**รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์**

# การลดสีน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษโดยถังปฏิกรณ์เยื่อกรองร่วมกับเชื้อราขาวสายพันธุ์ในประเทศไทย

# Decolorization of Pulp and Paper Mill Effluent by the Combination of Membrane Bioreactor (MBR) and White-rot Fungi in Thailand

**โดย**

**ต่อพงศ์ กรีธาชาติ และ ชาติ เจียมไชยศรี**

**สิงหาคม 2555**

สัญญาเลขที่ MRG5180107

**รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์**

# การลดสีน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษโดยถังปฏิกรณ์เยื่อกรองร่วมกับเชื้อราขาวสายพันธุ์ในประเทศไทย

# Decolorization of Pulp and Paper Mill Effluent by the Combination of Membrane Bioreactor (MBR) and White-rot Fungi in Thailand

**โดย**


**ต่อพงศ์ กรีธาชาติ**
**สาขาวิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม วิทยาลัยพลังงานและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยพะเยา**
**ชาติ เจียมไชยศรี**
**ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์**



**สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย**



**(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)**

# กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง “การลดสีน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษโดยถังปฏิกรณ์เยื่อกรองร่วมกับเชื้อราขาวสายพันธุ์ในประเทศไทย” ได้รับการสนับสนุนจากทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ประจำปี 2551 จากสำนักงานสนับสนุนงานวิจัย (สกว.) ผู้ทำการวิจัยขอขอบคุณเป็นอย่างสูงสำหรับ รองศาสตราจารย์ ดร.ชาติ เจียมไชยศรี ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สำหรับคำแนะนำในการดำเนินงานวิจัย ดร.พิลาณี ไวยถนอมสัตย์ หน่วยวิจัยเทคโนโลยีเอนไซม์และการจัดการของเสียอันตราย สถาบันวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สำหรับความอนุเคราะห์เชื้อราขาวและอุปกรณ์ต่างๆ ในการดำเนินงานวิจัยครั้งนี้ และ วิทยาลัยพลังงานและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยพะเยา ที่ให้ความสะดวกทั้งหมด

Project Code: MRG5180107

Project Title: Decolorization of Pulp and Paper Mill Effluent by the Combination of Membrane Bioreactor (MBR) and White-rot Fungi in Thailand

## Abstract

This study focused on a white-rot fungus in Thailand *(Lentinus strigosus)* producing a ligninolytic enzyme, in a simple medium indicated the production of laccase (Lac), manganese peroxidase (MnP) and lignin peroxidase (LiP) in the secondary growth phase. Samples were collected periodically for the measurement of COD, color, Lac, MnP and LiP activity. Preliminary study showed cellobiose and L-asparagine as the suitable nutrient sources for highest Lac and MnP production. The highest Lac activity (6947.26 unit/L) and MnP activity (409.49 unit/L) was detected under optimal conditions. For the experimental of pulp and paper mill effluents (initial COD and color approximate 210±10.5 mg/L and 500±20.0 unit, respectively) in Membrane bioreactor (MBR) with white-rot fungus, *Lentinus strigosus* efficiently performed more than 80% COD treatment efficiency and 85% decolorization, respectively. Therefore, the result indicated that *Lentinus strigosus* was able clearly, to breakdown the lignin and its derivatives in pulp and paper mill effluents and the Lac and MnP activities were considered as a major lignin-degradation enzyme in reaction.



รหัสโครงการ: MRG5180107

ชื่อโครงการ: การลดสีน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษโดยถังปฏิกรณ์เยื่อกรองร่วมกับเชื้อราขาวสายพันธุ์ในประเทศไทย

# บทคัดย่อ

งานวิจัยครั้งนี้ มุ่งเน้นที่จะศึกษาพฤติกรรมการผลิตเอนไซม์สำหรับย่อยสลายลิกนินจากเชื้อราขาวสายพันธุ์ในประเทศไทย (เน้นเชื้อราขาวสายพันธุ์ *Lentinus strigosus*) โดยเอนไซม์ที่สนใจและทำการศึกษาในช่วงการเจริญเติบโตแบบทุติยภูมิของเชื้อราขาว *Lentinus strigosus* ได้แก่ เอนไซม์แลคเคส (Lac) เอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (MnP) และเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (LiP) ซึ่งในการศึกษาจะเก็บตัวอย่างน้ำเสียจากอุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษเพื่อวิเคราะห์ประสิทธิภาพในการบำบัดของเชื้อราขาวมาวิเคราะห์ปริมาณสี ซีโอดี และกิจกรรมของเอนไซม์ Lac MnP และ LiP จากผลการศึกษา พบว่า แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์เพื่อย่อยสลายลิกนินในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษได้สูงสุด คือ น้ำตาลเซลโลไบโอส และ L-Asparagine ตามลำดับ ซึ่งเมื่อใช้สารดังกล่าวเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน เชื้อรา *Lentinus strigosus* จะผลิตเอนไซม์ Lac และ MnP ได้สูงสุดเท่ากับ 6947.3 หน่วยต่อลิตร และ 409.49 หน่วยต่อลิตร ตามลำดับ และในสภาวะดังกล่าวไม่พบการผลิต LiP นอกจากนี้เมื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษ (ซีโอดีเริ่มต้น 210±10.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และปริมาณสีเริ่มต้น 500±20.0 หน่วย) โดยเชื้อราขาว *Lentinus strigosus* ภายในถังปฏิกรณ์เยื่อกรอง พบว่า ระบบดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการบำบัดสารอินทรีย์ในรูปซีโอดีและสีได้มากกว่าร้อยละ 80.0 และ 85.0 ตามลำดับ ดังนั้น จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าเชื้อราขาว *Lentinus strigosus* สามารถที่จะผลิตเอนไซม์เพื่อย่อยสลายลิกนินและอนุพันธุ์ของลิกนินที่ปนเปื้อนอยู่ในน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษได้อย่างมีประสิทธิภาพ

# สารบัญ

หน้า


| | |
|---|---|
| หน้าปก | |
| กิตติกรรมประกาศ | |
| Abstract | |
| บทคัดย่อ | |
| สารบัญ | |
| สารบัญรูป | |
| สารบัญตาราง | |
| บทที่ 1 บทนำ | 1 |
| บทที่ 2 การทบทวนวรรณกรรม | 3 |
| น้ำเสียและลักษณะสมบัติของน้ำเสียจากอุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษ | 3 |
| เชื้อราขาวและการย่อยสลายลิกนินด้วยเชื้อราขาว | 5 |
| เอนไซม์ย่อยสลายลิกนิน | 10 |
| ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินของเชื้อราขาว | 13 |
| การคัดแยกสายพันธุ์เชื้อราขาว | 16 |
| การบำบัดน้ำเสียด้วยกระบวนการถังปฏิกรณ์เยื่อกรอง | 19 |
| ปัจจัยที่ส่งผลต่อการทำงานของเมมเบรนภายในถังปฏิกรณ์เยื่อกรอง | 22 |
| บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย | 25 |
| บทที่ 4 ผลและอภิปรายผลการวิจัย | 32 |
| การศึกษาชนิดของธาตุอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินของเชื้อราขาวสายพันธุ์ *L. strigosus* | 32 |
| การศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินของ *L. strigosus* | 40 |
| การทดสอบการบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนลิกนินโดยเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินของ *L. strigosus* | 45 |

## สารบัญ (ต่อ)

**หน้า**


บทที่ 4 (ต่อ)

การศึกษาการบำบัดสีจากน้ำทิ้งอุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษของเชื้อราขาว *L. strigosus* ภายในถังปฏิกรณ์เยื่อกรอง 46

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย 52

บทที่ 6 เอกสารอ้างอิง 54

# สารบัญรูป

หน้า


| | | |
|---|---|---|
| รูปที่ 2.1 | โครมาโทรแกรมขององค์ประกอบที่พบในน้ำทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษ | 5 |
| รูปที่ 2.2 | โครงสร้างของโมเลกุลลิกนิน | 6 |
| รูปที่ 2.3 | กลไกการทำงานของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส | 11 |
| รูปที่ 2.4 | กลไกการทำงานของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส | 12 |
| รูปที่ 2.5 | กลไกการทำงานของเอนไซม์แลคเคสเมื่อออกซิไดซ์สับสเตรตประเภทฟีนอลิก | 13 |
| รูปที่ 2.6 | ขั้นตอนการคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อราขาว | 17 |
| รูปที่ 2.7 | ลักษณะดอกเห็ดของ *L. strigosus* | 18 |
| รูปที่ 2.8 | ประเภทของเมมเบรนที่มีการใช้งาน (a) เมมเบรนชนิด Submersed/Immersed MBR และ (b) เมมเบรนชนิด Side Stream MBR | 20 |
| รูปที่ 2.9 | ตำแหน่งการติดตั้งเยื่องกรอง (a) ติดตั้งภายใน และ (b) ติดตั้งภายนอกถังปฏิกรณ์ | 23 |
| รูปที่ 2.10 | หลักการทำงานของถังปฏิกรณ์เยื่อกรอง | 24 |
| รูปที่ 3.1 | ผังการทำงานของระบบถังปฏิกรณ์เยื่อกรองที่ใช้ในการทดลอง | 30 |
| รูปที่ 3.2 | แผนผังขั้นตอนการทดลองในระบบถังปฏิกรณ์เยื่อกรอง | 31 |
| รูปที่ 4.1 | การเจริญของ *L. strigosus* หรือเห็ดเพ็กในระยะสร้างเส้นใยบนอาหาร PDA ที่เวลา 5 วัน | 32 |
| รูปที่ 4.2 | ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้งและกิจกรรมเอนไซม์แลคเคสของ *L. strigosus* | 33 |
| รูปที่ 4.3 | ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้งและกิจกรรมเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส ของ *L. strigosus* | 34 |
| รูปที่ 4.4 | ความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมเอนไซม์แลคเคส (ยูนิต/ลิตร) ที่ผลิตโดย *L. strigosus* เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร MM และระยะเวลา (วัน) ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน | 35 |
| รูปที่ 4.5 | ความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (ยูนิต/ลิตร) ที่ผลิตโดย *L. strigosus* เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร MM และระยะเวลา (วัน) ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน | 37 |
| รูปที่ 4.6 | ความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมเอนไซม์แลคเคส (ยูนิต/ลิตร) ที่ผลิตโดย *L. strigosus* เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร MM และระยะเวลา (วัน) ที่มีแหล่งไนโตรเจนต่างชนิดกัน | 38 |

## สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า


| | | |
|---|---|---|
| รูปที่ 4.7 | ความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (ยูนิต/ลิตร) ที่ผลิตโดย *L. strigosus* เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร MM และระยะเวลา (วัน) ที่มีแหล่งไนโตรเจนต่างชนิดกัน | 39 |
| รูปที่ 4.8 | การกำจัดสีจากลิกนินโดย *L. strigosus* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MM โดยแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการกำจัดสี กิจกรรมเอนไซม์แลคเคส และกิจกรรมเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส | 45 |
| รูปที่ 4.9 | ลักษณะของน้ำเสียก่อน (a) และหลังการบำบัด (b) ด้วยเชื้อราขาว *L. strigosus* ภายในถังปฏิกรณ์เยื่อกรองที่ใช้เมมเบรนที่มีขนาดรูพรุน 0.4 ไมครอน | 48 |
| รูปที่ 4.10 | ผลของความดันคร่อมเมมเบรน (TMP) ที่ SRT แตกต่างกัน | 49 |

# สารบัญตาราง

หน้า


| | | |
|---|---|---|
| ตารางที่ 2.1 | คุณภาพน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษและมาตรฐานคุณภาพน้ำทิ้งของกรมโรงงานอุตสาหกรรม | 3 |
| ตารางที่ 2.2 | ชนิดของเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินที่พบในเชื้อราขาว | 7 |
| ตารางที่ 3.1 | ปัจจัยและระดับของปัจจัยที่กำหนด | 28 |
| ตารางที่ 4.1 | orthogonal array แบบ $L_9$ ($3^4$) | 40 |
| ตารางที่ 4.2 | กิจกรรมเอนไซม์แลคเคสของ *L. strigosus* ในวันที่ 12 ของการทดลองภายใต้องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกันตามการทดลองโดยวิธีทากุชิ | 41 |
| ตารางที่ 4.3 | กิจกรรมเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสของ *L. strigosus* ในวันที่ 12 ของการทดลองภายใต้องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกันตามการทดลองโดยวิธีทากุชิ | 42 |
| ตารางที่ 4.4 | ค่าอิทธิพลเฉลี่ยที่ได้จากการผลิตเอนไซม์แลคเคสของ *L. strigosus* เมื่อแปรผันปัจจัยที่ระดับต่าง ๆ ของแต่ละการทดลอง | 43 |
| ตารางที่ 4.5 | ค่าอิทธิพลเฉลี่ยที่ได้จากการผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ของ *L. strigosus* เมื่อแปรผันปัจจัยที่ระดับต่าง ๆ ของแต่ละการทดลอง | 44 |
| ตารางที่ 4.6 | ประสิทธิภาพในการบำบัดสีและสารอินทรีย์เมื่อทำการควบคุมระบบที่ SRT ต่างๆ | 47 |
| ตารางที่ 4.7 | ความถี่ในการทำความสะอาดเมมเบรนที่ SRT แตกต่างกัน | 51 |

# บทที่ 1

## บทนำ

กระบวนการบำบัดน้ำเสียอุตสาหกรรมในปัจจุบัน มุ่งเน้นที่จะกำจัดสารอินทรีย์ที่ละลายอยู่ในน้ำทิ้งในรูปของค่าบีโอดี แต่สำหรับน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษปัญหาในด้านสีของน้ำทิ้งที่มีลักษณะเป็นสีน้ำตาลเข้มแม้ว่าจะผ่านการบำบัดโดยกระบวนการบำบัดน้ำเสียแล้วก็ตาม ยังคงเป็นปัญหาสำคัญและควรที่จะได้รับการปรับปรุงระบบบำบัดน้ำเสียให้มีประสิทธิภาพ สามารถลดความเข้มสีของน้ำทิ้งก่อนปล่อยออกสู่แหล่งรองรับน้ำทิ้งตามธรรมชาติ

สาเหตุสำคัญที่ทำให้น้ำทิ้งของอุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษมีสีน้ำตาลเข้ม คือ สารประกอบลิกนิน (Lignin compound) และอนุพันธุ์ของลิกนิน (Lignin derivative compound) ที่ปนเปื้อนในน้ำทิ้ง โดยสารประกอบดังกล่าวจัดเป็นสารโมเลกุลใหญ่ มีโครงสร้างไม่แน่นอน ย่อยสลายทางชีวภาพได้ยาก และส่งผลกระทบโดยตรงต่อสภาพแวดล้อม ประกอบกับในปัจจุบันมีการส่งเสริมการประยุกต์ใช้กระบวนการทางชีวภาพร่วมกับกระบวนการบำบัดน้ำเสีย เนื่องจากเป็นเทคโนโลยีที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมและไม่ก่อให้เกิดสารเคมีตกค้างในระบบสิ่งแวดล้อม อีกทั้งประเทศไทยยังคงมีทรัพยากรทางธรรมชาติที่อุดมสมบูรณ์และมีความหลากหลายทางชีวภาพ เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าวจึงได้มีการศึกษาวิธีการบำบัดสารประกอบลิกนิน และสารที่มีโครงสร้างคล้ายลิกนิน เช่น สีย้อม ทางชีวภาพอย่างกว้างขวาง งานวิจัยส่วนมากรายงานว่าจุลินทรีย์ทั้งแบคทีเรีย (Banat *et al.*, 1996) สาหร่าย (Mohan *et al.*, 2002) และรา (Wesenberg *et al.*, 2003) มีประสิทธิภาพในการบำบัดสีย้อมได้แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามจุลินทรีย์เพียงกลุ่มเดียวที่มีรายงานว่ามีประสิทธิภาพสูงในการบำบัด มีความทนทานต่อความเป็นพิษได้มากกว่าจุลินทรีย์กลุ่มอื่น ๆ และไม่ก่อให้เกิดสารพิษตกค้าง ได้แก่ รากลุ่มไวต์รอท (White Rot Fungi; WRF) ซึ่งสามารถสร้างเอนไซม์ย่อยสลายลิกนิน (Ligninolytic enzyme) ได้ เอนไซม์ดังกล่าวสามารถย่อยสลายสารประกอบลิกนินและสารที่มีโครงสร้างคล้ายลิกนิน ราไวต์รอทที่มีรายงานว่ามีประสิทธิภาพในการบำบัด เช่น *Phanerochaete chrysosporium* (Moldes *et al.*, 2003; Radha *et al.*, 2005) *Trametes versicolor* (Swamy and Ramsay, 1999; Borchert and Libra, 2001) *Pleurotus ostreatus* (Novotny *et al.*, 2001; Palmieri *et al.*, 2005) *Ganoderma* sp. (Revankar and Lele, 2006) และ *Lentinus edodes* (Boer *et al.*, 2004) เป็นต้น

งานวิจัยนี้จึงมีแนวคิดที่ใช้ประโยชน์จากเชื้อราขาวโดยเฉพาะอย่างยิ่งสายพันธุ์ที่พบในประเทศไทย และมีความสามารถสูงในการย่อยสลายลิกนินและอนุพันธุ์ของลิกนิน แต่เนื่องจากข้อจำกัดต่างๆ ของกระบวนการทางชีวภาพอาจมีขีดจำกัดต่อประสิทธิภาพของระบบบำบัดจึงพิจารณากระบวนการบำบัดให้สามารถประยุกต์ใช้งานกับกระบวนการบำบัดแบบถังปฏิกรณ์เยื่อกรองซึ่งเป็นเทคโนโลยีการบำบัดน้ำเสียที่มีประสิทธิภาพการบำบัดสูง

ดังนั้นวัตถุประสงค์หลักของงานวิจัยครั้งนี้ คือ การพัฒนากระบวนการบำบัดน้ำเสียขั้นสูงร่วมกับการใช้เทคโนโลยีชีวภาพ เพื่อประยุกต์ใช้สำหรับการบำบัดน้ำทิ้งที่เกิดขึ้นจากอุตสาหกรรมการผลิตเยื่อและกระดาษ โดยมุ่งเน้นทำการศึกษาวิจัยเพื่อ (1) หาชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อราขาวภายในประเทศไทย ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายลิกนินและอนุพันธุ์ของลิกนินที่ปนเปื้อนกับน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมการผลิตเยื่อและกระดาษ ตลอดจนหาประสิทธิภาพในการกำจัดลิกนินของเชื้อราขาวสายพันธุ์ดังกล่าว และ (2) เพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสมต่างๆ สำหรับการประยุกต์ใช้ระบบถังปฏิกรณ์เยื่อกรองร่วมกับเชื้อราขาวในการบำบัดน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษ

# บทที่ 2

# การทบทวนวรรณกรรม

## 1. น้ำเสียและลักษณะสมบัติของน้ำเสียจากอุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษ

Thompson และคณะ (2001) ทำการศึกษาการบำบัดน้ำเสียที่เกิดขึ้นจากอุตสาหกรรมการผลิตเยื่อและกระดาษ พบว่า อุตสาหกรรมดังกล่าวเป็นอุตสาหกรรมที่ใช้น้ำในกระบวนการผลิตจำนวนมากขึ้นอยู่กับชนิดของกระดาษที่ผลิตและวัตถุดิบที่ใช้ในกระบวนการ จึงส่งผลให้ปริมาณน้ำเสียที่เกิดขึ้นมีปริมาณมากตามไปด้วย นอกจากนั้นน้ำเสียที่เกิดขึ้นยังมีความสกปรกในรูปของของแข็งแขวนลอย (SS) บีโอดี (BOD) ค่าความเป็นพิษ (Toxicity) สี (Color) และสารอาหารต่างๆ (Nutrients) ในปริมาณที่สูงอีกด้วย

กระบวนการบำบัดน้ำเสียที่นิยมใช้ทั่วไปในภาคอุตสาหกรรมภายในประเทศไทย ได้แก่ กระบวนการตะกอนเร่ง (Activated sludge) โดยประสิทธิภาพของกระบวนการดังกล่าวสามารถที่จะบำบัดน้ำทิ้งให้คุณภาพน้ำทิ้งภายหลังจากการบำบัดมีค่าความสกปรกในรูปของค่าบีโอดีต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานน้ำทิ้งของกรมโรงงานอุตสาหกรรมได้ (< 20 mg/L) (Kreetachat T. และคณะ, 2006) ตารางที่ 2.1 แสดงการเปรียบเทียบคุณภาพน้ำทิ้งเฉลี่ยของโรงงานอุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษในประเทศไทยและมาตรฐานคุณภาพน้ำทิ้งของกรมโรงงานอุตสาหกรรม

**ตารางที่ 2.1** คุณภาพน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษและมาตรฐานคุณภาพน้ำทิ้งของกรมโรงงานอุตสาหกรรม

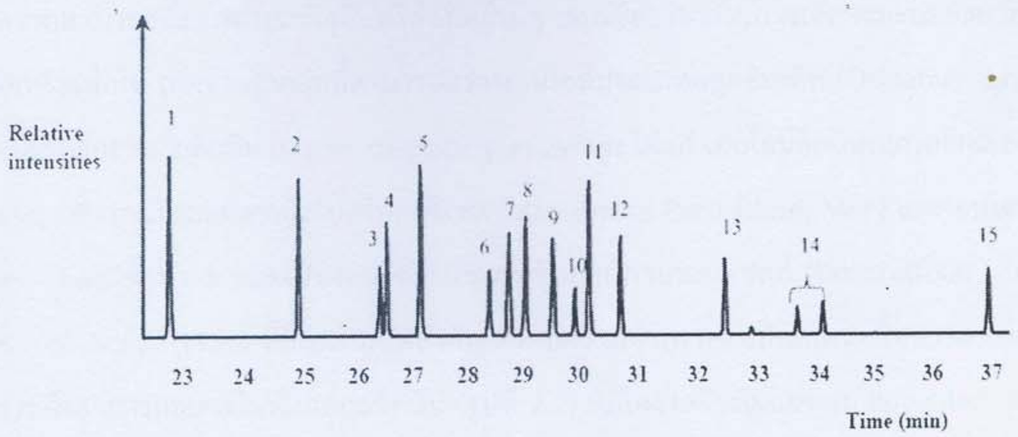
| พารามิเตอร์ | น้ำเสียก่อนบำบัด (1) | น้ำทิ้งภายหลังการบำบัด (1) | มาตรฐานคุณภาพน้ำทิ้ง (2) |
|---|---|---|---|
| pH | 7.5 ± 0.5 | 7.4 ± 0.5 | |
| BOD, มิลลิกรัมต่อลิตร | 550 ± 50 | 25 ± 5 | |
| COD, มิลลิกรัมต่อลิตร | 2,000 ± 100 | 210 ± 10 | |
| อัตราส่วน BOD/COD | 0.27 ± 0.01 | 0.12 ± 0.02 | ไม่กำหนด |
| TOC, มิลลิกรัมต่อลิตร | 650 ± 50 | 50 ± 5 | ไม่กำหนด |
| สี, ADMI unit | 1,000 ± 100 | 300 ± 50 | ไม่กำหนด |

(1) อ้างอิงจาก Kreetachat T. และคณะ (2007)

(2) มาตรฐานคุณภาพน้ำทิ้งของกรมโรงงานอุตสาหกรรม พ.ศ. xxxx

จากรายงานการศึกษาของ Lacorte และคณะ (2003) พบว่า องค์ประกอบต่างๆ ที่พบในน้ำเสียและน้ำทิ้งภายหลังจากการบำบัดด้วยกระบวนการบำบัดน้ำเสียของอุตสาหกรรมการผลิตเยื่อและกระดาษสามารถแยกได้เป็น 3 ประเภท คือ (1) สารอินทรีย์ทางธรรมชาติ (2) สารเติมแต่งที่ใช้ในการผลิตกระดาษ เช่น สารลดความตึงผิว สารเพิ่มความสว่างให้กระดาษ สารประกอบเคมีต่างๆ และ (3) สารเคมีที่ใช้ในการฟอกขาว ซึ่งในการวิเคราะห์องค์ประกอบต่างๆ จะใช้วิธีการสกัดโดย Liquid-liquid extraction (LLE) และ solid phase extraction (SPE) จากนั้นนำสารที่สกัดได้มาวิเคราะห์หาองค์ประกอบโดยวิธี Gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) โครมาโทรแกรมที่วิเคราะห์ได้แสดงดังรูปที่ 2.1 จากโครมาโทรแกรมดังกล่าวทำให้สามารถระบุชนิดองค์ประกอบที่พบว่าประกอบด้วยสารอินทรีย์ทางธรรมชาติที่มีลักษณะโครงสร้างซึ่งแตกตัวมากจากลิกนินและอนุพันธุ์ของลิกนินปนเปื้อนกับน้ำทิ้ง

นอกจากนั้น ในน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษหลังจากผ่านการบำบัดโดยกระบวนการไร้อากาศตามด้วยกระบวนการใช้อากาศยังวิเคราะห์พบสารประกอบกลุ่มวงแหวน (Aromatic compounds) อีกด้วย โดย Hernández และคณะ (1997) ตรวจพบสารกลุ่มวงแหวน ได้แก่ 1,2-benzenedicarboxylic acid, trimethylsilyl-benzoic acid, 2-trimethylsilyl benzoic acid, trimethylsilyl-*o*-hydroxyphenyl acetic acid, 4-hydroxybenzoic acid, 2,4-bis trimethylsilyl-*o*-benzoic acid, 4-bis trimethylsilyl-*o*-benzenepropanoic acid, 4-hydroxybenzeneacetic acid, vanillic acid, syringic acid, and *p*-coumaric acid ซึ่งสารดังกล่าวมีลักษณะโครงสร้างโมเลกุลใกล้เคียงกับโครงสร้างโมเลกุลพื้นฐานของลิกนินในเนื้อไม้ ได้แก่ กลุ่ม *p*-hydroxyphenyl กลุ่ม guaiacyl และ กลุ่ม syringyl โดยผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์องค์ประกอบในน้ำทิ้งของอุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษในประเทศไทยโดย Kreetachat T. และคณะ (2007)

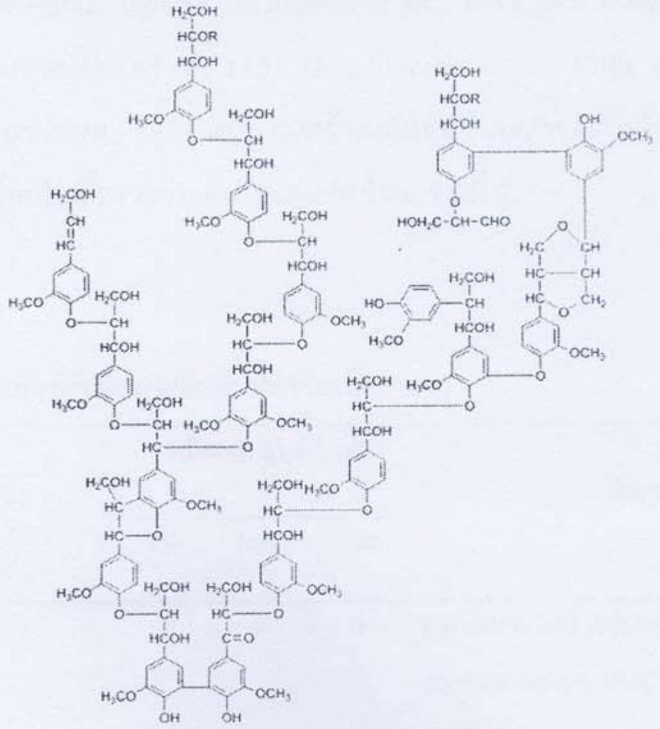



รูปที่ 2.1 โครมาโทรแกรมขององค์ประกอบที่พบในน้ำทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษ; (1) palmitic acid, (2) margaric acid, (3) linoleic acid, (4) oleic acid, (5) stearic acid, (6) pimaric acid, (7) sandarocopimaric acid, (8) isopimaric acid, (9) palustric acid, (10) levopimaric acid, (11) dehydroabietic acid, (12) abietic acid, (13) neoabietic acid, (14) chlorodehydroabietic acid, and (15) dichlorodehydroabietic acid (Lacorte และคณะ, 2003)

## 2. เชื้อราขาวและการย่อยสลายลิกนินด้วยเชื้อราขาว

เชื้อราขาวเป็นราในคลาสแบซิดิโอมัยซีท (Basidiomycetes) ที่พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ โดยเชื้อราขาวสามารถเจริญเติบโตบนเนื้อเยื่อพืช (Plant tissue) หรือไม้ที่ตายแล้ว (Dead tree) โดยใช้เซลลูโลส (Cellulose) และลิกนิน (Lignin) ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญในพืชเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานสำหรับการเจริญเติบโตจนพัฒนาเป็นดอกเห็ด (Fruiting body) (Madhavi and Lele, 2006) ความสามารถในการย่อยสลายทั้งเซลลูโลสและลิกนินของราไวต์รอทมีความสำคัญต่อการหมุนเวียนของคาร์บอนในวัฏจักรคาร์บอน (Carbon cycle) เป็นอย่างมาก เนื่องจากเซลลูโลสและลิกนินเป็นชีวมวล (Biomass) ที่มีปริมาณมากเป็นอันดับหนึ่งและสองในธรรมชาติ (Biosphere) อีกทั้งลิกนินจัดเป็นโมเลกุลอะโรมาติกขนาดใหญ่ (Aromatic macromolecule) ที่มีความซับซ้อนสูง จึงทนทานต่อการย่อยสลายโดยเอนไซม์ประเภทไฮโดรไลติก (Hydrolytic enzyme) ของจุลินทรีย์โดยทั่วไป (Ralph and Catcheside, 2002) นอกจากนี้เชื้อราขาวยังเป็นจุลินทรีย์เพียงกลุ่มเดียวที่มีรายงานว่าสามารถเลือก (Selectively) และย่อยสลายลิกนินในธรรมชาติได้อย่างสมบูรณ์จนเกิดผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ ($CO_2$) และน้ำ ($H_2O$) (Kirk and Farrell, 1987)

ความสามารถที่แตกต่างจากจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ของเชื้อราขาวในการเลือกและย่อยสลายลิกนินในเนื้อเยื่อพืชหรือเนื้อไม้ เกิดจากกลุ่มนี้สามารถสร้างเอนไซม์ประเภทออกซิเดทีฟ (Oxidative enzyme) ที่เรียกว่าเอนไซม์ย่อยสลายลิกนิน (Lignin degrading enzyme) ได้แก่ เอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (Lignin Peroxidase; LiP) เอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (Manganese Peroxidase; MnP) และเอนไซม์แลคเคส (Laccase; Lac) ซึ่งทั้ง 3 ชนิดเป็นเอนไซม์ประเภทขับออกภายนอกเซลล์ (Extracellular enzyme) (Eriksson *et al.*, 1990) ที่มีคุณสมบัติสำคัญ คือ มีความจำเพาะต่อสับสเตรตต่ำ (Low substrate specificity) จึงสามารถออกซิไดซ์โมเลกุลลิกนิน (รูปที่ 2.2) ที่มีโครงสร้างไม่แน่นอน (Irregular structure) และมีพันธะที่แตกต่างกันในโมเลกุลอย่างน้อย 12 ชนิด เช่น พันธะคาร์บอน-คาร์บอน (Carbon - carbon bond) พันธะเอริล-อีเทอร์ (Aryl - ether bond) เป็นต้นได้ (Ward *et al.*, 2004) โดยการเปลี่ยนแปลงภายในโมเลกุลลิกนินที่เกิดจากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ย่อยสลายลิกนิน เช่น การแยกของโซ่ข้างโพรพานอยด์ (Propanoid side chain cleavage) ดีเมทิเลชัน (Demethylation) และการแยกของวงแหวนอะโรมาติก (Aromatic ring cleavage) เป็นต้น



**รูปที่ 2.2** โครงสร้างของโมเลกุลลิกนิน

**ที่มา:** Adler (1977)

ในกระบวนการย่อยสลายลิกนินโดยเชื้อราขาว นอกจากเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินจะทำหน้าที่เป็นเอนไซม์หลักแล้ว ยังมีเอนไซม์สนับสนุน (Auxiliary enzyme) ชนิดอื่น ๆ เช่น ไกลออกซอส ออกซิเดส (Glyoxal oxidase; GLOX) เอริล แอลกอฮอล์ ออกซิเดส (Aryl alcohol oxidase; AAO) ที่มีความสำคัญต่อกระบวนการย่อยสลายลิกนินด้วยเช่นกัน โดยเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดจะทำหน้าที่ผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ($H_2O_2$) ที่เป็นสับสเตรตร่วม (Co - substrate) ของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสและเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส เป็นต้น ผลจากการทำงานร่วมกันของเอนไซม์เหล่านี้ทำให้กระบวนการย่อยสลายลิกนินเกิดขึ้นได้ (Wesenberg *et al.*, 2003)

โดยทั่วไปแล้วเชื้อราขาวจะเมตาบอไลซ์ลิกนินในสภาวะที่มีแหล่งพลังงานอื่น ๆ เช่น เซลลูโลสหรือเฮมิเซลลูโลสร่วมอยู่ด้วย เนื่องจากการเมตาบอไลซ์ลิกนินเพียงอย่างเดียวจะไม่ให้พลังงานแก่เชื้อราขาวดังนั้นกลไกการย่อยสลายลิกนินในธรรมชาติจึงจัดเป็นกลไกแบบเมตาบอลิกร่วม (Co - metabolism) โดยเชื้อราขาวส่วนใหญ่จะเมตาบอไลซ์ลิกนินในช่วงเมตาบอไลซ์ทุติยภูมิ (Secondary metabolism) ซึ่งถูกกระตุ้นโดยสภาวะสารอาหารที่จำกัด (Nutrient limitation) (Wesenberg *et al.*, 2003) นอกจากนี้งานวิจัยส่วนใหญ่รายงานว่าเชื้อราขาวแต่ละชนิดจะสร้างเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินได้เพียง 1-2 ชนิด เช่น *Ganoderma lucidum* (Orth *et al.*, 1993) และ *Panus tigrinus* (Maltseva *et al.*, 1991; Golovleva *et al.*, 1993) เป็นต้น ขณะที่ *Phlebia radiata* (Hatakka *et al.*, 1987; Niku-Paavola *et al.*, 1988; Vares *et al.*, 1994) และ *Trametes hirsuta* (Nerud *et al.*, 1991) สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินได้ทั้ง 3 ชนิด โดยชนิดของเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินที่พบในเชื้อราขาวแต่ละชนิดแสดงในตารางที่ 2.2

**ตารางที่ 2.2** ชนิดของเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินที่พบในเชื้อราขาว

| ชนิดของเชื้อราขาว | ชนิดของเอนไซม์ | | | ที่มา |
|---|---|---|---|---|
| | LiP | MnP | Lac | |
| *Trametes versicolor* | + | + | + | Fahraeus and Reinhammar, 1967; Jonsson *et al.*, 1968; Dodson *et al.*, 1987; Johansson and Nyman, 1987; Waldner, 1987; Waldner *et al.*, 1988; Johansson, 1993 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| *Phanerochaete chrysosporium* | + | + | + | Glenn *et al.*, 1983; Tien and Kirk, 1983; Leisola *et al.*, 1987 |
| *Phlebia radiata* | + | + | + | Hatakka *et al.*, 1987; Niku-Paavola *et al.*, 1988; Vares *et al.*, 1994 |
| *Pleurotus ostreatus* | + | + | + | Waldner *et al.*, 1988; Sannia *et al.*, 1991; Beckeret *et al.*, 1993 |
| *Pleurotus sajor-caju* | + | + | + | Fukuzumi, 1987; Bourbonnais and Paice, 1989; Boyle *et al.*, 1992 |
| *Trametes hirsuta* | + | + | + | Nerud *et al.*, 1991 |
| *Ceriporiopsis subvermispora* | - | + | + | Ruttimann *et al.*, 1992; Lobos *et al.*, 1994 |
| *Ganoderma lucidum* | | + | + | Orth et al., 1993 |
| *Panus tigrinus* | | + | + | Maltseva et al., 1991; Golovleva et al., 1993 |
| *Lentinula edodes* | - | + | + | Leatham and Stahmann, 1981; Leatham, 1986; Forrester et al., 1990; Orth et al., 1993 |
| *Rigidoporus lignosus* | - | | | Geiger et al., 1986; Galliano et al., 1991 |
| *Stereum hirsutum* | | + | + | Jong et al., 1992 |
| *Coriolus pruinosum* | + | + | | Waldner, 1987; Waldner et al., 1988 |
| *Oudemansiella radiata* | + | | + | Huttermann et al., 1989 |
| *Pleurotus florida* | + | | + | Huttermann et al., 1989 |
| *Polyporus platensis* | + | | + | Huttermann et al., 1989 |
| *Ustulina deusta* | + | | + | Huttermann et al., 1989 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| *Bjerkandera adusta* | + - | - | | Waldner, 1987; Huttermann et al., 1989; Muheim et al., 1990; Muheim, 1991 |
| *Daedaleopsis confragosa* | + | | | Huttermann et al., 1989 |
| *Phallus impudicus* | + | | | Huttermann et al., 1989 |
| *Abortiporus biennis* | | | + | Nerud and Misurcova, 1996 |
| *Agaricus bisporus* | | | + | Wood, 1980; Sermanni et al., 1982; Matcham and Wood, 1992; Perry et al., 1993; Ratcliffe et al., 1994 |
| *Agaricus brunnescens* | | | + | Fagan and Fergus, 1984 |
| *Aspergillus nidulans* | | | + | Law and Timberlake, 1980; Kurtz and Champe, 1982; Aramayo and Timberlake, 1990 |
| *Botryosphaeria sp.* | | | + | Barbousa et al., 1996 |
| *Cerrena maxima* | | | + | Gindilis et al., 1990 |
| *Cerrena unicolor* | | | + | Zakariashvill and Elisashvilli, 1993; Gianfreda et al., 1998 |
| *Chaetomium thermophila* | | | + | Ishigaml et al., 1988 |
| *Coriolus verilereus* | | | + | Zhou et al., 1993 |
| *Cryphonectria parasitica* | | | + | Rigling and Alfen, 1993; Slomozynski et al., 1995 |
| *Daedalea flavida* | | | + | Arora and Sandhu, 1985 |
| *Flammulina velutipes* | | | + | Lee and Suh, 1985 |
| *Fomes annosus* | | | + | Kaufmann and Wellendorf, 1980; Bollag and Leonowicz, 1984 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| *Grifola frondosa* | | + | Xing et al., 2006 |
| *Inonus hispidus* | | + | Nerud and Misurcova, 1996 |
| *Phellinus noxius* | | + | Geiger et al., 1986 |
| *Pycnoporus cinnabarinus* | | + | Nerud et al., 1991 |
| *Trametes sanguinea* | | + | Nishizawa et al., 1995 |
| *Perenniporia medulla-panis* | + | | Orth et al., 1993 |
| *Trametes cingulata* | + | | Orth *et al.*, 1993 |
| *Phanerochaete sordida* | + | | Ruttimann *et al.*, 1994 |

**หมายเหตุ** + คือ มีรายงานว่าผลิตเอนไซม์ชนิดดังกล่าว

\- คือ มีรายงานว่าไม่ผลิตเอนไซม์ชนิดดังกล่าว

คือ ไม่มีรายงานการศึกษาการผลิตเอนไซม์ดังกล่าว

LiP คือ เอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส

MnP คือ เอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส

Lac คือ เอนไซม์แลคเคส

**ที่มา:** ดัดแปลงจาก Teerapatsakul (2007)

### 3. เอนไซม์ย่อยสลายลิกนิน (Lignin degrading enzyme)

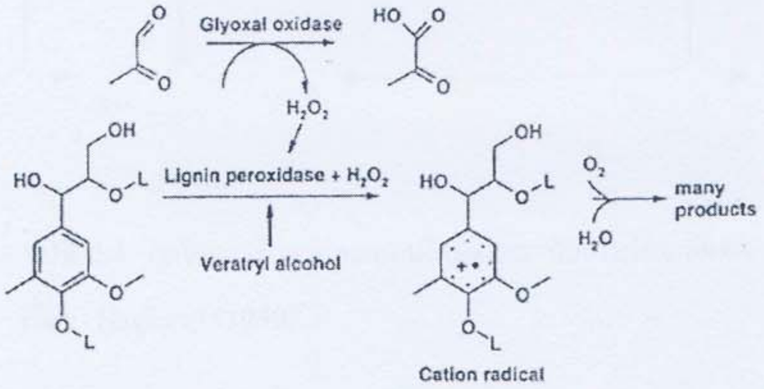
เอนไซม์หลักในกระบวนการย่อยสลายลิกนิน ได้แก่ เอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (Lignin Peroxidase) เอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (Manganese Peroxidase) และเอนไซม์แลคเคส (Laccase)

3.1 เอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (E.C. 1.11.1.14)

เอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสถูกค้นพบครั้งแรกใน *Phanerochaete chrysosporium* (Glenn, 1983; Tien and Kirk, 1984) โดยเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสเป็นไกลโคโปรตีน (glycoprotein) ที่มีฮีม (Heme) เป็นองค์ประกอบและมีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ($H_2O_2$) เป็นสับสเตรตร่วม (Co - substrate) เช่นเดียวกับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสโดยทั่วไป ซึ่งคุณสมบัติที่สำคัญของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส คือ มีความสามารถในการออกซิไดซ์สูง (High redox potential) และมีค่า pH ที่เหมาะสม (Optimum) ในการทำงานต่ำ (Gold and Alic, 1993) โดยเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสสามารถออกซิไดซ์สารประกอบ

ประเภทฟีนอลิก (Phenolic compound) จนเกิดผลิตภัณฑ์เป็นอนุมูลฟีนอกซี (Phenoxy radical) ที่ไม่เสถียร และเนื่องจากเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสมีความสามารถในการออกซิไดซ์สูง ทำให้สามารถออกซิไดซ์สารประกอบประเภทที่ไม่ใช่อะโรมาติกฟีนอล (Nonphenolic aromatic compound) เช่น ส่วนที่ไม่ใช่ฟีนอลิกของฟีนิวโพรพานอยด์ (Nonphenolic phenylpropanoid unit) ในลิกนิน เป็นต้น ซึ่งโดยปกติแล้วจะไม่ถูกออกซิไดซ์โดยเอนไซม์กลุ่มเปอร์ออกซิเดส (Ward *et al*., 2004)

ปฏิกิริยาที่เร่งโดยเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสประกอบด้วยปฏิกิริยา benzyl alcohol oxidation, side-chain cleavage, ring-opening reaction, dimethoxylation และ oxidative dechlorination และเนื่องจากเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสสามารถเข้าจับ (Attack) ที่พันธะได้หลายชนิด ทำให้เอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสมีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการย่อยสลายลิกนิน (Ward *et al*., 2004) โดยตัวอย่างกลไกการเร่งปฏิกิริยา (Catalytic cycle) ของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสแสดงในรูปที่ 2.3




**รูปที่ 2.3** กลไกการทำงานของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส

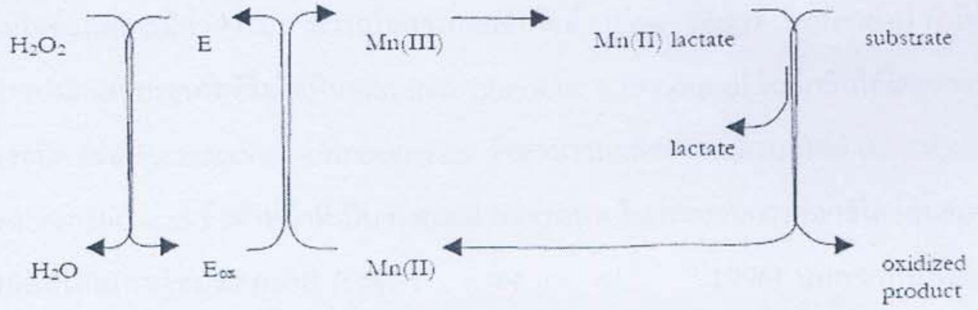
**ที่มา:** Hatakka (2001)

3.2 เอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (E.C. 1.11.1.13)

เอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสถูกพบครั้งแรกใน *Phanerochaete chrysosporium* (Glenn and Gold, 1985) เช่นเดียวกับเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส โดยเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสเป็นไกลโคโปรตีน (Glycoprotein) ที่มีฮีม (Heme) เป็นองค์ประกอบและมีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ($H_2O_2$) เป็นสับสเตรตร่วม (Co - substrate) ซึ่งเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสจะ ออกซิไดซ์ $Mn^{2+}$ ให้กลายเป็น $Mn^{3+}$ โดย $Mn^{3+}$ จะมีความเสถียรมากขึ้นเมื่อรวมตัวกับกรดอินทรีย์ (Organic acid) บางชนิดที่ขับออกมาจากเซลล์ของราไวต์รอท เช่น กรดออกซาลิก (Oxalic acid) กรดฟูมาริก (Fumalic acid) และกรดมาลิก (Malic acid)

เป็นต้น โดย chelate $Mn^{3+}$ จะทำหน้าที่เป็น strong diffusible oxidizing agent เพื่อออกซิไดซ์สารประกอบฟีนอลิกในลิกนินจนเกิดผลิตภัณฑ์เป็นอนุมูลฟีนอกซี (Phenoxy radical) ที่ไม่เสถียร (Hatakka, 1994) ซึ่งจะถูกเปลี่ยนแปลงต่อไปโดยปฏิกิริยาดังนี้ เช่น demethylation, alkyl - phenyl cleavage, $C\alpha$ oxidation และ $C\alpha$ - $C\beta$ cleavage เป็นต้น (Tuor *et al.*, 1992)

โดยทั่วไปเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสสามารถพบในเชื้อราขาวได้มากกว่าเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (Hatakka, 1994) ตัวอย่างกลไกการเร่งปฏิกิริยา (Catalytic cycle) ของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสแสดงในรูปที่ 2.4

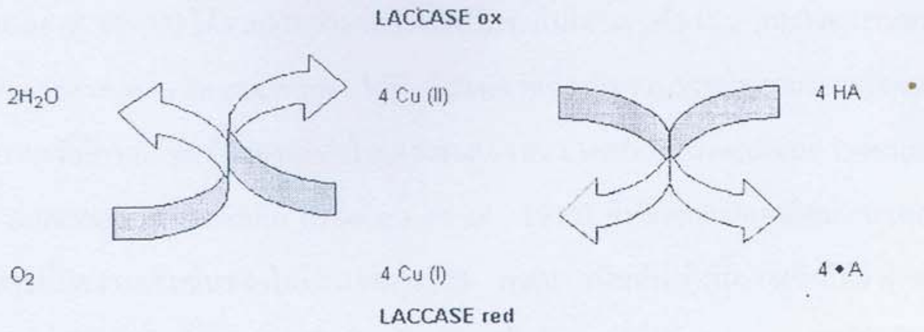



**รูปที่ 2.4** กลไกการทำงานของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส

**ที่มา:** Haglund (1999)

3.3 เอนไซม์แลคเคส (E.C. 1.10.3.2)

เอนไซม์แลคเคสเป็นเอนไซม์ประเภท phenol oxidase ที่มีโลหะคอปเปอร์ (Copper) จำนวน 4 อะตอม อยู่ที่บริเวณแอคทีฟไซด์ (Active site) ของเอนไซม์ ซึ่งเอนไซม์แลคเคสจะออกซิไดซ์สารประกอบประเภทฟีนอล (Phenolic compound) โดยใช้โมเลกุลออกซิเจน ($O_2$) เป็นตัวรับอิเล็คตรอนทำให้เกิดผลิตภัณฑ์เป็นน้ำ ($H_2O$) และอนุมูลฟีนอกซี (Phenoxy radical) (Ward *et al.*, 1996) ตัวอย่างกลไกการเร่งปฏิกิริยา (Catalytic cycle) ของเอนไซม์แลคเคสเมื่อออกซิไดซ์สับสเตรตประเภทฟีนอลิก (Phenolic substrate) แสดงในรูปที่ 2.5




**รูปที่ 2.5** กลไกการทำงานของเอนไซม์แลคเคสเมื่อออกซิไดซ์สับสเตรตประเภทฟีนอลิก

เอนไซม์แลคเคสมีค่าความสามารถในการออกซิไดซ์ต่ำ (Low redox potential) ทำให้ไม่สามารถออกซิไดซ์สารประกอบประเภทที่ไม่ใช่ฟีนอลิก (Nonphenolic compound) ในลิกนินได้โดยตรง ดังนั้นในราไวต์รอทบางชนิด เช่น *Pycnoporus cinnabarinus* จึงสามารถผลิตสารเมตาบอไลต์ (Metabolite) เช่น 3-hydroxyanthranillic acid ซึ่งทำหน้าที่เป็น natural mediator ในกระบวนการออกซิไดซ์สับสเตรตประเภทที่ไม่ใช่ฟีนอลิกโดยเอนไซม์แลคเคส (Eggert *et al.*, 1996) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า hydroxybenzotriazole และ 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) (ABTS) ก็ทำหน้าที่เป็น mediator ในกระบวนการย่อยสลายลิกนินโดยราไวต์รอทด้วยเช่นกัน (Ward *et al.*, 1996)

**4. ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินของเชื้อราขาว**

การศึกษาทางสรีรวิทยา (Physiology) ของการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินจากเชื้อราขาวได้ถูกศึกษาอย่างกว้างขวาง โดยพบว่าเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินจะถูกผลิตออกมาเมื่อเกิดการออกซิเดชันโมเลกุลลิกนินในช่วงการเจริญทุติยภูมิ (Secondary metabolism) ซึ่งจะไม่ให้พลังงานแก่ราไวต์รอท (Wesenberg *et al.*, 2003; Gold and Alic, 1993) นอกจากนี้ยังพบว่าการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินไม่ได้ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อราขาวเพียงอย่างเดียว แต่ยังขึ้นอยู่กับสภาวะของการเจริญเติบโต เช่น ชนิดและปริมาณของอินดิวเซอร์ ชนิดและปริมาณขององค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ และความเข้มข้นของออกซิเจน เป็นต้น

4.1 ปริมาณสารอาหาร

โดยทั่วไปแล้วการสังเคราะห์และการขับเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินของเชื้อราขาวจะถูกกระตุ้นในสภาวะที่สารอาหารถูกจำกัด ดังเช่นการศึกษาการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินใน *Phanerochaete chrysosporium* ซึ่งพบว่ากิจกรรมเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสและเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสจะเพิ่มขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่จำกัดแหล่งไนโตรเจน (Nitrogen limitation) (Kapich *et al.*, 2004)

นอกจากนี้ Eggert *et al*. (1996) ได้รายงานว่าอาหารที่มีปริมาณไนโตรเจนต่ำ (1.2 mM) สามารถกระตุ้นการผลิตเอนไซม์ใน *Pycnoporus cinnabarinus* ได้ดี ในขณะที่เชื้อราขาวบางชนิดสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินในสภาวะที่มีความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนสูง เช่น *Cyathus stercoreus* (Sethuraman *et al*., 1999) และ *Ganoderma lucidum* (D'souza *et al*., 1999) ซึ่งมีกิจกรรมเอนไซม์แลคเคสสูงขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของไนโตรเจนสูง (24 mM) เป็นต้น ดังนั้นจะเห็นได้ว่าหากพิจารณาความสัมพันธ์ของการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนิน กับความเข้มข้นของสารอาหาร เช่น แหล่งไนโตรเจน เป็นต้น พบว่าขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อราขาวเป็นสำคัญ

4.2 ความเข้มข้นของออกซิเจน

โดยทั่วไปสภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสและเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสของเชื้อราขาว คือ ปริมาณออกซิเจนต่ำ (High oxygen tension) เช่น การเพาะเลี้ยงแบบอาหารแข็ง (Solid state culture) และสามารถถูกยับยั้งด้วยการกวน (Agitation) ในการเพาะเลี้ยงแบบอาหารเหลว (Submerged culture) แต่ในขณะที่การผลิตเอนไซม์แลคเคสสามารถกระตุ้นได้โดยการกวน (Wesenberg *et al*., 2003) โดยมีรายงานว่าการเติมอากาศลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะช่วยเพิ่มการผลิตเอนไซม์แลคเคสใน *Botryosphaeria* sp. (Dekker and Barbosa, 2001) และ *Phanerochaete chrysosporium* (Srinivasan *et al*., 1995; Gold and Alic, 1993)

4.3 ไอออนของโลหะ

โลหะหนักบางชนิดมีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราขาว เช่น Cu Mn และ Zn เป็นต้น โดยเชื้อราขาวต้องการโลหะหนักเหล่านี้ปริมาณเพียงเล็กน้อยสำหรับกระบวนการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนิน แต่ในบางครั้งหากมีปริมาณที่สูงเกินไปอาจเป็นพิษต่อราได้ จากการศึกษาของ Baldrian (2003) พบว่าการเติม Zn ที่ความเข้มข้นในช่วง 0.006 - 1.8 mM และ Cu ความเข้มข้นในช่วง 0.0004 - 1.2 mM ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากโลหะ (Metal-free synthetic cultivation medium) จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสและเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสจาก *Phanerochaete chrysosporium* นอกจากนี้ยังช่วยเพิ่มการละลาย (Solubilization) และการย่อยสลายของโมเลกุลลิกนิน ซึ่งจะเห็นได้ว่าโลหะทั้งสองชนิดเกี่ยวข้องโดยตรงต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ย่อยสลายลิกนิน

ในกรณีของเอนไซม์แลคเคสที่มี Cu เป็นองค์ประกอบอยู่ภายในโครงสร้างนั้น พบว่า การเติม Cu ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะช่วยเพิ่มการถอดรหัส (Transcription) และเพิ่มการผลิตเอนไซม์แลคเคส (Palmieri *et al*., 2000; Galhaup and Haltrich, 2001) นอกจากนี้ Baldrian *et al* (2002) ได้รายงานว่าการเติม Cu ที่

ความเข้มข้น 50 mM สามารถกระตุ้นกิจกรรมเอนไซม์แลคเคสของ *Pleurotus ostreatus* ได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยจำนวนมากที่รายงานว่าการเติม Cu สามารถกระตุ้นการผลิตเอนไซม์แลคเคสของเชื้อราขาวหลายชนิด เช่น *Trametes versicolor* (Collins *et al.*, 1997), *Trametes pubescens* และ *Ganoderma applanatum* (Galhaup and Haltrich, 2001) *Pleurotus ostreatus* (Palmieri *et al.*, 2000) เป็นต้น

4.4 อินดิวเซอร์

จากการศึกษาการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินในเชื้อราขาว พบว่า กลไกการผลิตเอนไซม์มีทั้งแบบ constitutive enzyme และ inducible enzyme โดยสารประกอบทางเคมีหลายชนิดสามารถเหนี่ยวนำ (Induce) ให้เกิดการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินในเชื้อราขาวได้ ซึ่งส่วนมากเป็นสารประกอบประเภทฟีนอลิก (Phenolic compound) ที่มีโครงสร้างคล้ายลิกนินหรืออนุพันธ์ของลิกนิน โดยงานวิจัยส่วนใหญ่จะศึกษาถึงชนิด ปริมาณ และระยะเวลาในการเติมอินดิวเซอร์ที่เหมาะสมสำหรับการกระตุ้นการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินในเชื้อราขาว ดังเช่น

Arora and Gill (2001) ศึกษาผลของอินดิวเซอร์ต่อการกระตุ้นการผลิตเอนไซม์แลคเคสจาก *Phlebia radiata* โดยพบว่า veratryl alcohol (3,4-Dimethoxybenzyl alcohol) ที่ความเข้มข้น 1 mM สามารถกระตุ้นการผลิตเอนไซม์แลคเคสมากถึง 200 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะที่ไม่มีอินดิวเซอร์ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Eggert และคณะ (1996) ที่รายงานว่า veratryl alcohol ที่ความเข้มข้น 1 mM สามารถกระตุ้นให้กิจกรรมเอนไซม์แลคเคสของ *Pycnoporus cinnabarinus* เพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะที่ไม่มีอินดิวเซอร์ นอกจากนี้ veratryl alcohol ยังเหนี่ยวนำให้การผลิตเอนไซม์แลคเคสใน *Ganoderma lucidum* เพิ่มขึ้นเป็น 3 เท่า (D'souza *et al.*, 1999) ซึ่งจะเห็นได้ว่า veratry alcohol ถูกใช้อย่างแพร่หลายสำหรับการกระตุ้นการผลิตเอนไซม์แลคเคสในเชื้อราขาวหลายชนิด อีกทั้งสารชนิดนี้ยังมีบทบาทสำคัญในกระบวนการย่อยสลายลิกนินในธรรมชาติด้วย

Eggert และคณะ (1996) ศึกษาผลของอินดิวเซอร์ต่อการกระตุ้นการผลิตเอนไซม์แลคเคสจาก *Pycnoporus cinnabarinus* โดยพบว่ากิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้นเป็น 9 เท่า หลังจากเติม 2,5 - xylidine ลงไป 24 ชั่วโมง ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบเขย่า ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Chen และคณะ (2003) ที่พบว่า 2,5 - xylidine สามารถกระตุ้นการผลิตเอนไซม์แลคเคสจาก *Volvariella volvaceae* ได้ แต่ในทางกลับกันมีรายงานว่าสารดังกล่าวสามารถยับยั้งการผลิตเอนไซม์แลคเคสจาก *Podospora anserine* (Rogalski *et al.*, 1990) ได้เช่นกัน

การศึกษาผลของอินดิวเซอร์ต่อการกระตุ้นการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินของเชื้อราขาว พบว่าสารประกอบประเภทอะโรมาติก เช่น guaiacol และ ferulic acid เป็นต้น สามารถกระตุ้นการผลิตเอนไซม์แลคเคสได้ เช่น ferulic acid สามารถเหนี่ยวนำให้ *Trametes versicolor* ผลิตเอนไซม์แลคเคสมากขึ้นเป็น 2 เท่า (Leonowicz *et al.*, 1978) guaiacol สามารถเหนี่ยวนำให้ *Trametes pubescens* ผลิตเอนไซม์แลคเคสเพิ่มขึ้น 2 เท่า (Galhaup and Haltrich, 2001) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า lignocellulosic substrate สามารถเหนี่ยวนำให้ *Phanerochaete chrysosporium* ผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสเพิ่มขึ้นด้วย (Kapich *et al.*, 2004)

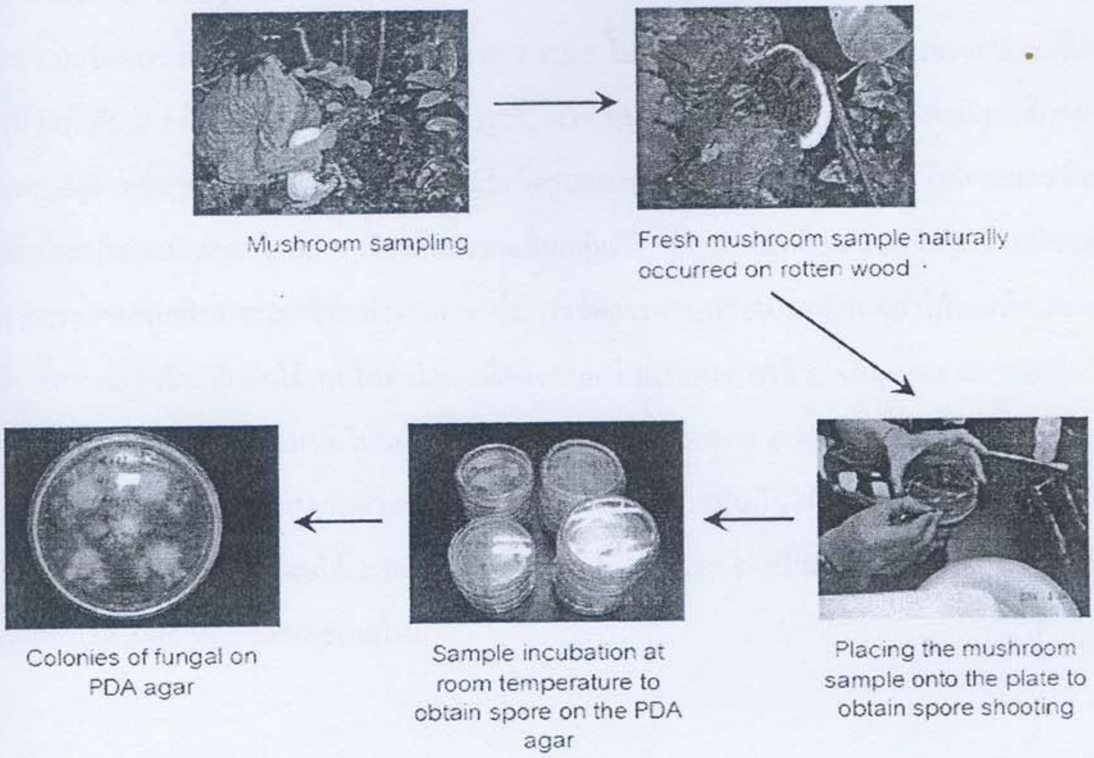
4.5 การควบคุมแบบ Catabolite repression

โดยปกติแล้วกลูโคสมักถูกพบว่าสามารถการยับยั้งการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนิน เนื่องจากสาร catabolite ที่เกิดขึ้นจะทำหน้าที่ยับยั้งยีนของกลุ่มเอนไซม์ย่อยสลายลิกนิน และจากการศึกษาของ Boominathan and Reddy (1992) ได้อธิบายว่าระยะเริ่มต้นของการสร้างเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินใน *Phanerochaete chrysosporium* กิจกรรมเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้นจะสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของปริมาณ cAMP นอกจากนี้การศึกษาเพิ่มเติมพบว่าเมื่อยับยั้ง cAMP จะทำให้เอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสถูกยับยั้งและการผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสถูกทำให้ผลิตช้าลงหรือถูกยังยั้งเมื่อระดับของ cAMP ภายในเซลล์ลดลง

จากการศึกษาโดย Galhaup *et al.* (2002) พบว่าการยับยั้งที่เกิดจากกลูโคสมีผลต่อ *Trametes pubescens* โดยเมื่อค่อย ๆ เพิ่มความเข้มข้นของกลูโคสจาก 10 กรัมต่อลิตร ไปจนถึง 40 กรัมต่อลิตร ส่งผลให้กิจกรรมเอนไซม์แลคเคสเพิ่มขึ้นถึง 5 เท่า แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นกลูโคสเป็น 60 กรัมต่อลิตร กิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสกลับมีค่าลดลง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Dekker and Barbosa (2001) ที่พบว่าเมื่อความเข้มข้นของกลูโคสมากกว่า 10 กรัมต่อลิตร จะยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์แลคเคสของ *Botryosphaeria* sp.

**5. การคัดแยกสายพันธุ์เชื้อราขาว**

Apiwattanapiwat W. และคณะ (2006) ทดลองนำตัวอย่างชิ้นไม้ผุภายในเขตบริเวณอุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ จ.นครราชสีมา มาเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อราขาวที่พบในประเทศไทย โดยวิธีการคัดเลือกสายพันธุ์สามารถแสดงได้ดังรูปที่ 2.6

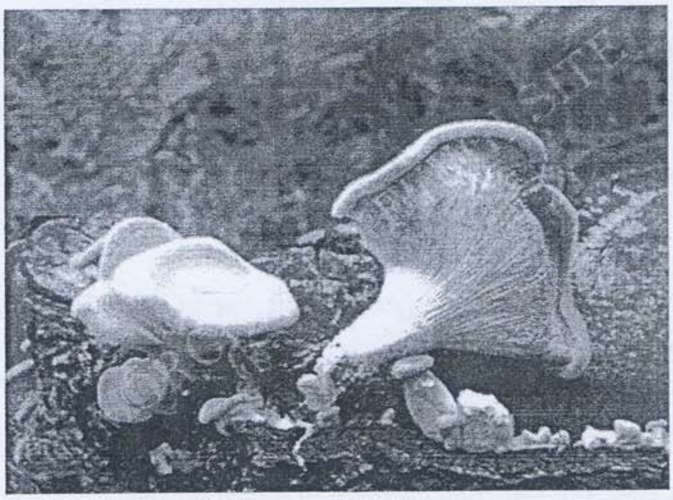



รูปที่ 2.6 ขั้นตอนการคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อราขาว (สถานที่ทำการทดลอง: ฝ่ายปฏิบัติการเทคโนโลยีเอนไซม์และการจัดการของเสีย สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์)

ผลการทดลองดังกล่าว พบว่า มีสายพันธุ์เชื้อราขาวจำนวน 64 สายพันธุ์ และเชื้อราขาวจำนวน 7 สายพันธุ์ ได้แก่ KAPI03 KAPI04 KAPI13 KAPI25 KAPI30 KAPI39 และ KAPI50 สามารถเจริญเติบโตได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มีลิกนินสังเคราะห์เป็นองค์ประกอบ จากเหตุผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าเชื้อราขาวทั้ง 7 สายพันธุสามารถใช้ลิกนินสังเคราะห์เป็นแหล่งอาหารได้ อย่างไรก็ตามเมื่อนำเชื้อราขาวทั้ง 7 สายพันธุ์มาทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นในหลอดทดลองเพือกำจัดสีทิ้งจากโรงงานผลิตเยื่อและกระดาษ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเชื้อราสายพันธุ์ KAPI25 KAPI39 และ KAPI50 มีประสิทธิภาพในการลดสีน้ำทิ้งเท่ากับ 54.4% 54.9% และ 53.7% ตามลำดับ (P. Vaithanomsat และคณะ, 2006)

*Lentinus strigosus* เป็นเชื้อราขาวที่จัดอยู่ในคลาสแบสิดิโอมัยซีท (Basidiomycetes) ซึ่งมีพัฒนาการขั้นสูงที่สามารถเจริญเป็นดอกเห็ดได้ (รูปที่ 2.7) โดยภาษาท้องถิ่นเรียกว่าเห็ดหูกวางหรือเห็ดเพ็กเมื่อเจริญเป็นดอกเห็ดจะมีลักษณะทางกายภาพดังนี้ คือ ดอกเห็ดอ่อนสีน้ำตาลอ่อนอมม่วงแดงแล้วเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอ่อนหรือขาวนวล หมวกเห็ดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 - 5 ซม. รูปกรวยตื้นหรือรูปพัดเพราะการเจริญของหมวกไม่เท่ากัน ส่วนมากด้านหนึ่งจะเล็กกว่าอีกด้านหนึ่ง ขอบมีขนละเอียดหนาแน่น ครีบสีขาวนวลขนานกันตามยาว และมีความยาว 4 ขนาด สันจักฟันเลื่อยเล็ก ๆ ก้านยาว 0.5 - 3 ซม. เส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5

- 8 มม. ส่วนม่ากก้านไม่อยู่กึ่งกลางดอกจะเยื้องไปข้างใดข้างหนึ่ง มีขนละเอียดสีเหมือนหมวก เนื้อเห็ดเหนียวเล็กน้อย สปอร์ค่อนข้างกลมหรือรี ใส ไม่มีสี ขนาด 2 x 5.5 ไมโครเมตร ที่ปลายข้างหนึ่งของสปอร์มีติ่งเล็ก ๆ ในครีบมีซิสทิเดีย 2 ชนิด ชนิดที่อยู่ตามขอบครีบรูปใบพาย ขนาด 4 - 6 x 18 - 23 ไมโครเมตร อีกชนิดหนึ่งเจริญแทรกอยู่ตามชั้นของเซลล์สร้างสปอร์รูปยาวรีหรือรูปคนโท ขนาด 5 - 7 x 28 - 45 ไมโครเมตร ซิสทิเดียชนิดนี้มีผนังหนาและมักมีเส้นใยสั้น ๆ เรียงล้อมรอบเป็นกลุ่มเล็ก ๆ รูปสามเหลี่ยม โดยเห็ดหูกวางหรือเห็ดเพ็กมีเขตการกระจายพันธุ์ในประเทศไทยทั่วทุกภาค ขึ้นกระจัดกระจายหรือเป็นกลุ่มบนลำไม้ไผ่แห้งและตามกอหญ้าเพ็กที่ตายแล้ว เป็นเห็ดกินได้ พบได้ทั่วโลก เมื่อพิจารณาในแง่ของการใช้ *L. strigosus* มากำจัดลิกนินพบว่ามีรายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องน้อยมาก ในขณะที่มีรายงานการใช้ *Lentinus edodes* (เห็ดหอม) มากำจัดสีย้อมอย่างกว้างขวาง อย่างไรก็ตามจากรายงานวิจัยดังกล่าวเป็นการยืนยันได้ว่าราในจีนัสนี้สามารถกำจัดสารประกอบที่มีโครงสร้างซับซ้อนได้ และด้วยเหตุผลที่ว่า *L. strigosus* เป็นเห็ดพื้นเมืองที่สามารถพบได้ทุกภาคและเจริญได้ในอุณหภูมิของประเทศไทย



**รูปที่ 2.7** ลักษณะดอกเห็ดของ *L. strigosus*

Manzanares และคณะ (1995) ทำการศึกษาการบำบัดสีน้ำของน้ำทิ้งจากขั้นตอนการต้มเยื่อกระดาษด้วยสารละลายด่างของโรงงานผลิตกระดาษและเยื่อกระดาษ โดยใช้ราขาวในกลุ่ม *Trametes versicolor* IJFM A-137 ผลการศึกษาพบว่า เชื้อราในกลุ่มดังกล่าวสามารถกำจัดปริมาณสีในน้ำทิ้งได้ 21% ภายในระยะเวลาการบำบัด 9 วัน และพบว่ามีปริมาณเอนไซม์แลคเคสซึ่งถูกผลิตขึ้นจากเชื้อราขาวเป็นเอนไซม์หลักในกระบวนการย่อยสลายสารประกอบลิกนินในน้ำทิ้ง ในลักษณะงานวิจัยเดียวกัน Calvo และคณะ (1998) ทำการศึกษาเชื้อราขาวในกลุ่ม *Coriolopsis gallica* เพื่อลดสีในน้ำทิ้งจากโรงงานกระดาษที่มีสภาพ

เป็นด่าง (pH < 7) และพบว่าเชื้อ C. *gallica* จะสร้างเอนไซม์แลคเคสในระหว่างกระบวนการลดสี ซึ่งเอนไซม์แลคเคสจะถูกสร้างมากที่สุดในอาหารที่มีส่วนประกอบของน้ำทิ้งจากโรงงาน โดยกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสจะสามารถตรวจวัดได้หลังจากระยะเวลาการบำบัด 2 วัน

**6. การบำบัดน้ำเสียด้วยกระบวนการถังปฏิกรณ์เยื่อกรอง**

ถังปฏิกรณ์เยื่อกรองเป็นระบบบำบัดน้ำเสียที่มีการผสมผสานกระบวนการพื้นฐาน 2 ขั้นตอน ที่ได้ปรับเปลี่ยนมาจากระบบแอกทิเวเต็ดสลัดจ์ คือ อาศัยการทำงานร่วมกันของการบำบัดทางชีวภาพและการบำบัดทางกายภาพ (พรทิพย์ และ ศุภลักษณ์,2552) ซึ่งการทำงานของถังปฏิกรณ์เยื่อกรองจะทำการโดยสารแขวนลอยและสารอินทรีย์เล็กๆ ถูกย่อยสลายได้ด้วยจุลินทรีย์จะถูกแยกตัวออกจากน้ำจากการกรองด้วยเยื่อเมมเบรน (จันทร์ทรงกลด, 2550)

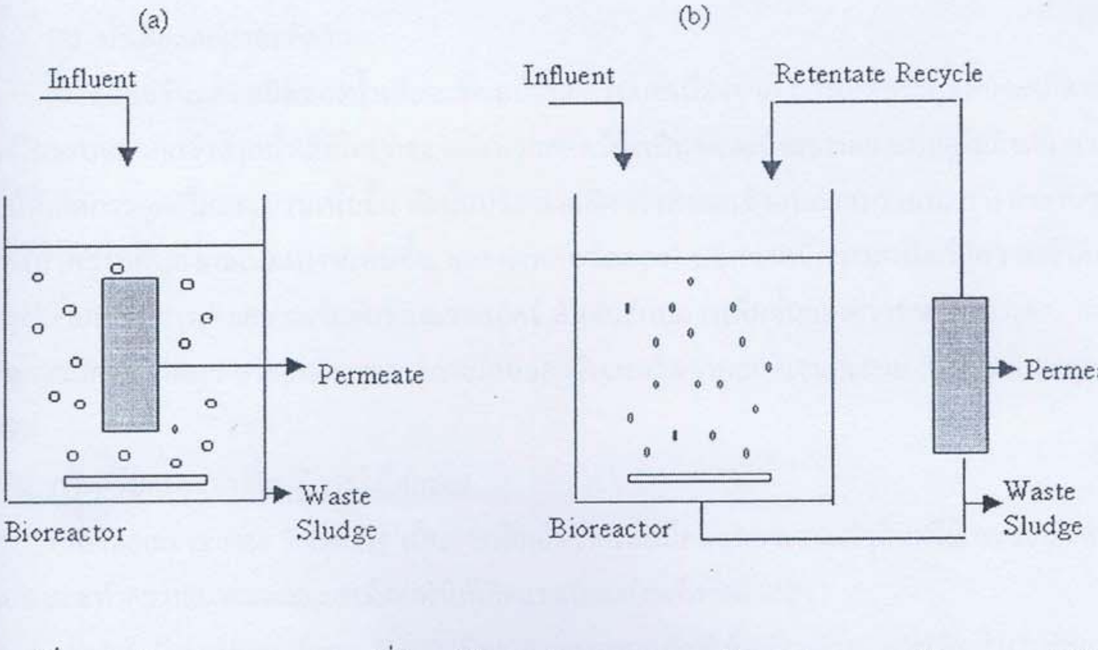
กระบวนการถังปฏิกรณ์เยื่อกรองมีลักษณะเฉพาะตัวซึ่งแตกต่างจากกระบวนการแอกติเวเตทสลัดจ์หลายประการ ตัวอย่างเช่น ถังปฏิกรณ์เยื่อกรองช่วยเพิ่มความเข้มข้นของชีวมวลในระบบทำให้มีประสิทธิภาพในการกำจัดสารได้สูงและช่วยลดขนาดของถังเนื่องจากไม่ต้องใช้ถังตกตะกอน ทำให้อัตราการไหลของน้ำเข้าระบบไม่มีผลต่อการตกตะกอนเหมือนที่เกิดในแอกติเวเตทสลัดจ์ และนอกจากนี้ Hydraulic shock/Organic shock มีผลน้อยมากต่อการทำงานของระบบเนื่องด้วยคุณสมบัติเหล่านี้จึงทำให้กระบวนการถังปฏิกรณ์เยื่อกรองจึงมีประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียได้สูงกว่าระบบบำบัดน้ำเสียแบบเดิม (พรทิพย์ และศุภลักษณ์ ,2552)

ลักษณะทั่วไปของถังปฏิกรณ์เยื่อกรอง ภายในถังปฏิกิริยาน้ำเสียจะถูกสูบจากถังพักน้ำเสียเข้าถังที่มีการติดตั้งชุดเมมเบรนและที่เติมอากาศเพื่อให้สัมผัสกับตะกอนจุลินทรีย์ภายในถัง จุลินทรีย์จะย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำเสียด้วยการย่อยสลายแบบใช้ออกซิเจน แล้วทำการกรองน้ำสะอาดออกด้วยเมมเบรนที่บรรจุอยู่ภายในถัง น้ำที่ผ่านการกรองแล้วจะถูกดึงออกจากระบบ ส่วนจุลินทรีย์จะถูกดึงกลับไปที่เครื่องทำปฏิกิริยาทางชีวภาพและตะกอนของเสียที่เป็นส่วนเกินจะถูกสูบออกไป มวลจุลินทรีย์จะถูกจำกัดอยู่ภายในระบบที่มีการจัดเตรียมทั้งเรื่องการควบคุมอายุของเชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่ในถังปฏิกรณ์การทำความสะอาดเมมเบรนสามารถทำได้โดยอาศัยหลักการเติมอากาศจากหัวปั๊มอากาศ ซึ่งอากาศจะถูกปล่อยเข้าไปจากด้านล่างของชุดเมมเบรนเพื่อให้ฟองอากาศยกตัวสัมผัสกับสิ่งสกปรกที่เกาะติดผิวหน้าของเมมเบรนและกำจัดสิ่งอุดตันที่ผิวหน้าของเมมเบรนออก นอกจากนั้นรูปแบบการกรองน้ำโดยให้เกิดทิศทางการไหลแบบ Cross Flow ก็จะช่วยป้องกันสิ่งตกค้างของตะกอนที่จะอุดตันผิวหน้าของเมมเบรน การทำความสะอาดเมมเบรนสามารถล้างกับน้ำหรือล้างด้วยสารเคมี

ระบบถังปฏิกรณ์เยื่อกรอง มีการใช้งานโดยทั่วไปมีอยู่ 2 รูปแบบ ได้แก่

(1) Submersed/Immersed เป็นชนิดที่ตัวของเมมเบรนจุ่มอยู่ในน้ำเสียโดยไม่ต้องดึงน้ำออกมาบำบัดข้างนอก เมมเบรนชนิดนี้จะมีราคาแพงกว่า ขึ้นอยู่กับการเลือกใช้งาน ดังแสดงในรูปที่ 2.8(a) น้ำเข้าจะถูกสูบเข้าถังปฏิกรณ์ชีวภาพเพื่อสัมผัสกับมวลชีวภาพและกรองด้วยเมมเบรน การทำความสะอาดสามารถทำได้โดยการเติมอากาศ โดยอากาศจะถูกปล่อยเข้าไปจากทางด้านล่างของชุดเมมเบรนเพื่อกำจัดสิ่งอุดตันที่ผิวหน้าของเมมเบรนด้วยการยกตัวของฟองอากาศ (Airlift effect) การใช้งานแบบกรองขนานกับทิศทางการไหล (Cross flow) และฟองอากาศจะช่วยป้องกันสิ่งตกค้างของตะกอนที่จะอุดตันผิวหน้าของเมมเบรนและอากาศยังถูกใช้สำหรับการออกซิเดชั่นและการสันดาปภายในของจุลินทรีย์ น้ำที่ผ่านการบำบัดแล้วจะไหลออกจากถังด้วยการดูดผ่านเมมเบรน ซึ่งในปัจจุบันการใช้เมมเบรนทั้ง MF และ UF จะใช้รูปแบบนี้

(2) Side Stream เป็นเมมเบรนชนิดที่อาศัยการดึงน้ำเสียออกมาบำบัดกับตัวเมมเบรนที่อยู่ข้างนอกดังแสดงในรูปภาพที่ 2.8(b) น้ำเข้าจะไหลสู่ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ซึ่งจะสัมผัสกับมวลชีวภาพ ของผสมนี้จะถูกสูบจากถังปฏิกรณ์ภายใต้แรงดันไปถูกกรองผ่านเมมเบรน น้ำส่วนที่ผ่านเมมเบรนจะไหลออกจากระบบในขณะที่มวลชีวภาพทั้งหมดจะถูกนำกลับไปสู่ถังปฏิกรณ์ ตะกอนส่วนเกินจะถูกสูบออกเพื่อควบคุมอายุตะกอนให้คงที่ และเมมเบรนจะถูกทำความสะอาดด้วยการล้างย้อนกลับ (Backwashing) ล้างด้วยสารเคมีหรือฟองอากาศ




รูปที่ 2.8 ประเภทของเมมเบรนที่มีการใช้งาน (a) เมมเบรนชนิด Submersed/Immersed MBR และ (b) เมมเบรนชนิด Side Stream MBR

ดังที่กล่าวมาข้างต้น ถังปฏิกรณ์เยื่อกรองที่นิยมใช้กันมากที่สุด คือ ชนิด Submersed/ImmersedMBR เนื่องมาจากใช้พลังงานต่ำที่สุด โดยมีส่วนประกอบหลักดังนี้

(1) เมมเบรน

ลักษณะเป็นแผ่นฟิล์มบางๆ ของสารอินทรีย์สังเคราะห์หรือสารอนินทรีย์ ที่จะทำให้เกิดการแยกตัวอย่างละเอียดของอนุภาคในของไหล เมมเบรนมีได้หลายรูปร่าง เช่น แผ่นเรียบ หลอดซึ่งมีหลายขนาด และ Hollow fiber ซึ่งที่เส้นผ่านศูนย์กลางภายในน้อยกว่าสิบเท่าของมิลลิเมตร โดยทั่วไปแล้วเมมเบรนที่ทำจากสารอนินทรีย์จะมีความต้านทานต่อความดันและสารเคมี โดยเฉพาะการฆ่าเชื้อโรคด้วยคลอรีน แต่มีความยุ่งยากและราคาแพงกว่า เมมเบรนที่ทำจากสารอินทรีย์จะมีความยืดหยุ่นดีกว่าและสามารถใส่ไว้ในระบบที่มีเนื้อที่จำกัด ซึ่งจะได้พื้นที่ผิวต่อปริมาตรมาก (ชวลิต,2548)

โดยทั่วไปแล้วพอลิเมอร์ส่วนใหญ่สามารถนำมาผลิตเป็นเมมเบรนได้ วัสดุที่จะนำมาใช้เป็นเมมเบรนส่วนมากจะเป็นวัสดุพวกพอลิเมอร์ที่ทนต่อแรงเชิงกลและสารเคมีที่ใช้ทำความสะอาด เป็นแบบชอบน้ำที่ทำให้เกิดการอุดตันต่ำและผลิตง่าย ราคาถูก พอลิเมอร์ที่นำมาทำเมมเบรน เช่น โพลิอีเทอร์ซัลโฟน (PES) โพลีไวนิลิดีนฟลูออไรด์ (PVDF) โพลิเอทิลีน (PE) (ธนิตพร ,2552)

นอกจากนี้สมบัติทางกายภาพมีความสำคัญเป็นอย่างมาก โดยจะพิจารณาถึงขนาดของรูพรุนของเมมเบรน ทั้งนี้เพื่อเลือกใช้เมมเบรนที่มีรูพรุนเหมาะสมกับผลิตภัณฑ์ต่างๆ สมบัติทางเคมีของเมมเบรนก็มีความสำคัญมากเช่นเดียวกับคุณสมบัติทางกายภาพเมมเบรนที่ใช้จะต้องเป็นชนิดที่ชอบน้ำเพราะถ้าเป็นชนิดที่ไม่ชอบน้ำมักจะเกิดการสะสมของสารอินทรีย์ที่ผิวหน้าเมมเบรน โดยเมมเบรนอาจจะมีการเคลือบสารที่เป็นพลาสมาเพื่อให้เมมเบรนชอบน้ำมากยิ่งขึ้น (ฐปนีย์,2548)

(2) น้ำเสียและมวลสลัดจ์

ความเข้มข้นและชนิดของน้ำเสียจะมีผลน้อยต่อระบบเนื่องจาก การเกิดการอุดตันจะเกิดจากมวลสลัดจ์ในระบบมากกว่าจากน้ำเสียโดยตรง และมวลสลัดจ์ซึ่งเป็นของแข็งแขวนลอยที่อยู่ในถังเติมอากาศยังส่งผลให้เกิดการอุดตันเมมเบรนเพิ่มขึ้น ดังนั้นปริมาณสลัดจ์จึงส่งผลเชิงลบต่อสมรรถนะการทำงานของเมมเบรน (ค่าความดันส่งผลเมมเบรนเพิ่มขึ้น และค่าฟลักซ์ลดลง) นอกจากนี้ความหนืดก็มีความสำคัญในถังปฏิกรณ์เยื่อกรอง การเพิ่มความเข้มข้นของมวลสลัดจ์ สัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของความหนืดในระบบ ส่งผลเชิงลบต่อการเกิดฟาวลิ่งและประสิทธิภาพการถ่ายโอนออกซิเจนหรือค่าออกซิเจนละลาย (พรทิพย์และศุภลักษณ์ ,2552)

(3) การควบคุมระบบถังปฏิกรณ์เยื่อกรอง

- Aeration or Gas Scouring เป็นการเติมอากาศเพื่อป้อนออกซิเจนแก่จุลินทรีย์ กวนของเหลวและตะกอน และทำความสะอาดเมมเบรนโดยทำให้เกิดแรงเฉือนส่งผลให้ฟลักซ์สูง

- Solid Retention time (SRT) เป็นเวลาของอายุสลัดจ์ให้อยู่ในระบบ การเพิ่ม SRT เป็นการเพิ่ม MLSS และลดการเกิดสลัดจ์ที่ต้องดึงออก แต่ส่งผลให้เกิดปัญหาการอุดตันและทำให้เกิดการถ่ายเทออกซิเจนทำได้ไม่ดี

การควบคุมการเกิดการอุดตันสำหรับระบบถังปฏิกรณ์เยื่อกรองทำได้โดยก่อนการบำบัดควรใช้การบำบัดขั้นต้น (Feed Pretreatment) เช่น ตะแกรงดักจับ หรืออาจใช้การทำความสะอาดทางกายภาพ (วิธีการล้างย้อน) หรืออาจจะมีการลดฟลักซ์โดยอัตราการไหลและลักษณะการเคลื่อนที่ของสารป้อนภายในเมมเบรน มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของฟลักซ์และสามารถลดการเกิดการอุดตันหรือฟาวลิ่งได้ ทั้งนี้เนื่องจากการเคลื่อนที่แบบปั่นป่วน มีแรงเฉือนสูง ทำให้การแพร่กลับของอนุภาคที่ผิวหน้าเมมเบรนมีมากขึ้น การสะสมของอนุภาคจึงลดลง (ฐปนีย์,2548 )และเพิ่มอัตราการเติมอากาศ เพื่อให้ฟองอากาศกระจายฟองได้ดีขึ้นเพื่อช่วยลดการอุดตันทำให้ฟลักซ์สูงขึ้น นอกจากนี้อาจมีปรับสภาพของเหลวในถังปฏิกรณ์เยื่อกรอง โดยใช้วิธีการรวมตะกอน(coagulation/flocculation) โดยใช้สารพวก Alum และ Ferric chloride โดย Ferric chloride จะมีประสิทธิภาพดีกว่าแต่ราคาแพงกว่า หรืออาจมีการเพิ่มสารพวกเหล็กให้แก่แบคทีเรียกลุ่มที่ย่อยซัลไฟด์เคลือบเมมเบรนด้วยสารพวก Ferric Hydroxide เติมสารดูดซับพวก PAC (Powder Activated Carbon) เพื่อให้แบคทีเรียเกาะตัวและดูดซับสารอินทรีย์ไปในตัว ซึ่งพบว่าจะช่วยลดการเกิดการอุดตันได้มาก นอกจากนั้นอาจใช้ zeolite และ cationic polymer ได้อีกด้วย (จันทร์ทรงกลด, 2550)

**7. ปัจจัยที่ส่งผลต่อการทำงานของเมมเบรนภายในถังปฏิกรณ์เยื่อกรอง**

(1) การสะสมความเข้มสูง (Concentration Polarization) คือ ปรากฏการณ์ที่เกิดการสะสมของสารอินทรีย์ หรืออนุภาคต่างๆ ใกล้ผิวหน้าเมมเบรน จนความเข้มข้นสูงกว่าค่าเฉลี่ยของสารนั้นในน้ำหลายเท่าทำให้ฟลักซ์ลดลง แก้ไขโดยแรงดันน้ำล้างย้อน การถอดล้างด้วยสารเคมี หรือการกรองขนานกับทิศทางการไหล (Cross Flow) เป็นต้น (รัตนา,2541)

(2) อุณหภูมิและพีเอช อุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น 1 องศาจะส่งผลให้ฟลักซ์เพิ่มขึ้น 3-5% แต่เมมเบรนอินทรีย์มักสลายตัวโดยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ซึ่งเกิดได้ช้าที่อุณหภูมิต่ำกว่า 30 องศาเซลเซียส พีเอช 3-7 จะทนทานต่อการต่อสารออกซิไดซ์ได้ดี ขณะที่เมมเบรนอนินทรีย์ไม่ทนต่อสารออกซิไดซ์มากนัก แต่ทนทานต่อพีเอชในช่วงที่กว้างกว่า (พีเอช 2 11) และอุณหภูมิทำงานที่ขีดจำกัดสูงกว่า 45 องศาเซลเซียส (พรทิพย์และศุภลักษณ์ ,2552)

(3) ความดัน การเพิ่มแรงดันมากขึ้นจะทำให้ฟลักซ์ของเมมเบรนและคุณภาพน้ำที่ผลิตได้ดีขึ้น แต่ถ้าแรงดันเพิ่มขึ้นเกินขีดจำกัด (Critical Pressure) จะทำให้โครงสร้างและอนุภาคสารต่างๆ ที่สะสมบริเวณผิวหน้าเมมเบรนอัดตัวแน่นจนทำให้ค่าฟลักซ์ลดลง และอาจทำลายโครงสร้างภายในของเมมเบรน จนไม่อาจคืนสภาพการกรองน้ำได้ดังเดิมอีก (ฐปนีย์, 2548)

(4) ความสกปรกของเมมเบรน เป็นผลมาจากการเกาะสะสมของสารอินทรีย์และอนุภาคสิ่งสกปรกต่างๆ ในรูช่องว่างของเมมเบรนทำให้อัตราการซึมผ่านลดลง ความดันใช้งานเพิ่มขึ้น และไม่สามารถคืนสภาพให้กลับเหมือนใหม่ได้ โดยการใช้แรงดันน้ำหรือสารเคมี ความสกปรกของเมมเบรนมีปัจจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้องดังต่อไปนี้

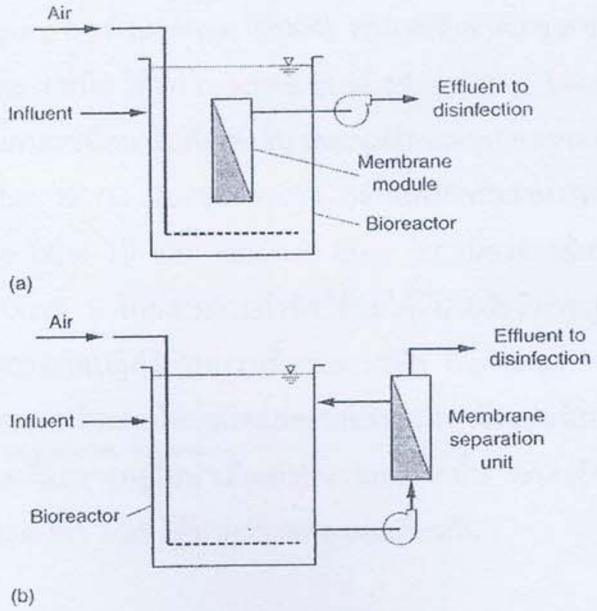
- ลักษณะของน้ำดิบที่นำมากรองผ่านเมมเบรน น้ำที่นำมากรองด้วยเมมเบรนนั้นมักจะมีสารอินทรีย์เจือปนอยู่ไม่มากก็น้อย สารอินทรีย์แต่ละประเภทมีผลต่อการเกิดความสกปรกต่างกันไปตามขนาดโครงสร้าง

ของโมเลกุลและแรงกระทำระหว่างผิวเมมเบรนกับตัวมันเอง เมื่อสารอินทรีย์หลายชนิดรวมอยู่ในสารละลายเดียวกันหรือมีความเข้มข้นสูงจะก่อให้เกิดความสกปรกมากกว่าที่อยู่เป็นชนิดเดี่ยวๆหรือความเข้มข้นต่ำตามลำดับ

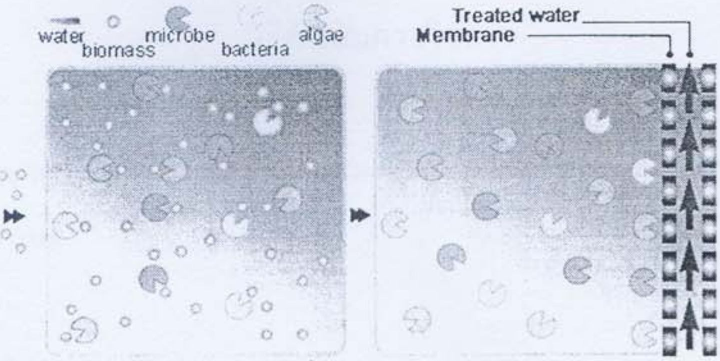
- วัสดุที่ใช้เมมเบรนรวมถึงขนาดและการกระจายของรูช่องว่างบนเมมเบรน มีผลต่ออัตราการเกิดความสกปรก เช่นกัน

- การปรับสภาพน้ำเบื้องต้น ได้แก่ การกำจัดอนุภาคแขวนลอยขนาดใหญ่ การปรับพีเอชและอุณหภูมิ และการกำจัดน้ำมัน ไขมัน เป็นต้น จะสามารถเพิ่มอัตราการซึมผ่านเมมเบรนและบรรเทาปัญหาความสกปรกให้ระบบมีรอบระยะการทำงานที่ยาวนานขึ้น (จันทร์ทรงกรด,2550)

ปัจจุบันการประยุกต์ใช้กระบวนการไมโครฟิลเตรชัน (Microfiltration, MF) ได้ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในกระบวนการบำบัดน้ำเสียจากอุตสาหกรรมและชุมชน ทั้งในกระบวนการที่ต้องใช้อากาศและกระบวนการไร้อากาศ โดยมีวัตถุประสงค์หลักเพื่อใช้แยกของแข็งแขวนลอยและเซลล์ของจุลินทรีย์ออกจากน้ำเสียก่อนปล่อยสู่แหล่งรองรับน้ำทิ้งภายนอก หลักการทำงานของกระบวนการ MF คือ การแยกส่วนของแข็งหรือแยกส่วนที่ไม่ต้องการออกจากของเหลวโดยการกรองผ่านเยื่อกรองที่มีขนาดรูพรุนขนาดเล็ก (Microporous) ซึ่งมีขนาดของรูพรุนอยู่ในช่วงระหว่าง 0.1-10 ไมโครเมตร โดยการติดตั้งแผ่นเยื่อกรองสามารถติดตั้งได้ทั้งภายในและภายนอกถังปฏิกรณ์เยื่อกรอง (membrane bioreactors, MBR) แสดงดังรูปที่ 2.9 ทั่วไประบบ MBR จะประกอบด้วย bioreactor ที่มีจุลินทรีย์ (biomass) กระจายอยู่ภายในถังปฏิกรณ์โดยจุลินทรีย์จะทำหน้าที่ย่อยสลายสารประกอบต่างๆ ของน้ำเสียในถังปฏิกรณ์ จากนั้นจึงแยกน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดแล้วออกจากถังปฏิกรณ์โดยใช้เยื่อกรองแบบ MF ดังแสดงในรูปที่ 2.10




รูปที่ 2.9 ตำแหน่งการติดตั้งเยื่องกรอง (a) ติดตั้งภายในถังปฏิกรณ์ และ (b) ติดตั้งภายนอกถังปฏิกรณ์
ที่มา: Tchobanoglous และคณะ 2003




**รูปที่ 2.10** หลักการทำงานของถังปฏิกรณ์เยื่อกรอง

การประยุกต์ใช้ถังปฏิกรณ์เยื่อกรองร่วมกับเชื้อราขาวในการบำบัดน้ำเสียได้ถูกพัฒนาขึ้นอย่างแพร่หลาย โดย Kim และคณะ 2004 พบว่าการใช้ราขาว *Trametes versicolor* KCTC 16781 ในระบบ MBR และใช้แผ่นกรองชนิดออสโมซิสผันกลับ (reverse osmosis) เพื่อกำจัดสีย้อม 3 ชนิด ได้แก่ reactive blue 19, reactive blue 49 และ reactive black 5 ในถังปฏิกรณ์ขนาด 2.5 ลิตร ซึ่งบรรจุอาหารแร่ธาตุตามสูตรของ Kirk ปริมาณ 1.7 ลิตร พบว่าสามารถลดปริมาณสีทั้ง 3 ชนิดได้ 76.9 %, 100 % และ 99.1 % ตามลำดับ และลดปริมาณ TOC ได้ 98.9% 94.8% และ 99.2% ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าการประยุกต์ใช้ราขาวร่วมกับการกรองด้วยเมมเบรนเพื่อใช้ในการบำบัดสีย้อมและสารอินทรีย์เป็นทางเลือกหนึ่งที่มีความน่าสนใจศึกษาต่อไป

นอกจากนี้ Tak-Hyun Kim และคณะ (2004) ทำการศึกษาความสามารถในการกำจัดสีของน้ำเสียสังเคราะห์ซึ่งเตรียมจากสีย้อม 3 ชนิด ได้แก่ reactive blue 19, reactive blue 49 และ reactive black 5 โดยใช้ระบบ MBR และแผ่นกรองชนิดนาโนฟิลเตรชัน (Nanofiltration) และรออสโมซิสผันกลับร่วมกับเชื้อราขาว *Trametes versicolor* KCTC 16781 พบว่า ระบบดังกล่าวสามารถที่จะกำจัดสีย้อมทั้ง 3 ชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่ง reactive blue 19 และ reactive blue 49 เนื่องจากลักษณะโครงสร้างและขนาดของโมเลกุลเล็กกว่า reactive black 5 โดยสามารถกำจัดสีย้อมได้มีประสิทธิภาพสูงกว่า 99% ภายในเวลาการบำบัด 8 ชั่วโมง ซึ่งระหว่างการเกิดปฏิกิริยาพบว่าเชื้อราขาวชนิด *Trametes versicolor* จะไม่สร้างเอนไซม์ชนิดลิกนินเปอร์ออกซิเดสโดยจะสร้างเอนไซม์ชนิดแลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสเพื่อย่อยสลายพันธะต่างๆ ในโครงสร้างของสีย้อมที่ละลายอยู่ในน้ำเสียเท่านั้น นอกจากนั้น ระบบดังกล่าวนี้ยังสามารถลดปริมาณสารอินทรีย์ที่ละลายน้ำในรูปของค่า TOC ได้มากกว่า 90% เช่นเดียวกัน

# บทที่ 3

# วิธีดำเนินการวิจัย

## 1. การศึกษาชนิดของธาตุอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินของเชื้อราขาวสายพันธุ์ *L. strigosus*

### 1.1 การเตรียมกล้าเชื้อรา *L. strigosus*

เขี่ยเส้นใยบริเวณที่กำลังเจริญของเชื้อรา *L. strigosus* จาก stock culture ที่เก็บรักษาไว้ที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มาวางที่กลางจานอาหาร PDA จานใหม่ นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 5 วัน จนเส้นใยสีขาวแพร่กระจายเต็มจานอาหาร จากนั้นใช้แท่งเจาะวุ้น (Cork borer) เบอร์ 3 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7.0 มิลลิเมตร ตัดส่วนปลายเส้นใยจากบริเวณริมขอบของ *L. strigosus* เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อ (Inoculum) สำหรับการทดลองต่อไป

### 1.2 การศึกษาการเจริญและการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนิน (Ligninolytic enzymes) ของเชื้อราขาวสายพันธุ์ *L. strigosus*

ถ่ายกล้าเชื้อรา *L. strigosus* อายุ 5 วัน จำนวน 10 ชิ้นวุ้น ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหาร Minimal Medium (MM) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยมีน้ำตาลกลูโคสและ yeast extract เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนตามลำดับ จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบที่ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง โดยเก็บตัวอย่างทุกวันเพื่อวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง (Cell dry weight) และกิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ เอนไซม์แลคเคส (LAC) เอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (MnP) และเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (LiP)

1.2.1 เอนไซม์แลคเคส วัดจากอัตราการเพิ่มขึ้นของค่าการดูดกลืนแสงของ cation radical (2, 2 azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate, ABTS $^{\bullet +}$) จากปฏิกิริยาออกซิเดชันของ ABTS ตามวิธีของ Eggert *et al.* (1996) โดยส่วนผสมที่เกิดปฏิกิริยา (Reaction mixture) ประกอบด้วยสารละลาย ABTS ความเข้มข้น 0.588 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 850 ไมโครลิตร เป็นสับสเตรต (Substrate) สารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 4.5 ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และสารละลายเอนไซม์ปริมาตร 50

ไมโครลิตร หลังจากการทำปฏิกิริยา วัดอัตราการเพิ่มขึ้นของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร แล้วคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์จากค่า molar absorption coefficient ของ ABTS ซึ่งเท่ากับ 36,000 โมลต่อลิตรต่อเซนติเมตร โดย 1 หน่วยของเอนไซม์ คือ ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถออกซิไดซ์ ABTS 1 ไมโครโมล เป็น ABTS $^{\bullet +}$ ในเวลา 1 นาที

1.2.2 เอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส วัดจากอัตราการเพิ่มขึ้นของค่าการดูดกลืนแสงของ indamine dye จากปฏิกิริยาออกซิเดชันของ 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone (MBTH) ตามวิธีของ Castello *et al.* (1994) โดยส่วนผสมที่เกิดปฏิกิริยา (Reaction mixture) ประกอบด้วยสารละลาย MBTH ความเข้มข้น 0.28 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 250 ไมโครลิตร เป็นสับสเตรต (Substrate) สารละลาย DMAB ความเข้มข้น 4.95 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร สารละลายแมงกานีสซัลเฟต ความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร สารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 4.5 ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 0.25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และสารละลายเอนไซม์ปริมาตร 50 ไมโครลิตร หลังจากการทำปฏิกิริยา วัดอัตราการเพิ่มขึ้นของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร แล้วคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์จากค่า molar absorption coefficient ของ MBTH ซึ่งเท่ากับ 53,000 โมลต่อลิตรต่อเซนติเมตร โดย 1 หน่วยของเอนไซม์ คือ ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถออกซิไดซ์ MBTH 1 ไมโครโมล เป็น indamine dye ในเวลา 1 นาที

1.2.3 เอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส วัดจากอัตราการเพิ่มขึ้นของค่าการดูดกลืนแสงของ veratraldehyde จากปฏิกิริยาออกซิเดชันของ veratryl alcohol ตามวิธีของ Tein and Kirk (1984) โดยส่วนผสมที่เกิดปฏิกิริยา (Reaction mixture) ประกอบด้วยสารละลาย veratryl alcohol ความเข้มข้น 1.43 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 700 ไมโครลิตร สารละลายซัคซิเนตบัฟเฟอร์ พีเอช 3.0 ความเข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 2.00 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และสารละลายเอนไซม์ปริมาตร 100 ไมโครลิตร หลังจากการทำปฏิกิริยา วัดอัตราการเพิ่มขึ้นของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร แล้วคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์จากค่า molar absorption coefficient ของ veratryl alcohol ซึ่งเท่ากับ 9,300 โมลต่อลิตรต่อเซนติเมตร โดย 1 หน่วยของเอนไซม์ คือ ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถออกซิไดซ์ veratryl alcohol 1 ไมโครโมล เป็น veratraldehyde ในเวลา 1 นาที

1.2.4 การคำนวณกิจกรรมของเอ่นไซม์

$$\text{กิจกรรมเอนไซม์ (หน่วยต่อลิตร)} = \frac{dA/dt \cdot V_T \cdot 10^6}{\varepsilon \cdot l \cdot V_E}$$

โดย dA/dt คือ อัตราการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงต่อนาที

$V_T$ คือ ปริมาตรทั้งหมดของ reaction mixture (มิลลิลิตร)

$V_E$ คือ ปริมาตรของเอนไซม์ (มิลลิลิตร)

$\varepsilon$ คือ ค่า molar absorption coefficient ของสับสเตรต (โมลต่อลิตรต่อเซนติเมตร)

$l$ คือ ความกว้างของคิวเวตต์ (เซนติเมตร)

**หมายเหตุ** ใช้เอนไซม์ที่ถูก inactivate ในน้ำเดือดเป็นเวลา 20 นาที เป็น blank

1.3 การหาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ของเชื้อราขาวสายพันธุ์ *L. strigosus*

ถ่ายกล้าเชื้อรา *L. strigosus* อายุ 5 วัน จำนวน 20 ชิ้นวุ้น ลงในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหาร MM ปริมาตร 200 มิลลิลิตร โดยทำการทดลองจำนวน 8 ชุดการทดลอง (Treatment) ซึ่งแต่ละชุดการทดลองมีแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส (Glucose) น้ำตาลฟรุคโตส (Fructrose) น้ำตาลทราย (Sucrose) น้ำตาลมอลโตส (Maltose) น้ำตาลแลคโตส (Lactose) น้ำตาลเซลโลไบโอส (Cellobiose) โซลูเบิลสตาร์ช (Soluble starch) และกลีเซอรอล (Glycerol) โดยทุกชุดการทดลองใช้ yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบที่ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง โดยเก็บตัวอย่างทุกๆ 2 วัน การทดลองละ 3 ซ้ำ เพื่อวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์แลคเคสและเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (ในวิธีแสดงดังหัวข้อ 1.2.1 1.2.4)

1.4 การหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ของเชื้อราขาวสายพันธุ์ *L. strigosus*

ถ่ายกล้าเชื้อรา *L. strigosus* อายุ 5 วัน จำนวน 20 ชิ้นวุ้น ลงในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหาร Minimal Medium ปริมาตร 200 มิลลิลิตร โดยทำการทดลองจำนวน 7 ชุดการทดลอง (Treatment) ซึ่งแต่ละชุดการทดลองมีแหล่งไนโตรเจนต่างชนิดกัน ได้แก่ ยีสต์สกัด (Yeast extract) บีฟสกัด (Beef extract) เปปโตน (Peptone) แอล-แอสพาราจีน (L-Asparagine) แอมโมเนียมไนเตรต ($NH_4NO_3$)

แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_3)_2SO_4$) และยูเรีย (Urea) โดยทุกชุดการทดลองใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบที่ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง โดยเก็บตัวอย่างทุก ๆ 2 วัน การทดลองละ 3 ซ้ำ เพื่อวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์แลคเคสและเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (ในวิธีแสดงดังหัวข้อ 1.2.1 1.2.4)

**2. การศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ (Medium composition) ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินของ *L. strigosus***

การทดลองนี้พิจารณาปัจจัย (Factor) และระดับ (Level) ของปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินของ *L. strigosus* จำนวน 4 ปัจจัย ประกอบด้วย ความเข้มข้นเซลโลไบโอส (กรัม/ลิตร) ความเข้มข้น peptone (กรัม/ลิตร) ความเข้มข้น L-Asparagine (กรัม/ลิตร) และความเข้มข้น $CuSO_4$ (กรัม/ลิตร) โดยแต่ละปัจจัยจะมี 3 ระดับ ซึ่งวิธีทากุชิจะแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนการทดลอง ปัจจัยและระดับของปัจจัยในรูปของ orthogonal array (OA) โดยการทดลองที่ประกอบด้วยปัจจัยที่มี 3 ระดับ จำนวน 4 ปัจจัย สามารถใช้ OA แบบ $L_9$ ($3^4$) ดังแสดงในตารางที่ 3.1

**ตารางที่ 3.1** ปัจจัยและระดับของปัจจัยที่กำหนด

| ปัจจัย | ระดับ | | |
|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 |
| 1. ความเข้มข้นเซลโลไบโอส (กรัม/ลิตร): A | 5.00 | 10.00 | 15.00 |
| 2. ความเข้มข้น peptone (กรัม/ลิตร): B | 0.3125 | 0.6250 | 1.2500 |
| 3. ความเข้มข้น L-Asparagine (กรัม/ลิตร): C | 0.3125 | 0.6250 | 1.2500 |
| 4. ความเข้มข้น $CuSO_4$ (กรัม/ลิตร): D | 0.001 | 0.002 | 0.004 |

**3. การทดสอบการบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนลิกนินโดยเอนไซม์ย่อยสลายลิกนิน ของ *L. strigosus***

ถ่ายกล้าเชื้อรา *L. strigosus* จำนวน 20 ชิ้นวุ้น ลงในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุน้ำเสียปริมาตร 200 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร Minimal Medium สูตร optimized เป็นองค์ประกอบหลักและผสมด้วยน้ำเสียจากโรงงานผลิตเยื่อและกระดาษ จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบที่ 150 รอบต่อ

นาที ที่อุณหภูมิ ห้อง โดยเก็บตัวอย่างทุกชั่วโมงที่ 0 6 12 18 24 30 36 42 48 72 96 120 144 168 และ 192 ทำการทดลองละ 3 ซ้ำ เพื่อวิเคราะห์ประสิทธิภาพการกำจัดสี (% Decolorization) และกิจกรรมเอนไซม์แลคเคสและเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (ในวิธีแสดงดังหัวข้อ 1.2.1 1.2.4)

3.1 การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

หาน้ำหนักเซลล์แห้ง (Cell dry weight) ตามวิธีของ Erkurt และคณะ (2007) โดยนำกระดาษกรองเบอร์ 4 (Whatman, England) ไปอบในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำออกมาใส่ในเดซิเคเตอร์เป็นเวลา 30 นาที จึงนำออกมาชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอน (Constant weight) แล้วบันทึกค่าเป็นน้ำหนักกระดาษกรองเปล่า ($W_2$)

กรองเชื้อรา *L. strigosus* ที่เพาะเลี้ยงในฟลาสก์ผ่านกระดาษกรองที่ทราบน้ำหนัก นำไปอบในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำออกมาใส่ในเดซิเคเตอร์เป็นเวลา 30 นาที จึงนำออกมาชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอน บันทึกค่าเป็นน้ำหนักรวมระหว่างกระดาษกรองและเชื้อรา *L. strigosus* ($W_1$) โดยสามารถคำนวณน้ำหนักเซลล์แห้ง (Cell dry weight) ได้ดังนี้

$$\text{น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ)} = (W_1 - W_2)$$

3.2 การหาร้อยละการกำจัดสี (% Dye removal)

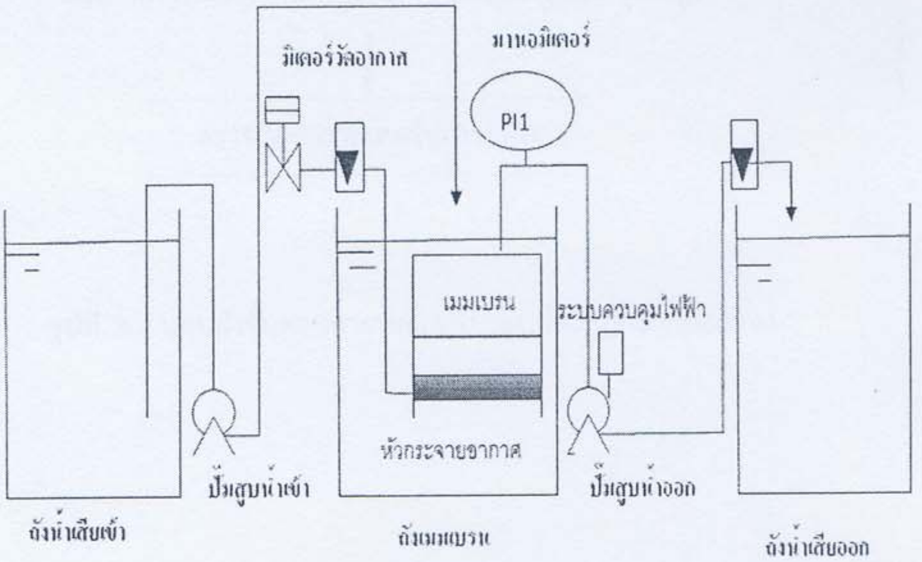
นำสารละลายตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนใสด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำสารละลายส่วนใสที่ได้มาวัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance, Abs) ที่ความยาวคลื่นสูงสุด ($\lambda_{max}$) ของสีย้อมแต่ละชนิด (ความยาวคลื่นสูงสุดของสี RBBR, RB5 และ indigo 4B มีค่าเท่ากับ 591, 597 และ 595 นาโนเมตร ตามลำดับ) จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงไปคำนวณหาค่าร้อยละการกำจัดสีได้ดังนี้

$$\text{ร้อยละการกำจัดสี} = \frac{(\text{ค่า Abs. ก่อนการกำจัดสี} - \text{ค่า Abs. หลังการกำจัดสี}) \times 100}{\text{ค่า Abs. ก่อนการกำจัดสี}}$$

**หมายเหตุ** ชุดการทดลองควบคุม (Control) คือ ชุดการทดลองที่ปราศจากเชื้อรา

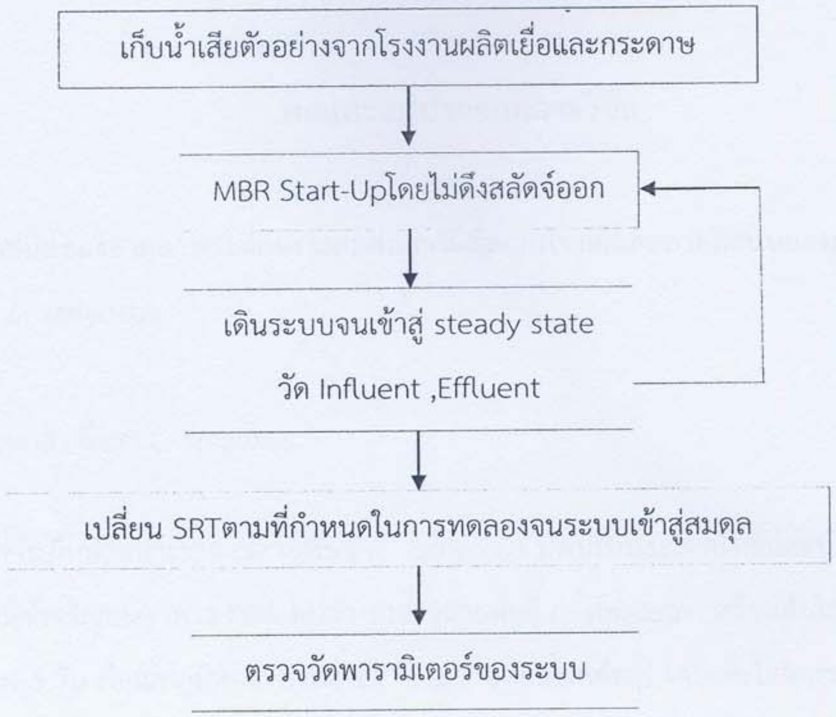
4. **การศึกษาการบำบัดสีจากน้ำทิ้งอุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษของเชื้อราขาว *L. strigosus* ภายในถังปฏิกรณ์เยื่อกรอง**

แบบจำลองการบำบัดน้ำเสียจากอุตสาหกรรมการผลิตเยื่อและกระดาษของเชื้อราขาว *L. strigosus* ภายในถังปฏิกรณ์เยื่อกรองแสดงดังรูปที่ 3.1 ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้ ถังปฏิกรณ์เยื่อกรองเป็นถังทำมาจากอะคลิลิกใส ความสูง 0.42 เมตร กว้าง 0.17 เมตร และยาว 0.17 เมตร ภายในตัวถังบรรจุเฟรมเมมเบรนทำาจากเหล็กสเตนเลส ขนาดความกว้าง 15 เซนติเมตร ความยาว 7 เซนติเมตร และสูง 27 เซนติเมตร โดยมีจำนวนเมมเบรนผูกติดกับเฟรม 2 ชุด ด้านล่างจะมีหัวกระจายอากาศ 2 หัว ซึ่งจะต่อกับปั๊มอากาศ ใน 1 โมดูลของเมมเบรนจะมีพื้นที่ทั้งหมด 0.04 ตารางเมตร




**รูปที่ 3.1** ผังการทำงานของระบบถังปฏิกรณ์เยื่อกรองที่ใช้ในการทดลอง

ในการทดลองใช้เมมเบรนที่ทำมาจาก Polyvinylidene fluoride (PVDF) มีพื้นที่ผิวจำเพาะ 0.02 ตารางเมตรต่อหนึ่งชุดเมมเบรน จำนวน 23 เส้น แต่ละเส้นยาว 10 เซนติเมตร 1 โมดูลของเมมเบรนจะมีพื้นที่ทั้งหมด 0.04 ตารางเมตร และควบคุมฟลักซ์ของเมมเบรนเท่ากับ 25 ลิตรต่อตารางเมตรต่อชั่วโมง ทั้งนี้ได้ติดตั้งเกจวัดความดันเพื่อติดตามความดันคร่อมเมมเบรนระหว่างด้าน Feed และด้าน Permeate โดยเมื่อความดันคร่อมเมมเบรนขึ้นถึง 15 กิโลปาสคาล แสดงว่าเกิดการอุดตันเมมเบรน (fouling) จะถอดเมมเบรนล้างด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรด์ 3,000 มก.ต่อลิตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อทำความสะอาด ขั้นตอนการดำเนินการทดลองเพื่อประยุกต์ใช้เชื้อราขาวร่วมบำบัดในถังปฏิกรณ์เยื่อกรองแสดงได้ดังรูปที่ 3.2




**รูปที่ 3.2** แผนผังขั้นตอนการทดลองในระบบถังปฏิกรณ์เยื่อกรอง

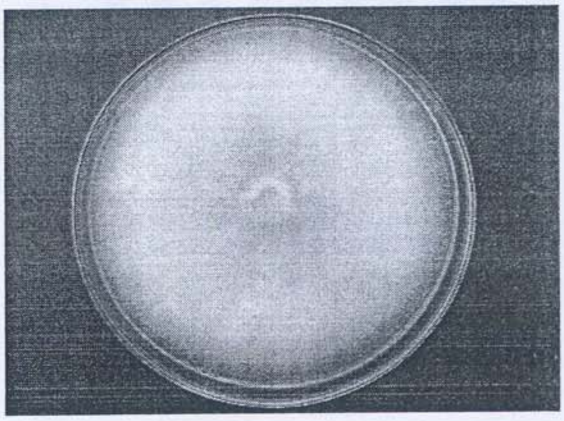
# บทที่ 4

# ผลและอภิปรายผลการวิจัย

## 1. การศึกษาชนิดของธาตุอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินของเชื้อราขาวสายพันธุ์ *L. strigosus*

### 1.1 การเตรียมกล้าเชื้อรา *L. strigosus*

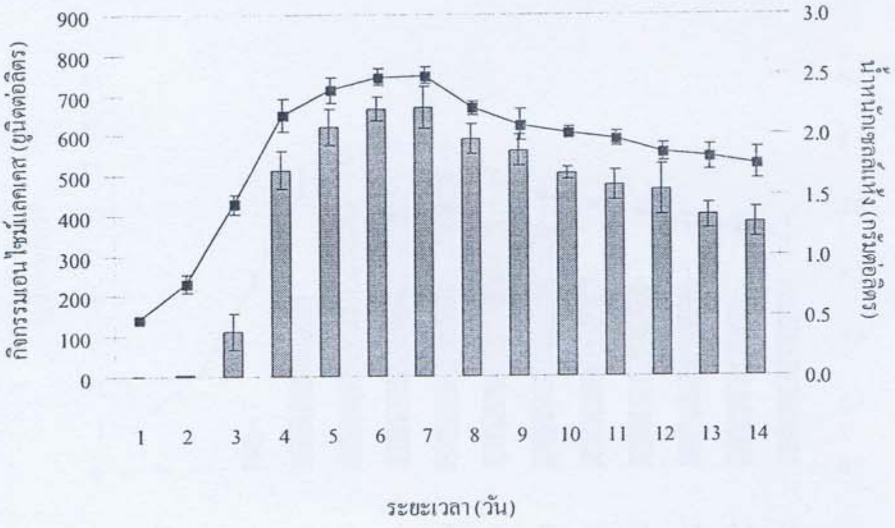
จากการเก็บตัวอย่างราขาวสายพันธุ์ *L. strigosus* ที่พบในประเทศไทยและนำมาเพาะเลี้ยงภายในห้องปฏิบัติการให้เจริญบนอาหาร PDA พบว่า ราขาวสายพันธุ์ *L. strigosus* สร้างเส้นใยบางๆ สีขาว และใช้ระยะเวลาเพียง 5 วัน ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 ± 2 องศาเซลเซียส) โดยเส้นใยจกระจายจนเต็มจานเพาะเชื้อค่อนข้างรวดเร็ว แสดงดังรูปที่ 4.1



**รูปที่ 4.1** การเจริญของ *L. strigosus* หรือเห็ดเพ็กในระยะสร้างเส้นใยบนอาหาร PDA ที่เวลา 5 วัน

1.2 การศึกษาการเจริญและการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนิน (Ligninolytic enzymes) ของเชื้อราขาวสายพันธุ์ *L. strigosus*

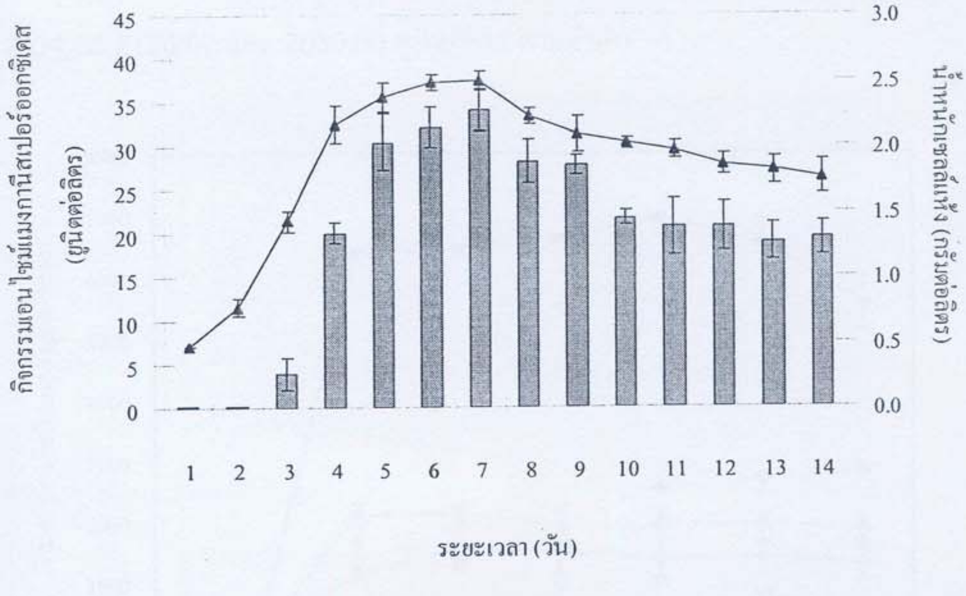
ผลจากการทดลองเพื่อศึกษาการเจริญและความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินของ *L. strigosus* ในระดับฟลาสก์ โดยใช้อาหาร Minimal Medium (MM) ที่มีกลูโคสและ yeast extract เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนตามลำดับ พบว่า *L. strigosus* สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินได้ 2 ชนิด คือ เอนไซม์แลคเคส (Lac) และเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (MnP) โดยตลอดระยะเวลา 14 วัน ของการทดลอง ไม่พบกิจกรรมเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (LiP) ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของ *L. strigosus* และความสามารถในการผลิตเอนไซม์แลคเคสและเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส แสดงดังรูปที่ 4.2 และ 4.3 ตามลำดับ




**รูปที่ 4.2** ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้ง ( —■—) และกิจกรรมเอนไซม์แลคเคส ( ▥ ) ของ *L. strigosus* ในช่วงของการทดลอง

น้ำหนักเซลล์แห้งของ *L. strigosus* หลังจากการทดลองผ่านไป 1 วัน มีค่าเท่ากับ 0.47 กรัม/ลิตร จากนั้นจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงการเจริญปฐมภูมิ (Primary growth) และเข้าสู่ช่วงการเจริญทุติยภูมิ (Secondary growth) ในวันที่ 4 ของการทดลอง ซึ่งมีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 2.17 กรัม/ลิตร หลังจากนั้นน้ำหนักเซลล์แห้งมีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในวันที่ 5 (2.37 กรัม/ลิตร) และคงที่ในวันที่ 6 (2.48 กรัม/ลิตร) และ 7 (2.49 กรัม/ลิตร) ของการทดลอง ส่วนกิจกรรมเอนไซม์แลคเคสในวันแรกของการทดลองมีค่าเท่ากับ 0.29 ยูนิต/ลิตร และเพิ่มขึ้นตามลำดับในวันที่ 2 และ 3 จากนั้นกิจกรรมเอนไซม์แลคเคสเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในวันที่

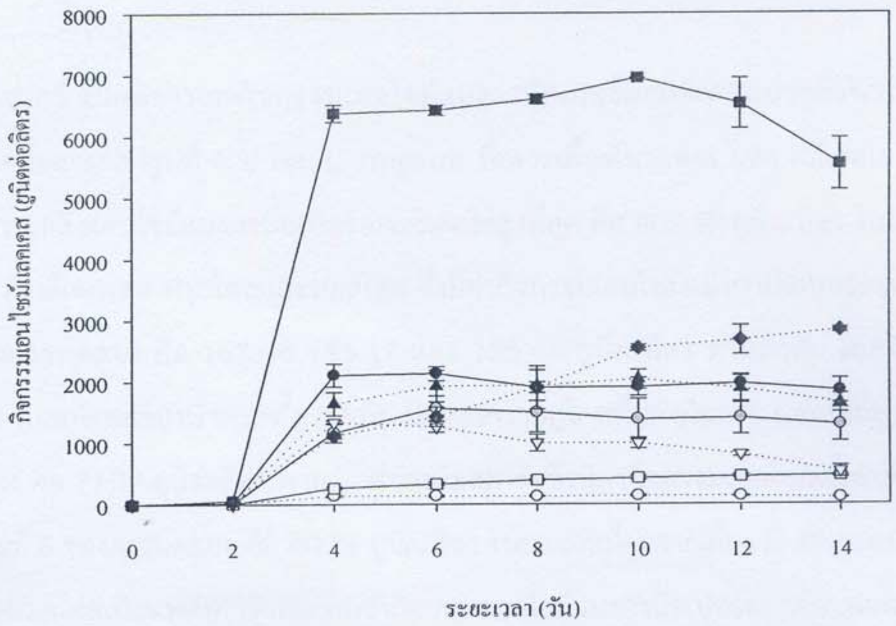
4 ของการทดลอง คือ 513.33 ยูนิต/ลิตร และเพิ่มขึ้นต่อไปจนมีค่าสูงสุดในวันที่ 7 ของการทดลอง คือ 669.81 ยูนิต/ลิตร หลังจากเวลาผ่านไป 7 วัน พบว่าทั้งน้ำหนักเซลล์แห้งและกิจกรรมเอนไซม์แลคเคสมีค่าลดลง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Arora และ Gill (2000) ที่พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งของ *Phlebia* spp. และกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์แลคเคส (Specific activity) มีค่าลดลงสัมพันธ์กันในช่วงท้ายของการเจริญเติบโตเมื่อเลี้ยงในอาหาร Mineral salts broth โดยเกิดจากการสลายตัวเอง (Autolysis) ของเซลล์เชื้อรา จากข้อมูลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์แลคเคสของ *L. strigosus* ถูกสร้างในช่วงการเจริญทุติยภูมิ โดยสอดคล้องกับรายงานของ Teerapatsakul และคณะ (2007) ซึ่งพบว่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสของเชื้อราขาว *Ganoderma* sp. KU-Alk4 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Standard kirk s basal medium ถูกสร้างในช่วงการเจริญทุติยภูมิเช่นกัน นอกจากนี้ Wesenberg และคณะ (2003) ได้รายงานว่าโดยทั่วไปเชื้อราขาวจะผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินในช่วง secondary metabolism เนื่องจากการออกซิเดชันของลิกนินในธรรมชาติจะไม่ให้พลังงานแก่เชื้อรา




รูปที่ 4.3 ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้ง (—■—) และกิจกรรมเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (▲) ของ *L. strigosus* ในช่วงของการทดลอง

1.3 การหาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ของเชื้อราขาวสายพันธุ์ *L. strigosus*

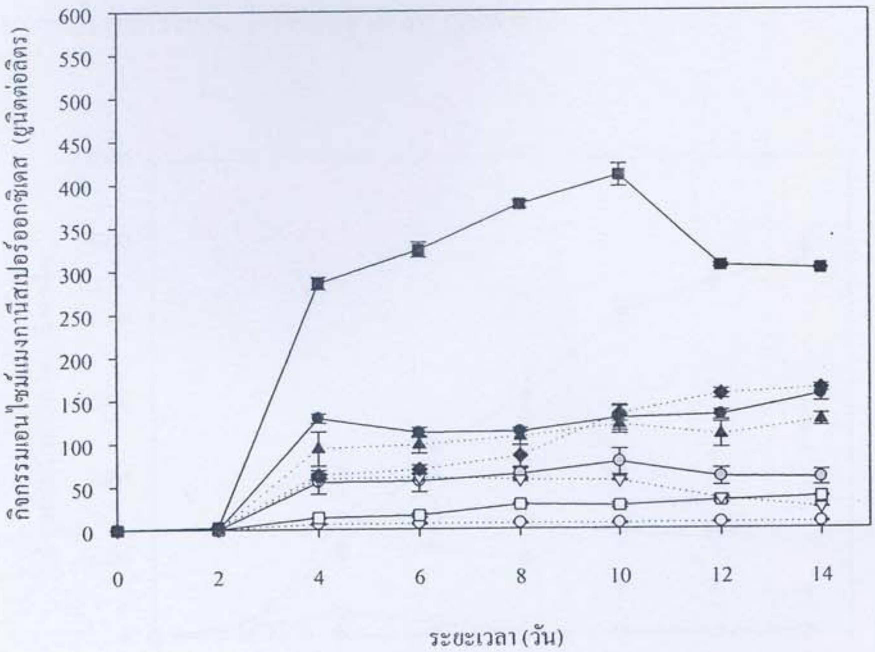
จากการศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แลคเคสของ *L. strigosus* จำนวน 8 ชนิด ได้แก่ กลูโคส ฟรุกโตส ซูโครส มอลโตส แลคโตส เซลโลไบโอส โซลูเบิลสตาร์ชและกลีเซอรอล พบว่า *L. strigosus* สามารถผลิตเอนไซม์แลคเคสได้สูงที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร Minimal Medium (MM) ที่มีน้ำตาลเซลโลไบโอสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสเท่ากับ 58.95 ยูนิต/ลิตร ในวันที่ 2 ของการทดลอง (ภาพที่ 4.4) และเพิ่มสูงขึ้นจนมีค่าเท่ากับ 6374.27 ยูนิต/ลิตร ในวันที่ 4 ของการทดลอง จากนั้นกิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้นอีกเล็กน้อยจนมีค่าสูงสุดในวันที่ 10 ของการทดลอง คือ 6947.26 ยูนิต/ลิตร และค่อย ๆ ลดลงตามระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่มากขึ้น ขณะที่เมื่อเพาะเลี้ยง *L. strigosus* ในอาหาร MM ที่มีกลีเซอรอล ฟรุกโตส และมอลโตสเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าสามารถผลิตเอนไซม์แลคเคสได้ต่ำกว่าเซลโลไบโอส แต่ยังมีระดับที่สูงกว่าเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยกิจกรรมเอนไซม์แลคเคสของ *L. strigosus* ที่ใช้กลีเซอรอล ฟรุกโตส และมอลโตสเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่ามีค่าสูงที่สุดในวันที่ 14 6 และ 10 ของการทดลอง คือ 2834.58 2126.67 และ 2030.00 ยูนิต/ลิตร ตามลำดับ




**รูปที่ 4.4** ความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมเอนไซม์แลคเคส (ยูนิต/ลิตร) ที่ผลิตโดย *L. strigosus* เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร MM และระยะเวลา (วัน) ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน ดังนี้ (—○— กลูโคส; —●— ฟรุกโตส; ···○··· ซูโครส; ···▲··· มอลโตส; —□— แลคโตส; —■— เซลโลไบโอส; ···▽··· โซลูเบิลสตาร์ช และ ···◆··· กลีเซอรอล)

จากผลการทดลองข้างต้นพบว่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสของ *L. strigosus* มีค่าสูงเมื่อใช้เซลโลไบโอสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยสอดคล้องกับงานวิจัยของ Galhaup *et al* (2002) ซึ่งรายงานว่าเซลโลไบโอสและกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมของ *Trametes pubescens* MB 89 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร Basal medium เนื่องจากเป็นสับสเตรตที่ใช้ได้ง่ายโดยเชื้อราและเมื่อใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนของ *L. strigosus* พบว่ามีค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสรองจากเซลโลไบโอส แต่สูงกว่าแหล่งคาร์บอนชนิดอื่น ๆ โดยกิจกรรมเอนไซม์แลคเคสค่อย ๆ เพิ่มขึ้นในช่วง 8 วันแรกของการทดลองและสูงขึ้นอย่างชัดเจนตั้งแต่วันที่ 10 ของการทดลองเป็นต้นไป โดยผลการทดลองที่ได้มีความใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Teerapatsakul *et al* (2007) ซึ่งรายงานว่ากลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แลคเคสของ *Ganoderma* sp. KU-Alk4 ภายใต้การออกแบบการทดลองแบบ box-behnken design เนื่องจากกลีเซอรอลถูกใช้อย่างช้า ๆ เมื่อเปรียบเทียบกับกลูโคส นอกจากนี้ในกรณีของโซลูเบิลสตาร์ชอาจเป็นไปได้ว่า *L. strigosus* ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ประเภทที่ไฮโดรไลซ์สารจำพวกสตาร์ชได้ ทำให้กิจกรรมเอนไซม์แลคเคสมีค่าไม่สูงมากนัก และเมื่อพิจารณาจากผลการทดลองข้างต้นรวมทั้งรายงานการศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์แลคเคสโดยทั่วไปของราไวต์รอทที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว (Submerged culture) จึงอาจกล่าวได้ว่า การพิจารณาเลือกแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แลคเคสโดยเชื้อราขาวขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อราขาวด้วย

นอกจากนี้ เมื่อพิจารณากิจกรรมเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสพบว่ามีแนวโน้มเช่นเดียวกับกิจกรรมเอนไซม์แลคเคส (รูปที่ 4.5) โดย *L. strigosus* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MM ที่มีเซลโลไบโอสเป็นแหล่งคาร์บอนสามารถผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสได้สูงที่สุด คือ 409.49 ยูนิต/ลิตร ในวันที่ 10 ของการทดลองตามด้วยกลีเซอรอล ฟรุกโตสและมอลโตส ซึ่งมีค่ากิจกรรมเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสสูงที่สุดในวันที่ 14 ของการทดลอง คือ 162.08 155.17 และ 125.45 ยูนิต/ลิตร ตามลำดับ โดยกิจกรรมเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสของน้ำตาลทั้ง 3 ชนิด มีค่าสูงกว่ากลูโคสที่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุดในวันที่ 10 ของการทดลอง คือ 77.39 ยูนิต/ลิตร ตามด้วยโซลูเบิลสตาร์ชซึ่งมีค่ากิจกรรมเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสสูงที่สุดในวันที่ 6 ของการทดลอง คือ 60.26 ยูนิต/ลิตร ในขณะที่เมื่อเพาะเลี้ยง *L. strigosus* ในอาหาร MM ที่มีซูโครสและแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ากิจกรรมเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสตลอดระยะเวลา 14 ของการทดลองมีค่าต่ำกว่า 40 ยูนิต/ลิตร จากผลการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แลคเคสของ *L. strigosus* พบว่าเซลโลไบโอสสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์แลคเคสได้สูงกว่ากลูโคสประมาณ 4.5 เท่า ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงสนใจศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แลคเคสของ *L. strigosus* เนื่องจากมีรายงานว่าแหล่งไนโตรเจนมีบทบาทสำคัญต่อการผลิตเอนไซม์แลคเคสของเชื้อราไวต์รอท (Galhaup *et al.*, 2001; Stajic *et al.*, 2006)



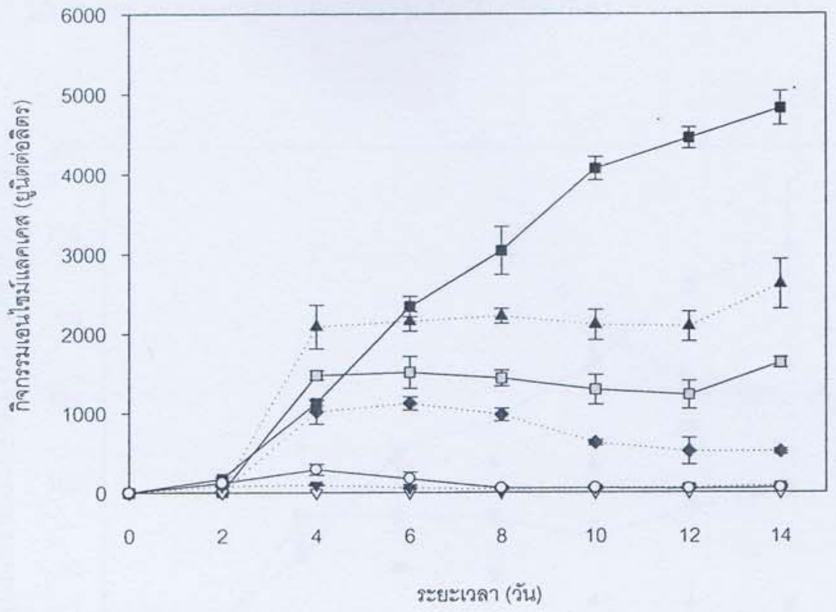

**รูปที่ 4.5** ความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (ยูนิต/ลิตร) ที่ผลิตโดย *L. strigosus* เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร MM และระยะเวลา (วัน ) ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน ดังนี้

(—◎— กลูโคส; —●— ฟรุกโตส; ···○··· ซูโครส; ···▲··· มอลโตส; —□— แลคโตส; —■— เซลโลไบโอส; ···▽··· โซลูเบิลสตาร์ช และ ···◆··· กลีเซอรอล)

1.4 การหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ของเชื้อราขาวสายพันธุ์ *L. strigosus*

จากการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แลคเคสของ *L. strigosus* จำนวน 7 ชนิด ได้แก่ yeast extract L-Asparagine peptone beef extract urea $NH_4NO_3$ และ $(NH_4)_2SO_4$ พบว่า *L. strigosus* สามารถผลิตเอนไซม์แลคเคสได้สูงที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร Minimal Medium (MM) ที่มี L-Asparagine เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยกิจกรรมเอนไซม์แลคเคสเพิ่มสูงขึ้นอย่างชัดเจนตั้งแต่วันที่ 2 ของการทดลองไปจนถึงวันที่ 10 ของการทดลอง ซึ่งมีค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสเท่ากับ 4068.31 ยูนิต/ลิตร และค่อย ๆ เพิ่มอีกเล็กน้อยจนกระทั่งวันที่ 14 ของการทดลองซึ่งเป็นวันที่กิจกรรมเอนไซม์แลคเคสมีค่าสูงที่สุด คือ 4818.60 ยูนิต/ลิตร ขณะที่เมื่อเพาะเลี้ยง *L. strigosus* ในอาหาร MM ที่มีแหล่งไนโตรเจนอื่น ๆ (peptone, yeast extract และ beef extract) พบว่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสมีค่าต่ำกว่าเมื่อใช้ L-Asparagine เป็น

แหล่งไนโตรเจน โดยกิจกรรมเอนไซม์แล่คเคสเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจากวันที่ 2 ของการทดลองไปจนถึงวันที่ 4 ของการทดลอง จากนั้นกิจกรรมเอนไซม์ค่อนข้างคงที่ (รูปที่ 4.6)

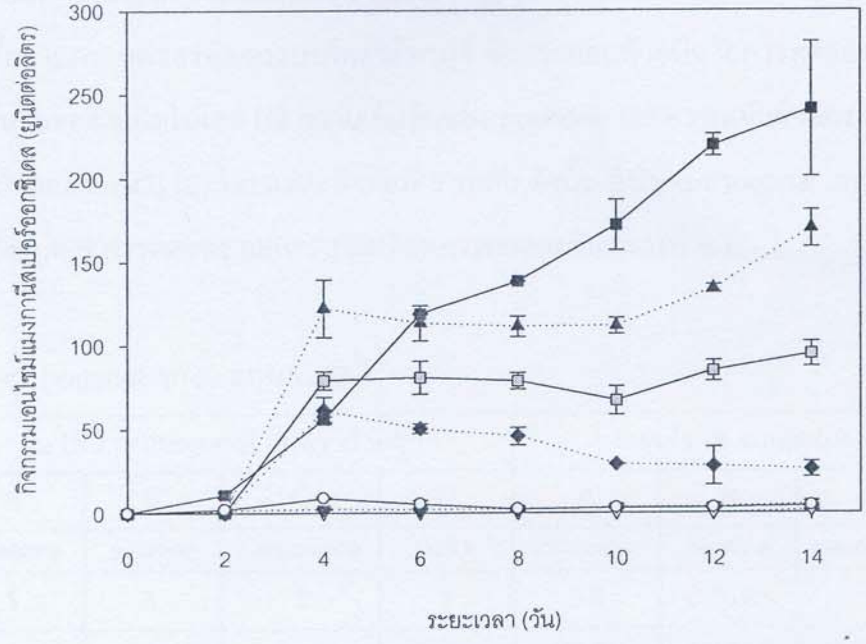



รูปที่ 4.6 ความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมเอนไซม์แลคเคส (ยูนิต/ลิตร) ที่ผลิตโดย *L. strigosus* เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร MM และระยะเวลา (วัน) ที่มีแหล่งไนโตรเจนต่างชนิดกัน ดังนี้ (–□– Yeast extract; –■– L-Asparagine; ···▲··· Peptone; ···◆··· Beef extract; ···▽··· Urea; ···▼··· $NH_4NO_3$ และ –○– $(NH_4)_2SO_4$ )

ส่วนการเพาะเลี้ยง *L. strigosus* ในอาหาร MM ที่มี urea $NH_4NO_3$ และ $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจนพบว่า กิจกรรมเอนไซม์แลคเคสตลอดระยะเวลา 14 วัน ของการทดลอง มีค่าต่ำกว่า 300 ยูนิต/ลิตร โดยกิจกรรมเอนไซม์แลคเคสของ *L.strigosus* เมื่อใช้ urea $NH_4NO_3$ และ $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจนมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุดเท่ากับ 2.94 95.08 และ 288.83 ยูนิต/ลิตร ในวันที่ 10 4 และ 4 ของการทดลองตามลำดับ

สำหรับการศึกษากิจกรรมเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (รูปที่ 4.7) พบว่ามีแนวโน้มเช่นเดียวกับกิจกรรมเอนไซม์แลคเคส โดย *L. strigosus* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MM ที่มี L-Asparagine เป็นแหล่งไนโตรเจนสามารถผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสได้สูงที่สุด คือ 241.11 ยูนิต/ลิตร ในวันที่ 14 ของการทดลอง ขณะที่เมื่อเพาะเลี้ยง *L. strigosus* โดยใช้ peptone เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่ากิจกรรมเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสมีค่าสูงสุดในวันที่ 14 ของการทดลอง คือ 169.88 ยูนิต/ลิตร ตามด้วย yeast

extract และ beef extract ซึ่งมีค่ากิจกรรมเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสสูงที่สุดในวันที่ 14 และ 4 ของการทดลอง คือ 94.90 และ 61.34 ยูนิต/ลิตร ตามลำดับ ส่วนการทดลองเพาะเลี้ยง *L. strigosus* ในอาหาร MM ที่มี urea $NH_4NO_3$และ $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจนพบว่า กิจกรรมเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสตลอดระยะเวลา 14 วัน ของการทดลอง มีค่าต่ำกว่า 10.00 ยูนิต/ลิตร




รูปที่ 4.7 ความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (ยูนิต/ลิตร) ที่ผลิตโดย *L. strigosus* เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร MM และระยะเวลา (วัน) ที่มีแหล่งไนโตรเจนต่างชนิดกัน ดังนี้ ( —□— Yeast extract; —■— L-Asparagine; ···▲·· Peptone; ···◆·· Beef extract; ···▽·· Urea; ···▼··· $NH_4NO_3$ และ —○— $(NH_4)_2SO_4$ )

จากผลการศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนิน ของ *L. strigosus* พบว่า L-Asparagine และ peptone สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์แลคเคสได้สูงกว่า yeast extract ประมาณ 3 และ 1.6 เท่า ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าแหล่งไนโตรเจนประเภทสารอินทรีย์มีความจำเป็นต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินของ *L. strigosus* มากกว่าแหล่งไนโตรเจนประเภทสารอนินทรีย์อีกด้วย

## 2. การศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ (Medium composition) ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินของ *L. strigosus*

### 2.1 การผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินจาก *L. strigosus* ตามการทดลองที่ออกแบบโดยวิธีทากุชิ

การผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินจาก *L. strigosus* ในระดับฟลาสก์ โดยใช้องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อตามการทดลองที่ออกแบบโดยวิธีทากุชิ ซึ่งประกอบด้วยปัจจัยการทดลอง จำนวน 4 ปัจจัย ได้แก่ ความเข้มข้นของเซลโลไบโอส (A) ความเข้มข้นของ peptone (B) ความเข้มข้นของ L-Asparagine (C) และความเข้มข้นของ $CuSO_4$ (D) โดยแต่ละปัจจัยมี 3 ระดับ ดังนั้น จึงใช้ orthogonal array แบบ $L_9$ $(3^4)$ ที่มีการทดลองทั้งหมด 9 การทดลอง แสดงรายละเอียดการทดลองดังตารางที่ 4.1

**ตารางที่ 4.1** orthogonal array แบบ $L_9$ $(3^4)$

| Run No. | $L_9$ $(3^4)$ orthogonal array design | | | | levels of variables (กรัม/ลิตร) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | A | B | C | D | A | B | C | D |
| | cellobiose | peptone | L-Asparagine | $CuSO_4$ | cellobiose | peptone | L-Asparagine | $CuSO_4$ |
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 5.0 | 0.3125 | 0.3125 | 0.001 |
| 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 5.0 | 0.6250 | 0.6250 | 0.002 |
| 3 | 1 | 3 | 3 | 3 | 5.0 | 1.2500 | 1.2500 | 0.004 |
| 4 | 2 | 1 | 2 | 3 | 10.0 | 0.3125 | 0.6250 | 0.004 |
| 5 | 2 | 2 | 3 | 1 | 10.0 | 0.6250 | 1.2500 | 0.001 |
| 6 | 2 | 3 | 1 | 2 | 10.0 | 1.2500 | 0.3125 | 0.002 |
| 7 | 3 | 1 | 3 | 2 | 15.0 | 0.3125 | 1.2500 | 0.002 |
| 8 | 3 | 2 | 1 | 3 | 15.0 | 0.6250 | 0.3125 | 0.004 |
| 9 | 3 | 3 | 2 | 1 | 15.0 | 1.2500 | 0.6250 | 0.001 |

โดยเมื่อทำการทดลองโดยเพาะเลี้ยง *L. strigosus* ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหาร MM (องค์ประกอบแตกต่างกันในแต่ละชุดการทดลอง) pH 5.5 จำนวน 200 มิลลิลิตร เติมหัวเชื้อของ *L. strigosus* จำนวน 20 ชิ้นวุ้น ลงในฟลาสก์แล้วนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบที่ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 14 วัน ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 ± 2 องศาเซลเซียส) โดยค่าพารามิเตอร์ (Parameter) ของการ

ทดลอง คือ กิจกรรมเอนไซม์แลคเคส (LAC) และกิจกรรมเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (MnP) จากชุดการทดลองทั้ง 9 การทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.2 และ 4.3 ตามลำดับ

**ตารางที่ 4.2** กิจกรรมเอนไซม์แลคเคสของ *L. strigosus* ในวันที่ 12 ของการทดลองภายใต้องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกันตามการทดลองโดยวิธีทากูชิ

| Run No. | levels of variables (กรัม/ลิตร) | | | | Lac activity (ยูนิต/ลิตร) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | cellobiose | peptone | asparagine | $CuSO_4$ | ครั้งที่ 1 | ครั้งที่ 2 | ค่าเฉลี่ย |
| 1 | 5.0 | 0.3125 | 0.3125 | 0.001 | 1,853.33 | 1,780.00 | 1,816.67 |
| 2 | 5.0 | 0.6250 | 0.6250 | 0.002 | 9,426.67 | 8,808.89 | 9,117.78 |
| 3 | 5.0 | 1.2500 | 1.2500 | 0.004 | 11,173.33 | 11,300.00 | 11,236.67 |
| 4 | 10.0 | 0.3125 | 0.6250 | 0.004 | 6,782.22 | 7,186.67 | 6,984.44 |
| 5 | 10.0 | 0.6250 | 1.2500 | 0.001 | 15,831.11 | 16,475.56 | 16,153.33 |
| 6 | 10.0 | 1.2500 | 0.3125 | 0.002 | 9,346.67 | 8,540.00 | 8,943.33 |
| 7 | 15.0 | 0.3125 | 1.2500 | 0.002 | 36,627.83 | 31,283.82 | 33,955.83 |
| 8 | 15.0 | 0.6250 | 0.3125 | 0.004 | 5,988.93 | 6,620.71 | 6,304.82 |
| 9 | 15.0 | 1.2500 | 0.6250 | 0.001 | 15,388.72 | 15,911.76 | 15,650.24 |

**ตารางที่ 4.3** กิจกรรมเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสของ *L. strigosus* ในวันที่ 12 ของการทดลองภายใต้องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกันตามการทดลองโดยวิธีทากุชิ

| Run No. | levels of variables (กรัม/ลิตร) | | | | MnP activity (ยูนิต/ลิตร) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | cellobiose | peptone | asparagine | $CuSO_4$ | ครั้งที่ 1 | ครั้งที่ 2 | ค่าเฉลี่ย |
| 1 | 5.0 | 0.3125 | 0.3125 | 0.001 | 197.25 | 200.74 | 198.99 |
| 2 | 5.0 | 0.6250 | 0.6250 | 0.002 | 1,087.86 | 1,035.34 | 1,061.60 |
| 3 | 5.0 | 1.2500 | 1.2500 | 0.004 | 1,334.59 | 1,439.87 | 1,387.23 |
| 4 | 10.0 | 0.3125 | 0.6250 | 0.004 | 783.17 | 757.84 | 770.51 |
| 5 | 10.0 | 0.6250 | 1.2500 | 0.001 | 2,019.93 | 2,050.51 | 2,035.22 |
| 6 | 10.0 | 1.2500 | 0.3125 | 0.002 | 1,079.61 | 1,065.71 | 1,072.66 |
| 7 | 15.0 | 0.3125 | 1.2500 | 0.002 | 4,172.90 | 3,356.23 | 3,764.57 |
| 8 | 15.0 | 0.6250 | 0.3125 | 0.004 | 505.94 | 588.65 | 547.30 |
| 9 | 15.0 | 1.2500 | 0.6250 | 0.001 | 2,025.70 | 2,009.77 | 2,017.74 |

จากผลการทดลองการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินจาก *L. strigosus* ในระดับฟลาสก์ภายใต้องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่แปรผัน 4 ปัจจัย (9 ชุดการทดลอง) ดังแสดงในตารางที่ 5 และ 6 พบว่าชุดการทดลองที่ 7 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสสูงที่สุด คือ 33,955.83 ยูนิต/ลิตร ในวันที่ 12 ของการทดลอง ซึ่งชุดการทดลองที่ 7 มีระดับของแต่ละปัจจัยในการทดลองดังนี้ คือ ความความเข้มข้นของเซลโลไบโอส 15 กรัม/ลิตร ความเข้มข้นของ peptone 0.3125 กรัม/ลิตร ความเข้มข้นของ L-Asparagine 1.2500 กรัม/ลิตร และความเข้มข้นของ $CuSO_4$ 0.002 กรัม/ลิตร นอกจากนี้จากผลการทดลองยังพบว่ากิจกรรมเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสที่ผลิตโดย *L. strigosus* ในวันที่ 12 ของการทดลอง มีค่าสูงที่สุดเท่ากับ 3,764.57 ยูนิต/ลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร Minimal Medium ที่มีองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อตามชุดการทดลองที่ 7 เช่นเดียวกัน

2.2 การหาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินของ *L. strigosus* โดยวิธีทากุชิ

นำค่าเฉลี่ยของแต่ละระดับของปัจจัย มาหาค่าอิทธิพลของปัจจัย และระดับของปัจจัยที่เหมาะสมดังแสดงในตารางที่ 4.4 และ 4.5 โดยพิจารณาจากค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสและกิจกรรมเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส ตามลำดับ

**ตารางที่ 4.4** ค่าอิทธิพลเฉลี่ยที่ได้จากการผลิตเอนไซม์แลคเคสของ *L. strigosus* เมื่อแปรผันปัจจัยที่ระดับต่าง ๆ ของแต่ละการทดลอง

| ระดับ | ค่าอิทธิพล | | | |
|---|---|---|---|---|
| | เซลโลไบโอส | เปปโตน | แอลแอสพาราจีน | คอปเปอร์ซัลเฟต |
| 1 | 7,390.369 | 14,252.311 | 5,688.273 | 11,206.747 |
| 2 | 10,693.706 | 10,525.311 | 10,584.155 | 17,338.978 |
| 3 | 18,636.960 | 11,943.414 | 20,448.607 | 8,175.310 |
| ค่าต่ำสุด | 7,390.369 | 10,525.311 | 5,688.273 | 8,175.310 |
| ค่าสูงสุด | 18,636.960 | 14,252.311 | 20,448.607 | 17,338.978 |
| ค่าอิทธิพล[1] | 11246.591 | 3727.000 | 14760.334 | 9163.668 |
| % ค่าอิทธิพล[2] | 28.91 % | 9.58 % | 37.95 % | 23.56 % |

**หมายเหตุ** [1] ค่าอิทธิพลเท่ากับผลต่างของค่าต่ำสุดและค่าสูงสุด

[2] % ค่าอิทธิพล ใช้ค่าอิทธิพลรวมเท่ากับ 38897.593

**ตารางที่ 4.5** ค่าอิทธิพลเฉลี่ยที่ได้จากการผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส *L. strigosus* เมื่อแปรผันปัจจัยที่ระดับต่าง ๆ ของแต่ละการทดลอง

| ระดับ | ค่าอิทธิพล | | | |
|---|---|---|---|---|
| | เซลโลไบโอส | เปปโตน | แอลแอสพาราจีน | คอปเปอร์ซัลเฟต |
| 1 | 882.608 | 1578.021 | 606.316 | 1417.316 |
| 2 | 1292.795 | 1214.704 | 1283.279 | 1966.274 |
| 3 | 2109.864 | 1492.541 | 2395.671 | 901.676 |
| ค่าต่ำสุด | 882.608 | 1214.704 | 606.316 | 901.676 |
| ค่าสูงสุด | 2109.864 | 1578.021 | 2395.671 | 1966.274 |
| ค่าอิทธิพล[1] | 1227.256 | 363.317 | 1789.355 | 1064.598 |
| % ค่าอิทธิพล[2] | 27.61 % | 8.18 % | 40.26 % | 23.95 % |

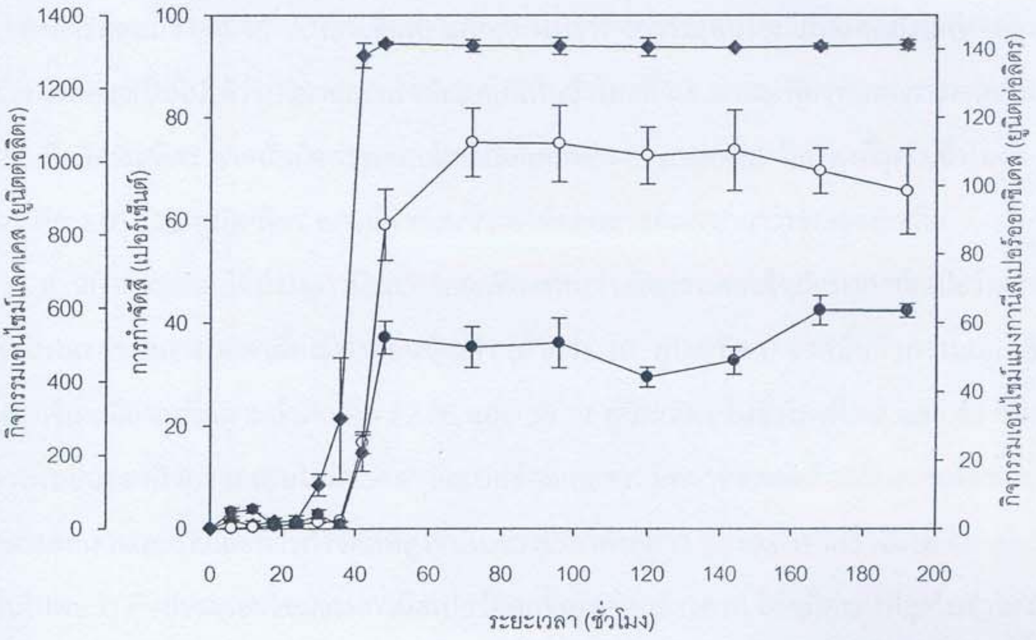
**หมายเหตุ** [1] ค่าอิทธิพลเท่ากับผลต่างของค่าต่ำสุดและค่าสูงสุด

[2] % ค่าอิทธิพล คำนวณดังสูตรคำนวณในภาคผนวก ค โดยใช้ค่าอิทธิพลรวมเท่ากับ 4444.526

จากผลการวิเคราะห์อิทธิพลของแต่ละปัจจัยการทดลองจากค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสและกิจกรรมเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสในตารางที่ 5 และ 6 พบว่า เมื่อพิจารณาค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสสามารถเรียงลำดับร้อยละอิทธิพลของปัจจัยการทดลองจากมากไปน้อยได้ดังนี้ ความเข้มข้นของ L-Asparagine (37.95 เปอร์เซ็นต์) ความเข้มข้นของเซลโลไบโอส (28.91 เปอร์เซ็นต์) ความเข้มข้นของ $CuSO_4$ (23.56 เปอร์เซ็นต์) และความเข้มข้นของ peptone (9.58 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับเมื่อพิจารณาค่ากิจกรรมเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสสามารถเรียงลำดับร้อยละอิทธิพลของปัจจัยการทดลองจากมากไปน้อยได้ดังนี้ ความเข้มข้นของ L-Asparagine (40.26 เปอร์เซ็นต์) ความเข้มข้นของเซลโลไบโอส (27.61 เปอร์เซ็นต์) ความเข้มข้นของ $CuSO_4$ (23.95 เปอร์เซ็นต์) และความเข้มข้นของ peptone (8.18 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าความเข้มข้นของ L-Asparagine มีอิทธิพลต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินทั้ง 2 ชนิด ของ *L. strigosus* มากที่สุด

## 3. การทดสอบการบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนลิกนินโดยเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินของ *L. strigosus*

จากการศึกษาความสามารถของ *L. strigosus* ในการกำจัดสีของน้ำเสียจากอุตสาหกรรมการผลิตเยื่อและกระดาษ ที่ความเข้มข้นลิกนินเริ่มต้น 500 มิลลิกรัม/ลิตร ในอาหาร Minimal Medium (MM) พบว่าความเข้มสีเริ่มลดลงตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 ของการทดลอง และลดลงอย่างรวดเร็วตั้งแต่ชั่วโมงที่ 30 ไปจนถึงชั่วโมงที่ 48 ของการทดลอง ซึ่งมีค่าร้อยละการกำจัดสี (% color removal) สูงที่สุด คือ 94.45 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นความเข้มสี ค่อนข้างคงที่ตลอดระยะเวลาการทดลองที่เหลือ โดยมีค่าร้อยละการกำจัดสีเท่ากับ 94.19 เปอร์เซ็นต์ ในชั่วโมงที่ 192 ซึ่งเป็นชั่วโมงสุดท้ายของการทดลอง แสดงดังรูปที่ 4.8




**รูปที่ 4.8** การกำจัดสีจากลิกนินโดย *L. strigosus* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MM โดยแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการกำจัดสี (–◆–) กิจกรรมเอนไซม์แลคเคส (–○–) และกิจกรรมเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (–●–)

โดยทั่วไปแล้วการลดความเข้มของลิกนินโดยเชื้อราขาวเกิดขึ้นด้วยกลไกหลัก 2 ชนิดคือ การดูดซับทางชีวภาพ (Biosorption) และการย่อยสลายทางชีวภาพโดยเอนไซม์ ดังนั้นเพื่อเป็นการยืนยันว่ากลไกหลักของการลดความเข้มสีของลิกนินโดย *L. strigosus* เป็นการย่อยสลายทางชีวภาพโดยการทำงานของเอนไซม์

ย่อยสลายลิกนิน (Robinson *et al.*, 2001) จึงได้ทำการตรวจวัดกิจกรรมเอนไซม์แลคเคสและกิจกรรมเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสในระหว่างการทดลองการบำบัดสีย้อมของ *L. strigosus*

จากผลการทดลองพบว่าในช่วง 24 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยงสามารถตรวจพบกิจกรรมเอนไซม์แลคเคสได้เพียงเล็กน้อย (ต่ำกว่า 10 ยูนิต/ลิตร) อาจเนื่องมาจากเป็นช่วงเวลาของการเจริญและเพิ่มจำนวนเซลล์ของ *L. strigosus* ซึ่งสอดคล้องกับร้อยละการกำจัดสีใน 24 ชั่วโมงแรกของการทดลองที่มีค่าเพียง 1.42 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นกิจกรรมเอนไซม์แลคเคสค่อย ๆ เพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วตั้งแต่ชั่วโมงที่ 30 ของการทดลองเป็นต้นไป โดยกิจกรรมเอนไซม์แลคเคสในชั่วโมงที่ 30 36 42 และ 48 ของการทดลอง มีค่าเท่ากับ 17.11 20.69 234.67 และ 826.56 ยูนิต/ลิตร ตามลำดับ ซึ่งการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมเอนไซม์แลคเคสสอดคล้องกับร้อยละการกำจัดสีที่เพิ่มขึ้นในช่วงเวลาดังกล่าว อย่างไรก็ตามแม้ว่าร้อยละการกำจัดสีจะมีค่าสูงสุดในชั่วโมงที่ 48 ของการทดลอง (94.45 เปอร์เซ็นต์) แต่กลับพบว่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสยังไม่ถึงจุดสูงสุดที่ชั่วโมงดังกล่าว โดยอาจเป็นไปได้ว่าปริมาณเอนไซม์แลคเคสในชั่วโมงที่ 48 น่าจะเพียงพอต่อการลดความเข้มข้นของสีที่ 500 มิลลิกรัม/ลิตร จากนั้นกิจกรรมเอนไซม์แลคเคสของ *L. strigosus* มีค่าสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 72 ของการทดลอง คือ 1,051.25 ยูนิต/ลิตร และมีค่าค่อนข้างคงที่ตลอดระยะเวลาการทดลองที่เหลือ

ส่วนกิจกรรมเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสพบว่า กิจกรรมเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสในช่วง 36 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยงมีค่าค่อนข้างต่ำ (ต่ำกว่า 10 ยูนิต/ลิตร) จากนั้นกิจกรรมเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสมีค่าสูงขึ้นตามลำดับ คือ 22.06 และ 55.77 ยูนิต/ลิตร ในชั่วโมงที่ 42 และ 48 ของการทดลอง ซึ่งการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส มีความสอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมเอนไซม์แลคเคสและร้อยละการกำจัดสีที่สูงขึ้นในช่วงเวลาดังกล่าว และหลังจากชั่วโมงที่ 48 ของการทดลองเป็นต้นไปพบว่า กิจกรรมเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสค่อนข้างคงที่ โดยมีค่าสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 168 ของการทดลอง คือ 63.58 ยูนิต/ลิตร

**4. การศึกษาการบำบัดสีจากน้ำทิ้งอุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษของเชื้อราขาว *L. strigosus* ภายในถังปฏิกรณ์เยื่อกรอง**

ทำการเริ่มต้นระบบ (Start-Up) โดยมีการเดินระบบขนานกัน 3 ถัง ในช่วงเริ่มแรกของการทดลองจะทำการเลี้ยงเชื้อราขาว *L. strigosus* ให้สามารถปรับตัวเข้ากับสภาพน้ำเสียก่อน โดยการนำเชื้อราขาว *L. strigosus* ที่ได้มาเจือจางกับอัตราส่วนน้ำเสียให้ได้ค่าเอ็มแอลเอสเอสในระบบประมาณ 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วเติมลงในระบบเป่าอากาศตลอดเวลา เลี้ยงตะกอนแบบต่อเนื่อง (Continuous) โดยใช้น้ำเสียจาก

อุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษให้แก่ระบบ เมื่อเลี้ยงเชื้อราขาว *L. strigosus* ดังกล่าวต่อไประยะหนึ่งจนปริมาณเชื้อราขาว *L. strigosus* สามารถปรับตัวได้ดี จึงทำการควบคุมสลัดจ์ไว้ที่ 3 5 10 20 30 วัน และระยะเวลาอนันต์ (ไม่มีการดึงสลัดจ์ออก) โดยจะใช้พารามิเตอร์ที่ควบคุมระบบ คือ อัตราการทิ้งสลัดจ์ เนื่องจากเป็นตัวกำหนดประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสีย และนำน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดมาวิเคราะห์ปริมาณสีและสารอินทรีย์ของน้ำทิ้งภายหลังการบำบัดเพื่อวิเคราะห์ประสิทธิภาพของระบบดังกล่าว

4.1 ประสิทธิภาพการกำจัดสีและสารอินทรีย์ของเชื้อราขาว *L. strigosus* ภายในถังปฏิกรณ์เยื่อกรอง

ผลการศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดสารสีและสารอินทรีย์ในน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษที่ควบคุมค่าอายุสลัดจ์ต่างๆ กัน คือ 5 10 20 30 วัน และอายุสลัดจ์อนันต์ ภายใต้สภาวะแบบแอโรบิกเป็นหลัก โดยไม่มีการเจือจางความเข้มข้นของน้ำเสีย (ความเข้มข้นสีเริ่มต้นเท่ากับ 500 หน่วย และซีโอดีเริ่มต้นเท่ากับ 210 มิลลิกรัมต่อลิตร)

จากการทดลองเพื่อหาประสิทธิภาพในการกำจัดสีและสารอินทรีย์ในรูปซีโอดีที่ระบบสามารถรองรับได้โดยการเพิ่มอายุสลัดจ์ 5 10 20 30 วัน และค่าอายุสลัดจ์อนันต์(ไม่มีการดึงตะกอนออก) ให้ผลการทดลองดังรายละเอียดดังตารางที่ 4.6

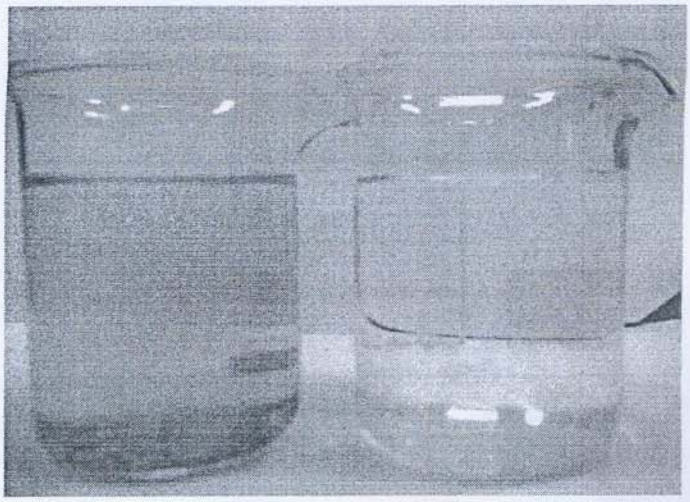
**ตารางที่ 4.6** ประสิทธิภาพในการบำบัดสีและสารอินทรีย์เมื่อทำการควบคุมระบบที่ SRT ต่างๆ

| SRT (วัน) | COD in (มก./ล.) | COD out (มก./ล.) | % การกำจัดซีโอดี | สี in (หน่วย) | สี out (หน่วย) | % การกำจัดสี |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 5 | 210±10.5 | 22.9 | 89.1 | 500±20.0 | 72.5 | 85.5 |
| 10 | | 16.2 | 92.3 | | 59.0 | 88.2 |
| 20 | | 41.4 | 80.3 | | 56.0 | 88.8 |
| 30 | | 36.3 | 82.7 | | 49.5 | 90.1 |
| อนันต์ | | 7.2 | 96.6 | | 33.5 | 93.3 |

จากตารางที่ 4.6 กรณีเริ่มต้นระบบน้ำตัวอย่างมีค่าซีโอดีเฉลี่ย 210±10.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ควบคุมที่ค่าอายุสลัดจ์ 5 10 20 30 วันและอายุอนันต์ ตามลำดับ โดยหลังจากผ่านระบบน้ำแพร่ผ่านเมมเบรนมีค่าซีโอดีเฉลี่ยเท่ากับ 22.9 16.2 41.4 36.3 และ 7.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ คิดเป็นประสิทธิภาพการกำจัดซีโอดีได้เฉลี่ยร้อยละ 89.1 92.3 80.3 81.2 82.7 และ 96.6 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าทุกๆ การทดลองให้

ประสิทธิภาพในการกำจัดซีโอดีที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยประสิทธิภาพโดยรวมในการกำจัดมากกว่าร้อยละ 80.0 และในน้ำทิ้งภายหลังการบำบัดด้วยถังปฏิกรณ์เยื่อกรองจะมีค่าสีเฉลี่ยเท่ากับ 72.5 59.0 56.0 49.5 และ 33.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ คิดเป็นประสิทธิภาพการกำจัดสีได้เฉลี่ยมากกว่าร้อยละ 85.0 โดยเมื่อควบคุมอายุสลัดจ์ที่อายุอนันต์จะมีประสิทธิภาพในการบำบัดสารอินทรีย์ในรูปของซีโอดีและสีของน้ำทิ้งสูงสุด

จากรูปที่ 4.9 จะสังเกตสีของน้ำเสียจากอุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษที่นำมาใช้ในการทดลองเริ่มต้นซึ่งจะมีลักษณะสีเหลือง ขุ่น มีปริมาณของแข็งแขวนลอยอยู่มาก แต่เมื่อน้ำนำเสียมาผ่านกระบวนการบำบัดน้ำเสียด้วยเชื้อราขาว *L. strigosus* ภายในถังปฏิกรณ์เยื่อกรองที่ใช้เมมเบรนที่มีขนาดรูพรุน 0.4 ไมครอน ส่งผลให้ลักษณะสมบัติของน้ำที่ผ่านการบำบัดแล้วจะมีลักษณะใส ปริมาณของแข็งแขวนลอยหลุดปนออกมากับน้ำน้อยมากหรือแทบจะไม่มีของแข็งปนหลุดออกมา ดังนั้นการบำบัดน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษด้วยเชื้อราขาว *L. strigosus* ภายในถังปฏิกรณ์เยื่อกรองจะส่งผลให้น้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดได้มีคุณภาพได้มาตรฐานน้ำทิ้ง

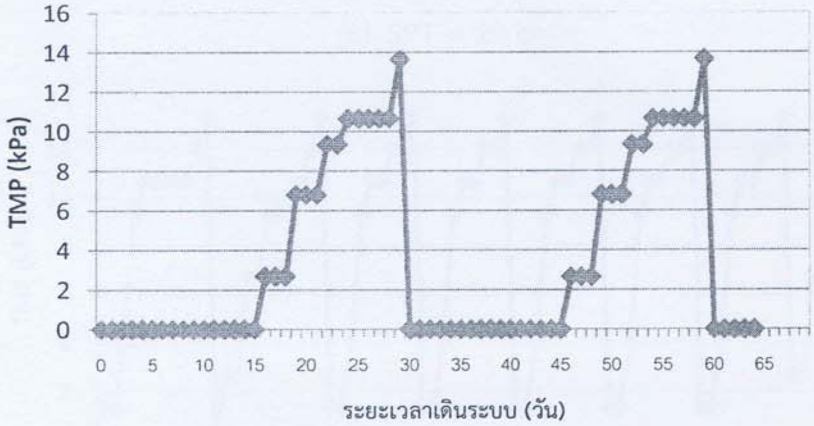


**รูปที่ 4.9** ลักษณะของน้ำเสียก่อน (a) และหลังการบำบัด (b) ด้วยเชื้อราขาว *L. strigosus* ภายในถังปฏิกรณ์เยื่อกรองที่ใช้เมมเบรนที่มีขนาดรูพรุน 0.4 ไมครอน

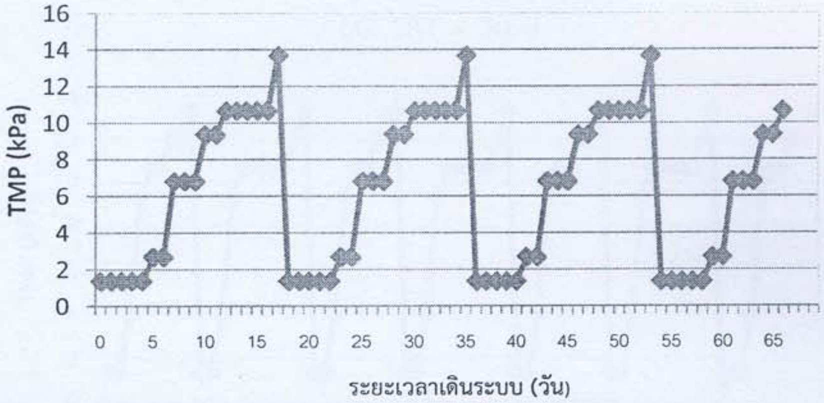
สำหรับการประยุกต์ใช้ถังปฏิกรณ์เยื่อกรองร่วมกับการบำบัดน้ำเสียโดย เชื้อราขาว *L. strigosus* การใช้เมมเบรนสำหรับกรองเชื้อราและน้ำทิ้งที่ผ่านการบบัดแล้วในระยะแรกจะเป็นเมมเบรนที่ไม่ได้ผ่านการใช้งานมาก่อน โดยเมื่อใช้งานกรองน้ำเสียภายในถังปฏิกรณ์เยื่อกรองเมมเบรนจะทำให้เกิดการอุดตัน (fouling) ที่ผิวหน้าของเมมเบรนเพิ่มมากขึ้นส่งผลให้ค่าความดันคร่อมเมมเบรน (Transmembrane Pressure TMP)

เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการเดินระบบ ซึ่งในการศึกษาได้มีการควบคุมไม่ให้เมมเบรนมีความดันคร่อมเกิน 15 kPa ซึ่งหากเกินกว่านี้แล้วจะทำให้เมมเบรนอุดตัน และปั๊มน้ำทำงานหนัก จึงต้องมีการนำเมมเบรนออกมาล้างทำความสะอาดด้วยสารทำความสะอาดด้วยสารละลาย NaOCl เป็นช่วงๆ

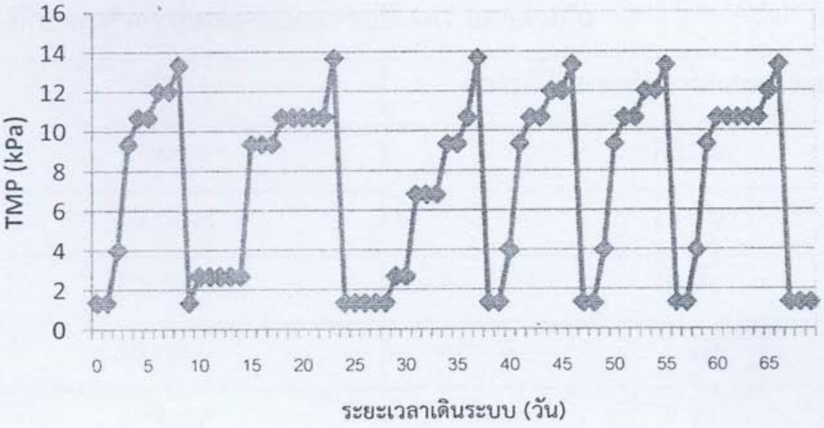
รูปที่ 4.10 แสดงผลของความดันคร่อมเมมเบรนที่ SRT แตกต่างกันในช่วงที่ระบบเข้าสู่สภาวะสมดุลแล้ว ซึ่งในแต่ละการทดลองจะเห็นการเพิ่มขึ้นของ TMP ที่แตกต่างกัน จากผลการทดลองดังกล่าวจะทำให้สามารถกำหนดระยะเวลาในการทำความสะอาดของเมมเบรนในระบบได้ดังตารางที่ 4.7



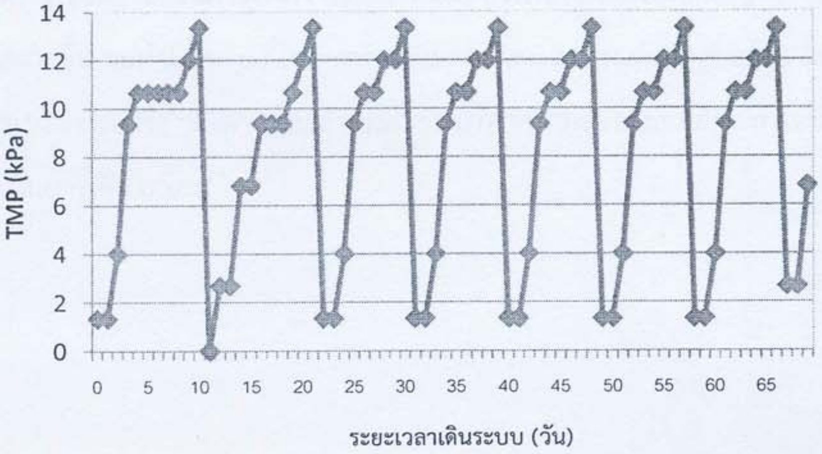

(ก) SRT = 5 d



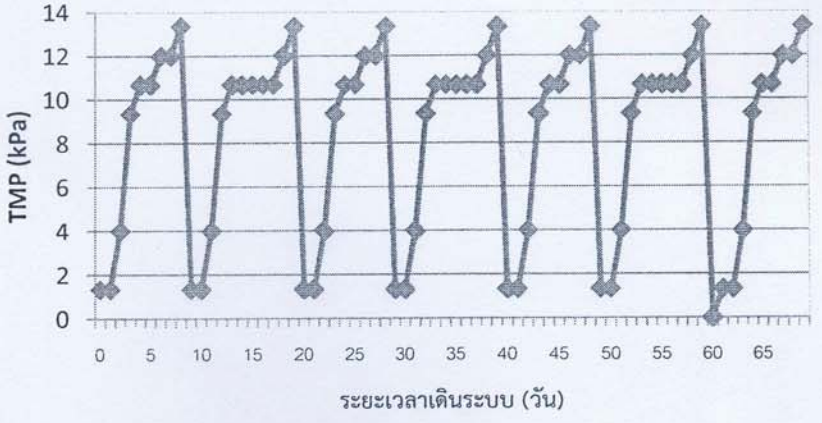

(ข) SRT = 10 d




(ค) SRT = 20 d




(ง) SRT = 30 d




(จ) SRT = Infinity

**รูปที่ 4.10** ผลของความดันคร่อมเมมเบรน (TMP) ที่ SRT แตกต่างกัน

**ตารางที่ 4.7** ความถี่ในการทำความสะอาดเมมเบรนที่ SRT แตกต่างกัน

| SRT | **ความถี่ในการทำความสะอาดเมมเบรน** |
|---|---|
| 5 days | 28 วัน |
| 10 days | 18 วัน |
| 20 days | 10 วัน |
| 30 days | 7 วัน |
| Infinity | 7 วัน |

ตารางที่ 4.7 สรุปความถี่ในการทำความสะอาดเมมเบรนที่การเดินระบบที่ SRT แตกต่างกัน จะเห็นว่ายิ่ง SRT ยาวนานมากขึ้น จะทำให้ความถี่ในการทำความสะอาดเมมเบรนต้องสูงขึ้นด้วย โดยเป็นปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงในการออกแบบระบบจริง ซึ่งหากต้องนำเมมเบรนมาทำความสะอาดบ่อยๆ ทำให้เกิดความไม่สะดวกและเกิดค่าใช้จ่ายสูงในการเดินระบบ

# บทที่ 5

## สรุปผลการวิจัย

(1) การเจริญเติบโตและช่วงเวลาของการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินของ *Lentinus strigosus* ในอาหาร Minimal Medium (MM) ที่มีกลูโคสและ yeast extract เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนตามลำดับพบว่า กิจกรรมเอนไซม์แลคเคสและเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสมีค่าสูงที่สุด คือ 1,560.0 และ 77.4 ยูนิต/ลิตร ตามลำดับ

(2) เอนไซม์แลคเคสและเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสเป็นผลิตภัณฑ์ทุติยภูมิ และถูกสร้างในช่วงการเจริญทุติยภูมิ (Secondary growth phase) ของ *L. strigosus* เมื่อศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แลคเคสและเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสของ *L. strigosus* พบว่า เซลโลไบโอสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด สูงที่สุด คือ 6,947.26 และ 409.49 ยูนิต/ลิตร ตามลำดับ และ L-Asparagine เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด สูงที่สุด คือ 4,818.60 และ 241.11 ยูนิต/ลิตร ตามลำดับ

(3) องค์ประกอบของอาหาร Minimal Medium ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินของ *L. strigosus* โดยแปรผันปัจจัย 4 ปัจจัย โดยอาศัยการออกแบบการทดลองด้วยวิธีทากุชิ ซึ่งใช้ orthogonal array แบบ L9 ($3^4$) พบว่า องค์ประกอบของสารอาหารที่เหมาะสม ได้แก่ เซลโลไบโอส 15 กรัม/ลิตร Peptone 0.3125 กรัม/ลิตร L-Asparagine 1.2500 กรัม/ลิตร และ $CuSO_4$ 0.002 กรัม/ลิตร โดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสและเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสเท่ากับ 33,955.83 และ 3,764.57 ยูนิต/ลิตร ตามลำดับ

(4) ความสามารถของ *L. strigosus* ในการกำจัดสีของน้ำเสียจากอุตสาหกรรมการผลิตเยื่อและกระดาษที่ความเข้มข้นลิกนินเริ่มต้น 500 มิลลิกรัม/ลิตร ในอาหาร Minimal Medium (MM) พบว่าความเข้มสีเริ่มลดลงตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 ของการทดลอง และลดลงอย่างรวดเร็วตั้งแต่ชั่วโมงที่ 30 ไปจนถึงชั่วโมงที่ 48 ของการทดลอง ซึ่งมีค่าร้อยละการกำจัดสี (% color removal) สูงที่สุด คือ 94.45 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นความเข้มสี ค่อนข้างคงที่ตลอดระยะเวลาการทดลองที่เหลือ โดยมีค่าร้อยละการกำจัดสีเท่ากับ 94.19 เปอร์เซ็นต์ ในชั่วโมงที่ 192

(5) การประยุกต์ใช้เชื้อราขาว *L. strigosus* ในถังปฏิกรณ์เยื่อกรอง พบว่า เมื่อควบคุมน้ำตัวอย่างที่เข้าสู่ระบบให้มีค่าซีโอดีเฉลี่ย 210±10.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของสีในน้ำเสียเท่ากับ 500±20.0 หน่วย เมื่อควบคุมที่ระบบค่าอายุสลัดจ์ 5 10 20 30 วันและอายุอนันต์ ตามลำดับ พบว่า ประสิทธิภาพในการบำบัดสารอินทรีย์ในรูปซีโอดีมีประสิทธิภาพมากกว่าร้อยละ 80.0 และประสิทธิภาพการกำจัดสีของน้ำทิ้งได้เฉลี่ยมากกว่าร้อยละ 85.0 โดยเมื่อควบคุมอายุสลัดจ์ที่อายุอนันต์จะมีประสิทธิภาพในการบำบัดสารอินทรีย์ในรูปของซีโอดีและสีของน้ำทิ้งสูงสุด

(6) การใช้ถังปฏิกรณ์เยื่อกรองจำเป็นต้องพิจารณาความถี่ในการทำความสะอาดเมมเบรนที่การเดินระบบที่ SRT แตกต่างกัน จากผลการทดลองจะเห็นว่าเมื่อควบคุมระบบให้มี SRT ยาวนานมากขึ้น จะทำให้ความถี่ในการทำความสะอาดเมมเบรนต้องสูงขึ้นด้วย

# บทที่ 6

## เอกสารอ้างอิง

Adler, E. 1997. Lignin chemistry-past, present and future. **Wood Sci Technol.** 11: 169-218.

Arora, D.S. and P.K. Gill. 2001. Effect of various media and supplements on laccase production by some white rot fungi. **Bioresour. Technol.** 77: 89-91.

Banat, M.I., P. Nigam, D. Singh and R. Marchant. 1996. Microbial decolorization of textile dye containing effluents. **Bioresour. Technol.** 58: 217-227.

Borchert, M. and J.A. Libra. 2001. Decolorization of reactive dyes by the white rot fungus *Trametes versicolor* in sequencing batch reactors. **Biotechnol. Bioeng.** 75: 313-321.

Eggert, C., U. Temp and K.-E.-L. Eriksson. 1996. Laccase-producing white-rot fungus lacking lignin peroxidase and manganese peroxidase: role of laccase in lignin biodegradation, pp. 130-150. *In* T.W. Jeffries and L. Viikari, eds. **Enzymes for Pulp and Paper Processing.** American Chemical Society, Washington, D.C.

Eriksson, K.E., R.A. Blanchette and P. Ander. 1990. **Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components.** Springer-Verlag, Berlin.

Golovleva, L.A., A.A. Leontievsky, O.V. Maltseva and N.M. Myasoedova. 1993. Ligninolytic enzymes of the fungus *Panus tigrinus*: Biosynthesis, purification and properties. **J. Biotechnol.** 30: 71-77.

Haglund, C. 1999. Biodegradation of xenobiotic compounds by the white-rot fungus *Trametes trogii*. **Master s degree project,** Uppsala University.

Hatakka, A., A. Kantelinen, A. Tervilä-Wilo and A. Viikari. 1987. Production of ligninases by *Phlebia radiata* in agitated cultũres, pp. 141-160. *In*: Odier E ed. **Lignin Enzymatic and Microbial Degradation.** INRA Publications, Paris.

Hatakka, A. 1994. Lignin-modifying enzymes from selected white rot fungi-production and role in lignin degradation. **FEMS Microbiol. REV.** 13: 125-135.

Hernádez, M., Rodríguez, M.I. Pérez, A.S. Ball and M.E. Arias. (1997), $^{13}$C NMR cross polarization and magic angle spinning (CPMAS) and gas chromatography/mass spectrometry analysis of the products from a soda pulp mill effluent decolourised by two *Streptomycesstrains* strains. **Apply Microbiol Biotechnology.** 47(3): 272-278.

Kim, T.H., Y. Lee., J. Yang., B. Lee., C. Park and S. Kim. (2004), Decolorization of dye solutions by a membrane bioreactor (MBR) using white-rot fungi. **Desalination.** 168: 287-293.

Kirk, T.K. and R.L. Farrell. 1987. Enzymatic combustion: The microbial degradation of lignin. **Annu. Rev. Microbiol.** 41: 465-505.

Lacorte, S., A. Latorre, D. Barceló, A. Rigol, A. Malmqvist and T. Welander. (2003), Organic compounds in paper-mill process waters and effluents. **Trends in Analytical Chemistry**. 22(10): 212-221.

Maltseva, O.V., M.L. Niku-Paavola, A.A. Leontievsky, N.M. Myasoedova and L.A. Golovleva. 1991. Ligninolytic enzymes of the white rot fungus *Panus tigrinus*. **Biotechnology and Applied Biochemistry.** 13: 291-302.

Mohan, S.V., N.C. Rao, K.K. Prasad and J. Karthikeyan. 2002. Treatment of simulated Reactive Yellow 22 (azo) dye effluents using *Spirogyra* species. **Waste Management** 22: 575-582.

Moldes, D., S.R. Couto, C. Cameselle and M.A. Sanroman. 2003. Study of the degradation of dyes by MnP of *Phanerochaete chrysosporium* produced in a fixed-bed bioreactor. **Chemosphere.** 51: 295-303.

Nerud, F., Z. Zouchova and Z. Misurcova. 1991. Ligninolytic properties of different white-rot fungi. **Biotechnology Letters.** 13: 657-660.

Niku-Paavola, M.L., E. Karhunen, P. Salola and V. Raunio. 1988. Ligninolytic enzymes of the white-rot fungus *Phlebia radiata*. **J. Biochemistry.** 354: 877-884.

Orth, A.B., D.J. Royse and M. Tien. 1993. Ubiquity of lignin-degrading peroxidases among various wood-degrading fungi. **Appl Environ Microbiol.** 12: 4017-4023.

P. Vaithanomsat, W. Apiwattanapiwat , T. Kreetachat and P. Siriacha. (2006), Comparison of White-Rot Fungi and Ozone for Decolorization of Wastewater from Pulp and Paper Industry, **Proceeding of the 4th International Conference on Oxidation Technologies for Water and Wastewater Treatment**, 27-29 August 2006, Goslar, Germany.

Palmieri, G., G. Cennamo and G. Sammia. 2005. Remazol Brilliant Blue R decolorization by the fungus *Pleurotus ostreatus* and its oxidative enzymatic system. **Enzyme Microb. Technol.** 36: 17-24.

Radha, K.V., I. Regupathi, A. Arunagiri and T. Muregesan. 2005. Decolorization studies of synthetic dyes using *Phanerochaete chrysosporium* and their kinetics. **Process Biochem.** 40: 3337-3345

Ralph, J.P., D.E.A. Catcheside. 2002. Biodegradation by white-rot fungi. *In*: H.D. Osiewacz, ed. **The Mycota, Industrial Application.** 15: 303-326.

Revankar, M.S. and S.S. Lele. 2006. Increased production of extracellular laccase by the white rot fungus *Coriolus versicolor* MTCC 138. **Microbiol & Biotechnol.** 22: 921-926.

Swamy, J. and J.A. Ramsay. 1999. The evaluation of white rot fungi in the decoloration of textile dyes. **Enzyme Microb. Technol.** 24: 130-137.

T. Kreetachat, M. Damrongsri, V. Punsuwon, P. Vaithanomsat, C. Chiemchaisri and C. Chomsurin. (2007), Effects of ozonation process on lignin-derived compounds in pulp and paper mill effluents, **Journal of hazardous materials.** 142: 250 -257.

T. Kreetachat, M. Damrongsri and P. Vaithanomsat. (2006), Effect of Ozone on Lignin-derived Compounds in Pulp and Paper Mill Effluent, **Proceeding of the 4$^{th}$ International Conference on Oxidation Technologies for Water and Wastewater Treatment,** 27-29 August 2006, Goslar, Germany.

Tak-Hyun Kim, Yuri Lee, Jeongmok Yang, Byunghwan Lee, Chulhwan Park and Sangyong Kim. (2004), Decolorization of dye solutions by a membrane bioreactor (MBR) using white-rot fungi, **Desalination** 168: 287-293.

Teerapatsakul, C., R. Parra, C. Bucke and L. Chitradon. 2007. Improvement of laccase production from *Ganoderma* sp. KU-Alk4 by medium engineering. **J. Microbiol Biotechnol.** 23: 1519-1527.

Tein, M. and K. Kirk. 1984. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium:* Purification, characterization, and catalytic propoties of a unique $H_2O_2$-requiring oxygenes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 81: 2280-2284.

Vares, T., M. Kalsi and A. Hatakka. 1995. Lignin peroxidase, manganese peroxidase and other ligninolytic enzyme produced by *Phlebia radiata* during solid state fermentation of wheat straw. **Appl. Environ. Microb.** 61: 3515-3520.

Ward, G., Y. Hadar and C.G. Dosoretz. 2004. The biodegradation of lignocellulose by white rot fungi, pp. 393-407. *In* D.K. Arora, P.D. Bridge and D. Bhatnagar, eds. **Fungal Biotechnology in Agricultural, Food and Environmental Applications.** CRC Press, London.

Wesenberg, D., I. Kyriakides and S.N. Agathos. 2003. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. **Biotechnol. Adv.** 22: 161-187.