

บทที่ 4

วิจารณ์และสรุปผลงานวิจัย

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพของ PHA ที่ผลิตได้จาก *Alcaligenes* sp. A-04 ด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสในภาวะปลอดเชื้อและการย่อยสลายทางชีวภาพในดินในภาวะที่มีอากาศ โดยศึกษาผลขององค์ประกอบของพอลิเมอร์ อุณหภูมิ และแหล่งจุลินทรีย์ที่ต่างกันต่อการย่อยสลายทางชีวภาพ มีขั้นตอนการดำเนินงานวิจัยคือ ทำการผลิต PHA ที่มีองค์ประกอบต่างๆ กันจาก *Alcaligenes* sp. A-04 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร สกัดแยกและทำให้บริสุทธิ์แล้วเก็บรวบรวมให้ได้ในปริมาณมากเพื่อนำไปใช้ทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพ ตรวจสอบลักษณะและองค์ประกอบของพอลิเมอร์ที่ผลิตได้ นำมาเตรียมเป็นชิ้นตัวอย่างเพื่อใช้ในการทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ปลอดเชื้อ และการย่อยสลายทางชีวภาพในแหล่งจุลินทรีย์ต่างกัน 5 ชนิด โดยศึกษาการย่อยสลายที่อุณหภูมิต่างกัน 3 อุณหภูมิคือ 30 40 และ 55 °C ขั้นตอนสุดท้ายคือการตรวจสอบลักษณะที่เปลี่ยนแปลงของพอลิเมอร์ภายหลังการย่อยสลายทางชีวภาพ จากการทดลองสรุปผลได้ดังนี้

4.1 การผลิต PHA ที่มีองค์ประกอบของโมโนเมอร์แตกต่างกันโดย *Alcaligenes* sp. A-04

เมื่อทำการเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 ในอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 12 กรัม (น้ำหนักเซลล์เปียก) ต่อลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิต PHA ที่มีกรดบิวทีริก กรดวาเลอริก และไซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทีเรตเป็นแหล่งคาร์บอนผสมความเข้มข้นรวม 20 กรัมต่อลิตร ทำการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C โดยให้อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.8 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที ควบคุมพีเอชเท่ากับ 7.0 ± 0.5 เป็นเวลา 60 ชั่วโมง พบว่าเมื่อให้แหล่งคาร์บอนเป็นกรดบิวทีริกเพียงชนิดเดียว เชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 มีการเจริญและผลิต PHA ที่มี 3HB โมโนเมอร์เป็นองค์ประกอบ เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกรดบิวทีริกและกรดวาเลอริกในอัตราส่วน 2 ต่อ 3 เชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 จะใช้แหล่งคาร์บอนผสมในการผลิตโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-71%3HV) และใช้กรดบิวทีริกและไซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทีเรตในอัตราส่วน 3 ต่อ 1 เป็น

แหล่งคาร์บอนผสมในการผลิตโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-23%4HB) สำหรับกรดบิวทีริก กรดวาเลอริก และ โซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทีเรต เมื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนผสมในอัตราส่วน 2 ต่อ 1 ต่อ 2 โดย *Alcaligenes* sp. A-04 พบว่าสามารถผลิตเทอร์พอลิเมอร์ P(3HB-co-44%3HV-co-39%4HB) ได้ ซึ่งแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในงานวิจัยนี้ได้จากแนวทางการวิจัยของอัญชญา สุจริตขจร (2537) โดยมีรายงานการวิจัยที่ศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพของ PHA ที่มืองค์ประกอบของพอลิเมอร์ต่างกันที่ผลิตโดย *Alcaligenes eutrophus* สายพันธุ์ H16 (ATCC 17699) จากแหล่งคาร์บอนหลายชนิด เช่น งานวิจัยของ Doi (1990) Kunioka และ Doi (1990) Kazuya และคณะ (1995) และ Tomasi และคณะ (1996) ที่ผลิตโฮโมพอลิเมอร์ P(3HB) จากแหล่งคาร์บอนที่เป็นฟรักโทสหรือกรดบิวทีริก ผลิตโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) จากกรดบิวทีริกและกรดเพนทาโนอิก และผลิตโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-4HB) จากกรดบิวทีริกและกรด-4-ไฮดรอกซีบิวทีริก หรือ γ -บิวไทโรแลคโตน หรืองานวิจัยของ Mukai และคณะ (1994) ที่ผลิต P(3HB) จาก *A. eutrophus* โดยใช้กรดบิวทีริกเป็นแหล่งคาร์บอนและผลิต P(4HB) โดย *Comamonas acidovorans* โดยใช้ 1,4-บิวเทนไดออลเป็นแหล่งคาร์บอน นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่เลือกใช้ PHA สำเร็จรูปของบริษัท Aldrich Chemicals (Sato et al, 1994; Mitomo et al, 1994) หรือบริษัท Marlborough Biopolymers (ICI) ในนามของ 'BIOPOL' (Csomorova et al, 1994; Lauzier et al, 1994; McCarthy et al, 1994; Marchessault et al, 1994) เป็นต้น

4.2 การเตรียมตัวอย่าง PHA ที่ผลิตได้เพื่อทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพ

แผ่นฟิล์ม PHA ทั้ง 4 ชนิดที่ผลิตได้ เมื่อตรวจสอบชนิดและองค์ประกอบของพอลิเมอร์ด้วยเครื่อง GC แล้ว พบว่า PHA ทั้ง 4 ชนิดได้แก่ P(3HB) P(3HB-co-71%3HV) P(3HB-co-23%4HB) และ P(3HB-co-44%3HV-co-39%4HB) เมื่อนำมาแผ่เป็นแผ่นฟิล์มบนกระจกพื้นเรียบ ได้แผ่นฟิล์มพอลิเมอร์ที่มีลักษณะทางกายภาพที่แตกต่างกันคือ P(3HB) ฟิล์มมีลักษณะเป็นแผ่นฟิล์มสีขาวขุ่นและมีความเปราะ P(3HB-co-71%3HV) ฟิล์มมีลักษณะเป็นแผ่นฟิล์มสีขาวใสและมีความเหนียว P(3HB-co-23%4HB) ฟิล์มมีสีขาวขุ่น มีความเป็นมันวาว และมีความเหนียวมากกว่าแผ่นฟิล์ม P(3HB-co-71%3HV) และ P(3HB-co-44%3HV-co-39%4HB) ฟิล์มมีลักษณะโปร่งแสงแต่ไม่ใสและมีความเหนียว แผ่นฟิล์ม PHA ทั้ง 4 ชนิดต้องทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-3 สัปดาห์เพื่อให้พอลิเมอร์มีการจัดเรียงตัวอย่างสม่ำเสมอทั่วแผ่น แล้วจึงนำมาตัดเป็นขนาด 1x1 ซม. เพื่อใช้ทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ปลอดเชื้อ และตัดเป็นชิ้นขนาด 1

×2 ซม. เพื่อทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพในดิน ซึ่งพอลิเมอร์ทั้ง 2 ขนาดมีความหนาประมาณ 0.05 มม. และมีน้ำหนักเริ่มต้นตั้งแต่ 5-20 มก. ซึ่งการเลือกใช้ชิ้นตัวอย่างพอลิเมอร์ที่มีขนาด 1×1 ซม. และ 1×2 ซม. ได้จากการศึกษางานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PHA โดย Doi (1990) และ Adamus และคณะ (1995) ใช้ชิ้นตัวอย่างพอลิเมอร์ที่แผ่ในจานเลี้ยงเชื้อที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 12 มม. และมีความหนา 0.04-0.07 มม. และ 0.2-0.3 มม. ตามลำดับ ในการย่อยสลายด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.4 ที่อุณหภูมิ 70 °ซ งานวิจัยของ Ramsay และคณะ (1993) ใช้ชิ้นทดสอบของพอลิเมอร์ขนาด 2.5×1 ซม. และหนา 0.1 มม. ในการย่อยสลายด้วยเอ็นไซม์ P(3HB) ดีพอลิเมอร์ส ในงานวิจัยของ Mukai และคณะ (1994) Kanosawa และคณะ (1994) และ Kasuya และคณะ (1994) ใช้ชิ้นพอลิเมอร์ทดสอบเริ่มต้นขนาด 10×10×0.07 มม. หนัก 8.0 มก. ในการศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพของ PHA ด้วยเอ็นไซม์ P(3HB) ดีพอลิเมอร์ส Mitomo และคณะ (1994) ใช้ชิ้นตัวอย่างพอลิเมอร์ขนาด 10×10×0.1 มม. ที่มีน้ำหนักเริ่มต้น 10-15 มก. ในการศึกษาการย่อยสลายด้วยรังสีของ PHB และ P(3HB-co-3HV) และ Yue และคณะ (1996) ใช้ชิ้นพอลิเมอร์ทดสอบที่มีขนาด 2×2 ซม. และหนา 0.46 มม. ศึกษาการย่อยสลาย P(3HB-co-3HV) ในถังปฏิกิริยาเมื่อใช้กากตะกอนจากการบำบัดน้ำเสียเป็นแหล่งจุลินทรีย์

4.3 การย่อยสลายทางชีวภาพด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของ PHA ที่ผลิตได้ ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ปลอดเชื้อ

การย่อยสลายทางชีวภาพด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของพอลิเมอร์ในภาวะปลอดเชื้อจะเกิดขึ้นอย่างช้าๆ โดยมีการตัดสายพอลิเมอร์แบบสุ่มด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Doi, 1990) จากผลการวิจัยสรุปได้ว่า PHA ทั้ง 4 ชนิดที่ผลิตได้ ถูกย่อยสลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ปลอดเชื้อความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ พีเอช 7.4 ได้ โดยการย่อยสลายของ PHA ทั้ง 4 ชนิดเกิดขึ้นเป็น 2 ช่วงคือ ในช่วงแรกของการทดลอง (70-140 วัน) มีการลดลงของน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของพอลิเมอร์โดยน้ำหนักของพอลิเมอร์ไม่มีการเปลี่ยนแปลง นั่นคือค่า Mn ลดลง ในขณะที่ค่า Mw ไม่เปลี่ยนแปลง มีผลให้ค่า PDI เพิ่มขึ้น แต่หลังจากนั้นน้ำหนักของพอลิเมอร์ลดลงเป็นสัดส่วนกับเวลา โดยอัตราการลดลงแตกต่างกันตามชนิดของพอลิเมอร์และอุณหภูมิที่บ่ม และสรุปได้ว่า P(3HB-co-23%4HB) มีอัตราการย่อยสลายด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่ดีที่สุด รองลงมาคือ P(3HB-co-44%3HV-co-39%4HB) P(3HB) และ P(3HB-co-71%3HV) ตามลำดับ และ PHA ทุกชนิดมีอัตราการย่อยสลายที่สูงขึ้นเมื่อบ่มที่อุณหภูมิสูงขึ้น

จากงานวิจัยของ Doi และคณะ (1989-1990) ที่ศึกษาการย่อยสลายด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของ P(3HB) P(3HB-co-3HV) และ P(3HB-co-4HB) ที่มีองค์ประกอบของโมโนเมอร์แตกต่างกันในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ปลอดเชื้อความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ พีเอช 7.4 ที่อุณหภูมิ 37 °C และ 70 °C พบว่าให้ผลการทดลองบางส่วนสอดคล้องกับงานวิจัยนี้กล่าวคือ การย่อยสลายของ พอลิเมอร์ทั้ง 3 ชนิดที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 180 วัน น้ำหนักของพอลิเมอร์ไม่มีการเปลี่ยนแปลงแต่มีการลดลงของน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ โดยการย่อยสลายเกิดขึ้นเป็น 2 ช่วงคือ ในช่วงแรกไม่มีการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักโมเลกุลเป็นเวลา 98 วัน แต่หลังจากนั้น น้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ลดลงเป็นสัดส่วนกับเวลา อธิบายได้ว่า ในช่วงแรกโมเลกุลของน้ำ จะมีการซึมเข้าสู่โมเลกุลของพอลิเมอร์ทำให้แผ่นฟิล์มมีความหนาขึ้นโดยไม่มีกรย่อยสลาย หลังจากนั้นการย่อยสลายเกิดขึ้นจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสทำให้น้ำหนักโมเลกุลลดลง โดยการลดลงของน้ำหนักโมเลกุลและน้ำหนักของพอลิเมอร์ไม่มีความเกี่ยวข้องกัน ส่วนการย่อยสลายที่อุณหภูมิ 55 °C มีการลดลงของน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ที่อัตราการย่อยสลายที่ต่างกันและสรุปว่า อัตราการย่อยสลายของพอลิเมอร์ด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของพอลิเมอร์ และเรียงลำดับการย่อยสลายจากมากไปหาน้อยดังนี้ P(3HB-co-27%4HB) > P(3HB-co-17%4HB) > P(3HB-co-10%4HB) > P(3HB) > P(3HB-co-45%3HV) > P(3HB-co-71%3HV) ตามลำดับ และที่อุณหภูมิ 70 °C การย่อยสลายของ P(3HB-co-9%4HB) ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์จะเกิดได้ดีขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น และสรุปว่า อุณหภูมิที่สูงขึ้นช่วยเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายของพอลิเมอร์โดยน้ำหนักโมเลกุลลดลงอย่างรวดเร็วตามเวลาบ่มที่นานขึ้น และการมีโมโนเมอร์ของ 4HB ในโมเลกุลช่วยเร่งอัตราการย่อยสลายให้เร็วขึ้น Satoh และคณะ (1994) ได้ศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการถูกย่อยสลายกับความเป็นผลึกของพอลิเมอร์ 2 ชนิด คือ P(3HB) และ P(3HB-co-3HV) โดยการผสมแผ่นฟิล์มทั้ง 2 ชนิดเข้าด้วยกันได้แผ่นฟิล์มผสม P(3HB)/(3HB-co-3HV) และทำการบ่มในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.4 ที่อุณหภูมิ 50 °C พบว่าค่า T_m และ Δh_f ของแผ่นฟิล์มผสมมีค่าลดลงเมื่อปริมาณ P(3HB-co-3HV) เพิ่มขึ้น โดยอธิบายว่า P(3HB-co-3HV) ในแผ่นฟิล์มผสมทำให้ความเป็นผลึกลดลง และการย่อยสลายด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเป็นเวลา 180 วัน น้ำหนักเปียกของแผ่นฟิล์มพอลิเมอร์เพิ่มขึ้นจากการมีน้ำในโมเลกุล (hydration) และคงที่ในเวลาต่อมา ในขณะที่น้ำหนักแห้งของพอลิเมอร์มีค่าคงที่ในช่วง 80 วันแรกแต่หลังจากนั้นมีค่าลดลงตามเวลาที่บ่มจนสิ้นสุดการทดลอง การมีปริมาณ P(3HB) ในแผ่นฟิล์มผสมมากขึ้นทำให้มีการลดลงของน้ำหนักโมเลกุลที่เร็วขึ้น โดยค่า M_n มีค่าลดลงอย่างต่อเนื่องเกือบเป็นเส้นตรงเป็นสัดส่วนกับเวลาและมีค่า PDI เกือบคงที่ในทุกตัวอย่าง และสรุปว่าอัตราการย่อยสลายด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสขึ้นอยู่กับอัตราส่วนของพอลิเมอร์ที่ผสม

กันโดยปริมาณ P(3HB) ที่ลดลงในแผ่นฟิล์มผสมทำให้อัตราการย่อยสลายลดลงโดยเรียงลำดับการย่อยสลายจากมากไปหาน้อยดังนี้ $P(3HB) > P(3HB)/P(3HB-co-25\%3HV) > P(3HB)/P(3HB-co-50\%3HV) > P(3HB)/P(3HB-co-75\%3HV)$ นอกจากนี้ Mergaert และคณะ (1993) ที่ศึกษาการย่อยสลายด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของ P(3HB) และ P(3HB-co-10%3HV) ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ปลอดเชื้อความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ พีเอช 7.4 ที่อุณหภูมิ 4 15 28 40 และ 55 °ซ เป็นเวลา 98 วัน พบว่าน้ำหนักของพอลิเมอร์ไม่มีการเปลี่ยนแปลงตลอดการทดลองที่อุณหภูมิ 4-55 °ซ ในขณะที่น้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ที่อุณหภูมิ 4 15 และ 28 °ซ ไม่เปลี่ยนแปลง แต่มีค่าลดลงเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 40 และ 55 °ซ ซึ่งให้ผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยนี้และงานวิจัยของ Lauzier และคณะ (1994) และ Marchessault และคณะ (1994)

4.4 การย่อยสลายทางชีวภาพของ PHA ที่ผลิตได้ในดิน

PHA มีสมบัติที่สามารถถูกย่อยสลายได้ในธรรมชาติโดยจุลินทรีย์บางชนิดที่มีเอ็นไซม์เอสเทอเรสหรือดีพอลิเมอเรสในดิน กากตะกอนจากการบำบัดน้ำเสีย หรือในน้ำทะเลได้อย่างรวดเร็วภายใต้ภาวะที่เหมาะสม งานวิจัยนี้ได้ศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพของ PHA ที่ผลิตได้จาก *Alcaligenes* sp. A-04 ในแหล่งจุลินทรีย์ต่างกัน 5 ชนิดได้แก่ ดินจากการย่อยสลายขยะ ดินจากการเผาขยะ ปุ๋ยคอก ดินปลูก และกากตะกอนจากการบำบัดน้ำเสียที่อุณหภูมิต่างกัน ภายใต้ภาวะที่มีอากาศและควบคุมความชื้นสัมพัทธ์ในช่วง 30-80% ผลการทดลองสรุปได้ว่า การย่อยสลายของ P(3HB) และ P(3HB-co-71%3HV) ที่คิดจากอัตราการสูญพังของแผ่นฟิล์มเมื่อบ่มในแหล่งจุลินทรีย์ที่เป็นกากตะกอนจากการบำบัดน้ำเสียเกิดได้ดีที่สุด รองลงมาคือ ดินจากการเผาขยะ ปุ๋ยคอก ดินจากการย่อยสลายขยะ และดินปลูกตามลำดับ การย่อยสลายของแผ่นฟิล์ม P(3HB-co-23%4HB) เกิดได้ดีที่สุดในแหล่งจุลินทรีย์ที่เป็นกากตะกอนจากการบำบัดน้ำเสียเช่นกัน รองลงมาคือปุ๋ยคอก ดินจากการเผาขยะ ดินปลูก และดินจากการย่อยสลายขยะตามลำดับ และ P(3HB-co-44%3HV-co-39%4HB) ฟิล์มถูกย่อยสลายได้ดีที่สุดในแหล่งจุลินทรีย์ที่เป็นกากตะกอนจากการบำบัดน้ำเสีย รองลงมาคือปุ๋ยคอก ดินจากการเผาขยะ ดินจากการย่อยสลายขยะ และดินปลูกตามลำดับ โดยการบ่มที่อุณหภูมิสูงขึ้นช่วยเร่งอัตราการย่อยสลายของแผ่นฟิล์มให้เกิดขึ้นได้เร็วขึ้น

แนวทางในการศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพของงานวิจัยนี้ ได้จากการศึกษางานวิจัยของ Mergaert และคณะ (1993) ซึ่งศึกษาการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ของ P(3HB) และ P(3HB-co-10%3HV) ในดินต่างกัน 5 ชนิดในประเทศเบลเยียมได้แก่ ดินทราย (sandy soil) ดินเหนียว

(clay soil) ดินผสมปุ๋ย (loamy soil) ดินป่าไม้เนื้อแข็ง (hardwood forest soil) และดินป่าสน (pinewood forest soil) ทำการบ่มที่อุณหภูมิต่างกัน 5 อุณหภูมิคือ 4 15 28 40 และ 55 °ซ เป็นเวลา 98 วัน ผลการทดลองสรุปได้ว่า มีการย่อยสลายทางชีวภาพโดยจุลินทรีย์ในพอลิเมอร์ ทั้ง 2 ชนิด โดยจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ที่พบบนแผ่นฟิล์มพอลิเมอร์ภายหลังการย่อยสลายถึง 295 ชนิด เป็นแบคทีเรียแกรมลบ 105 ชนิด บาซิลลัสแกรมบวก 36 ชนิด แอกติโนไมซีต (Actinomyces) 68 ชนิด และรา 86 ชนิด และพบว่าการสูญเสียน้ำหนักของพอลิเมอร์เพิ่มขึ้นเป็นเส้นตรงเป็นสัดส่วนกับเวลาตามสมการ $k_c = W/t$ และแผ่นฟิล์มทั้ง 2 ชนิดมีอัตราการผุพัง (ร้อยละของน้ำหนักที่สูญเสียไปต่อวัน) ของแผ่นฟิล์มแตกต่างกันตั้งแต่ 0.03-0.64 ขึ้นกับอุณหภูมิที่บ่ม ชนิดของดิน และองค์ประกอบของพอลิเมอร์

น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยที่เปลี่ยนแปลงภายหลังการย่อยสลายทางชีวภาพของ PHA ทั้ง 4 ชนิดจากค่า M_w และ M_n มีการลดลงตามระยะเวลาบ่มที่นานขึ้น และอุณหภูมิที่สูงขึ้น และมีค่าแตกต่างกันตามชนิดของแหล่งจุลินทรีย์ที่ทำการศึกษา โดยแผ่นฟิล์ม P(3HB) เมื่อบ่มในแหล่งจุลินทรีย์ที่เป็นกากตะกอนจากการบำบัดน้ำเสียที่อุณหภูมิ 55 °ซ มีการลดลงของน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยสูงสุด รองลงมาคือที่อุณหภูมิ 40 °ซ และในแหล่งจุลินทรีย์ที่เป็นดินจากการเผาขยะและดินจากการย่อยสลายขยะที่อุณหภูมิ 55 °ซ ตามลำดับ น้ำหนักโมเลกุลของ P(3HB-co-71%3HV) ฟิล์มมีค่าลดลงมากที่สุดเมื่อทำการบ่มในแหล่งจุลินทรีย์ที่เป็นกากตะกอนจากการบำบัดน้ำเสียที่อุณหภูมิ 55 40 และ 30 °ซ ตามลำดับ รองลงมาคือปุ๋ยคอกที่อุณหภูมิ 55 และ 30 °ซ และดินจากการเผาขยะที่อุณหภูมิ 55 °ซ P(3HB-co-23%4HB) ฟิล์มมีการลดลงของน้ำหนักโมเลกุลมากที่สุดเมื่อบ่มในแหล่งจุลินทรีย์ที่เป็นกากตะกอนจากการบำบัดน้ำเสียที่อุณหภูมิ 55 40 และ 30 °ซ เมื่อบ่มเป็นเวลา 70 วัน รองลงมาคือปุ๋ยคอก ดินจากการเผาขยะ และดินจากการย่อยสลายขยะที่อุณหภูมิ 55 °ซ เมื่อบ่มเป็นเวลา 140 วัน ส่วน P(3HB-co-44%3HV-co-39%4HB) เมื่อบ่มในแหล่งจุลินทรีย์ที่เป็นกากตะกอนจากการบำบัดน้ำเสียที่อุณหภูมิ 55 และ 40 °ซ มีการลดลงของน้ำหนักโมเลกุลมากที่สุด รองลงมาคือการบ่มในดินปลูก ปุ๋ยคอก ดินจากการเผาขยะ และดินจากการย่อยสลายขยะที่อุณหภูมิ 55 °ซ ตามลำดับ

ค่า PDI ที่เปลี่ยนแปลงของแผ่นฟิล์ม PHA ทั้ง 4 ชนิดภายหลังการย่อยสลายทางชีวภาพที่อุณหภูมิต่างกัน โคนส่วนใหญ่มีค่าเพิ่มขึ้นเนื่องจากค่า M_n ที่ลดลง มีบางส่วนที่ค่า PDI ไม่แตกต่างกัน และเป็นที่สังเกตว่าแผ่นฟิล์ม P(3HB) และ P(3HB-co-44%3HV-co-39%4HB) มีค่า PDI เริ่มต้นเท่ากับ 1.19 และ 1.57 ซึ่งมีค่าเข้าใกล้ 1.00 แสดงว่าการกระจายของน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยอยู่ในช่วงแคบ และค่า PDI ที่เปลี่ยนแปลงภายหลังการย่อยสลายอยู่ในช่วง 1.00-2.00 นั่นคือการย่อยสลายของพอลิเมอร์เกิดขึ้นทั่วทั้งแผ่นฟิล์มทำให้มีการกระจายของ

น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยอยู่ในช่วงแคบ การย่อยสลายของ P(3HB-co-71%3HV) ที่มีค่า PDI เริ่มต้นเท่ากับ 2.44 และมีค่า PDI ที่เปลี่ยนแปลงภายหลังการย่อยสลายในช่วง 2.00-3.00 อยู่ในช่วงแคบเช่นกัน การย่อยสลายของ P(3HB-co-23%4HB) พิล์มที่มีค่า PDI เริ่มต้นเท่ากับ 1.29 ภายหลังการย่อยสลายทางชีวภาพในดินทำให้ค่า PDI เพิ่มขึ้นโดยมีค่าอยู่ในช่วงกว้าง (1.00-5.00) แสดงว่าการย่อยสลายของแผ่นฟิล์มเกิดไม่สม่ำเสมอทั่วแผ่น เนื่องจากโครงสร้างที่เป็นผลึกในโมเลกุลของโคพอลิเมอร์ที่มี 3HB และ 4HB เป็นองค์ประกอบ โดยผลึกของ 3HB และ 4HB โมโนเมอร์ในโมเลกุลไม่รวมเป็นเนื้อเดียวกัน (เห็นได้จากภาพ SEM) เพราะมีโครงสร้างผลึกที่ต่างกัน ทำให้โคพอลิเมอร์ที่ได้มีลักษณะเป็นผลึกบางส่วน (partial crystalline) ในขณะที่โครงสร้างผลึกของ 3HB จะคล้ายกับโครงสร้างผลึกของ 3HV ทำให้สามารถเกิดผลึกร่วมกันได้ในโมเลกุล (Doi, 1990) Bluhm และคณะ (1986) รายงานว่า P(3HB-co-3HV) มีการเรียงตัวของพอลิเมอร์แบบสุ่มและแสดงลักษณะไอโซไดมอร์ฟิก (isodimorphic) เนื่องจากการเกิดผลึกร่วมกันระหว่าง 3HB และ 3HV โมโนเมอร์ Scandola และคณะ (1990) รายงานว่า P(3HB-co-4HB) เป็นโคพอลิเมอร์ที่มีผลึกบางส่วน เนื่องจากโมโนเมอร์ของ 4HB ไม่สามารถเกิดผลึกร่วมกับ 3HB ได้ Bloembergen และคณะ (1986) พบว่าการเกิดเป็นผลึกของแผ่นฟิล์ม P(3HB-co-3HV) จะเกิดได้ช้ามาก (หลายสัปดาห์ที่อุณหภูมิห้อง) เนื่องจากมีการจัดเรียงตัวของผลึกของโมโนเมอร์ทั้ง 2 ชนิด

จากงานวิจัยของ Mergaert และคณะ (1993) พบว่าการย่อยสลายในดินของโฮโมพอลิเมอร์ P(3HB) และโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) ทำให้น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของพอลิเมอร์ลดลงในทำนองเดียวกันเมื่อบ่มในดินทุกชนิด โดยที่อุณหภูมิ 4, 15 และ 28 มีการลดลงเล็กน้อย แต่มีค่าลดลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 40 และ 55 °C ในขณะที่ค่า PDI ของพอลิเมอร์ทั้ง 2 ชนิดมีค่าเกือบคงที่ [2.6±0.2 ใน P(3HB) และ 2.7±0.2 ใน P(3HB-co-3HV)] แสดงว่ากลไกการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ไม่ให้ส่วนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ และสรุปว่าการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ในแผ่นฟิล์มพอลิเมอร์ทั้ง 2 ชนิดเกิดขึ้นใน 2 ระดับคือ 1) เกิดขึ้นตลอดทั่วทั้งชิ้นพอลิเมอร์ทำให้น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยลดลงโดยไม่มีผลต่อน้ำหนักของพอลิเมอร์ และ 2) เกิดขึ้นเฉพาะพื้นผิวของแผ่นฟิล์ม โดยพอลิเมอร์ถูกย่อยสลายด้วยเอ็นไซม์จากจุลินทรีย์ทำให้น้ำหนักของพอลิเมอร์ลดลง

ค่า T_m และ Δh_f ที่เปลี่ยนแปลงของ PHA ทั้ง 4 ชนิด จากผลการทดลองสรุปได้ว่าเมื่อทำการบ่ม P(3HB) ในแหล่งจุลินทรีย์เป็นภาคตะกอนจากการบำบัดน้ำเสียและปุ๋ยคอก และ P(3HB-co-23%4HB) ในแหล่งจุลินทรีย์ทุกชนิด ผลการย่อยสลายทำให้ค่า T_m และ Δh_f ลดลง แสดงว่าการย่อยสลายเกิดขึ้นทั่วทั้งแผ่นฟิล์มทั้งในส่วนที่เป็นผลึกและส่วนที่เป็นอสัณฐาน ส่วน

การย่อยสลายของ P(3HB) พิล์มในแหล่งจุลินทรีย์ที่เป็นดินจากการย่อยสลายขยะ ดินจากการเผาขยะ และดินปลูก และ P(3HB-co-71%3HV) และ P(3HB-co-44%3HV-co-39%4HB) ในแหล่งจุลินทรีย์ทุกชนิด ผลการย่อยสลายทำให้ค่า T_m และ Δh_f เพิ่มขึ้น แสดงว่าการย่อยสลายเกิดขึ้นเฉพาะในส่วนที่เป็นอสัณฐานทำให้ความเป็นผลึกเพิ่มขึ้น ค่า T_m และ Δh_f จึงมีค่าสูงขึ้น

4.5 ลักษณะทางกายภาพของพื้นผิวพอลิเมอร์ที่เปลี่ยนแปลงภายหลังการย่อยสลายทางชีวภาพ

แผ่นฟิล์ม PHA ทั้ง 4 ชนิดที่ผลิตได้ มีลักษณะของพื้นผิวพอลิเมอร์จากกล้อง SEM แตกต่างกัน โดย P(3HB) พิล์มมีลักษณะเป็นเส้นใยอัดกันแน่นผสมอยู่ในเนื้อพอลิเมอร์ P(3HB-co-71%3HV) พิล์มมีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกันโดยไม่มีรูพรุนแต่พื้นผิวไม่เรียบ แผ่นฟิล์มของ P(3HB-co-23%4HB) ประกอบด้วย 2 ส่วนที่ต่างกันคือส่วนที่เป็นเนื้อฟิล์มเรียบและส่วนที่เป็นก้อนกระจายอยู่ทั่วไปในเนื้อฟิล์ม และแผ่นฟิล์ม P(3HB-co-44%3HV-co-39%4HB) เป็นแผ่นฟิล์มที่มีความเรียบสม่ำเสมอทั่วแผ่น

ลักษณะของแผ่นฟิล์ม PHA ทั้ง 4 ชนิดภายหลังการย่อยสลายทางชีวภาพด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ปลอดเชื้อความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ พีเอช 7.4 ที่อุณหภูมิต่างกันเป็นเวลา 140 วัน ผลการย่อยสลายทำให้แผ่นฟิล์มมีลักษณะเปลี่ยนแปลงไปซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสในสารละลายบัฟเฟอร์ แผ่นฟิล์มพอลิเมอร์ทั้ง 4 ชนิดมีลักษณะบวมเนื่องจากการมีน้ำในโมเลกุลของพอลิเมอร์ ความเรียบของแผ่นฟิล์มลดลงโดยขรุขระมากขึ้น และมีรูพรุนเกิดขึ้นในบางชนิดของพอลิเมอร์ การเปลี่ยนแปลงเหล่านี้เห็นได้ชัดเจนขึ้นเมื่อบ่มที่อุณหภูมิสูงขึ้น จากผลการทดลองสรุปได้ว่า การย่อยสลายทางชีวภาพด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ปลอดเชื้อทำให้แผ่นฟิล์ม PHA ทั้ง 4 ชนิดที่ผลิตจาก *Alcaligenes* sp. A-04 มีลักษณะทางกายภาพของพื้นผิวพอลิเมอร์เปลี่ยนแปลงไป

การย่อยสลายทางชีวภาพของ PHA เมื่อบ่มในแหล่งจุลินทรีย์ต่างกัน 5 ชนิด ที่อุณหภูมิต่างกัน พบว่าลักษณะทางกายภาพของพื้นผิวพอลิเมอร์มีการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจน ผลการย่อยสลายทำให้แผ่นฟิล์มมีลักษณะที่ขรุขระ และมีรูพรุนกระจายอยู่ทั่วไป โดยการผุพังของแผ่นฟิล์มพอลิเมอร์แต่ละชนิดมีความแตกต่างกันเมื่อบ่มในแหล่งจุลินทรีย์ต่างกันและอัตราการผุพังของแผ่นฟิล์มเห็นได้ชัดเจนขึ้นเมื่อบ่มที่อุณหภูมิสูงขึ้น จากผลการทดลองสรุปได้ว่า มีการย่อยสลายทางชีวภาพของ PHA ทั้ง 4 ชนิดที่ผลิตได้จาก *Alcaligenes* sp. A-04 โดยอัตราการผุพังของแผ่นฟิล์มของพอลิเมอร์ทั้ง 4 ชนิดแตกต่างกัน ขึ้นกับชนิดและองค์ประกอบของพอลิเมอร์ แหล่งจุลินทรีย์ และอุณหภูมิที่บ่ม

สรุปผลงานวิจัย

1 ผลิต PHA ชนิดต่างๆ โดยการใช้ชนิดของแหล่งคาร์บอนแตกต่างกันจาก *Alcaligenes* sp. A-04 เมื่อวิเคราะห์ชนิดของโมโนเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบ พบว่าได้พอลิเมอร์แตกต่างกัน 4 ชนิด ได้แก่

- ก) โฮโมพอลิเมอร์ P(3HB)
- ข) โคพอลิเมอร์ P(3HB-co-71%3HV)
- ค) โคพอลิเมอร์ P(3HB-co-23%4HB)
- ง) เทอร์พอลิเมอร์ P(3HB-co-44%3HV-co-39%4HB)

2 เลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 ในถังหมัก สกัดแยก และทำให้สารพอลิเมอร์บริสุทธิ์ สะสมสารพอลิเมอร์ทั้ง 4 ชนิดให้ได้ปริมาณมาก แล้วเตรียมตัวอย่างทดสอบโดยทำเป็นแผ่นฟิล์มได้ขนาดตามมาตรฐาน ASTM

3 ลักษณะแผ่นฟิล์ม PHA ทั้ง 4 ชนิด มีความแตกต่างกันเมื่อเป็นแผ่นฟิล์มดังนี้

- P(3HB) สีขาวขุ่น และเปราะ
- P(3HB-co-71%3HV) ใส และเหนียว
- P(3HB-co-23%4HB) สีขาวขุ่น แต่มีนวลและเหนียวกว่า P(3HB-co-71%3HV)
- P(3HB-co-44%3HV-co-39%4HB) โปร่งแสง แต่ไม่ใส เหนียวคล้ายยาง

4 การย่อยสลายทางชีวภาพของ PHA ที่ผลิตได้ด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่อุณหภูมิ 30 40 และ 55 °C พบว่ามีการย่อยสลายเกิดขึ้นอย่างช้าๆ โดยในช่วงแรก PHA ทั้ง 4 ชนิดมีค่า Mn ลดลง แต่ค่า Mw ไม่เปลี่ยนแปลง (ค่า PDI เพิ่มขึ้น) หลังจากนั้นน้ำหนักของพอลิเมอร์ลดลงเป็นสัดส่วนกับเวลา โดยอัตราการลดลงขึ้นกับชนิดของพอลิเมอร์และอุณหภูมิที่บ่ม โดยสรุปได้ว่าอัตราการย่อยสลายเป็นดังนี้

$$P(3HB-co-23\%4HB) > P(3HB-co-44\%3HV-co-39\%4HB) > P(3HB) > P(3HB-co-71\%3HV)$$

และ PHA ทุกชนิดมีอัตราการย่อยสลายสูงขึ้นเมื่อบ่มที่อุณหภูมิสูงขึ้น

5 การย่อยสลายทางชีวภาพของ PHA ที่ผลิตได้ในแหล่งจุลินทรีย์ต่างชนิดกัน 5 ชนิด ที่อุณหภูมิ 30 40 และ 55 °ซ

แหล่งจุลินทรีย์ที่ใช่แตกต่างกัน ได้แก่

ก) ดินจากการย่อยสลายขยะ (decomposed soil)

ข) ดินจากการเผาขยะ (refuse soil)

ค) ปุ๋ยคอก (manure)

ง) ดินปลูก (potting soil)

จ) กากตะกอนจากการบำบัดน้ำเสีย (activated sludge)

ผลการวิจัยสรุปได้ว่า

- การย่อยสลายของ P(3HB) และ P(3HB-co-71%3HV) เกิดได้ดีตามลำดับดังนี้
ในแหล่งจุลินทรีย์ที่เป็นกากตะกอนจากการบำบัดน้ำเสีย > ดินจากการเผาขยะ > ปุ๋ยคอก
> ดินจากการย่อยสลายขยะ > ดินปลูก
- การย่อยสลายของ P(3HB-co-23%4HB) เกิดได้ดีตามลำดับดังนี้
ในแหล่งจุลินทรีย์ที่เป็นกากตะกอนจากการบำบัดน้ำเสีย > ปุ๋ยคอก > ดินจากการเผาขยะ
> ดินปลูก > ดินจากการย่อยสลายขยะ
- การย่อยสลายของ P(3HB-co-44%3HV-co-39%4HB) เกิดได้ดีตามลำดับคือ
ในแหล่งจุลินทรีย์ที่เป็นกากตะกอนจากการบำบัดน้ำเสีย > ปุ๋ยคอก > ดินจากการเผาขยะ
> ดินจากการย่อยสลายขยะ > ดินปลูก

โดยพบว่า การบ่มที่อุณหภูมิสูงขึ้นช่วยเร่งอัตราการย่อยสลายของแผ่นฟิล์มได้เร็วขึ้น (55 °ซ > 40 °ซ > 30 °ซ)

- ◆ น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยที่เปลี่ยนแปลงภายหลังการย่อยสลายทางชีวภาพของ PHA ทั้ง 4 ชนิด โดยค่า Mw และ Mn มีค่าลดลงตามระยะเวลาบ่มที่นานขึ้นและอุณหภูมิที่สูงขึ้น และมีความแตกต่างกันตามชนิดของแหล่งจุลินทรีย์
- ◆ ค่า PDI ที่เปลี่ยนแปลงของแผ่นฟิล์ม PHA ทั้ง 4 ชนิด ภายหลังการย่อยสลายทางชีวภาพที่อุณหภูมิต่างกัน พบว่าส่วนใหญ่มีค่าเพิ่มขึ้น เนื่องจากค่า Mn ลดลง มีส่วนน้อยที่ค่า PDI ไม่แตกต่างกัน ค่า PDI ซึ่งแสดงถึงการกระจายของน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยนั้นขึ้นอยู่กับโครงสร้างที่เป็นผลึกในโมเลกุลของพอลิเมอร์แต่ละชนิด
- ◆ ค่า Tm และ Δh_f ของ PHA ที่เปลี่ยนแปลง สรุปได้ว่า
เมื่อบ่มฟิล์ม P(3HB) - ในแหล่งจุลินทรีย์ที่เป็นกากตะกอนจากการบำบัดน้ำเสีย
- ในแหล่งจุลินทรีย์ที่เป็นปุ๋ยคอก

และเมื่อบ่มฟิล์ม P(3HB-co-23%4HB) - ในแหล่งจุลินทรีย์ทุกชนิด



ผลการย่อยสลายทำให้ค่า T_m และ Δh_f ลดลง

แสดงว่าการย่อยสลายเกิดทั่วทั้งแผ่นฟิล์มทั้งในส่วนที่เป็นผลึกและส่วนที่เป็นอสัณฐาน

เมื่อบ่มฟิล์ม P(3HB) - ในแหล่งจุลินทรีย์ที่เป็นดินจากการย่อยสลายขยะ

- ในแหล่งจุลินทรีย์ที่เป็นดินจากการเผาขยะ

- ในแหล่งจุลินทรีย์ที่เป็นดินปลูก

และเมื่อบ่มฟิล์ม P(3HB-co-71%3HB) และ P(3HB-co-44%3HV-co-39%4HB)

- ในแหล่งจุลินทรีย์ทุกชนิด



ผลการย่อยสลายทำให้ค่า T_m และ Δh_f เพิ่มขึ้น

แสดงว่าการย่อยสลายเกิดขึ้นเฉพาะในส่วนที่เป็นอสัณฐาน ทำให้ความเป็นผลึกเพิ่มขึ้น

6 การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของพื้นผิวพอลิเมอร์ ที่ศึกษาโดย Scanning Electron Microscope (SEM)

- ผลจากการย่อยสลายทางชีวภาพด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่อุณหภูมิต่างกัน พบว่า ความเรียบของ PHA ทั้ง 4 ชนิดลดลง มีความขรุขระมากขึ้น และมีรูพรุนเกิดขึ้นในบางชนิด โดยการเปลี่ยนแปลงของพื้นผิวนี้เห็นได้ชัดเจนขึ้นเมื่อบ่มที่อุณหภูมิสูงขึ้น
- ผลจากการย่อยสลายทางชีวภาพในแหล่งจุลินทรีย์ต่างกันและที่อุณหภูมิต่างกันพบว่า แผ่นฟิล์มมีลักษณะขรุขระและมีรูพรุนกระจายโดยทั่วไป แผ่นฟิล์มบางชนิดมีการเจริญของจุลินทรีย์ในเนื้อพอลิเมอร์และมีการสูญหายไปของเนื้อฟิล์ม และการผุพังของแผ่นฟิล์มมีความแตกต่างกัน ขึ้นกับชนิดของพอลิเมอร์ แหล่งจุลินทรีย์ และอุณหภูมิที่ทำการบ่ม

ผลจากงานวิจัยนี้ ทำให้ทราบว่า PHA ชนิดต่างๆ สามารถถูกย่อยสลายทางชีวภาพได้ดีแตกต่างกัน และทราบปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการย่อยสลายของพอลิเมอร์ ทำให้ได้ข้อมูลในการเลือกชนิดของพอลิเมอร์ที่จะผลิตได้เหมาะสมต่อลักษณะงาน และภาวะในการย่อยสลายหลังเสร็จสิ้นการใช้งาน เพื่อเลือกหาวิธีการกำจัดได้อย่างมีประสิทธิภาพ