



โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การพัฒนากระบวนการรีไซเคิลชีวภาพโดยการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ
ด้วยแบคทีเรียที่ผลิตพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต

ชื่อนิสิต นางสาวสิริยากร มิตรจิตร รหัสประจำตัว 6032355823

ภาควิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2563

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

เรื่อง

การพัฒนากระบวนการรีไซเคิลชีวภาพโดยการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ

ด้วยแบคทีเรียที่ผลิตพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต

โดย

นางสาวสิริยากร มิตรจิตร เลขประจำตัวนิต 6032355823

อาจารย์ที่ปรึกษาในโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร.สุชาดา จันทร์ประทีป นภาพร

โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ประจำปีการศึกษา 2563

ภาคจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อโครงการ

การพัฒนากระบวนการรีไซเคิลชีวภาพโดยการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ
ด้วยแบคทีเรียที่ผลิตพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต

โดย

นางสาวสิริยากร มิตรจิตร รหัสนิสิต 6032355823


อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร.สุชาดา จันทร์ประทีป นภทร

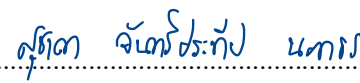
ปีการศึกษา


2563


ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับโครงการฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่ง ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต ในรายวิชา 2321499 โครงการวิทยาศาสตร์


.....หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา
(ศาสตราจารย์ ดร. ธานีทร ปาลกะ)

คณะกรรมการสอบโครงการ


.....อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุชาดา จันทร์ประทีป นภทร)


.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.เอกวัล ลือพร้อมชัย)


.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.อรุทัย ภิญญาคง)


.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชีวานันท์ เดชอุปการ ศิริสมบุญรณ์)

กิตติกรรมประกาศ

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์นี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณาจากอาจารย์ที่ปรึกษา งานวิจัย รองศาสตราจารย์ ดร. สุชาติา จันทร์ประทีป ภาธร ที่ให้ความรู้ คำแนะนำ อบรมสั่งสอน แก้ไข ข้อบกพร่องต่าง ๆ เป็นกำลังใจที่ดีให้ และช่วยเหลือนิสิตในช่วงสถานการณ์การระบาดของโรค COVID-19 อย่างดี มาโดยตลอดการทำวิจัยนี้ทำให้รายงานวิจัยฉบับนี้สมบูรณ์และสำเร็จตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้

ขอขอบคุณคณาจารย์ และเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่านที่คอยให้ความรู้ คำแนะนำ และอำนวยความสะดวกด้วยดีตลอดระยะเวลาการศึกษาและการทำวิจัย

ขอขอบคุณทุนโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ จากงบประมาณภาควิชาจุลชีววิทยา

ขอขอบคุณรุ่นพี่ในห้องวิจัย 1904/16 นางสาวกนกจันทร์ ใจบุญ นางสาววรรณดา อัจฉรวรรณ และ นายศิริราชย์ นันทะชัย รวมไปถึงพี่ๆ ทุกคนในห้องวิจัย ที่คอยให้ความรู้ ให้คำปรึกษา ให้ความช่วยเหลือ และให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยเสมอมา

ขอขอบคุณนายธเนศ ศรีโมรา และนางสาวสิริรัช ภมรสุต ที่คอยช่วยเหลือ และให้คำปรึกษาโดยตลอด ขอขอบคุณพี่ๆเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยา ที่คอยให้การช่วยเหลือ อำนวยความสะดวก ให้ความรู้การใช้ อุปกรณ์เป็นอย่างดี

ขอขอบคุณรุ่นพี่ และรุ่นน้องทุกคนในภาควิชาจุลชีววิทยา ที่ช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ และคอยเป็นกำลังใจ ให้

ขอขอบคุณเพื่อนๆ ทุกคนที่คอยช่วยเหลือ ให้คำปรึกษา เป็นกำลังใจ และแรงผลักดันให้เสมอมา

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณบิดา มารดา ของนางสาวสิริยากร มิตรจิตร และสมาชิกในครอบครัวทุกคนที่คอยให้ความช่วยเหลือ ให้กำลังใจ และสนับสนุนในทุก ๆ อย่างตลอดจนสำเร็จการศึกษา

นางสาวสิริยากร มิตรจิตร

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญรูป	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	6
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	6
บทที่ 2 อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีการดำเนินการทดลอง	
2.1 อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์	
2.1.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย	7
2.1.2 เคมีภัณฑ์	8
2.2 วิธีการดำเนินการทดลอง	
2.2.1 การเตรียมแหล่งคาร์บอน	
2.2.1.1 การขึ้นรูปแผ่นฟิล์มพลาสติกชีวภาพชนิด PHBV	9
2.2.1.2 การขึ้นรูปแผ่นฟิล์มพลาสติกชีวภาพชนิด PLA	9
2.2.1.3 การเตรียมพลาสติกชีวภาพชนิด เทอร์โมพลาสติกสตาร์ช	9
2.2.2 การย่อยสลายพลาสติกชีวภาพในขวดเขย่า	
2.2.2.1 การเตรียมหัวเชื้อของ <i>Cupriavidus necator</i> strain A-04	9
2.2.2.2 การเตรียมหัวเชื้อของเชื้อ <i>Burkholderia contaminans</i> SCN-KJ และ <i>Burkholderia gladioli</i> A7	10
2.2.2.3 การย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ	10
2.2.2.4 การวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง	11
2.2.2.3 การวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์สูญเสียมวลของแผ่นฟิล์ม	11
2.2.2.4 การวิเคราะห์ความเป็นกรด – ต่าง	11
2.2.2.5 การวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสง	11
2.2.2.6 การย้อมสี Sudan black B	11

2.2.2.7 การวิเคราะห์ปริมาณของ PHAs	11
บทที่ 3 ผลการทดลอง	
3.1 การเตรียมแหล่งคาร์บอน	
3.1.1 การขึ้นรูปแผ่นฟิล์มพลาสติกชีวภาพชนิด PHBV	13
3.1.2 การขึ้นรูปแผ่นฟิล์มพลาสติกชีวภาพชนิด PLA	13
3.1.3 การเตรียมพลาสติกชีวภาพชนิด เทอร์โมพลาสติกสตาร์ช	14
3.2 การย่อยสลายพลาสติกชีวภาพในขวดเขย่า	
3.3 วิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง	15
3.4 วิเคราะห์เปอร์เซ็นต์สูญเสียมวลของแผ่นฟิล์ม	16
3.5 วิเคราะห์ค่าความเป็นกรด - ต่าง	20
3.6 วิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสง	21
3.7 ย้อมแกรนูลด้วย Sudan black B	22
3.8 วิเคราะห์ปริมาณของ PHAs	24
บทที่ 4 สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	25
เอกสารอ้างอิง	28
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ	31
ภาคผนวก ข สารเคมีและวิธีการเตรียมที่ใช้ในการทดลอง	32

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1.1 กระบวนการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ	3
รูปที่ 1.2 โครงสร้างทั่วไปของ PHBV	4
รูปที่ 1.3 โครงสร้างทั่วไปของ PLA	4
รูปที่ 1.3 โครงสร้างทั่วไปของ TPS	6
รูปที่ 3.1 ก่อนและหลังตัดแผ่นฟิล์ม PHBV ให้มีขนาด 2 x 2 เซนติเมตร	13
รูปที่ 3.2 ก่อนและหลังตัดแผ่นฟิล์ม PLA ให้มีขนาด 2 x 2 เซนติเมตร	13
รูปที่ 3.3 ก่อนและหลังตัดแผ่นฟิล์ม TPS ให้มีขนาด 2 x 2 เซนติเมตร	14
รูปที่ 3.4 ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้งกับเวลา โดยใช้พลาสติกชีวภาพเป็นแหล่งคาร์บอน	
(ก) PLA	15
(ข) TPS เป็นแหล่งคาร์บอน	16
รูปที่ 3.5 แผ่นฟิล์ม PLA และ TPS หลังการย่อยสลายในชุดควบคุม	17
รูปที่ 3.6 แผ่นฟิล์ม PLA และ TPS หลังการย่อยสลายด้วย <i>C. necator</i> A-04	17
รูปที่ 3.7 แผ่นฟิล์ม PLA และ TPS หลังการย่อยสลายด้วย <i>B. gladioli</i> A7	17
รูปที่ 3.8 แผ่นฟิล์ม PLA และ TPS หลังการย่อยสลายด้วย <i>B. contaminans</i> SCN+KJ	17
รูปที่ 3.9 ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์สูญเสียมวลของแผ่นฟิล์มกับเวลา โดยใช้พลาสติกชีวภาพเป็นแหล่งคาร์บอน	
(ก) PLA	18
(ข) TPS	18
รูปที่ 3.10 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเป็นกรด – ต่างกับเวลา โดยใช้พลาสติกชีวภาพเป็นแหล่งคาร์บอน	
(ก) PLA	19
(ข) TPS	19
รูปที่ 3.11 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับเวลา โดยใช้พลาสติกชีวภาพ	
(ก) PLA	21
(ข) TPS	21

รูปที่ 3.12 ผลการย้อมแกรนูลด้วยสี Sudan black B โดยใช้พลาสติกชีวภาพ PLA	22
รูปที่ 3.13 ผลการย้อมแกรนูลด้วยสี Sudan black B โดยใช้พลาสติกชีวภาพ TPS	23
รูปที่ 3.14 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของ PHAs กับเวลา โดยใช้พลาสติกชีวภาพ	
(ก) PLA	24
(ข) TPS	24

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

พลาสติกดั้งเดิม หรือพลาสติกจากปิโตรเลียม (petroleum based plastics) พลาสติกเป็นวัสดุสังเคราะห์ที่มีโครงสร้างเป็นพอลิเมอร์ เกิดจากหน่วยย่อยของพลาสติกหรือมอนอเมอร์มาต่อกันหลาย ๆ หน่วยด้วยพันธะโคเวเลนต์ ซึ่งองค์ประกอบของมอนอเมอร์ที่แตกต่างกัน จะทำให้ได้คุณสมบัติของพลาสติกที่ต่างกักัน โดยในปัจจุบันนี้พลาสติกมีที่มาจากถ่านหิน ก๊าซธรรมชาติและน้ำมัน จึงเรียกอีกอย่างว่า พลาสติกจากปิโตรเลียม (petroleum based plastics) (Johnston et al, 2018) พลาสติกดังกล่าวมีบทบาทอย่างมากในชีวิตประจำวัน มีการนำพลาสติกมาใช้เป็นองค์ประกอบสำคัญในหลายด้าน เช่น ด้านเครื่องนุ่งห่ม ด้านบรรจุภัณฑ์ ด้านอุปกรณ์คมนาคม ตลอดจนอุปกรณ์การแพทย์ (Andrady and Neal, 2009) ด้วยคุณสมบัติที่มีความโปร่งใส ประหยัดต้นทุน น้ำหนักเบา แข็งแรง และทนทาน (Johnston et al., 2018) ทำให้พลาสติกเหนือกว่าวัสดุอื่น ๆ ในด้านการใช้งาน ส่งผลให้ขนาดการผลิตของพลาสติกขยายตัวขึ้น 20 เท่าในช่วง 5 ทศวรรษตั้งแต่ปี พ.ศ. 2507 ซึ่งมีอัตราการผลิตเกิน 300 ล้านตันต่อปี และสูงถึง 335 ล้านตันในปี พ.ศ. 2558 นอกจากนี้แนวโน้มการผลิตพลาสติกในอนาคตจะเพิ่มสูงขึ้นเป็นสองเท่าในปี พ.ศ. 2573 และเกือบสี่เท่าภายในปี พ.ศ. 2593

แต่ทว่าคุณสมบัติที่มีความเสถียรสูงของพลาสติกอันเกิดจากโครงสร้างโพลีเมอร์แบบโซ่ยาว น้ำหนักโมเลกุล (MW) สูง การขาดหมู่ฟังก์ชันที่ดี การไม่ชอบน้ำและการตกผลึก นั้นส่งผลทำให้กระบวนการย่อยสลายตามธรรมชาติทำได้ยาก (Urbanek et al., 2018) ใช้เวลาในการย่อยสลายเฉลี่ยหลายร้อยปี โดยมีพลาสติกเพียงส่วนหนึ่งที่ถูกลำไปรีไซเคิล พลาสติกที่เหลือจะถูกกำจัดด้วยการเผา หรือการฝังกลบส่งผลเสียต่อสิ่งแวดล้อมในระยะยาว (Drzyzga and Prieto, 2018) ส่งผลในแง่ของสิ่งแวดล้อมทำให้มีปริมาณพลาสติกที่สะสมในสิ่งแวดล้อมเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว (Chamas et al., 2020) และในแง่ของสุขภาพนั้นพบว่าเทคโนโลยีการผลิตพลาสติกสมัยใหม่ที่มีการเพิ่มสารเติมแต่งบางชนิดลงไปเพื่อให้พลาสติกมีคุณสมบัติตามความต้องการได้อย่างหลากหลาย เช่น กระจกใส อาหาร บรรจุภัณฑ์ใส่อาหารและเครื่องดื่ม फिल्मถนอมอาหาร ของเล่นเด็ก อุปกรณ์ก่อสร้าง และ เฟอร์นิเจอร์ เป็นต้น ซึ่งสารเหล่านี้อาจปนเปื้อนสู่อาหาร หากมีการใช้งานพลาสติกที่ไม่ถูกวิธีหรือใช้ไม่เหมาะสมกับประเภทของพลาสติก อาจนำมาซึ่งโรคเรื้อรังต่าง ๆ เช่น ไวนิล คลอไรด์ (vinyl chloride) และฟอร์มัลดีไฮด์ (formaldehyde) จัดเป็นสารก่อมะเร็งกลุ่ม 1 คือ ก่อให้เกิด โรคมะเร็งในคน จากรายงานของ International Agency for Research on Cancer (IARC) (ศุสิทธิ์ แสงกระจ่าง และคณะ, 2556)

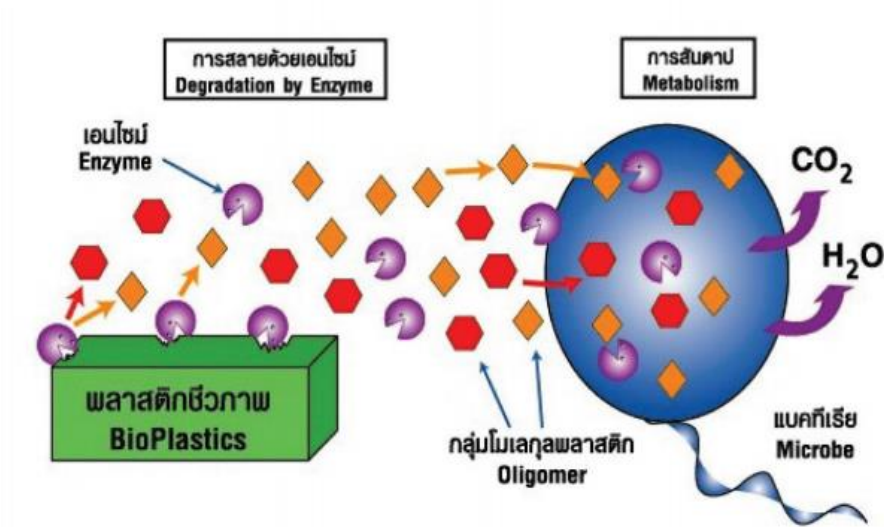
ต่อมาเพื่อลดผลกระทบจากปัญหาของพลาสติกสังเคราะห์ อุตสาหกรรมต่าง ๆ ได้ริเริ่มพัฒนาและผลิตพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพได้มาทดแทน (Shah et al., 2010) พลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (biodegradable plastic) หรือพลาสติกชีวภาพ หมายถึง พลาสติกที่ได้รับการออกแบบมา เพื่อรองรับการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางเคมีบางประการภายใต้สภาพแวดล้อมที่กำหนด โดยการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีนั้นเป็นผลมาจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ

พลาสติกที่ถูกย่อยสลายได้ทางชีวภาพถูกจำแนกออกเป็น 4 ประเภท โดยใช้กระบวนการสังเคราะห์และแหล่งของวัตถุดิบในการผลิตที่แตกต่างกันเป็นเกณฑ์ ดังนี้ (Vieira et al., 2011)

1. พอลิเมอร์ที่ได้มาจากวัตถุดิบที่เป็นชีวมวล (biomass) ได้แก่
 - วัตถุดิบที่เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ เช่น แป้งข้าวสาลี แป้งมันฝรั่ง แป้งข้าวโพด เป็นต้น
 - วัตถุดิบที่เป็นผลิตภัณฑ์ลิกโนเซลลูโลส เช่น ฟาง ไม้ เป็นต้น
 - วัตถุดิบในกลุ่มของไคโตซานและไคติน ที่หากนำมาละลายในกรดอินทรีย์จะมีลักษณะเป็นสารละลายใสเหนียวคล้ายวุ้น แล้วนำมาขึ้นรูปเป็นพลาสติก
 - วัตถุดิบในกลุ่มคอลลาเจนและเจลาตินที่สกัดจากโปรตีนพืชและสัตว์แล้วนำมาขึ้นรูปเป็นพลาสติก
 2. พอลิเมอร์ที่ได้จากการผลิตของจุลินทรีย์ ได้แก่ โพลิเมอร์ในกลุ่ม PHAs เช่น poly(hydroxybutyrate) (PHB) และ poly(hydroxybutyrate cohydroxyvalerate) (PHBV) เป็นต้น
 3. พอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ขึ้นจากกระบวนการทางเคมี ได้วัตถุดิบที่เป็นมอนอเมอร์จากผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร เช่น ข้าวโพด มันสำปะหลัง อ้อย เป็นต้น นำมาผ่านกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพเพื่อเปลี่ยนแปลงเป็นน้ำตาลและเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นมอนอเมอร์ ซึ่งก็คือ กรดแลคติก (lactic acid) และนำมาเชื่อมต่อกันเป็นพอลิเมอร์สายยาว ซึ่งพอลิเมอร์ประเภทนี้ คือ poly(lactic acid) (PLA)
 4. พอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ขึ้นจากมอนอเมอร์หรือพอลิเมอร์จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี 2 กลุ่มหลัก คือ
 - กลุ่มที่มีโครงสร้างเป็นโซ่สายตรง เช่น poly(butylene succinate) (PBS) ที่มีมอนอเมอร์เป็นกรดซัคซินิกและ 1,4 -บิวเทนไดออล
 - กลุ่มที่มีโครงสร้างเป็นวงอะโรมาติก เช่น poly(butylene adipate/terephthalate) (PBAT) เป็นต้น
- จากการจำแนกประเภทข้างต้นจะสังเกตได้ว่าพลาสติกที่ถูกย่อยสลายได้ทางชีวภาพทุกประเภทมีสังเคราะห์จากวัตถุดิบที่เป็นทรัพยากรธรรมชาติ ที่สามารถสร้างทดแทนใหม่ได้ (renewable resources) ยกเว้นแต่ที่ประเภท 4 แต่ทั้ง 4 ประเภทนั้นสามารถถูกย่อยสลายได้ภายใต้กระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพ (biodegradation) โดยกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพเป็นกระบวนการย่อยสลายที่เกิดขึ้นจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย รา ยีสต์ แอคติโนมัยซิส เป็นต้น แล้วนำไปสู่การหมุนเวียนคาร์บอน ซึ่งหากมีการย่อย

สลายได้อย่างสมบูรณ์ จะได้ผลผลิตสุดท้ายเป็น ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และ มวลชีวภาพ (Barlaz et al., 1989)

กระบวนการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพนั้นเริ่มจากการทำงานร่วมกันของจุลินทรีย์และปัจจัยภายนอกที่ส่งผลให้พลาสติกชีวภาพแตกออกเป็นชิ้นเล็กชิ้นน้อย ขั้นตอนนี้เรียกว่า “biodegradation” จากนั้นจุลินทรีย์จะปล่อยเอนไซม์ออกมานอกเซลล์เพื่อย่อยสลายสายพอลิเมอร์ของพลาสติกชีวภาพ ขั้นตอนนี้เรียกว่า “depolymerisation” ให้กลายเป็นโมเลกุลเล็ก ๆ ซึ่งโมเลกุลที่เกิดขึ้นเหล่านี้จะถูกซึมผ่านเข้าไปในเซลล์ของจุลินทรีย์ผ่านทางเยื่อหุ้มเซลล์ และส่งเข้าสู่กระบวนการสันดาปเพื่อนำไปใช้ในการสร้างพลังงานและมวลชีวภาพ ขั้นตอนนี้เรียกว่า การดูดซึม (assimilation) (Chandra and Rustgi, 1998) ดังแสดงในรูปที่ 1.1



รูปที่ 1.1 กระบวนการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ (จุฬากานต์ บุญมี, 2561)

ปัจจัยหลายที่ส่งผลต่ออัตราการย่อยสลายของพลาสติกชีวภาพ ประกอบด้วย ปัจจัยภายนอก และปัจจัยด้านคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของพลาสติกแต่ละประเภท เช่น หากมีการนำพลาสติกชีวภาพไปฝังดินหรือทิ้งในระบบฝังกลบขยะ ปัจจัยภายนอกที่จะมีผลต่ออัตราการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ ได้แก่ อุณหภูมิ ความชื้นหรือปริมาณน้ำในดิน การถ่ายเทอากาศในดิน ปริมาณธาตุอาหารในดิน ค่าความเป็นกรดเป็นด่างของดิน ลักษณะของเนื้อดิน รวมไปถึงชนิดของจุลินทรีย์ในดิน ส่วนปัจจัยด้านคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพที่แตกต่างกันไปพลาสติกแต่ละประเภท เช่น น้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) ของสายพอลิเมอร์ แต่ถึงแม้ว่าอัตราการย่อยสลายของพลาสติกชีวภาพจะถูกควบคุมโดยปัจจัยมากมาย แต่ก็ย่อยสลายได้ภายในระยะเวลาที่รวดเร็ว เมื่อเทียบกับพลาสติกสังเคราะห์ที่ย่อยสลายได้ยากมากใช้เวลาย่อยสลายเฉลี่ย 450 ปี และอาจสลายตัวสะสมในสิ่งแวดล้อมตลอดจนร่างกายมนุษย์ในรูปของไมโครพลาสติกอีกด้วย (สถาบันลูกโลกสีเขียว, 2561)

ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพเป็นพลาสติกที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมด้วย (จุฬากานต์ บุญมี, 2561) ข้อดีมากมายได้แก่ เพิ่มความอุดมสมบูรณ์ของดิน ผลิตได้จากวัตถุดิบที่หมุนเวียนได้ (ลดการปล่อยก๊าซเรือนกระจก) ลดการสะสมของวัสดุพลาสติกขนาดใหญ่ในสิ่งแวดล้อม (ช่วยลดการบาดเจ็บของสัตว์ป่า) และลดต้นทุนในการจัดการขยะ นอกจากนี้พลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพยังสามารถนำไปรีไซเคิลเป็นสารที่มีประโยชน์ (มอนอเมอร์และโอลิโกเมอร์) ด้วยจุลินทรีย์และเอนไซม์ (Tokiwa et al., 2009)

โดยในปัจจุบันมีประยุกต์ใช้งานพลาสติกชีวภาพในหลากหลายด้าน เน้นเป็น 3 ด้านหลักด้วยกันได้แก่ ทางด้านการแพทย์ ทางด้านการเกษตร และทางด้านบรรจุภัณฑ์

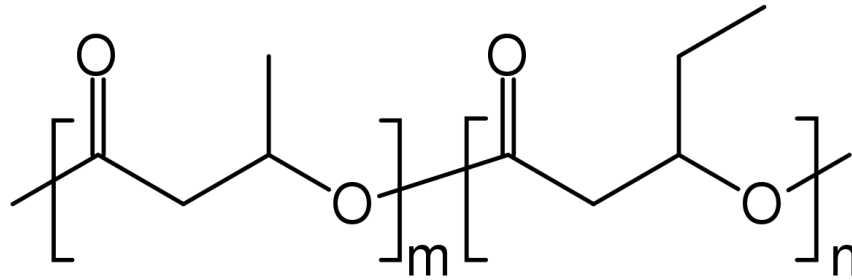
1. **การประยุกต์ใช้งานด้านการแพทย์** เช่น ใช้ผลิตรากฟันเทียม (ภัทรนันท์ ทวดอาจ และคณะ, 2021) ผลิตแคปซูลยาที่สามารถควบคุมการปล่อยตัวยาได้อย่างช้าๆตามต้องการ ผลิตวัสดุทางการแพทย์ที่นำมาใช้กับดวงตา ผลิตไหมเทียมเพื่อใช้ในการผ่าตัด ผลิตเป็นวัสดุรีงกระดูกซึ่งพบว่ามีคามยืดหยุ่นกว่าการใช้โลหะ นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาเพื่อใช้ในการผลิตผิวหนังเทียม เช่นในกลุ่มของคอลลาเจน และ ไคติน เป็นต้น เพื่อใช้ตกแต่งบาดแผลที่เกิดจากไฟไหม้ (วิลาส รัตนานุกูล, 2554)
2. **การประยุกต์ใช้งานด้านการเกษตร** เช่น มีการนำพลาสติกชีวภาพมาใช้เป็นตัวควบคุมการปลดปล่อยสารอาหารให้กับพืช นำมาใช้เป็นวัสดุคลุมดินหรือผลผลิต นำมาใช้เป็นภาชนะปลูกพืชเพื่อให้เกิดการย่อยสลายและเป็นอาหารให้กับพืชในระหว่างการเพาะปลูกด้วย นอกจากนี้ทางการเกษตรเริ่มสนใจนำ มาใช้เป็นตัวปรับปรุงคุณภาพของดิน (soil conditioner) ร่วมกับวัสดุที่สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติชนิดอื่น ๆ อีกด้วย (สวรรณยา เชื้อพันธ์, 2553)
3. **การประยุกต์ใช้งานด้านบรรจุภัณฑ์** นำมาผลิตถุงใส่ของ และถุงใส่ขยะเพื่อลดขั้นตอนและระยะเวลาในการคัดแยกและกำจัดขยะ (สถาบันพลาสติก, 2556b)

ตัวอย่างพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพที่มีการนำมาใช้อย่างแพร่หลายในปัจจุบัน ได้แก่ โคพอลิเมอร์ของ poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV), พอลิแลกติกแอซิด (PLA) (Tokiwa et al., 2009) และ เทอร์โมพลาสติกสตาอ์ซ (TPS) (รังรอง ยกसान และคณะ, 2552) เป็นต้น

โคพอลิเมอร์ของ poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV)

เป็นพอลิเมอร์ที่ได้จากการผลิตของจุลินทรีย์ อยู่ในกลุ่มพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต (PHAs) โดยจุลินทรีย์จะผลิต PHAs ในสภาวะที่มีความเครียดหรือภายใต้สภาวะการเจริญเติบโตไม่สมดุล เพื่อควบคุมระดับ acetyl CoA ภายในเซลล์ที่มากเกินไป และลดปริมาณ $NADH^+H^+$ โดยเฉพาในสภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนสูง และไนโตรเจนต่ำ (Bhati et al., 2010) ซึ่ง PHAs ทำหน้าที่เป็นแหล่งกักเก็บคาร์บอนสำรองของจุลินทรีย์ซึ่งมักอยู่ในรูปของแกรนูลภายในเซลล์ (Johnston et al., 2018) PHBV นั้นเกิดจากการรวมกันของมอนอเมอร์ของพอลิไฮ

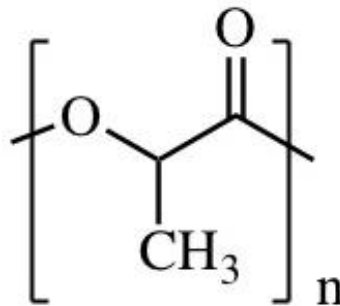
ดรอกซีแอลคาโนเอตทั้งสองชนิด (copolymer) คือ บิวทิเรต และวาเลอเรต (Shah et al., 2010) ซึ่งทำให้มีสมบัติคงทนแข็งแรงมากขึ้นกว่าฮอโมพอลิเมอร์ (ฉันทชนก ดวงศรี และ วุฒินันท์ รักษาจิตร, 2559) มีคุณสมบัติคล้ายกับเทอร์โมพลาสติกที่ผลิตจากปิโตรเคมี แต่ทว่ามีความเข้ากันได้ทางชีวภาพและย่อยสลายได้ทางชีวภาพ ซึ่ง PHBV จะใช้ในการผลิตเทอร์โมพลาสติกเชิงพาณิชย์ขนาดใหญ่ (Shah et al., 2010) และมีโครงสร้างทั่วไปดังรูปที่ 1.2



รูปที่ 1.2 โครงสร้างทั่วไปของ PHBV (Urbanek et al., 2018)

พอลิแลกติกแอซิด (PLA)

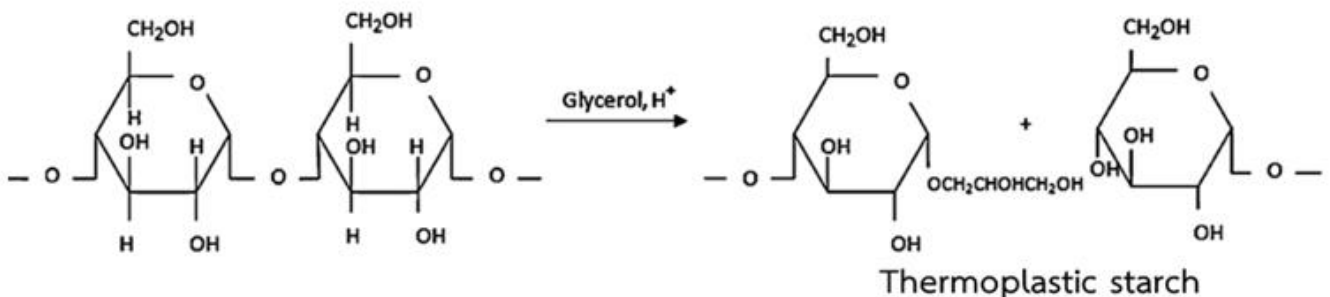
เป็นอะลิฟาติกพอลิเมอร์ ที่สังเคราะห์ได้จากกรดแลกติก ซึ่งผลิตมาจากผลผลิตทางการเกษตร เช่น ข้าว ข้าวโพด อ้อย มันสำปะหลัง กระบวนการผลิตเริ่มจากการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลและใช้กระบวนการหมักด้วยแบคทีเรียได้เป็นกรดแลกติกกับน้ำตาล จากนั้นนำกรดแลกติกที่ได้มาผ่านกระบวนการทางเคมี เพื่อเปลี่ยนโครงสร้างให้เป็นพอลิเมอร์สายยาวที่เรียกว่า พอลิแลกติกแอซิด (PLA) (ศุสิทธิ์ แสงกระจ่าง และคณะ, 2556) มีคุณสมบัติคล้ายคลึงกับพอลิสไตรีน มีความโปร่งใสสูง สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ ย่อยสลายในกระบวนการหมักได้ (compostable) ทนต่อการละลายน้ำ การกระแทก มีความต้านทานน้ำมันและไขมันได้ดี แก๊สออกซิเจน, คาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำแพร่ผ่านได้ดี (Suksawad and Prathum-aree, 2012) และมีโครงสร้างทั่วไปดังรูปที่ 1.3



รูปที่ 1.3 โครงสร้างทั่วไปของ PLA (Urbanek et al., 2018)

เทอร์โมพลาสติกสตา์ช (TPS)

เป็นพอลิเมอร์ที่มีแป้งเป็นวัตถุดิบหลัก หรือเทอร์โมพลาสติกที่ผลิตขึ้นจากแป้ง และผ่านกระบวนการทำลายพันธะไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุลแป้งที่ด้วยพลังงานกลในการผลิต โดยแป้งที่ใช้จะต้องมีปริมาณน้ำต่ำ และมีระดับการทำลายโครงสร้างสูง ซึ่งจะทำให้มีคุณสมบัติเหมือนเทอร์โมพลาสติกทั่วไป มีการหลอมไหวได้ ขึ้นรูปได้ (Liu et al., 2009) และในกระบวนการผลิตจะต้องมีการเติมพลาสติกไซเซอร์ เพื่อป้องกันการสลายตัวของแป้งเมื่อผ่านอุณหภูมิสูงลักษณะคล้ายเทอร์โมเซต (thermoset polymer) ซึ่งพลาสติกไซเซอร์จะช่วยลดแรงยึดเหนี่ยวระหว่างสายโซ่ของโมเลกุลแป้ง ให้สามารถหลอมขึ้นรูปได้ และเพื่อป้องกันการกลับคืนความเป็นผลึกของแป้งเมื่อสัมผัสความชื้น เพราะ TPS มีความไวต่อความชื้นสูง (สามารถดูดความชื้นได้) (ไพโรจน์ ใบบตาเฮ, 2555) และมีโครงสร้างทั่วไปดังรูปที่ 1.4



รูปที่ 1.4 โครงสร้างทั่วไปของ TPS (สถาบันพลาสติก, 2558a)

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนากระบวนการรีไซเคิลชีวภาพโดยการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ ด้วยเชื้อแบคทีเรียที่มีการศึกษาก่อนหน้านี้แล้วว่ามีประสิทธิภาพในการผลิต PHAs 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Cupriavidus necator* strain A-04, เชื้อที่คัดแยกโดยนางสาวกนกจันทร์ ใจบุญ *Burkholderia contaminans* SCN-KJ และเชื้อที่คัดแยกโดยนายศิริราชย์ นันทะชัย *Burkholderia gladioli* A7 เพื่อผลิต PHAs ขึ้นจากการใช้พลาสติกชีวภาพดังกล่าวเป็นแหล่งคาร์บอน

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้สายพันธุ์ของจุลินทรีย์และชนิดของพลาสติกที่สามารถให้ผลผลิตเป็นปริมาณของ PHAs อย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุด

บทที่ 2

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการทดลอง

2.1 อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์

2.1.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. ขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask) ของบริษัท Pyrex Ltd., USA
2. ขวดลดความดัน (suction flask) ของบริษัท Pyrex Ltd., USA
3. ปีกเกอร์ (beaker) ของบริษัท Pyrex Ltd., USA
4. กระบอกตวง (cylinder) ของบริษัท Pyrex Ltd., USA
5. หลอดทดลองฝาเกลียว (screw-cap tube) ของบริษัท Pyrex Ltd., USA
6. ไมโครปิเปต (micropipette) รุ่น P2, P20, P200 และ P1000 ของบริษัท Gilson Scientific Ltd., France
7. หลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ (microcentrifuge tube) ของบริษัท Sigma-Aldrich Co.Ltd., USA
8. หลอดเก็บเชื้อแช่แข็ง (cryotube) ของบริษัท Bioadvance Co. Ltd., Thailand
9. เครื่องผสมสาร (vortex mixer) รุ่น G-560E ของบริษัท Science Industries Inc., USA
10. เครื่องชั่งสารแบบหยาบ (laboratory balance) รุ่น PG 2002-S ของบริษัท Metter Toledo Co. Ltd., Switzerland และรุ่นATX224R ของบริษัท Shimadzu Corp., Ltd.,Japan
11. เครื่องชั่งสารแบบละเอียด (analytical balance) รุ่น AG 204 ของบริษัท Metter Toledo Co. Ltd., Switzerland และรุ่น ของบริษัท Shimadzu Corp., Ltd.,Japan
12. เครื่องปั่นเหวี่ยงสาร (centrifuge) รุ่น 5810 R และ 5810 R ของบริษัท Eppendorf (Thailand) Co., Ltd., Thailand
13. ตู้ปลอดเชื้อ biosafety Cabinet class 2 รุ่น BSC-1100IIA2-X ของบริษัท Biobase Biodustry (Shandong) Co., Ltd., China
14. ตู้บ่มเชื้อแบบควบคุมอุณหภูมิ (incubator) รุ่น D06062 ของบริษัท Kubota Co. Ltd., Japan
15. ตู้อบแห้ง (hot air oven) ของบริษัท Memmert Co. Ltd., Germany
16. ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ของบริษัท Mitsubishi Electric Co. Ltd., Japan
17. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) -20 องศาเซลเซียส ของบริษัท Sanyo electric Co. Ltd., Japan

18. เครื่องวัดความเป็นกรด - ด่าง (pH meter) รุ่น S20 SevenEasy™ pH ของบริษัท Mettler Toledo Co. Ltd., Switzerland
19. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (visible spectrophotometer) รุ่น BIOMATE 3S UV-Vis ของบริษัท Thermo Fisher Scientific Inc., USA
20. ควอร์ต คิวเวท (quartz cuvette) ของบริษัท K N science innovaton Co. Ltd., Thailand
21. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น SS-325 และ ES-215 ของบริษัท Tomy Seiko Ltd., Tokyo, Japan
22. เตาแม่เหล็กไฟฟ้า (induction cooker) รุ่น NC 501 ของบริษัท Nesco Ltd., Thailand
23. กล่องถ่ายภาพสตูดิโอ (lighting studio box) รุ่น UDIOBIZ 40D ของบริษัท Udiobox Ltd., Thailand
24. สกรูเกลไมโครมิเตอร์ (micrometer screw gauge) ของบริษัท Mitutoyo (Thailand) Co.,Ltd., Thailand
25. ลูกยางซิลิโคน (silicone Bulb) ของบริษัท T. C. Sathaporn Group Ltd., Part., Thailand
26. กระจาดาชกรองเซลลูโลสไนเตรท 0.45 ไมครอน (cellulose nitrate filter) ของบริษัท Sartorius stedim biotech Ltd., Germany
27. ถาดแม่พิมพ์แก้ว (glass baking bowl) ของบริษัท Pyrex Ltd., USA

2.1.2 เคมีภัณฑ์

1. ผงโพลีเมอร์ของพอลิ(ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) (PHBV) ของบริษัท Tianan biologic material Co. Ltd., China
2. เม็ดพลาสติกพอลิแลกติกแอซิด (PLA) ของบริษัท Greenwill Solution Co.,Ltd., Thailand
3. คลอโรฟอร์ม (chloroform, CHCl_3) ของบริษัท Merck Ltd., Germany
4. อะซิโตน (Acetone, $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$) ของบริษัท RCI Labscan Co., Ltd., Thailand
5. สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Springer Co., Ltd., France
6. สารสกัดจากเนื้อ (beef extract) ของบริษัท Lavscan Asia Co., Ltd., Ireland
7. เพปโตน (peptone) ของบริษัท Lavscan Asia Co., Ltd., Ireland
8. โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride, NaCl) ของบริษัท Merck Ltd., Germany
9. วุ้นผง (agar) ของบริษัท Egton Medical Information Systems Ltd., Chile
10. แอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) ของบริษัท T. C. Sathaporn Group Ltd., Part., Thailand

11. เมทานอล (methanol, CH_3OH) ของบริษัท Merck Ltd., Germany

2.2 วิธีการดำเนินงาน

2.2.1 การเตรียมแหล่งคาร์บอน

2.2.1.1 การขึ้นรูปแผ่นฟิล์มพลาสติกชีวภาพชนิด PHBV

การขึ้นรูปแผ่นฟิล์ม PHBV ด้วยวิธี solvent casting technique (Doi et al., 1995) โดยนำ PHBV มาละลายในคลอโรฟอร์มให้มีความเข้มข้น 1% (น้ำหนักต่อปริมาตร) จากนั้นนำไปต้มให้ละลายสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เทสารละลายพอลิเมอร์ลงในถาดแม่พิมพ์แก้ว แล้วนำแผ่นพอยด์มาคลุมถาดแม่พิมพ์แก้ว พร้อมเจาะรู จากนั้นทิ้งให้แผ่นฟิล์มตกผลึกที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 - 5 วัน ต่อมานำแผ่นฟิล์มมาตัดด้วยคัตเตอร์ให้มีขนาด 2×2 เซนติเมตร แล้วนำแผ่นฟิล์มที่ตัดเรียบร้อยแล้วไปอบให้แห้งในตู้อบแห้ง จากนั้นนำมาเก็บข้อมูลทางกายภาพของแผ่นฟิล์ม

2.2.1.2 การขึ้นรูปแผ่นฟิล์มพลาสติกชีวภาพชนิด PLA

การขึ้นรูปแผ่นฟิล์ม PLA ตามวิธี solvent casting technique ของ (Doi et al., 1995) โดยนำเม็ดพลาสติก PLA มาละลายในคลอโรฟอร์มให้มีความเข้มข้น 1% (น้ำหนักต่อปริมาตร) จากนั้นนำไปต้มให้ละลายสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส แล้วเทสารละลายพอลิเมอร์ลงในถาดแม่พิมพ์แก้ว นำแผ่นพอยด์มาคลุมถาดแม่พิมพ์แก้ว พร้อมเจาะรู จากนั้นทิ้งให้แผ่นฟิล์มตกผลึกที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 - 5 วัน ต่อมานำแผ่นฟิล์มมาตัดด้วยคัตเตอร์ให้มีขนาด 2×2 เซนติเมตร จากนั้นนำแผ่นฟิล์มที่ตัดเรียบร้อยแล้วไปอบให้แห้งในตู้อบแห้ง จากนั้นนำมาเก็บข้อมูลทางกายภาพของแผ่นฟิล์ม

2.2.1.3 การเตรียมพลาสติกชีวภาพชนิด เทอร์โมพลาสติกสตาร์ช

โดยในการทดลองนี้ใช้เป็นถักรักขโลกมาใช้เป็นฟิล์มของพลาสติกชีวภาพชนิด เทอร์โมพลาสติกสตาร์ชมาตัดด้วยคัตเตอร์ให้มีขนาด 2×2 เซนติเมตร นำแผ่นฟิล์มที่ตัดเรียบร้อยแล้วไปอบให้แห้งในตู้อบแห้ง จากนั้นนำมาเก็บข้อมูลทางกายภาพของแผ่นฟิล์ม

2.2.2 การย่อยสลายพลาสติกชีวภาพในขวดเขย่า

2.2.2.1 การเตรียมหัวเชื้อของ *Cupriavidus necator* strain A-04

เลี้ยงเชื้อ *C. necator* strain A-04 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง NA (ภาคผนวก ก1) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน เพื่อเป็นการกระตุ้นการเจริญแก่เชื้อ จากนั้นนำเชื้อที่กระตุ้นแล้วมาเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนในอาหารสูตรอุดมสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ (Chanprateep and Kulpreecha, 2006) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใน

พลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 วัน ต่อมาดูดเพื่อเลี้ยงเป็นกล้าเชื้อในอาหารอุดมสมบูรณ์(ภาคผนวก ก3) (Chanprateep and Kulpreecha, 2006) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 วัน เมื่อครบกำหนดเวลาจึงนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนของเหลวทิ้ง ล้างตะกอนเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 % ที่ปราศจากเชื้อ 1 ครั้ง จากนั้นแขวนลอยตะกอนเซลล์ที่ได้ด้วยน้ำด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 % ที่ปราศจากเชื้อเพื่อเตรียมเป็นหัวเชื้อ

2.2.2.2 การเตรียมหัวเชื้อของเชื้อ *Burkholderia contaminans* SCN-KJ และ *Burkholderia gladioli* A7

เลี้ยงเชื้อทั้งสองชนิดบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง NA ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน เพื่อเป็นการกระตุ้นการเจริญแก่เชื้อ จากนั้นนำเชื้อที่กระตุ้นแล้วมาเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YP ความเข้มข้น 1 เท่า (ภาคผนวก ก2) ซึ่งเป็นอาหารที่ใช้ในการคัดแยกเชื้อมาจากธรรมชาติ ปริมาตร 200 มิลลิลิตรต่อเชื้อ 1 ชนิด ใน พลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 วัน เมื่อครบกำหนดเวลาจึงนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาทีสำหรับเชื้อ *B. gladioli* A7 และ 30 นาทีสำหรับเชื้อ *B. contaminans* SCN-KJ จากนั้นเทส่วนของเหลวทิ้ง ล้างตะกอนเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 % ที่ปราศจากเชื้อ 1 ครั้ง จากนั้นแขวนลอยตะกอนเซลล์ที่ได้ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 % ที่ปราศจากเชื้อ เพื่อเตรียมเป็นหัวเชื้อ

2.2.2.3 การย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ

ใส่หัวเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดที่เตรียมในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YP ความเข้มข้น 0.1 เท่า (ภาคผนวก ก4) เป็น 5 % ของปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร โดยมีแผ่นฟิล์มพลาสติกชีวภาพขนาด 2 × 2 เซนติเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยการแช่สารละลายเอทานอลความเข้มข้น 70 % เป็นเวลา 10 นาที เป็นแหล่งคาร์บอน เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่ 0, 3, 7, 10 และ 14 วัน เมื่อครบกำหนดเวลาจะนำไปวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง ตามวิธีข้อ 2.2.2.4 การวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์สูญเสียมวลของแผ่นฟิล์ม ตามวิธีข้อ 2.2.2.5 วิเคราะห์ค่าความเป็นกรด - ด่าง ตามวิธีข้อ 2.2.2.6 วิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสง ตามวิธีข้อ 2.2.2.7 ย้อม Sudan black B ตามวิธีข้อ 2.2.2.8 และวิเคราะห์ปริมาณของ PHAs ตามวิธีข้อ 2.2.2.9

2.2.2.4 การวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง

นำกระดาษกรองเซลลูโลสไนเตรท 0.45 ไมครอนไปอบในตู้อบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน แล้วนำมาชั่งน้ำหนักก่อนทำการกรองเซลล์ โดยกรองเชื้อในอาหารเหลวปริมาตร 2 มิลลิลิตร บนกระดาษกรอง จากนั้นนำไปอบในตู้อบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน แล้วนำมาชั่งน้ำหนักหลังการกรอง คำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้งในหน่วยกรัมต่อลิตร

2.2.2.5 การวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์สูญเสียมวลของแผ่นฟิล์ม

เมื่อครบกำหนดเวลาเก็บตัวอย่าง นำแผ่นฟิล์มพลาสติกชีวภาพที่ผ่านการบ่มตามเวลา มาล้างด้วยน้ำปราศจากไอออน 2 ครั้ง จากนั้นนำไปอบในตู้อบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน แล้วนำมาชั่งน้ำหนักหลังการเลี้ยงเชื้อ คำนวณหาเปอร์เซ็นต์สูญเสียมวลของแผ่นฟิล์ม

2.2.2.6 การวิเคราะห์ความเป็นกรด - ต่าง

นำเชื้อในอาหารเหลวที่ครบกำหนดเวลาเก็บตัวอย่างมาวัดค่าความเป็นกรด - ต่าง ด้วยเครื่องวัดความเป็นกรด-ต่าง (pH meter) ที่ผ่านการสอบเทียบ (calibration) เรียบร้อยแล้ว แล้วนำค่ามาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเวลาและความเป็นกรด - ต่าง

2.2.2.7 การวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสง

นำเชื้อในอาหารเหลวที่ครบกำหนดเวลาเก็บตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนของเหลวทิ้ง ล้างตะกอนเซลล์และแขวนลอยด้วยน้ำปราศจากไอออน นำสารแขวนลอยมาวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ 600 นาโนเมตร แล้วนำค่ามาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเวลาและค่าความดูดกลืนแสง

2.2.2.8 การย้อมสี Sudan black B

นำเชื้อที่แขวนลอยด้วยน้ำปราศจากไอออน นำเซลล์แขวนลอยมากระจายบนสไลด์ แล้วทำให้ติดแน่นโดยใช้ความร้อน ย้อมด้วย Sudan black B เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลาล้างด้วยน้ำปราศจากไอออน ต่อมาหยด Safanin O เป็นเวลา 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำปราศจากไอออน และนำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง โดยไขมันจะย้อมติดสีม่วงดำ และเซลล์จะย้อมติดสีแดง

2.2.2.9 การวิเคราะห์ปริมาณของ PHAs

นำเชื้อในอาหารเหลวที่ครบกำหนดเวลาเก็บตัวอย่างที่เหลือนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 12 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เทส่วนของเหลวทิ้ง ล้างตะกอนเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 % ที่ปราศจากเชื้อหนึ่งครั้ง นำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นชั่งเซลล์แห้งหนัก 20 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดฝาเกลียว เต็มคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

จากนั้นเติมกรดเบนโซอิก 2 กรัมต่อลิตรที่ละลายอยู่ใน 3 % กรดซัลฟูริกในเมทานอล ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ปิดฝาให้สนิท นำไปต้มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง โดยทุก ๆ 30 นาทีจะนำมาเขย่าเป็นเวลา 1 นาที เมื่อครบเวลา นำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเติมน้ำที่ปราศจากไอออนปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าผสมเป็นเวลา 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้สารแยกชั้น แล้วใช้ฟาสเจอร์ปีเปตต์ดูดชั้นของคลอโรฟอร์มด้านล่าง เพื่อจำไปวิเคราะห์ปริมาณ PHAs ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี (gas chromatography) โดยมีสภาวะ ดังนี้

เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี	: รุ่น 3400C ของบริษัท Varian, USA
คอลัมน์	: แคพิลลารีคอลัมน์ แบบ Cabowax-PEG ขนาด 60m x 25mm ID x 25 μ m Df :250
อุณหภูมิอินเจคเตอร์ (injector)	: 250 องศาเซลเซียส
อุณหภูมิคอลัมน์	: 140 องศาเซลเซียส
อุณหภูมิดีเทคเตอร์ชนิด flame ionization	: 250 องศาเซลเซียส
อัตราส่วนการสพลิต (split ratio)	: 50 ต่อ 1
ก๊าซตัวพา	: N₂ อัตราการไหล 2 มิลลิลิตรต่อนาที : O₂ อัตราการไหล 2 มิลลิลิตรต่อนาที : H₂ อัตราการไหล 2 มิลลิลิตรต่อนาที
ปริมาตรฉีด	: 1 ไมโครลิตร

จากนั้นคำนวณตามวิธีของ (Chanprateep and Kulpreecha, 2006) เพื่อหาปริมาณของ PHAs

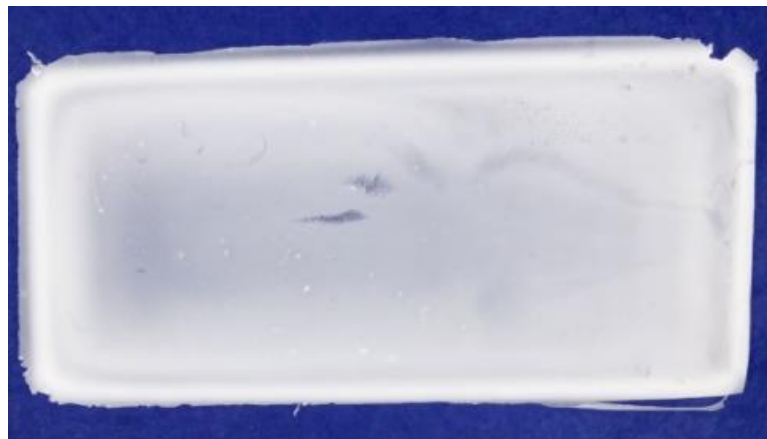
บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 การเตรียมแหล่งคาร์บอน

3.1.1 การขึ้นรูปแผ่นฟิล์มพลาสติกชีวภาพชนิด PHBV

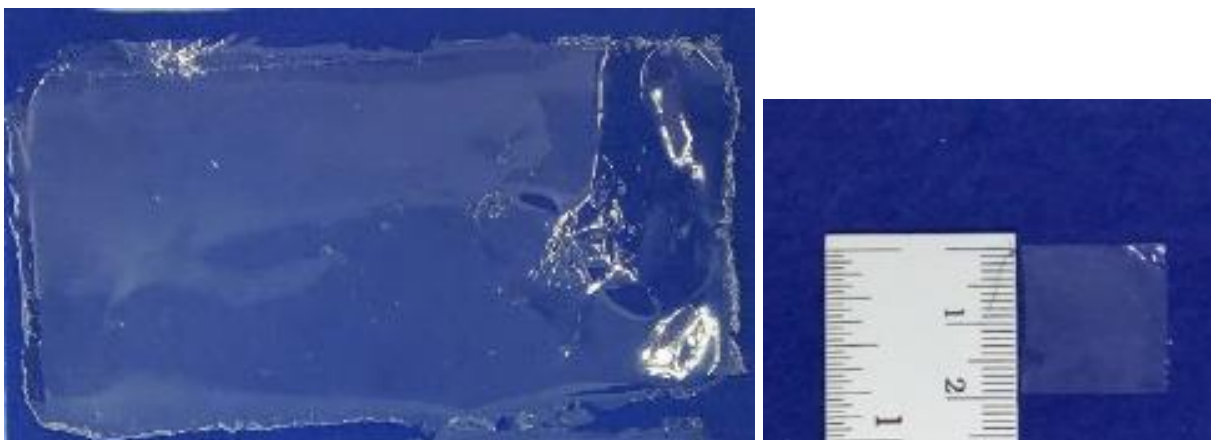
จากการขึ้นรูปแผ่นฟิล์ม PHBV ด้วยวิธี solvent casting technique ของ (Doi et al., 1995) พบว่าได้แผ่นฟิล์มลักษณะสีขาวขุ่น บางจุดโปร่งแสง มีผลึกสีขาวกระจายประปราย ผิวด้านที่บแสง ขนาดกว้าง 7.5 เซนติเมตร ยาว 15.5 เซนติเมตร ดังแสดงในรูปที่ 3.1 แต่เนื่องจากมหาวิทยาลัยปิดทำการจากสถานการณ์โรคระบาด COVID-19 จึงยังไม่ได้ทำการทดลองจนเสร็จสมบูรณ์



รูปที่ 3.1 ลักษณะแผ่นฟิล์ม PHBV

3.1.2 การขึ้นรูปแผ่นฟิล์มพลาสติกชีวภาพชนิด PLA

จากการขึ้นรูปแผ่นฟิล์ม PLA ตามวิธี solvent casting technique (Doi et al., 1995) พบว่าได้แผ่นฟิล์มลักษณะโปร่งใส ผิวมัน ขนาดกว้าง 7.5 เซนติเมตร ยาว 15.5 เซนติเมตร จากนั้นนำมาตัดให้มีขนาด 2 x 2 เซนติเมตร ดังแสดงในรูปที่ 3.2 แผ่นฟิล์มหลังตัดมีน้ำหนักโดยเฉลี่ย 5.8 ± 0.28 มิลลิกรัม



รูปที่ 3.2 ก่อนและหลังตัดแผ่นฟิล์ม PLA ให้มีขนาด 2 x 2 เซนติเมตร

3.1.3 การเตรียมพลาสติกชีวภาพชนิด เทอร์โมพลาสติกสตา์ช

นำถุงรักษ์โลกของบริษัท Advanced Know-How Co., Ltd. ลักษณะสีขาวขุ่น ผิวด้าน ถุงมีขนาดกว้าง 14.3 เซนติเมตร ยาว 28.0 เซนติเมตร ตัดให้มีขนาด 2 x 2 เซนติเมตร ดังแสดงในรูปที่ 3.3 แผ่นฟิล์มหลังตัดมีน้ำหนักโดยเฉลี่ย 10.4 ± 5.3 มิลลิกรัม



รูปที่ 3.3 ก่อนและหลังตัดแผ่นฟิล์ม TPS ให้มีขนาด 2 x 2 เซนติเมตร

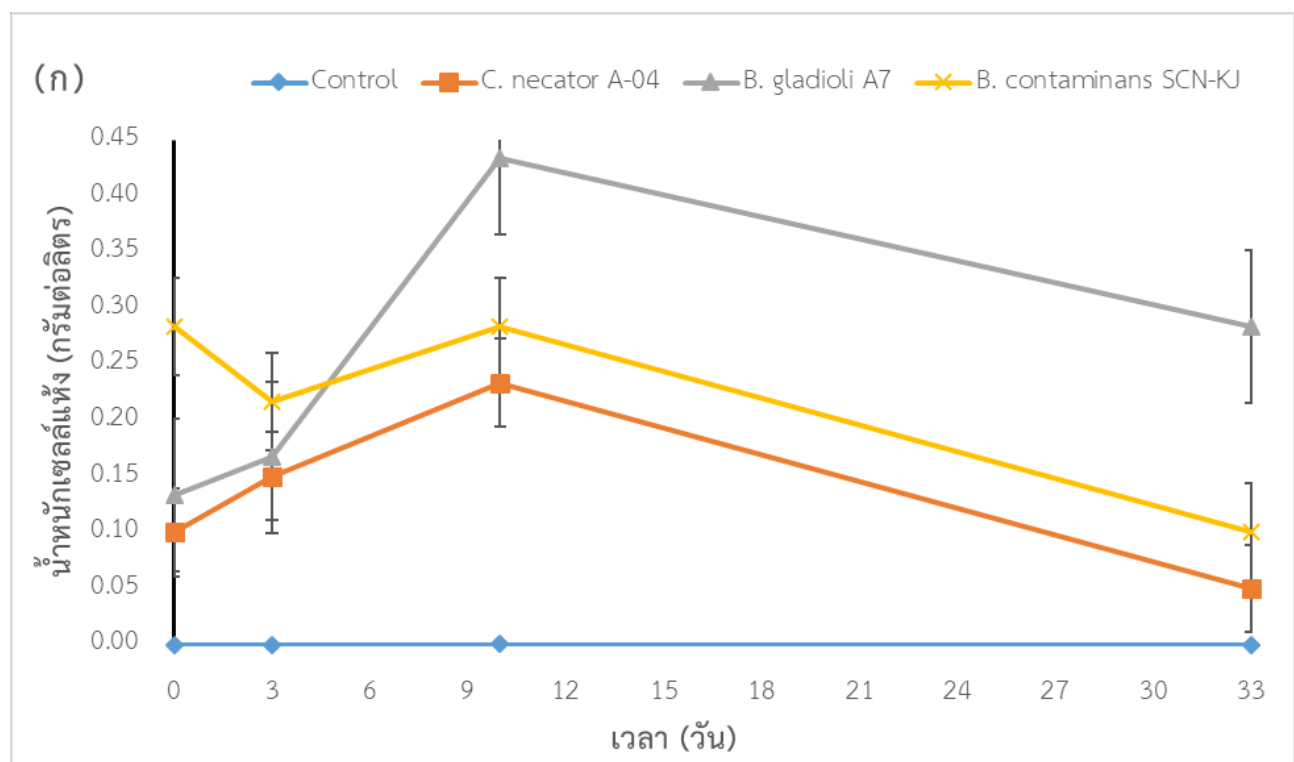
3.2 การย่อยสลายพลาสติกชีวภาพในขวดเขย่า

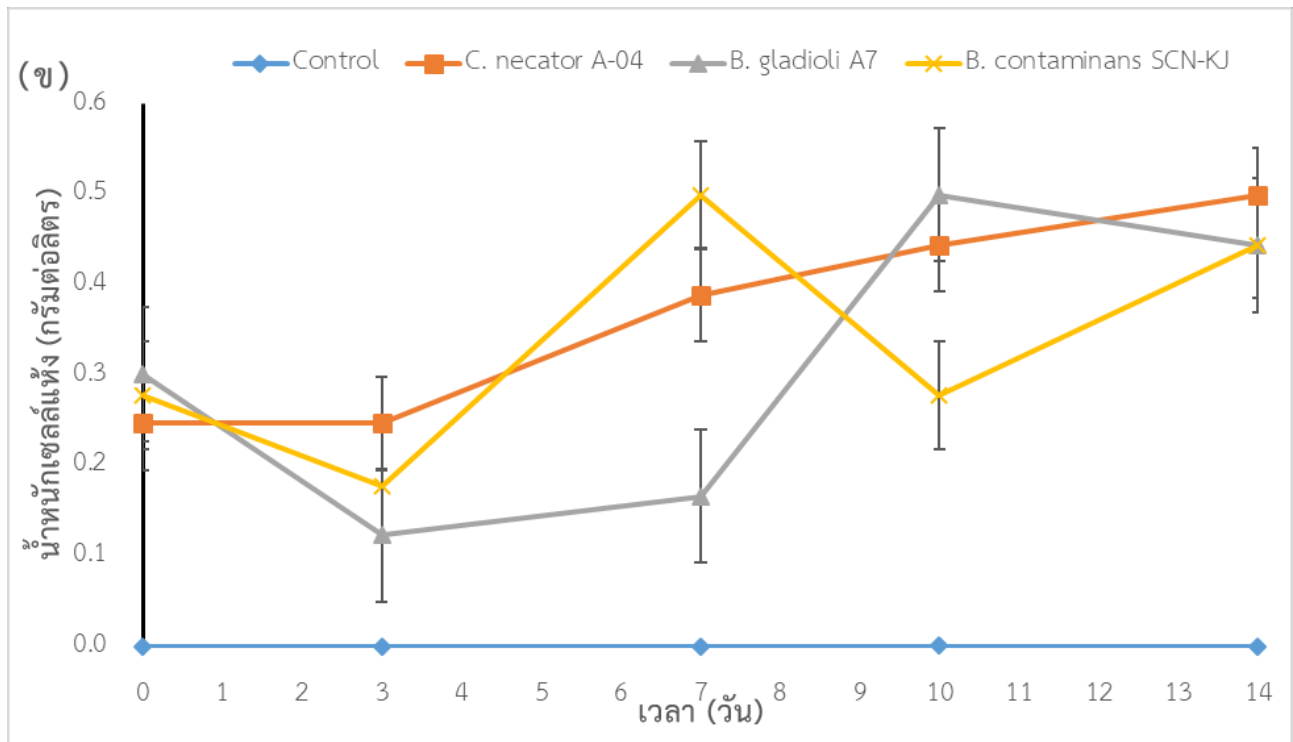
จากการนำแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิต PHAs ทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ *C. necator* A-04, เชื้อ *B. contaminans* SCN+KJ คัดแยกโดยนางสาวกนกจันทร์ ใจบุญ และเชื้อ *B. gladioli* A7 คัดแยกโดยนายศิริราชย์ นันทะชัย เพื่อทดสอบการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพทั้งสามชนิดข้างต้น ในระดับขวดเขย่า โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว YP ความเข้มข้น 0.1 เท่า เพื่อให้เชื้ออยู่ในสภาวะขาดแคลนแหล่งคาร์บอนและคาดว่าจะย่อยสลายพลาสติกชีวภาพเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยมีแผ่นฟิล์มพลาสติกชีวภาพขนาด 2 x 2 เซนติเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยการแช่สารละลายเอทานอลความเข้มข้น 70 % เป็นเวลา 10 นาที เป็นแหล่งคาร์บอน เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (สำหรับ *C. necator* strain A-04) และ 37 องศาเซลเซียส (สำหรับ *B. contaminans* SCN-KJ และ *B. gladioli* A7) อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่ 0, 3, 7, 10 และ 14 วัน (33 วัน ในการเลี้ยงเชื้อด้วยพลาสติกชีวภาพ PLA เนื่องจากมหาวิทยาลัยปิดทำการจากสถานการณ์โรคระบาด COVID-19 ไม่สามารถเข้าไปเก็บผลได้ตามที่วางแผนไว้) เพื่อวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง เปอร์เซ็นต์สูญเสียมวลของแผ่นฟิล์ม ค่าความเป็นกรด - ด่าง ค่าการดูดกลืนแสง ย้อมสี Sudan black B และปริมาณของ PHAs ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี

3.3 วิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง

จากการนำตัวอย่างที่ป่มตามระยะเวลาที่กำหนดมากรองเซลล์ โดยใช้กรองกระดาษกรองเซลลูโลสไนเตรท 0.45 ไมครอน พบว่า ในการเลี้ยงเชื้อทั้งสามสายพันธุ์ โดยใช้พลาสติกชีวภาพชนิด PLA เป็นแหล่งคาร์บอนนั้น ในตอนเริ่มต้น *B. contaminans* SCN-KJ จะค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงที่สุดเป็น 0.33 กรัมต่อลิตร รองลงเป็น *C. necator* A-04 (0.10 กรัมต่อลิตร) และ *B. gladioli* A7 (0.13 กรัมต่อลิตร) ตามลำดับ มีการเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในวันที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อสำหรับ *B. contaminans* SCN-KJ และ *B. gladioli* A7 ในวันที่ 7 ของการเลี้ยงเชื้อทั้งสามสายพันธุ์มีการลดลงอย่างชัดเจนของน้ำหนักเซลล์แห้ง จากนั้นเพิ่มสูงขึ้นมีจุดสูงสุดในวันที่ 10 และค่อย ๆ ลดต่ำลงในวันที่ 33 ของการเลี้ยงเชื้อ โดยเชื้อ *B. gladioli* A7 (0.28 กรัมต่อลิตร) มีค่าของน้ำหนักเซลล์แห้งสุดท้ายสูงที่สุด ตามมาด้วย A7 (0.10 กรัมต่อลิตร) *B. contaminans* SCN-KJ (0.05 กรัมต่อลิตร) ตามลำดับ ดังแสดงในรูป 3.4 (ก)

และในการเลี้ยงเชื้อโดยใช้พลาสติกชีวภาพ ชนิด TPS เป็นแหล่งคาร์บอน ในวันที่ 0 *B. contaminans* SCN-KJ จะค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงที่สุดเป็น 0.30 กรัมต่อลิตร รองลงเป็น *C. necator* A-04 (0.28 กรัมต่อลิตร) และ *B. gladioli* A7 (0.25 กรัมต่อลิตร) ตามลำดับ มีการลดลงเล็กน้อยในวันที่ 3 สำหรับ *B. contaminans* SCN-KJ และ *B. gladioli* A7 ต่อมา มีการเพิ่มขึ้นเห็นได้ชัดของน้ำหนักเซลล์แห้งจนเป็นจุดสูงสุดในวันที่ 7 สำหรับ *B. contaminans* SCN-KJ ส่วน *B. gladioli* A7 และ *C. necator* A-04 เพิ่มขึ้นอย่างช้า ๆ ต่อมาในวันที่ 10 *B. contaminans* SCN-KJ มีการลดต่ำลงจนถึงจุดต่ำสุดต่างจากอีกสองสายพันธุ์ที่เพิ่มขึ้น และในวันที่ 14 A-04 มีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงที่สุด เป็น 0.50 กรัมต่อลิตร รองลงมาเป็น *B. contaminans* SCN-KJ และ *B. gladioli* A7 ที่มีค่าเท่ากันเป็น 0.44 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในรูป 3.4 (ข)





รูปที่ 3.4 ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้งกับเวลา โดยใช้พลาสติกชีวภาพ (ก) PLA และ (ข) TPS เป็นแหล่งคาร์บอน

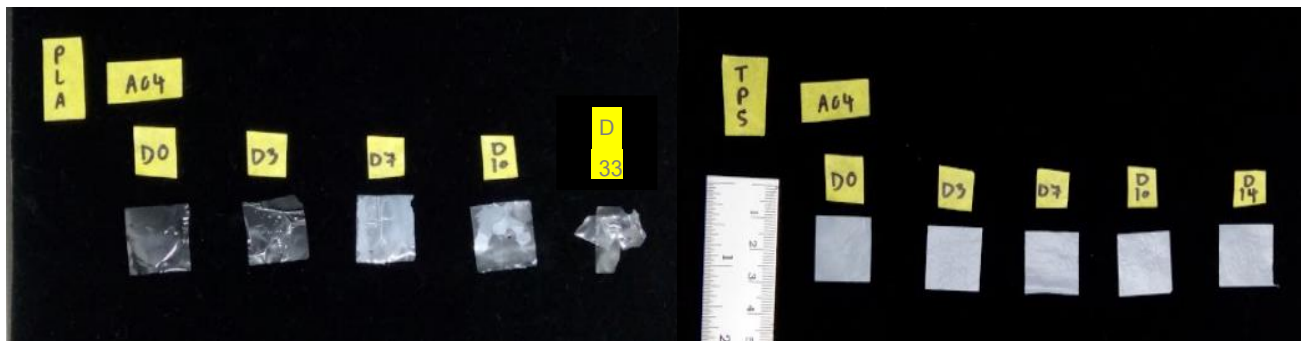
3.3 วิเคราะห์เปอร์เซ็นต์สูญเสียมวลของแผ่นฟิล์ม

จากการทดสอบการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพในระดับขวดเขย่า เมื่อกำหนดเวลาเก็บตัวอย่างจะนำแผ่นฟิล์มพลาสติกชีวภาพมาล้างด้วยน้ำปราศจากไอออน 2 ครั้ง จากนั้นนำไปอบในตู้อบแห้ง จะพบว่า ในการเลี้ยงเชื้อด้วยพลาสติกชีวภาพชนิด PLA เมื่อเวลาผ่านไปจะพบการย่อยสลายของแผ่นฟิล์มมากยิ่งขึ้น แม้จะอยู่ในชุดควบคุม (รูปที่ 3.5) ที่ปราศจากการใส่เชื้อก็ตาม โดยในชุดทดลองที่มีการใส่เชื้อ จะเห็นได้ว่า *B. gladioli* A7 มีการย่อยสลายของแผ่นฟิล์มได้ดีที่สุด ถึง 11 เปอร์เซ็นต์ในวันที่ 33 ของการบ่ม รองลงมาคือ *B. contaminans* SCN-KJ ที่มีจุดสูงสุดเปอร์เซ็นต์การสูญเสียมวลอยู่ที่ 8 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 10 ตามมาด้วย *C. necator* A-04 (3 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 10) และชุดควบคุม 2 เปอร์เซ็นต์ในวันที่ 33 ดังแสดงในรูปที่ 3.9 (ก)

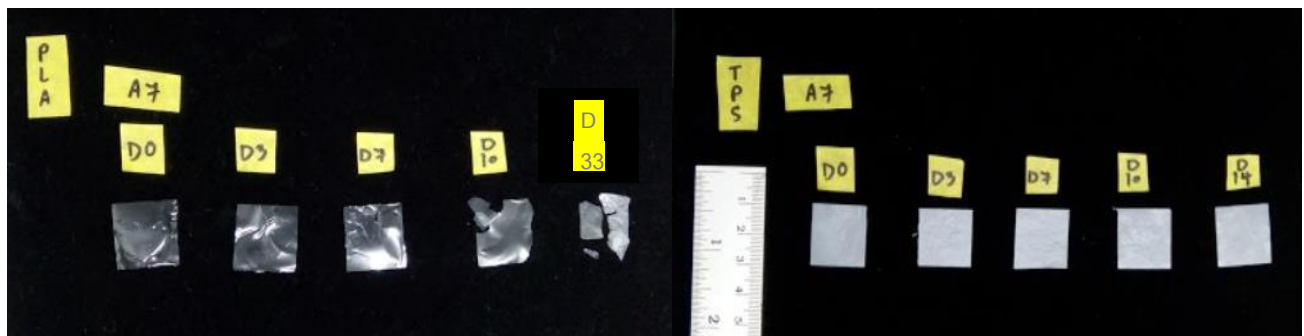
แต่ทว่าในการเลี้ยงเชื้อโดยใช้พลาสติกชีวภาพ ชนิด TPS เป็นแหล่งคาร์บอนนั้นแทบไม่พบการย่อยสลายที่เห็นได้ชัด แต่เมื่อนำมาวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การสูญเสียมวลจากการชั่งน้ำหนักของแผ่นฟิล์มพบว่าการสูญเสียมวลเกิดขึ้น โดยมี *B. gladioli* A7 เป็นสายพันธุ์ที่มีการสูญเสียมวลมากที่สุด เป็น 4 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 10 รองลงมาเป็น *B. contaminans* SCN-KJ (เป็น 3 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 14) และ *C. necator* A-04 (ตั้งแต่วันที่ 7) กับชุดควบคุม (ในวันที่ 14) เป็น 2 เปอร์เซ็นต์เท่ากัน ดังแสดงในรูปที่ 3.9 (ข)



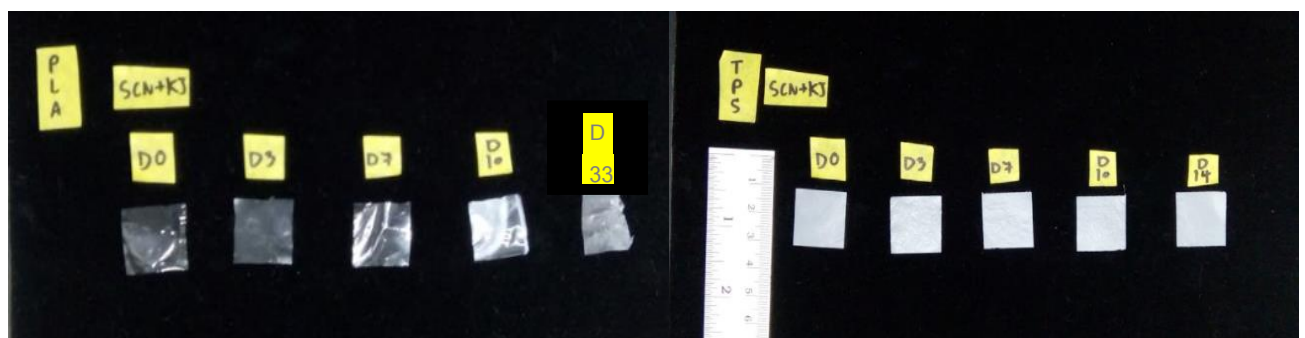
รูปที่ 3.5 แผ่นฟิล์ม PLA และ TPS หลังการย่อยสลายในชุดควบคุม



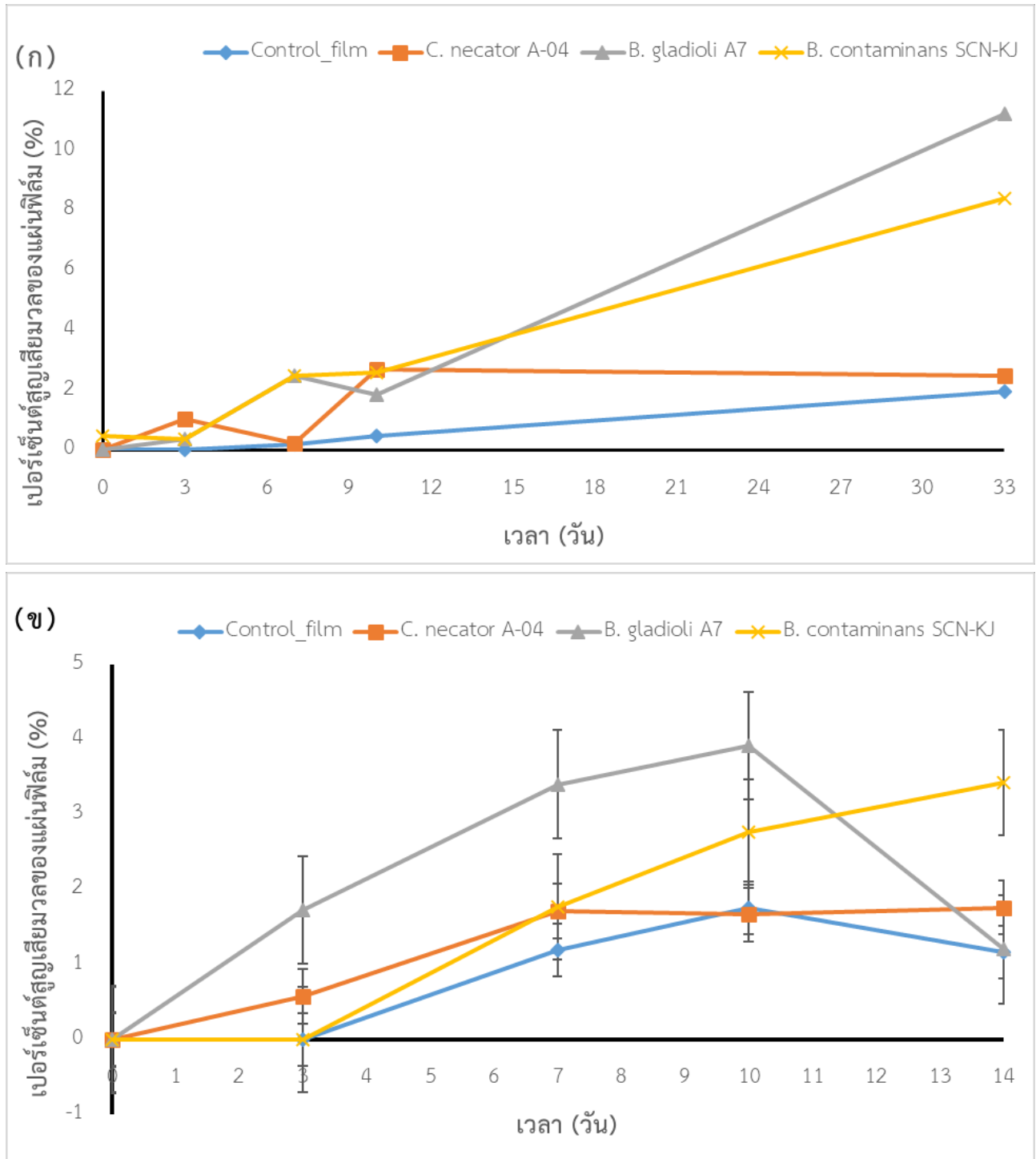
รูปที่ 3.6 แผ่นฟิล์ม PLA และ TPS หลังการย่อยสลายด้วย *C. necator* A-04



รูปที่ 3.7 แผ่นฟิล์ม PLA และ TPS หลังการย่อยสลายด้วย *B. gladioli* A7



รูปที่ 3.8 แผ่นฟิล์ม PLA และ TPS หลังการย่อยสลายด้วย *B. contaminans* SCN+KJ



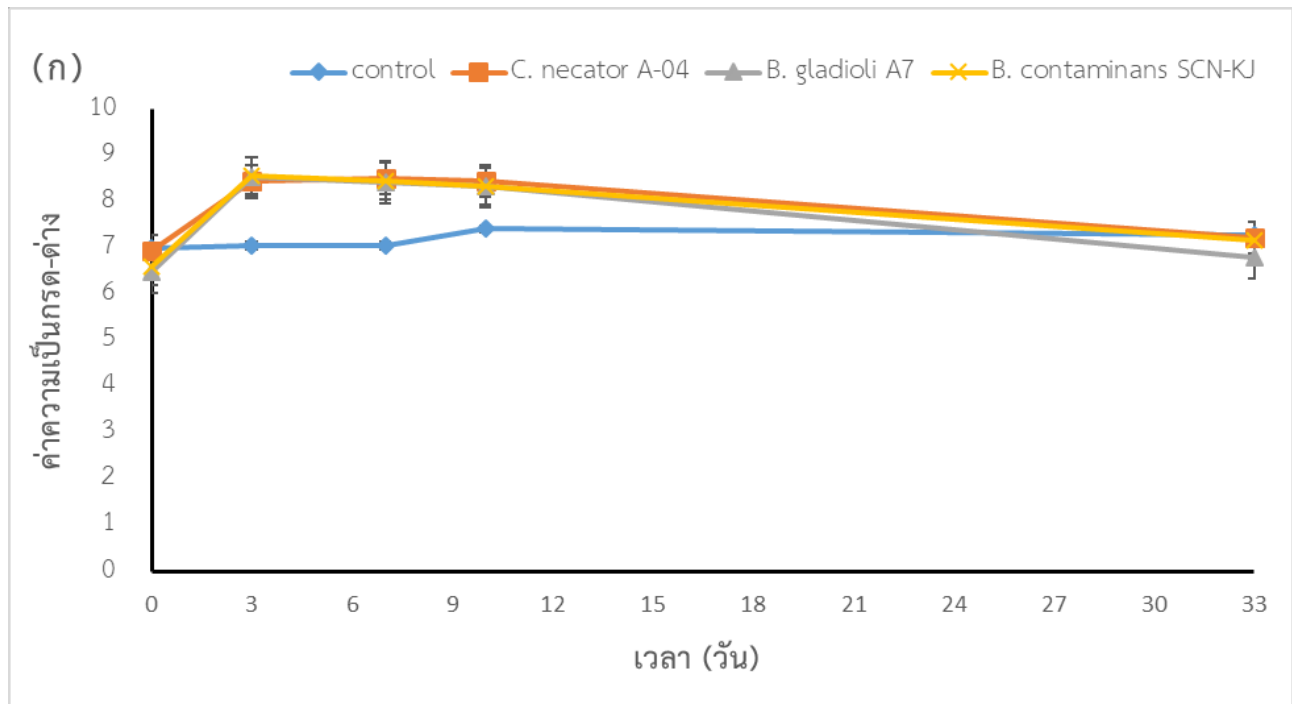
รูปที่ 3.9 ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์สูญเสียมวลของแผ่นฟิล์มกับเวลา โดยใช้พลาสติกชีวภาพ (ก)

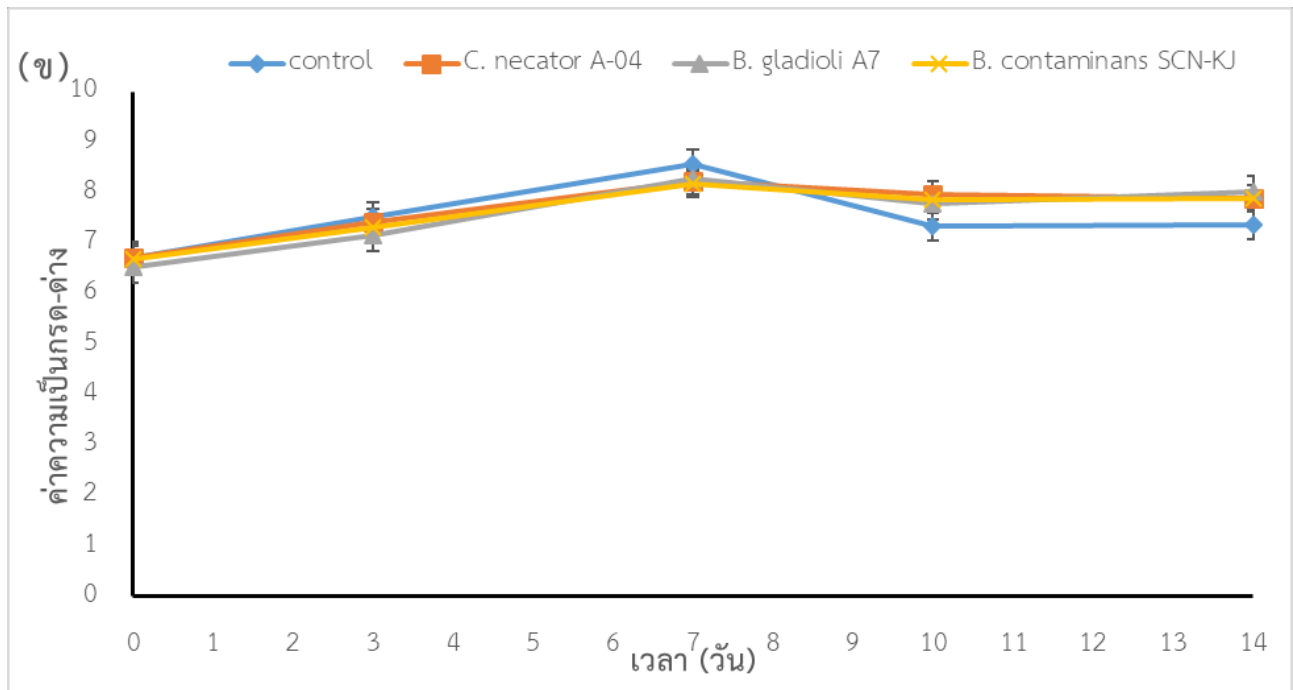
PLA และ (ข) TPS เป็นแหล่งคาร์บอน

3.5 วิเคราะห์ค่าความเป็นกรด - ด่าง

จากการนำตัวอย่างที่ป่มตามระยะเวลาที่กำหนดมาวัดค่าความเป็นกรด - ด่างด้วยเครื่องวัดความเป็นกรด - ด่าง (pH meter) ที่ผ่านการสอบเทียบแล้ว พบว่า ในการเลี้ยงเชื้อโดยใช้พลาสติกชีวภาพ ชนิด PLA เป็นแหล่งคาร์บอนนั้น ทั้งสามสายพันธุ์ของเชื้อที่นำมาทดสอบมีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด - ด่างเหมือนกัน โดยที่เริ่มต้นการทดสอบจะมีค่าความเป็นกรด - ด่างอยู่ที่ประมาณ 6.7 - 7.0 แล้วค่าเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเป็น 8.4 - 8.6 ในวันที่ 3 จากนั้นลดลงอย่างช้า ๆ จนมีค่าประมาณ 6.8 - 7.3 ในวันที่ 33 และชุดควบคุมที่มีค่าความเป็นกรด - ด่างเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในวันที่ 10 จากนั้นลดลงอย่างช้า ๆ จนมีค่าเป็น 7.2 ในวันที่ 33 ดังแสดงในรูปที่ 3.10 (ก)

ส่วนในการเลี้ยงเชื้อโดยใช้พลาสติกชีวภาพ ชนิด TPS เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าทั้งสามสายพันธุ์ของเชื้อและชุดควบคุมที่นำมาทดสอบมีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด-ด่างเหมือนกัน โดยที่เริ่มต้นการทดสอบจะมีค่าความเป็นกรด - ด่างอยู่ที่ประมาณ 6.7 - 7.0 แล้วค่าค่อยๆเพิ่มขึ้นเป็น 8.3 - 8.6 ในวันที่ 7 จากนั้นลดลงจนมีค่าประมาณ 7.4 - 8.0 และค่อนข้างคงที่จนถึงวันที่ 33 ดังแสดงในรูปที่ 3.10 (ข)



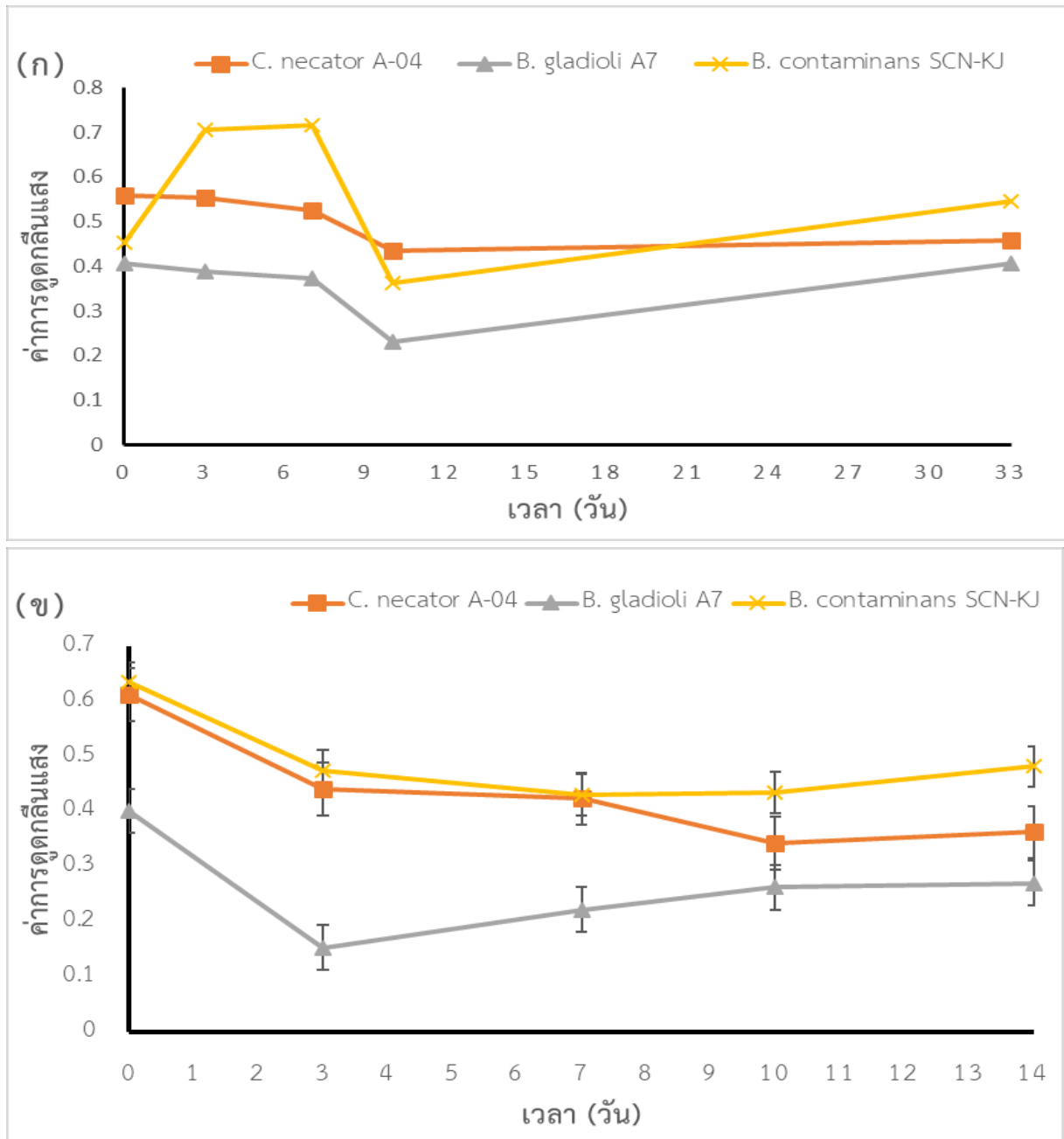


รูปที่ 3.10 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเป็นกรด - ต่างกับเวลา โดยใช้พลาสติกชีวภาพ (ก) PLA และ (ข) TPS เป็นแหล่งคาร์บอน

3.6 วิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสง

จากการนำตัวอย่างที่บ่มตามระยะเวลาที่กำหนดมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ 600 นาโนเมตร พบว่า ในการเลี้ยงเชื้อโดยใช้พลาสติกชีวภาพ ชนิด PLA เป็นแหล่งคาร์บอนนั้น เชื้อ *C. necator* A-04 และ *B. gladioli* A7 นั้นมีแนวโน้มของค่าการดูดกลืนแสงที่คล้ายคลึงกัน คือ ลดลงอย่างช้า ๆ ในช่วง 7 วันแรกจากนั้นลดอย่างรวดเร็วจนถึงจุดต่ำสุดในวันที่ 10 แล้วเพิ่มขึ้นอย่างช้า ๆ จนกระทั่งถึงวันที่ 33 ซึ่งต่างจาก *B. contaminans* SCN-KJ ที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในวันที่ 3 แล้วค่อนข้างคงที่ แล้วมาลดลงอย่างรวดเร็วอีกทีในวันที่ 10 ดังแสดงในรูปที่ 3.11 (ก)

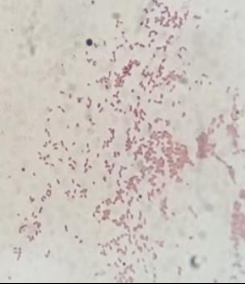
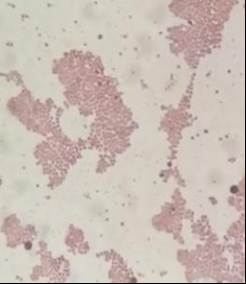
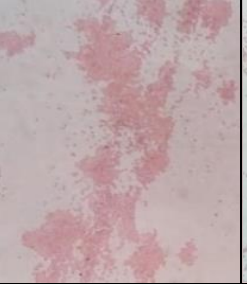

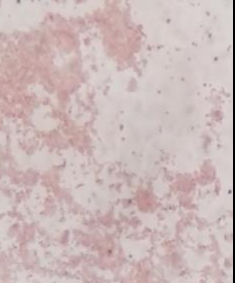

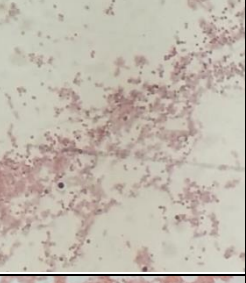
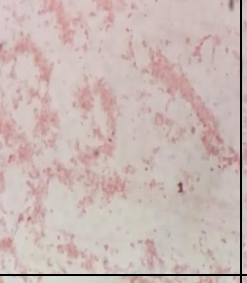
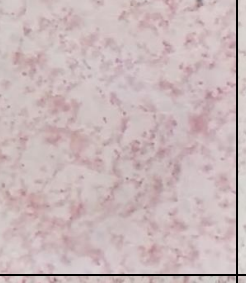
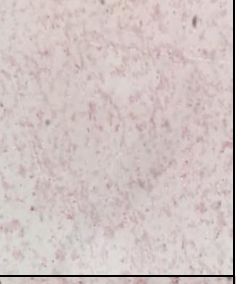
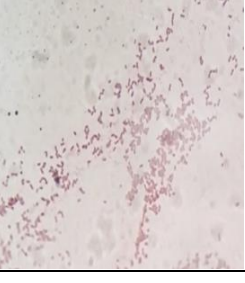
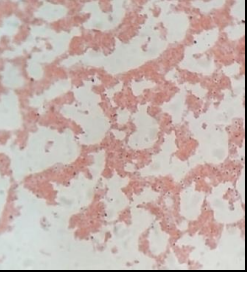
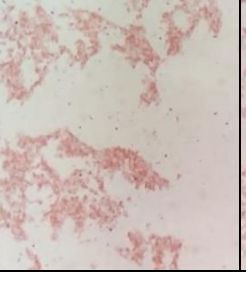

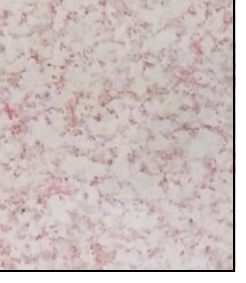
ในส่วนการเลี้ยงเชื้อโดยใช้พลาสติกชีวภาพ ชนิด TPS เป็นแหล่งคาร์บอนนั้น พบว่าเชื้อ *B. contaminans* SCN-KJ และ *C. necator* A-04 นั้นมีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสงคล้ายคลึงกันที่ เมื่อเวลาผ่านไปค่าการดูดกลืนแสงจะค่อยๆลดลง ต่างกันที่ *B. contaminans* SCN-KJ จะมีการเพิ่มขึ้นเล็กน้อยแต่ *C. necator* A-04 จะลดลงอย่างเห็นได้ชัด ในช่วงวันที่ 10-14ของการบ่ม แต่สำหรับ *B. gladioli* A7 นั้นจะมีการลดลงของค่าการดูดกลืนแสงอย่างรวดเร็วในช่วง 3 แรก แล้วค่อยๆเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป ดังแสดงในรูปที่ 3.11 (ข)




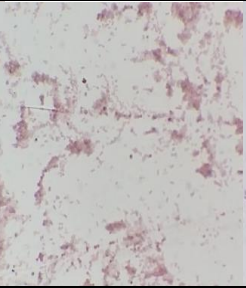
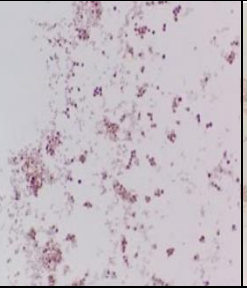
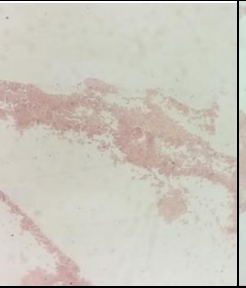
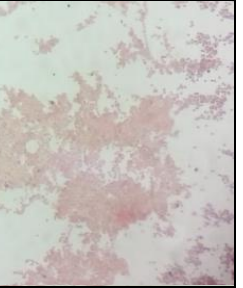

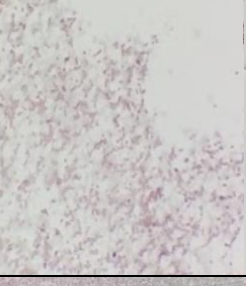
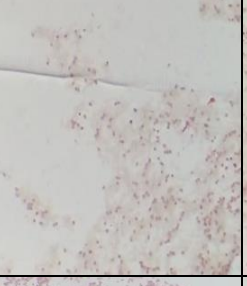
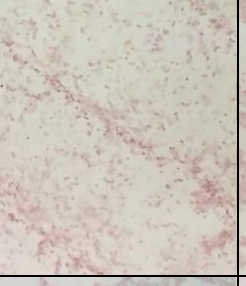
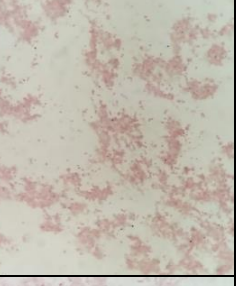
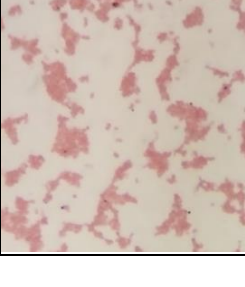
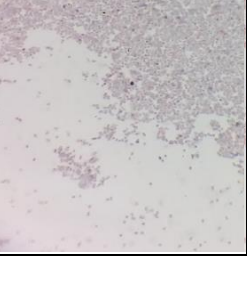
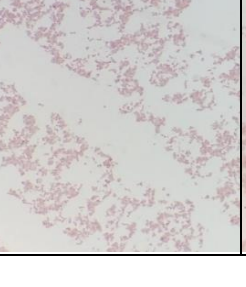
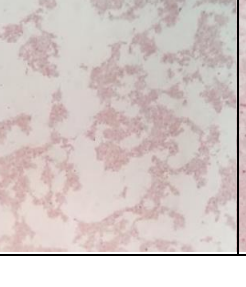
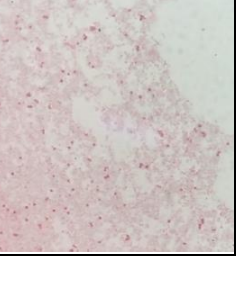
รูปที่ 3.11 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับเวลา โดยใช้พลาสติกชีวภาพ (ก) PLA และ (ข) TPS เป็นแหล่งคาร์บอน

3.7 ย้อมแกรนูลด้วย Sudan black B

จากการนำตัวอย่างที่ป่มตามระยะเวลาที่กำหนดมาย้อมด้วย Sudan black B เพื่อดูการสะสมไขมันภายในเซลล์ โดยไขมันที่สะสมนั้นจะติดสีม่วงดำ และเซลล์จะย้อมติดสีแดง พบว่าในการเลี้ยงเชื้อโดยใช้พลาสติกชีวภาพทั้ง PLA (รูปที่ 3.12) และ TPS (รูปที่ 3.13) เป็นแหล่งคาร์บอนนั้น เชื้อทั้งสามสายพันธุ์มีการติดม่วงดำภายในเซลล์ลดน้อยลงเมื่อเวลาผ่านไป

วัน เชื้อ	0	3	7	10	33
<i>C. necator</i> strain A-04					
<i>B. gladioli</i> A7					
<i>B. contaminans</i> SCN - KJ					

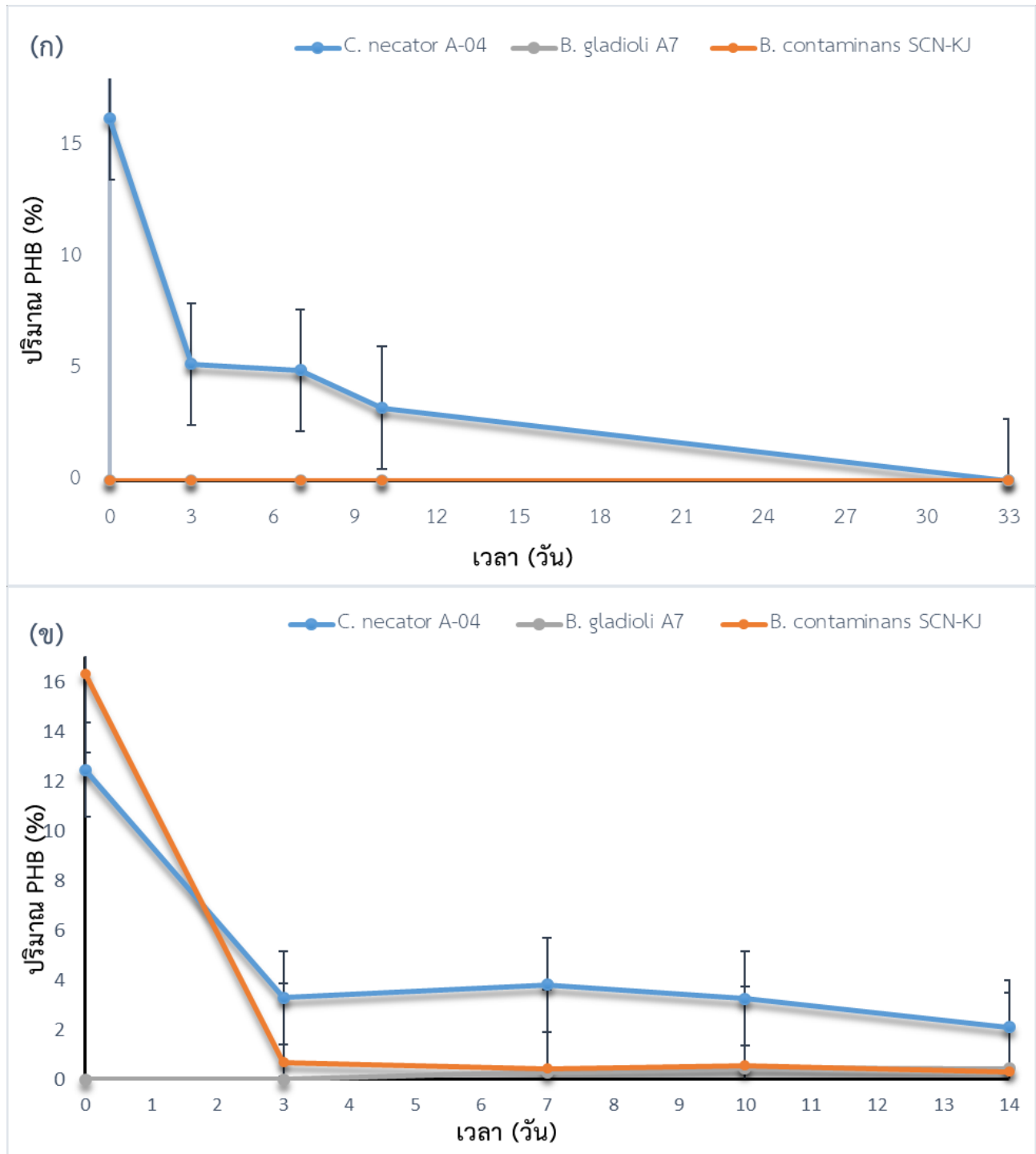
รูปที่ 3.12 ผลการย้อมแกรนูลด้วยสี Sudan black B โดยใช้พลาสติกชีวภาพ PLA เป็นแหล่งคาร์บอน

วัน เชื้อ	0	3	7	10	14
<i>C. necator</i> strain A-04					
<i>B. gladioli</i> A7					
<i>B. contaminans</i> SCN - KJ					

รูปที่ 3.13 ผลการย้อมแกรนูลด้วยสี Sudan black B โดยใช้พลาสติกชีวภาพ TPS เป็นแหล่งคาร์บอน

3.8 วิเคราะห์ปริมาณของ PHAs

จากการนำตัวอย่างที่บ่มตามระยะเวลาที่กำหนดวิเคราะห์ปริมาณของ PHAs ชนิด PHB ภายในเซลล์ของแบคทีเรีย ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี พบว่า ในการเลี้ยงเชื้อโดยใช้พลาสติกชีวภาพทั้ง PLA (รูปที่ 3.14 (ก)) และ TPS (รูปที่ 3.14 (ข)) เป็นแหล่งคาร์บอนนั้น เชื้อทั้งสามสายพันธุ์มีปริมาณของ PHAs ภายในเซลล์ลดลงอย่างเห็นได้ชัด



รูปที่ 3.14 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของ PHAs กับเวลา โดยใช้พลาสติกชีวภาพ (ก) PLA และ (ข) TPS เป็นแหล่งคาร์บอน

บทที่ 4

สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาความสามารถและประสิทธิภาพในการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ 3 ชนิดที่มีการใช้อย่างแพร่หลาย ประกอบด้วย PHBV (ไม่ได้ทำการทดลอง เนื่องจากจากระยะเวลาที่จำกัด และสภาวะการณ์โรคระบาด COVID-19), PLA และ TPS ด้วยเชื้อแบคทีเรียที่มีการศึกษาก่อนหน้านี้แล้วว่ามีความสามารถในการผลิต PHAs ชนิด PHB จำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Cupriavidus necator* A-04, *Burkholderia contaminans* SCN+KJ คัดแยกโดยนางสาวกนกจันทร์ ใจบุญ และ *Burkholderia gladioli* A7 คัดแยกโดยนายศิริราชย์ นันทะชัย เพื่อผลิต PHAs ขึ้นจากการใช้พลาสติกชีวภาพดังกล่าวเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งจัดเป็นการรีไซเคิลทางชีวภาพของ PHAs

จากการขึ้นรูปแผ่นฟิล์มเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนให้แก่เชื้อแบคทีเรียที่ โดยนำผงหรือเม็ดพลาสติกที่ต้องการมาขึ้นรูปด้วยวิธี solvent casting technique ของ (Doi et al., 1995) พบว่า เมื่อใช้ผงพลาสติกชีวภาพชนิด PHBV จะได้แผ่นฟิล์มลักษณะสีขาวขุ่น มีลักษณะสีขาวกระจายประปราย ผิวด้านทึบแสง และเมื่อใช้เป็นเม็ดพลาสติกชีวภาพชนิด PLA จะได้แผ่นฟิล์มที่มีลักษณะโปร่งใส ผิวมัน ซึ่งเป็นลักษณะพิเศษของ PLA (Suksawad and Prathum-aree, 2012)

เมื่อนำแบคทีเรียที่มีการศึกษาก่อนหน้านี้แล้วว่าสามารถผลิต PHAs ได้ 3 สายพันธุ์ มาใช้ในการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพทั้ง 3 ชนิด โดยการเลี้ยงให้อยู่ในสภาวะขาดแคลนแหล่งคาร์บอน คือในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว YP ความเข้มข้น 0.1 เท่า แล้วใส่แผ่นฟิล์มพลาสติกชีวภาพเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ 600 นาโนเมตร พบว่าพลาสติกชีวภาพทั้งสองชนิดให้แนวโน้มค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มมากขึ้นเล็กน้อย ซึ่งหมายถึงมีการเพิ่มปริมาณของเซลล์ในระหว่างการเลี้ยงเชื้อมากขึ้น และเมื่อวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง โดยการดูดตัวอย่าง 2 มิลลิลิตรมากรองผ่านกระดาษกรองเซลลูโลสไนเตรท 0.45 ไมครอน พบว่าในส่วนการเลี้ยงเชื้อโดยใช้พลาสติกชีวภาพ ชนิด TPS เป็นแหล่งคาร์บอนนั้นจะให้แนวโน้มของน้ำหนักเซลล์แห้งที่เพิ่มขึ้น หมายถึงมีปริมาณเซลล์เพิ่มมากขึ้นระหว่างการเลี้ยงเชื้อ แต่ในขณะที่ใช้พลาสติกชีวภาพชนิด PLA ให้แนวโน้มที่มีการแปรผันสูง ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากปริมาณเซลล์ที่น้อยมากในอาหารเลี้ยงเชื้อและเมื่อนำมากรองในปริมาณที่น้อยมากเช่นกันจึงอาจทำให้ไม่ได้ค่าของน้ำหนักเซลล์แห้งที่สามารถยอมรับได้ ควรใช้ตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตร กรณีตัวอย่างที่มีจำนวนเซลล์มาก เช่น จำนวนเซลล์จากกระบวนการหมัก เป็นต้น หรือปริมาตร 100 มิลลิลิตรกรณีตัวอย่างที่มีจำนวนเซลล์น้อย (Stone et al., 1992)

ต่อมานำตัวอย่างวัดค่าความเป็นกรด - ด่าง พบว่าในการเลี้ยงเชื้อที่ใช้ PLA มีการเพิ่มขึ้นของค่าความเป็นกรด-ด่างในช่วง 3 วันแรก จากนั้นลดลงอย่างช้า ๆ ในช่วงหลังจากวันที่ 3 ในขณะที่ TPS ค่อยๆเพิ่มสูงขึ้นเล็กน้อย ซึ่งการลดลงของค่าความเป็นกรด - ด่างนั้นชี้ให้เห็นว่ามีการย่อยสลายของพลาสติกชีวภาพเกิดขึ้น และจากเปอร์เซ็นต์การสูญเสียมวลของแผ่นฟิล์ม พบว่าในการเลี้ยงด้วย PLA เชื้อ *B. gladioli* A7 มีเปอร์เซ็นต์การสูญเสียมวลสูงที่สุดมีค่าเป็น 11 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับใน TPS ที่ *B. gladioli* A7 (4 เปอร์เซ็นต์) สูงที่สุดเช่นกัน ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าการย่อยสลายของพลาสติกชีวภาพเกิดขึ้นในการเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิดของพลาสติกชีวภาพ และทั้ง 3 สายพันธุ์ของแบคทีเรีย โดยในสายพันธุ์ *B. gladioli* A7 มีความสามารถในการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพทั้ง 2 ชนิด มากที่สุด

เมื่อนำตัวอย่างมาข้อมเซลล์ด้วยสี Sudan black B เพื่อดูการสะสมของไขมันภายในเซลล์ ซึ่งสี Sudan black B จัดเป็นสีย้อมที่ละลายในไขมัน โดยเมื่อไขมันแล้วจะให้ผลเป็นแกรนูลสีม่วงดำ (Hartman, 2009) พบว่าในการเลี้ยงเชื้อด้วยพลาสติกชีวภาพทั้งสองชนิดมีแนวโน้มที่เหมือนกัน คือมีการติดสีม่วงดำภายในเซลล์ที่น้อยลงเมื่อเวลาในการบ่มมากขึ้น ซึ่งหมายถึงมีปริมาณของ PHAs ชนิด PHB ภายในเซลล์ของแบคทีเรียที่ลดต่ำลง และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณ PHAs ชนิด PHB ภายในเซลล์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีพบว่าทั้งสองพลาสติกชีวภาพไม่พบการเพิ่มขึ้นของปริมาณ PHAs ภายในเซลล์ นอกจากนี้เชื้อที่พบว่ามีปริมาณ PHAs เริ่มต้นภายในเซลล์อย่าง *C. necator* A-04 และ *B. contaminans* SCN-KJ ก็มีการลดลงอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์นั้นมีปริมาณของ PHB ภายในเซลล์ที่ลดลงอย่างชัดเจนระหว่างการทดลอง

จากผลการทดลองทั้งหมดจึงสรุปได้ว่า แบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถย่อยพลาสติกชีวภาพทั้ง 2 ชนิด ได้ โดยสามารถย่อยสลายพลาสติกชีวภาพชนิด PLA ได้ดีกว่าชนิด TPS ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ได้ศึกษาว่าเชื้อ *Burkholderia* spp. มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปส (lipase) ซึ่งสามารถย่อยสลายไขมันให้กลายเป็นกรดไขมันอิสระ (Putra et al., 2019) เช่นเดียวกับเชื้อ *C. necator* (Schmidt et al., 2016) แต่ทว่าไม่สามารถนำผลผลิตจากการย่อยสลายของพลาสติกชีวภาพทั้ง 2 ชนิดมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อผลิตเป็น PHAs ได้ แม้จะมีการศึกษาก่อนหน้านี้แล้วว่าเชื้อ *Burkholderia* spp. พบการแสดงออกของโอเปอรอน ในยีน Pha ที่ประกอบไปด้วยยีน PhaC1, PhaC2, PhaC3 ซึ่งสามารถสังเคราะห์ได้เป็น PHB (Urtuvia et al., 2018) เช่นเดียวกับเชื้อ *C. necator* (Mifune et al., 2010) ก็ตาม ซึ่งอาจเกิดจากสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการผลิต PHAs ชนิด PHB ของเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ จึงจำเป็นที่จะต้องหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้เกิดทั้งการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพและผลิต PHAs ไปพร้อมกัน

นอกจากนี้ผลที่คาดว่าจะได้รับหากดำเนินการครบทุกขั้นตอนของปฏิบัติการทดลอง คือ พัฒนาระบบการรีไซเคิลชีวภาพโดยการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพทั้งสองชนิดที่ได้ทำการทดลองมาแล้ว รวมทั้งชนิด PHBV ให้เป็นแหล่งคาร์บอนแก่เชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ และผลิตเป็น PHAs ชนิด PHB และอาจลดความผิดพลาดของผลการทดลองบางอย่างที่อาจจะเป็นผลมาจากสภาวะการณ์โรคระบาด COVID-19

เอกสารอ้างอิง

- Andrady, A. L., Neal, M. A., (2009) Applications and societal benefits of plastics. *Philosophical transactions of the royal society b: biological sciences* 364, 1977-1984.
- Barlaz, M. A., Ham, R. K., Schaefer, D. M., (1989). Mass-balance analysis of anaerobically decomposed refuse. *J Environ Eng*, 115(6), 1088-1102.
- Bhati, R., Samantaray, S., Sharma, L., Mallick, N., (2010) Poly- β -hydroxybutyrate accumulation in cyanobacteria under photoautotrophy. *Biotechnology journal* 5, 1181-1185.
- Chamas, A., Moon, H., Zheng, J., Qiu, Y., Tabassum, T., Jang, J. H., Abu-Omar, M., Scott, S. L., Suh, S., (2020) Degradation rates of plastics in the environment. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 8, 3494–3511.
- Chandra, R., and Rustgi, R., (1998). Biodegradable polymers. *Prog. Polym. Sci.*, 1273–1335.
- Chanprateep, S., Kulpreecha, S., (2012) Production and characterization of biodegradable terpolymer poly(3- hydroxybutyrate- co- 3- hydroxyvalerate- co- 4- hydroxybutyrate) by *Alcaligenes* sp. A-04. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101, 51-56.
- Doi, Y., Kitamura, S., Abe, H., (1995) Microbial Synthesis and Characterization of Poly(3- hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). *Macromolecules* 28, 4822-4828.
- Drzyzga, O. , Prieto, A., (2018) Plastic waste management, a matter for the ‘community’ . *Microbial Biotechnology* 12.
- Hartman, T., (2009) The Use of Sudan Black B as a Bacterial Fat Stain. *Biotech & Histochem.* 15, 23-28.
- Johnston, B., Radecka, I., Hill, D., Chiellini, E., Ilieva, I. V., Sikorska, W., Musioł, M., Ziłeba, M., Marek, A. A., Keddie, D., Mendrek, B., Darbar, S., Adamus, G., Kowalczyk, M., (2018) The microbial production of polyhydroxyalkanoates from waste polystyrene fragments attained using oxidative degradation. *Polymers*, 10, 957.
- Liu, H., Xie, F., Yu, L., Chen, L., Li, L., (2009) Thermal processing of starch-based polymers. *Progress in polymer science*, 34, 1348-1368.

- Mifune, J., Nakamura, S., Fukui, T., (2010) Engineering of *pha* operon on *Cupriavidus necator* chromosome for efficient biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from vegetable oil. *Polymer Degradation and Stability*, 95(8), 1305-1312.
- Putra, L., Natadiputri, G., Meryandini, A., Suwanto, A., (2019) Isolation, Cloning and Co-Expression of Lipase and Foldase Genes of *Burkholderia territorii* GP3 from Mount Papandayan Soil. *J Microbiol Biotechnol*, 29(6), 944-951.
- Schmidt, M., Ienczak, J. L., Quines, L. K., Zanfonato, K., Schmidell, W. and Aragão, G. M. F., (2016). Poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* supplemented with minemulsified soybean oil. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 33(1), 13-20.
- Shah, A. A., Hasan, F., Hameed, A., (2010) Degradation of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by a newly isolated *Actinomadura* sp. AF-555, from soil. *International biodeterioration & biodegradation*, 64, 281-285.
- Stone, K. M., Roche, F. W. and Thornhill, N. F., (1992). Dry weight measurement of microbial biomass and measurement variability analysis. *Biotechnol Tech*, 6, 207-212.
- Suksawad, S., Prathum-aree, W., (2012) The role of bacteria on bioplastic. *Srinakharinwirot science journal*, 28, 285-304.
- Tokiwa, Y., Calabia, B. P., Ugwu, C. U., Aiba, S., (2009) Biodegradability of plastics . *International journal of Molecular Sciences*, 10, 3722-3742.
- Urbanek, A.K., Rymowicz, W. and Mirończuk, A.M., (2018) Degradation of plastics and plastic-degrading bacteria in cold marine habitats. *Appl Microbiol Biotechnol* 102, 7669-7678.
- Urtuvia, V., Villegas, P., Fuentes Alburquenque, S., Vergara, M., Seeger, M., (2018) *Burkholderia xenovorans* LB400 possess a functional polyhydroxyalkanoate anabolic pathway encoded by the *pha* genes and synthesizes poly(3- hydroxybutyrate) under nitrogen limiting conditions. *International Microbiology* 21.
- Vieira, M., Gurgel, A., Mariana, A., S., Lucielen, O.,S., and Marisa, M., (2011). Natural-based plasticizers and biopolymer films: A review. *European Polymer Journal*, 47(3), 254-263.
- จุฬากานต์ บุญมี. (2555). พลาสติกชีวภาพ (Biodegradable plastics) ทางเลือกที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม. *วารสารสิ่งแวดล้อม*, 16(2), 15-19.
- ฉันทชนก ดวงศรี และ วุฒินันท์ รักษาจิตร. (2559). พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต : วัสดุชีวภาพทางเลือกทดแทนพลาสติก. *วารสารหน่วยวิจัยวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี และสิ่งแวดล้อมเพื่อการเรียนรู้*, 7(2), 414-423.

- ไพโรจน์ ไบตาเฮ. (2555). การปรับปรุงสมบัติเชิงกลและการดูดซับความชื้นของเทอร์โมพลาสติกที่เตรียมจากแป้ง โดยใช้อ่อนพูนซ์ของเอไมด์, ระดับปริญญาบัณฑิต ภาควิทยาการและวิศวกรรมวัสดุ คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร.
- รังรอง ยกसान, น้ำฝน ลำดับวงศ์, อำพร เสน่ห์, & ชนิษฐา วัชรภรณ์. (2552). นิทรรศการงานวิจัย บนเส้นทาง งานวิจัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในงานวันเกษตรแห่งชาติ ประจำปี 2552. (น.). [ม.ป.ท.].
- วิลาส รัตนานุกูล. (2554). พลาสติกชีวภาพ (Bioplastic). Retrieved from สถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี: <http://biology.ipst.ac.th/?p=927>. 18 พฤษภาคม 2564.
- ศุสิทธิ์ แสงกระจ่าง ปัทมา พลอยสว่าง, & ปริณดา พรหมหิตาธร. (2556). ผลกระทบของพลาสติกต่อสุขภาพและ สิ่งแวดล้อม. วารสารพิษวิทยาไทย, 28(1), 39-50.
- สถาบันพลาสติก. (2558a). เทอร์โมพลาสติกสตาร์ช (THERMOPLASTIC STARCH: TPS). Retrieved from http://asp.plastics.or.th:8001/Article_Detail.aspx?id=69. 10 พฤษภาคม 2564.
- สถาบันพลาสติก. (2556b). Bioplastics Polymer of The Future. Plastic foresight, 8, 1-80.
- สถาบันลูกโลกสีเขียว. (2561). ลูกโลกสีเขียว. วารสารเพื่อเครือข่ายคนรักธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม, 13(50), 1-5.
- สวรรยา เชื้อพันธุ์. (2553). ไบโอพลาสติก...เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม. (online). Retrieved from กรม วิทยาศาสตร์บริการ: http://www.dss.go.th/dssweb/st-articles/files/bla_5_2553_Bio.pdf. 18 พฤษภาคม 2564.

ภาคผนวก ก
สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง nutrient agar (NA)

อาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

Beef	1	กรัม
Yeast extract	1	กรัม
Peptone	5	กรัม
NaCl	5	กรัม
Agar	5	กรัม

นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ yeast peptone ความเข้มข้น 1 เท่า (YP)

อาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

Yeast extract	5	กรัม
Peptone	10	กรัม

นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรอุดม (enrich medium)

อาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

Yeast extract	10	กรัม
Peptone	10	กรัม
Beef extract	5	กรัม
Ammonium sulfate	5	กรัม

นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YP ความเข้มข้น 0.1 เท่า (production medium)

อาหาร 50 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

Yeast extract	0.0235 กรัม
Peptone	0.05 กรัม

นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

สารเคมีและวิธีการเตรียมที่ใช้ในการทดลอง

1. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์

ละลายผงโซเดียมคลอไรด์ 0.85 กรัม ในน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ینگฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที