waste tire rubber by microwaves. Polymer Degradation and Stability 138 (2017): 169-181.
- [8] Ghorai, S., Bhunia, S., Roy, M., and De, D. Mechanochemical devulcanization of natural rubber vulcanizate by dual function disulfide chemicals. Polymer Degradation and Stability 129 (2016): 34-46.
- [9] Hu, M., Zhao, S., Li, C., Wang, B., Fu, Y., and Wang, Y. Biodesulfurization of vulcanized rubber by enzymes induced from Gordonia amicalisa. Polymer Degradation and Stability 128 (2016): 8-14.
- [10] Hu, M., Zhao, S., Li, C., Wang, B., Yao, C., and Wang, Y. The influence of different Tween surfactants on biodesulfurization of ground tire rubber by Sphingomonas sp. Polymer Degradation and Stability 107 (2014): 91-97.
- [11] Li, Y., Zhao, S., and Wang, Y. Microbial desulfurization of ground tire rubber by

- Thiobacillus ferrooxidans. Polymer Degradation and Stability 96(9) (2011): 1662-1668.
- [12] Novotny, D.S., Marsh, R.L., Masters, F.C., and Tally, D.N. Microwave devulcanization of rubber. 1978, Google Patents.
- [13] Phinyocheep, P. 3 - Chemical modification of natural rubber (NR) for improved performance. in Chemistry, Manufacture and Applications of Natural Rubber, pp. 68-118: Woodhead Publishing, 2014.
- [14] Chou, L.-H., Yang, C.-K., Lee, M.-T., and Shu, C.-C. Effects of partial oxidation of crumb rubber on properties of rubberized mortar. Composites Part B: Engineering 41(8) (2010): 613-616.
- [15] Cornish, K. 1 - Biosynthesis of natural rubber (NR) in different rubber-producing species. in Chemistry, Manufacture and Applications of Natural Rubber, pp. 3-29: Woodhead Publishing, 2014.
- [16] Erman, B. and Mark, J.E. Chapter 4 - The Molecular Basis of Rubberlike Elasticity. in The Science and Technology of Rubber (Fourth Edition), pp. 167-192. Boston: Academic Press, 2013.
- [17] Grady, B.P., Cooper, S.L., and Robertson, C.G. Chapter 1 3 - Thermoplastic Elastomers. in The Science and Technology of Rubber (Fourth Edition), pp. 591-652. Boston: Academic Press, 2013.
- [18] Nunes, R.C.R. 1 0 - Natural rubber (NR) composites using cellulosic fiber reinforcements. in Chemistry, Manufacture and Applications of Natural Rubber, pp. 284-302: Woodhead Publishing, 2014.
- [19] Palosuo, T. 1 8 - Recent research on natural rubber latex (NRL) allergy. in Chemistry, Manufacture and Applications of Natural Rubber, pp. 4 5 2 -4 8 2 : Woodhead Publishing, 2014.
- [20] Puskas, J.E., Chiang, K., and Barkakaty, B. 2 - Natural rubber (NR) biosynthesis: perspectives from polymer chemistry. in Chemistry, Manufacture and Applications of Natural Rubber, pp. 30-67: Woodhead Publishing, 2014.
- [21] Rodgers, B. and Waddell, W. Chapter 14 - Tire Engineering. in The Science and Technology of Rubber (Fourth Edition), pp. 6 5 3-6 9 5. Boston: Academic Press, 2013.

- [22] Hirata, Y., Kondo, H., and Ozawa, Y. Natural rubber (NR) for the tyre industry. in Chemistry, Manufacture and Applications of Natural Rubber, pp. 325-352: Elsevier, 2014.
- [23] Kohjiya, S. 15 - Improving the sustainable development of natural rubber (NR). in Chemistry, Manufacture and Applications of Natural Rubber, pp. 385-394: Woodhead Publishing, 2014.
- [24] Ngai, K.L., Capaccioli, S., and Plazek, D.J. Chapter 5 - The Viscoelastic Behavior of Rubber and Dynamics of Blends. in The Science and Technology of Rubber (Fourth Edition), pp. 193-284. Boston: Academic Press, 2013.
- [25] Sheehan, C.J. and Bisio, A.L. Polymer/Solvent Interaction Parameters. Rubber Chemistry and Technology 39(1) (1966): 149-192.
- [26] Zhang, Z., Zhang, L., Li, Y., and Xu, H. New fabricate of styrene-butadiene rubber/montmorillonite nanocomposites by anionic polymerization. Polymer 46(1) (2005): 129-136.
- [27] Datta, S. Chapter 12 - Elastomer Blends. in The Science and Technology of Rubber (Fourth Edition), pp. 547-589. Boston: Academic Press, 2013.
- [28] Gent, A.N. Chapter 1 - Rubber Elasticity: Basic Concepts and Behavior. in The Science and Technology of Rubber (Fourth Edition), pp. 1-26. Boston: Academic Press, 2013.
- [29] Gent, A.N. and Mars, W.V. Chapter 10 - Strength of Elastomers. in The Science and Technology of Rubber (Fourth Edition), pp. 473-516. Boston: Academic Press, 2013.
- [30] Sinn, H. and Kaminsky, W. Ziegler-Natta catalysis. in Advances in Organometallic Chemistry, pp. 99-149: Elsevier, 1980.
- [31] Gregg Jr, E. and Macey, J. The relationship of properties of synthetic poly (isoprene) and natural rubber in the factory. The effect of non-rubber constituents of natural rubber. Rubber Chemistry and Technology 46(1) (1973): 47-66.
- [32] Kawabata, S., Matsuda, M., Tei, K., and Kawai, H. Experimental survey of the strain energy density function of isoprene rubber vulcanizate. Macromolecules 14(1) (1981): 154-162.

- [33] Lattime, R.R. Styrene-Butadiene Rubber. Van Nostrand's Encyclopedia of Chemistry (2005).
- [34] Brydson, J. Styrene-Butadiene Rubber. in Developments in Rubber Technology—2, pp. 21-49: Springer, 1981.
- [35] Zhang, L., Wang, Y., Wang, Y., Sui, Y., and Yu, D. Morphology and mechanical properties of clay/styrene-butadiene rubber nanocomposites. Journal of Applied Polymer Science 78(11) (2000): 1873-1878.
- [36] Donnet, J.-B. and Custodero, E. Chapter 8 - Reinforcement of Elastomers by Particulate Fillers. in The Science and Technology of Rubber (Fourth Edition), pp. 383-416. Boston: Academic Press, 2013.
- [37] White, W.C. Butadiene production process overview. Chemico-biological interactions 166(1-3) (2007): 10-14.
- [38] Nasir, M. and Choo, C. Cure characteristics and mechanical properties of carbon black filled styrene-butadiene rubber and epoxidized natural rubber blends. European polymer journal 25(4) (1989): 355-359.
- [39] Chakraborty, S., Bandyopadhyay, S., Ameta, R., Mukhopadhyay, R., and Deuri, A. Application of FTIR in characterization of acrylonitrile-butadiene rubber (nitrile rubber). Polymer Testing 26(1) (2007): 38-41.
- [40] Joseph, R., Alex, R., Vinod, V., Premalatha, C., and Kuriakose, B. Studies on epoxidized rubber seed oil as plasticizer for acrylonitrile butadiene rubber. Journal of applied polymer science 89(3) (2003): 668-673.
- [41] Davis, S. Ethylene-Propylene Copolymer. Patent Number EP 0374695 (1990).
- [42] Carman, C., Harrington, R., and Wilkes, C. Monomer sequence distribution in ethylene-propylene rubber measured by ^{13}C NMR. 3. Use of reaction probability model. Macromolecules 10(3) (1977): 536-544.
- [43] Gatos, K.G., Thomann, R., and Karger-Kocsis, J. Characteristics of ethylene propylene diene monomer rubber/organoclay nanocomposites resulting from different processing conditions and formulations. Polymer International 53(8) (2004): 1191-1197.
- [44] Ismail, H., Pasbakhsh, P., Fauzi, M.A., and Bakar, A.A. Morphological, thermal and

- tensile properties of halloysite nanotubes filled ethylene propylene diene monomer (EPDM) nanocomposites. Polymer Testing 27(7) (2008): 841-850.
- [45] Sienkiewicz, M., Kucinska-Lipka, J., Janik, H., and Balas, A. Progress in used tyres management in the European Union: A review. Waste Management 32(10) (2012): 1742-1751.
- [46] Yehia, A.A. Recycling of Rubber Waste. Polymer-Plastics Technology and Engineering 43(6) (2004): 1735-1754.
- [47] Ikeda, Y. 17 - Recycling of sulfur cross-linked natural rubber (NR) using supercritical carbon dioxide. in Chemistry, Manufacture and Applications of Natural Rubber, pp. 436-451: Woodhead Publishing, 2014.
- [48] Isayev, A.I. Chapter 15 - Recycling of Rubbers. in The Science and Technology of Rubber (Fourth Edition), pp. 697-764. Boston: Academic Press, 2013.
- [49] Zedler, Ł., Przybysz, M., Klein, M., Saeb, M.R., and Formela, K. Processing, physico-mechanical and thermal properties of reclaimed GTR and NBR/reclaimed GTR blends as function of various additives. Polymer Degradation and Stability 143 (2017): 186-195.
- [50] De, D., Das, A., De, D., Dey, B., Debnath, S.C., and Roy, B.C. Reclaiming of ground rubber tire (GRT) by a novel reclaiming agent. European Polymer Journal 42(4) (2006): 917-927.
- [51] De, D., Maiti, S., and Adhikari, B. Reclaiming of rubber by a renewable resource material (RRM). III. Evaluation of properties of NR reclaim. Journal of applied polymer science 75(12) (2000): 1493-1502.
- [52] De, D., Panda, P.K., Roy, M., and Bhunia, S. Reinforcing effect of reclaim rubber on natural rubber/polybutadiene rubber blends. Materials & Design 46 (2013): 142-150.
- [53] Ikeda, Y. 4 - Understanding network control by vulcanization for sulfur cross-linked natural rubber (NR). in Chemistry, Manufacture and Applications of Natural Rubber, pp. 119-134: Woodhead Publishing, 2014.
- [54] Rodgers, B. and Waddell, W. Chapter 9 - The Science of Rubber Compounding. in The Science and Technology of Rubber (Fourth Edition), pp. 417-471. Boston: Academic Press, 2013.

- [55] Halasa, A.F., Massie, J.M., and Ceresa, R.J. Chapter 1 1 - The Chemical Modification of Polymers. in The Science and Technology of Rubber (Fourth Edition), pp. 517-546. Boston: Academic Press, 2013.
- [56] Quirk, R.P. and Pickel, D.L. Chapter 2 - Polymerization: Elastomer Synthesis. in The Science and Technology of Rubber (Fourth Edition), pp. 27-113. Boston: Academic Press, 2013.
- [57] Saville, B. and Watson, A.A. Structural Characterization of Sulfur-Vulcanized Rubber Networks. Rubber Chemistry and Technology 40(1) (1967): 100-148.
- [58] Roland, C.M. Chapter 3 - Structure Characterization in the Science and Technology of Elastomers. in The Science and Technology of Rubber (Fourth Edition), pp. 115-166. Boston: Academic Press, 2013.
- [59] Isayev, A.I., Yushanov, S.P., Kim, S.-H., and Levin, V.Y. Ultrasonic devulcanization of waste rubbers: Experimentation and modeling. Rheologica acta 35(6) (1996): 616-630.
- [60] Hirayama, D. and Saron, C. Chemical modifications in styrene-butadiene rubber after microwave devulcanization. Industrial & Engineering Chemistry Research 51(10) (2012): 3975-3980.
- [61] Mangili, I., Lasagni, M., Huang, K., and Isayev, A.I. Modeling and optimization of ultrasonic devulcanization using the response surface methodology based on central composite face-centered design. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems 144 (2015): 1-10.
- [62] Si, H., Chen, T., and Zhang, Y. Effects of high shear stress on the devulcanization of ground tire rubber in a twin-screw extruder. Journal of Applied Polymer Science 128(4) (2013): 2307-2318.
- [63] Joseph, A.M., George, B., N., M.K., and Alex, R. EFFECT OF DEVULCANIZATION ON CROSSLINK DENSITY AND CROSSLINK DISTRIBUTION OF CARBON BLACK FILLED NATURAL RUBBER VULCANIZATES. Rubber Chemistry and Technology 89 (4) (2016): 653-670.
- [64] Sabzekar, M., Chenar, M.P., Mortazavi, S.M., Kariminejad, M., Asadi, S., and Zohuri, G. Influence of process variables on chemical devulcanization of sulfur-cured natural rubber. Polymer Degradation and Stability 118 (2015): 88-95.

- [65] Thaicharoen, P., Thamyongkit, P., and Poompradub, S. Thiosalicylic acid as a devulcanizing agent for mechano-chemical devulcanization. Vol. 27, 2010.
- [66] Yamashita, S., Kawabata, N., Sagan, S., and Hayashi, K. Reclamation of vulcanized rubbers by chemical degradation. V. Degradation of vulcanized synthetic isoprene rubber by the phenylhydrazine–ferrous chloride system. Journal of Applied polymer science 21(8) (1977): 2201-2209.
- [67] Larkin, M.J., Kulakov, L.A., and Allen, C.C. Biodegradation by members of the genus *Rhodococcus*: biochemistry, physiology, and genetic adaptation. Advances in applied microbiology 59 (2006): 1-29.
- [68] Chen, H., Cai, Y.-B., Zhang, W.-J., and Li, W. Methoxylation pathway in biodesulfurization of model organosulfur compounds with *Mycobacterium* sp. Bioresource Technology 100(6) (2009): 2085-2087.
- [69] Mohebali, G. and Ball, A.S. Biodesulfurization of diesel fuels – Past, present and future perspectives. International Biodeterioration & Biodegradation 110 (2016): 163-180.
- [70] Su, T., et al. Structural and Biochemical Characterization of BdsA from *Bacillus subtilis* WU-S2B, a Key Enzyme in the “4S” Desulfurization Pathway. Frontiers in Microbiology 9(231) (2018).
- [71] Yao, C., Zhao, S., Wang, Y., Wang, B., Wei, M., and Hu, M. Microbial desulfurization of waste latex rubber with *Alicyclobacillus* sp. Polymer Degradation and Stability 98(9) (2013): 1724-1730.
- [72] Steinbuchel, A., Romine, R.A., and Romine, M.F. Biodegradable polymers and macromolecules rubbercycle: A bioprocess for surface modification of waste tyre rubber. Polymer Degradation and Stability 59(1) (1998): 353-358.
- [73] Sato, S., et al. Microbial scission of sulfide linkages in vulcanized natural rubber by a white rot basidiomycete, *ceriporiopsis s ubvermispora*. Biomacromolecules 5(2) (2004): 511-515.
- [74] Ghavipankeh, F., Rad, Z.Z., and Pazouki, M. Devulcanization of Ground Tires by Different Strains of Bacteria: Optimization of Culture Condition by Taguchi Method. Journal of Polymers and the Environment (2018): 1-8.
- [75] Tatangelo, V., et al. Biological devulcanization of ground natural rubber by

- Gordonia desulfuricans DSM 4 4 4 6 2 T strain. Applied microbiology and biotechnology 100(20) (2016): 8931-8942.
- [76] Davoodi-Dehaghani, F., Vosoughi, M., and Ziaee, A.A. Biodesulfurization of dibenzothiophene by a newly isolated Rhodococcus erythropolis strain. Bioresource Technology 101(3) (2010): 1102-1105.
- [77] Turner, S., Pryer, K.M., Miao, V.P., and Palmer, J.D. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis 1. Journal of Eukaryotic Microbiology 46(4) (1999): 327-338.
- [78] Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., and Lane, D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. Journal of bacteriology 173(2) (1991): 697-703.
- [79] Thaicharoen, P., Thamyongkit, P., and Poompradub, S. Thiosalicylic acid as a devulcanizing agent for mechano-chemical devulcanization. Korean Journal of Chemical Engineering 27(4) (2010): 1177-1183.
- [80] Flory, P.J. and Rehner Jr, J. Statistical mechanics of cross-linked polymer networks I. Rubberlike elasticity. The journal of chemical physics 11(11) (1943): 512-520.
- [81] Sheehan, C. and Bisio, A. Polymer/solvent interaction parameters. Rubber Chemistry and Technology 39(1) (1966): 149-192.
- [82] Chongcharoenchaikul, T., Thamyongkit, P., and Poompradub, S. Synthesis, characterization and properties of a bio-based poly (glycerol azelate) polyester. Materials Chemistry and Physics 177 (2016): 485-495.
- [83] Jana, G. and Das, C. Recycling natural rubber vulcanizates through mechanochemical devulcanization. Macromolecular research 13(1) (2005): 30-38.
- [84] Romine, R.A. and Romine, M.F. Rubbercycle: a bioprocess for surface modification of waste tyre rubber. Polymer degradation and stability 59(1-3) (1998): 353-358.
- [85] Watkins, L., et al. Purification and characterization of the aromatic desulfinase,

- 2-(2'-hydroxyphenyl) benzenesulfinate desulfinate. Archives of biochemistry and biophysics 415(1) (2003): 14-23.
- [86] Konishi, J., Onaka, T., Ishii, Y., and Suzuki, M. Demonstration of the carbon-sulfur bond targeted desulfurization of benzothiophene by thermophilic *Paenibacillus* sp. strain A11-2 capable of desulfurizing dibenzothiophene. FEMS microbiology letters 187(2) (2000): 151-154.



ภาคผนวก

1. การคำนวณปริมาณซัลเฟอร์ด้วยเทคนิคบอมบ์แคลอรีเมทรี

$$\text{เปอร์เซ็นต์ของซัลเฟอร์ในสารตัวอย่าง} = \frac{(A-B) \times 13.738}{C}$$

A คือ น้ำหนักตะกอน BaSO_4 ได้จากตัวอย่าง

B คือ น้ำหนักตะกอน BaSO_4 ของชุดควบคุม

C คือ น้ำหนักของสารตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์

ตัวอย่าง 1. น้ำหนักของยางที่ใช้ในการวิเคราะห์ 0.8539 กรัม หลังจากไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคบอมบ์แคลอรีเมทรี และเปลี่ยนรูปซัลเฟอร์ให้อยู่ในรูปตะกอน BaSO_4 พบว่ามีน้ำหนักตะกอน BaSO_4 ที่ได้มีค่าเท่ากับ 0.1650 กรัม โดยน้ำหนักตะกอน BaSO_4 ของชุดควบคุมมีค่าเท่ากับ 0.0005 กรัม

$$\text{เปอร์เซ็นต์ของซัลเฟอร์ในสารตัวอย่าง} = \frac{(0.1650 - 0.0005) \times 13.738}{0.8539}$$

ดังนั้น เปอร์เซ็นต์ของซัลเฟอร์ในสารตัวอย่าง มีค่าเท่ากับ 2.65%

2. สารละลายบัฟเฟอร์ TBE

2.1 เตรียมสารละลาย 0.5 โมลาร์ EDTA

- 1) ชั่งน้ำหนัก EDTA 93.05 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร
- 2) ปรับพีเอชของสารละลายด้วยสารละลาย NaOH จนพีเอชของสารละลายมีค่าเท่ากับ 8
- 3) ปรับปริมาตรของสารละลายจนมีปริมาตร 500 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

2.2 เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ 10X TBE

- 1) ชั่งน้ำหนัก Tris base 108 กรัม และ boric acid 55 กรัม แล้วทำการละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร
- 2) เติมสารละลาย 0.5 โมลาร์ Na_2EDTA ที่เตรียมได้จากข้อที่ 4.1 ปริมาตร 40 มิลลิลิตรลงในสารละลายผสม
- 3) ปรับปริมาตรของสารละลายจนได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

3. ชุดปฏิกิริยาสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ 16S rRNA ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ รายละเอียดดังนี้

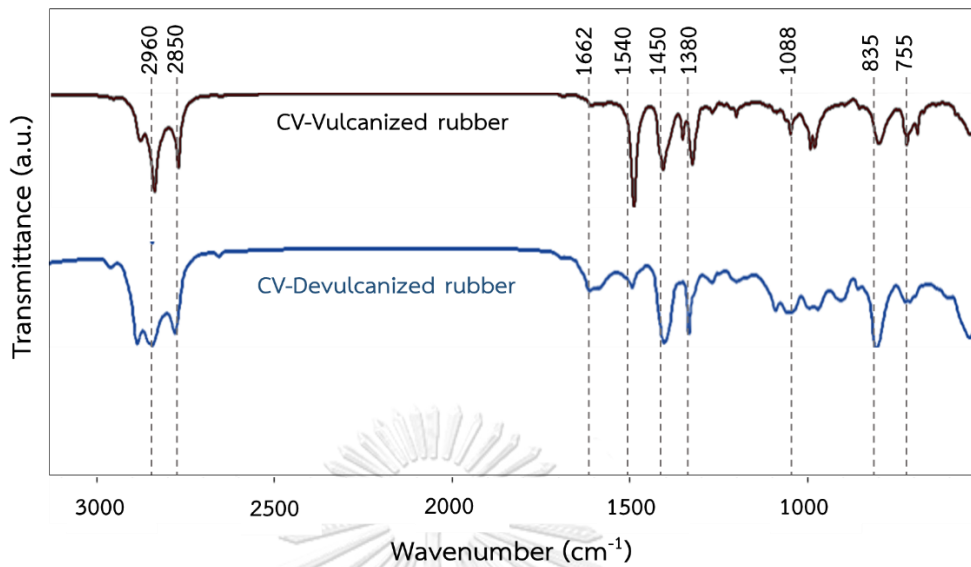
-ddH ₂ O	28.5	ไมโครลิตร
-10X PCR buffer with Mg ²⁺	5.0	ไมโครลิตร
-Primer 27F (10 พิโคโมลต่อไมโครลิตร)	5.0	ไมโครลิตร
-Primer 1492R (10 พิโคโมลต่อไมโครลิตร)	5.0	ไมโครลิตร
-dNTPs (50 มิลลิโมลาร์)	1.0	ไมโครลิตร
-DNA template	0.5	ไมโครลิตร
-Tag polymerase (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	<u>0.5</u>	ไมโครลิตร
รวม	<u>50.0</u>	ไมโครลิตร

4. ภาวะของปฏิกิริยาอุณหภูมิพอลิเมอร์เรสที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ 16S rRNA

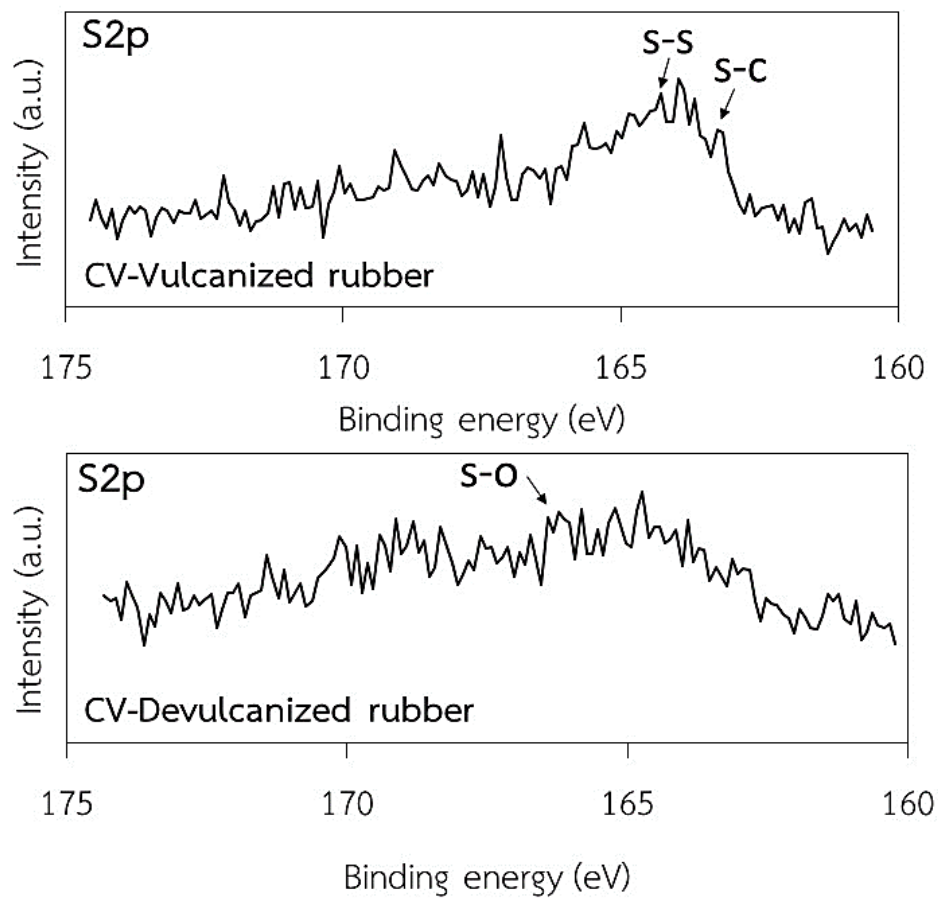
Reaction	Temperature (°C)	Time (min)
Initial denaturation	94	3
Denaturation	94	1
Annealing	55	1
Extension	72	2
Final extension	72	15



5. สเปกตรัม FTIR ของยางธรรมชาติวัลคาไนซ์สูตร CV ก่อน-หลังกระบวนการตีวัลคาไนเซชัน



6. สเปกตรัม XPS ของยางธรรมชาติวัลคาไนซ์สูตร CV ก่อน-หลังกระบวนการตีวัลคาไนเซชัน



ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	เบญจา แก้วเพชร
วัน เดือน ปี เกิด	16 กุมภาพันธ์ 2534
สถานที่เกิด	นราธิวาส
วุฒิการศึกษา	พ.ศ.2552 มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนเตรียมอุดมศึกษาภาคใต้ พ.ศ.2555 วิทยาศาสตร์บัณฑิต (วท.บ.) สาขาวิชาพันธุศาสตร์ (เกียรตินิยมอันดับ 2) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ที่อยู่ปัจจุบัน	25 หมู่ 1 ตำบลบ้านควนมุด อำเภอจุฬาภรณ์ จังหวัดนครศรีธรรมราช
ผลงานตีพิมพ์	Kaewpetch, B.; Prasongsuk, S.; Poompradub S. "Screening of desulfurized microbes from sulfur-contaminated soil in Thailand". Proceedings of the 29th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference, Bangkok, Thailand, November 23-25, 2017.
รางวัลที่ได้รับ	-