

ดังที่กล่าวมาข้างต้น ถึงปฏิกิริยาเยื่อกรองที่นิยมใช้กันมากที่สุด คือ ชนิด Submersed/Immersed MBR เนื่องจากใช้พลังงานต่ำที่สุด โดยมีส่วนประกอบหลักดังนี้

(1) เมมเบรน

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

โดยทั่วไปแล้วพอลิเมอร์ส่วนใหญ่สามารถนำมาผลิตเป็นเมมเบรนได้ วัสดุที่จะนำมาใช้เป็นเมมเบรนส่วนมากจะเป็นวัสดุพอลิเมอร์ที่ทนต่อแรงเชิงกลและสารเคมีที่ใช้ทำความสะอาด เป็นแบบชอบน้ำที่ทำให้เกิดการอุดตันต่ำและผลิตง่าย ราคาถูก พอลิเมอร์ที่นำมาทำเมมเบรน เช่น โพลีเอเทอร์ซัลโฟน (PES) โพลีไวนิลิดีนฟลูออไรด์ (PVDF) โพลีเอทิลีน (PE) (ธนิตพร , 2552)

นอกจากนี้สมบัติทางกายภาพมีความสำคัญเป็นอย่างมาก โดยจะพิจารณาถึงขนาดของรูพรุนของเมมเบรน ทั้งนี้เพื่อเลือกใช้เมมเบรนที่มีรูพรุนเหมาะสมกับผลิตภัณฑ์ต่างๆ สมบัติทางเคมีของเมมเบรนก็มีความสำคัญมากเช่นเดียวกับคุณสมบัติทางกายภาพเมมเบรนที่ใช้จะต้องเป็นชนิดที่ชอบน้ำเพราะถ้าเป็นชนิดที่ไม่ชอบน้ำมักจะเกิดการสะสมของสารอินทรีย์ที่ผิวหน้าเมมเบรน โดยเมมเบรนอาจจะมีการเคลือบสารที่เป็นพลาสมาเพื่อให้เมมเบรนชอบน้ำมากยิ่งขึ้น (ฐปณีย์, 2548)

(2) น้ำเสียและมวลสลัดจ์

ความเข้มข้นและชนิดของน้ำเสียจะมีผลน้อยต่อระบบเนื่องจาก การเกิดการอุดตันจะเกิดจากมวลสลัดจ์ในระบบมากกว่าจากน้ำเสียโดยตรง และมวลสลัดจ์ซึ่งเป็นของแข็งแขวนลอยที่อยู่ในถังเติมอากาศยังส่งผลให้เกิดการอุดตันเมมเบรนเพิ่มขึ้น ดังนั้นปริมาณสลัดจ์จึงส่งผลเชิงลบต่อสมรรถนะการทำงานของเมมเบรน (ค่าความดันส่งผลเมมเบรนเพิ่มขึ้น และค่าฟลักซ์ลดลง) นอกจากนี้ความหนืดก็มีความสำคัญในถึงปฏิกิริยาเยื่อกรอง การเพิ่มความเข้มข้นของมวลสลัดจ์ สัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของความหนืดในระบบ ส่งผลเชิงลบต่อการเกิดฟาวลิงและประสิทธิภาพการถ่ายโอนออกซิเจนหรือค่าออกซิเจนละลาย (พรทิพย์และศุภลักษณ์ , 2552)

(3) การควบคุมระบบถึงปฏิกิริยาเยื่อกรอง

- Aeration or Gas Scouring เป็นการเติมอากาศเพื่อป้อนออกซิเจนแก่จุลินทรีย์ กวนของเหลวและตะกอน และทำความสะอาดเมมเบรนโดยทำให้เกิดแรงเฉือนส่งผลให้ฟลักซ์สูง

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

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

7. ปัจจัยที่ส่งผลต่อการทำงานของเมมเบรนภายในถังปฏิกรณ์เยื่อกรอง

(1) การสะสมความเข้มข้นสูง (Concentration Polarization) คือ ปรากฏการณ์ที่เกิดการสะสมของสารอินทรีย์ หรืออนุภาคต่างๆ ใกล้ผิวหน้าเมมเบรน จนความเข้มข้นสูงกว่าค่าเฉลี่ยของสารนั้นในน้ำหลายเท่า ทำให้ฟลักซ์ลดลง แก้ไขโดยแรงดันน้ำล้างย้อน การถอดล้างด้วยสารเคมี หรือการกรองขนานกับทิศทางการไหล (Cross Flow) เป็นต้น (รัตนา, 2541)

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

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

(4) ความสกปรกของเมมเบรน เป็นผลมาจากการเกาะสะสมของสารอินทรีย์และอนุภาคสิ่งสกปรกต่างๆ ในรูช่องว่างของเมมเบรนทำให้อัตราการซึมผ่านลดลง ความดันใช้งานเพิ่มขึ้น และไม่สามารถคืนสภาพให้กลับเหมือนใหม่ได้ โดยการใช้แรงดันน้ำหรือสารเคมี ความสกปรกของเมมเบรนมีปัจจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้องดังต่อไปนี้

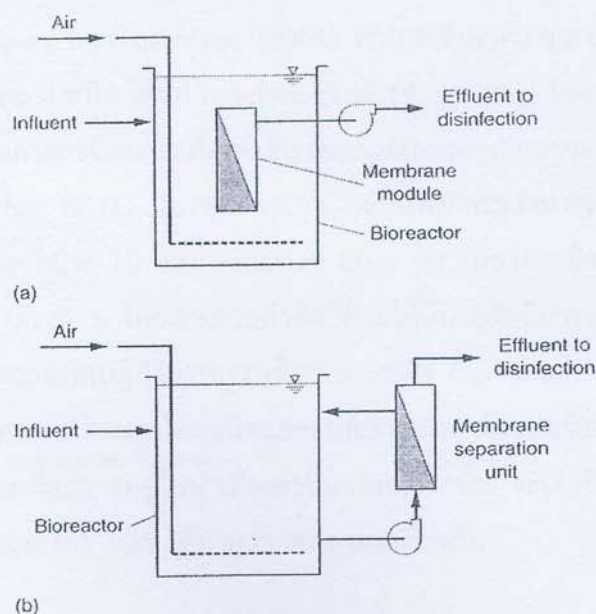
- ลักษณะของน้ำดิบที่นำมากรองผ่านเมมเบรน น้ำที่นำมากรองด้วยเมมเบรนนั้นมักจะมีสารอินทรีย์เจือปนอยู่ไม่มากนัก สารอินทรีย์แต่ละประเภทมีผลต่อการเกิดความสกปรกต่างกันไปตามขนาดโครงสร้าง

ของโมเลกุลและแรงกระทำระหว่างผิวเมมเบรนกับตัวมันเอง เมื่อสารอินทรีย์หลายชนิดรวมอยู่ในสารละลายเดียวกันหรือมีความเข้มข้นสูงจะก่อให้เกิดความสกปรกมากกว่าที่อยู่เป็นชนิดเดี่ยวๆหรือความเข้มข้นต่ำตามลำดับ

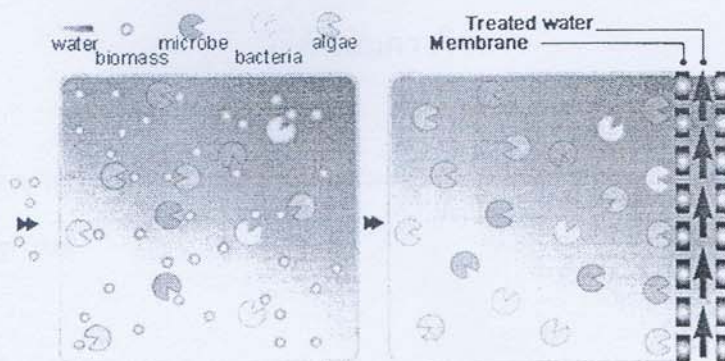
- วัสดุที่ใช้เมมเบรนรวมถึงขนาดและการกระจายของรูช่องว่างบนเมมเบรน มีผลต่ออัตราการเกิด ความสกปรก เช่นกัน

- 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 ทั้งไประบบ MBR จะประกอบด้วย bioreactor ที่มีจุลินทรีย์ (biomass) กระจายอยู่ภายในถังปฏิกรณ์ โดยจุลินทรีย์จะทำหน้าที่ย่อยสลายสารประกอบต่างๆ ของน้ำเสียในถังปฏิกรณ์ จากนั้นจึงแยกน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดแล้วออกจากถังปฏิกรณ์โดยใช้เยื่อกรองแบบ MF ดังแสดงในรูปที่ 2.10



รูปที่ 2.9 ตำแหน่งการติดตั้งเยื่อกรอง (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 ซึ่งจะเห็นได้ว่าการประยุกต์ใช้ราขาวร่วมกับการกรองด้วยเมมเบรนเพื่อใช้ในการบำบัดสีย้อมและสารอินทรีย์เป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจศึกษาต่อไป

นอกจากนี้ Tak-Hyun Kim และคณะ (2004) ทำการศึกษาความสามารถในการกำจัดสีของน้ำเสียสังเคราะห์ซึ่งเตรียมจากสีย้อม 3 ชนิด ได้แก่ reactive blue 19, reactive blue 49 และ reactive black 5 โดยใช้ระบบ MBR และแผ่นกรองชนิดนาโนฟิลเตรชัน (Nanofiltration) และรอสโมซิสผันกลับร่วมกับเชื้อราขาว *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 นอกจากนี้ ระบบดังกล่าวยังสามารถลดปริมาณสารอินทรีย์ที่ละลายน้ำในรูปของค่า TOC ได้มากกว่า 90% เช่นเดียวกัน

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การศึกษาชนิดของธาตุอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินของเชื้อราขาว สายพันธุ์ *L. strigosus*

1.1 การเตรียมกล้าเชื้อรา *L. strigosus*

เชื้อเส้นใยบริเวณที่กำลังเจริญของเชื้อรา *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) ของเชื้อราขาว สายพันธุ์ *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 รอบต่อ นาที 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^{•+}) 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 ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถออกซิไดส์ 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 ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถออกซิไดส์ 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 สารละลายซัคซินเนตบัฟเฟอร์ 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 ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถออกซิไดส์ veratryl alcohol 1 ไมโครโมล เป็น veratraldehyde ในเวลา 1 นาที

1.2.4 การคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์

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

โดย dA/dt คือ อัตราการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงต่อนาที

V_T คือ ปริมาตรทั้งหมดของ reaction mixture (มิลลิลิตร)

V_E คือ ปริมาตรของเอนไซม์ (มิลลิลิตร)

ϵ คือ ค่า molar absorption coefficient ของสับสเตรต (โมลต่อลิตร ต่อเซนติเมตร)

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 ชิ้นวัน ลงในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหาร MM ปริมาตร 200 มิลลิลิตร โดยทำการทดลองจำนวน 8 ชุดการทดลอง (Treatment) ซึ่งแต่ละชุดการทดลองมีแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส (Glucose) น้ำตาลฟรุคโตส (Fructose) 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 ชิ้นวัน 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 $((\text{NH}_3)_2\text{SO}_4)$ 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) ที่เหมาะสมต่อการผลิต

เอนไซม์ย่อยสลายลิกนินของ *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 ซึ่งวิธีทางนี้จะแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนการทดลอง 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 ขี้นวุ้น ลงในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุน้ำเสียปริมาตร 200 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร Minimal Medium สูตร optimized เป็นองค์ประกอบหลักและผสมด้วยน้ำเสียจากโรงงานผลิตเยื่อและกระดาษ จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบที่ 150 รอบต่อ

นาที่ 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)

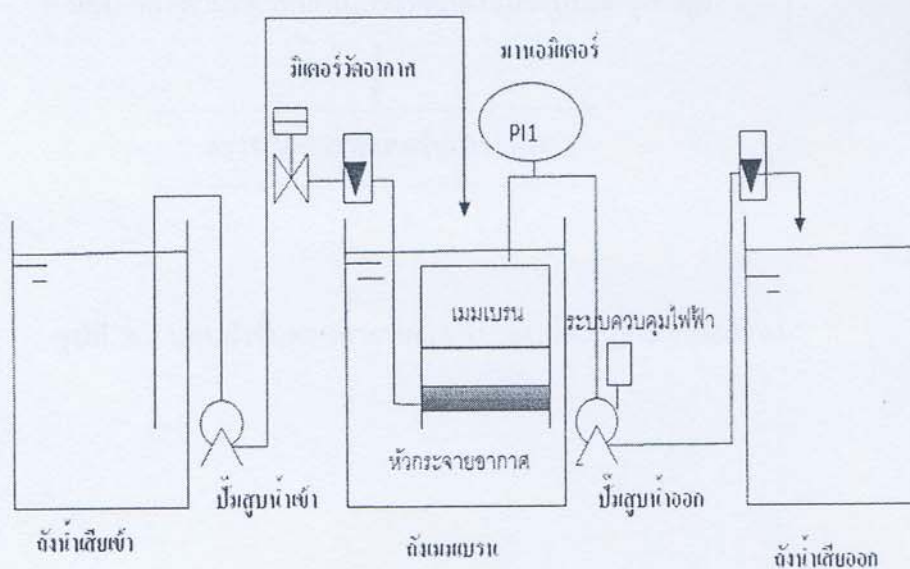
นำสารละลายตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนใสด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำสารละลายส่วนใสที่ได้มาวัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance, Abs) ที่ความยาวคลื่นสูงสุด ($\lambda_{\max}$) ของสีย้อมแต่ละชนิด (ความยาวคลื่นสูงสุดของสี RBBR, RB5 และ indigo 4B มีค่าเท่ากับ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

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

หมายเหตุ ชุดการทดลองควบคุม (Control) คือ ชุดการทดลองที่ปราศจากเชื้อรา

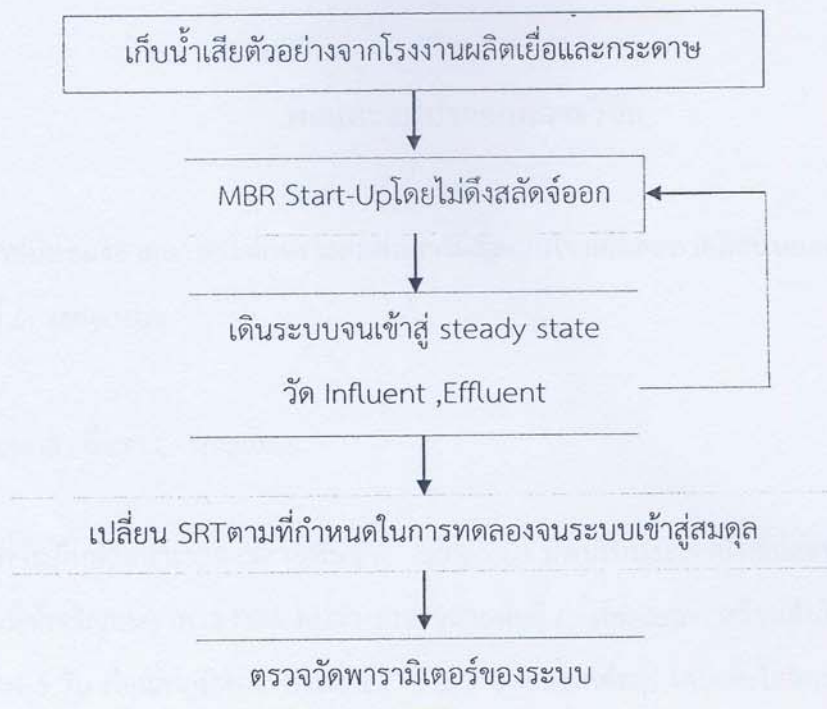
4. การศึกษาการบำบัดน้ำเสียจากอุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษของเชื้อราขาว *L. strigosus* ภายในถังปฏิกรณ์เยื่อกรอง

แบบจำลองการบำบัดน้ำเสียจากอุตสาหกรรมการผลิตเยื่อและกระดาษของเชื้อราขาว *L. strigosus* ภายในถังปฏิกรณ์เยื่อกรองแสดงดังรูปที่ 3.1 ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้ ถังปฏิกรณ์เยื่อกรองเป็นถังทำมาจากอะคริลิกใส ความสูง 0.42 เมตร กว้าง 0.17 เมตร และยาว 0.17 เมตร ภายในตัวถังบรรจุเฟรมเมมเบรนทำจากเหล็กสแตนเลส 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 กิโลปาสกาล แสดงว่าเกิดการอุดตันเมมเบรน (fouling) จะถอดเมมเบรนล้างด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรต์ 3,000 มก.ต่อลิตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อทำความสะอาด ขั้นตอนการดำเนินการทดลองเพื่อประยุกต์ใช้เชื้อราขาวร่วมบำบัดในถังปฏิกรณ์เยื่อกรองแสดงดังรูปที่ 3.2



รูปที่ 3.2 แผนผังขั้นตอนการทดลองในระบบถังปฏิกรณ์เยื่อกรอง

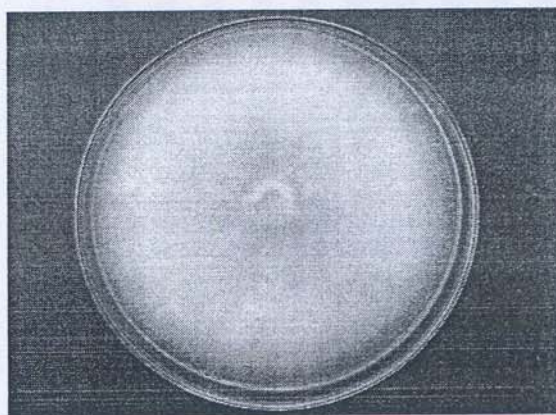
บทที่ 4

ผลและอภิปรายผลการวิจัย

1. การศึกษาชนิดของธาตุอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินของเชื้อราขาวสายพันธุ์ *L. strigosus*

1.1 การเตรียมกล้าเชื้อรา *L. strigosus*

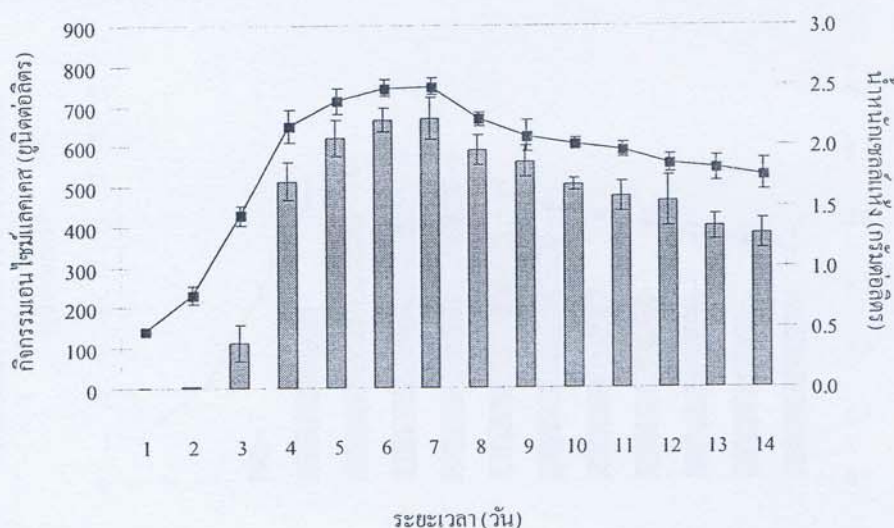
จากการเก็บตัวอย่างราขาวสายพันธุ์ *L. strigosus* ที่พบในประเทศไทยและนำมาเพาะเลี้ยงภายในห้องปฏิบัติการให้เจริญบนอาหาร PDA พบว่า ราขาวสายพันธุ์ *L. strigosus* สร้างเส้นใยบางๆ สีขาว และใช้ระยะเวลาเพียง 5 วัน ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 ± 2 องศาเซลเซียส) โดยเส้นใยกระจายจนเต็มจานเพาะเชื้อค่อนข้างรวดเร็ว แสดงดังรูปที่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



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

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

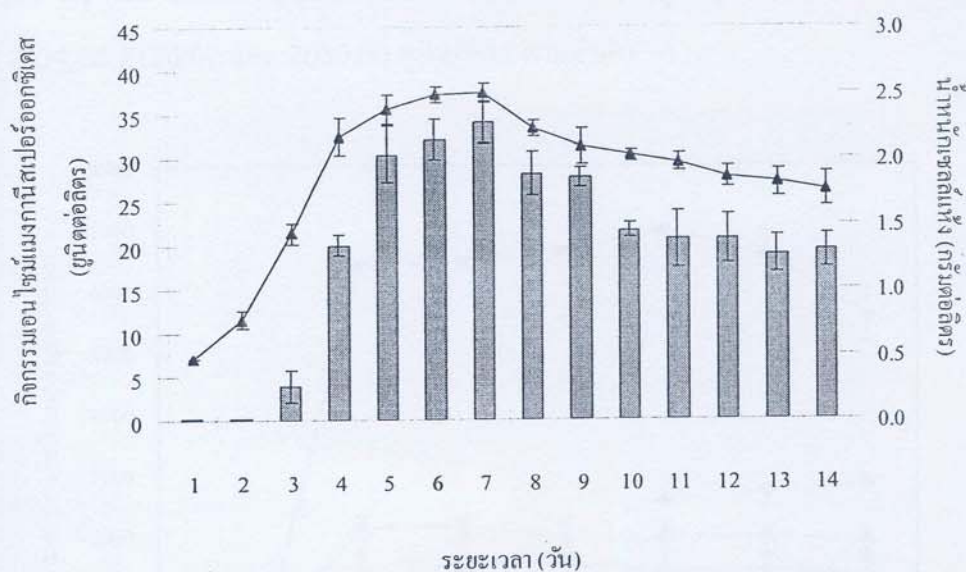
ผลจากการทดลองเพื่อศึกษาการเจริญและความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินของ *L. strigosus* ในระดับฟลาสก์ โดยใช้อาหาร Minimal Medium (MM) ที่มีกลูโคสและ yeast extract เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนตามลำดับ พบว่า *L. strigosus* สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินได้ 2 ชนิด คือ เอนไซม์แลคเคส (Lac) และเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (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 หลังจากนั้น น้ำหนักเซลล์แห้งมีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในวันที่ 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

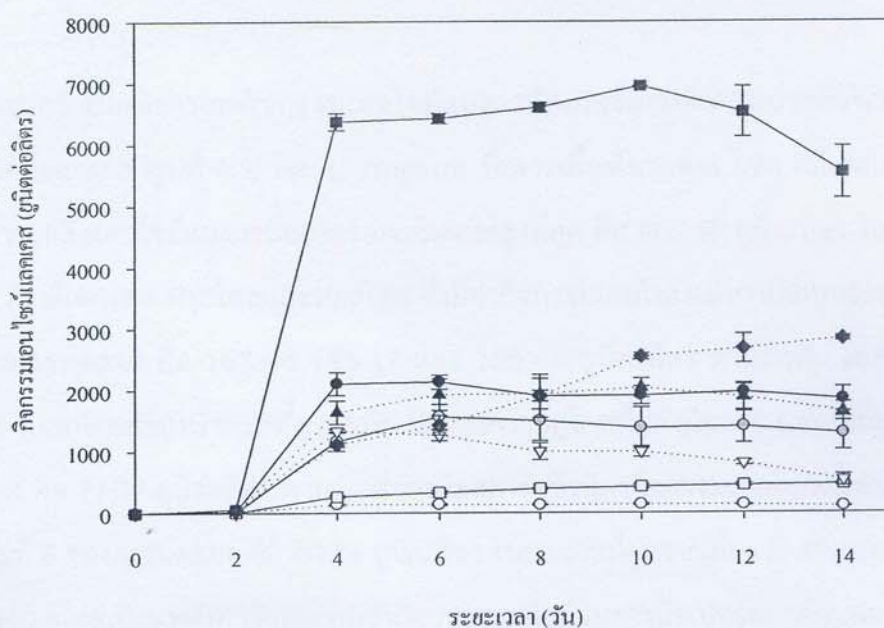
4 ของการทดลอง คือ 513.33 ยูนิต/ลิตร และเพิ่มขึ้นต่อไปจนมีค่าสูงสุดในวันที่ 7 ของการทดลอง คือ 669.81 ยูนิต/ลิตร หลังจากเวลาผ่านไป 7 วัน พบว่าทั้งน้ำหนักเซลล์แห้งและกิจกรรมเอนไซม์แลคเคสมีค่าลดลง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Arora และ Gill (2000) ที่พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งของ *Phlebia* spp. และกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์แลคเคส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



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

1.3 การหาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ของเชื้อราขาวสายพันธุ์ *L. strigosus*

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



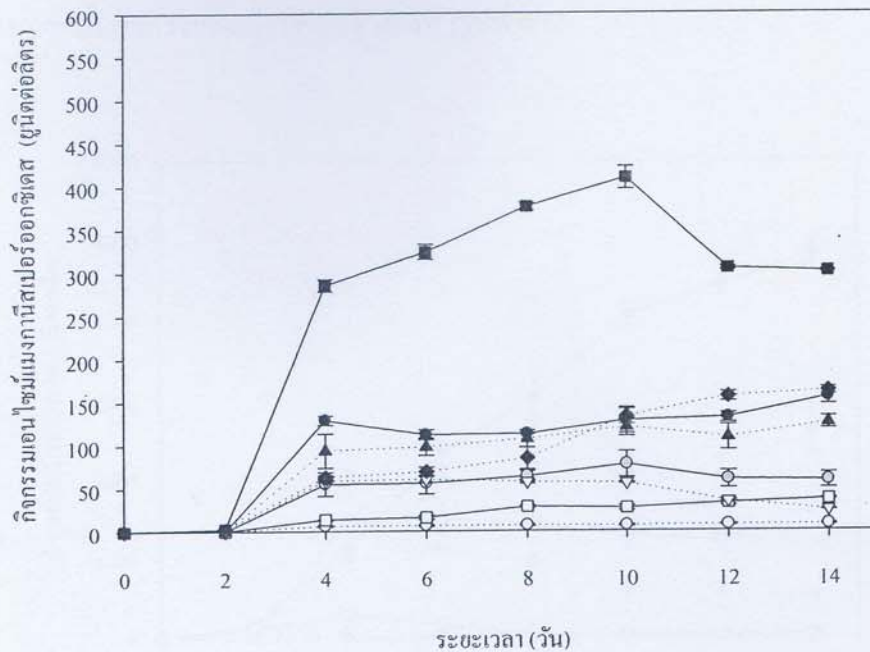
รูปที่ 4.4 ความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมเอนไซม์แลคเคส (หน่วย/ลิตร) ที่ผลิตโดย *L. strigosus*

เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร MM และระยะเวลา (วัน) ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน ดังนี้

(—○— กลูโคส; —●— ฟรุคโตส; ...○... ซูโครส; —▲— มอลโตส; —□— แลคโตส; —■— เซลโลไบโอส;
...▽... โซลูเบิลสตาρχ 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) ซึ่งรายงานวากลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แลคเคสของ *Ganoderma* sp. KU-Alk4 ภายใต้การออกแบบการทดลองแบบ box-behnken design เนื่องจากกลีเซอรอลถูกใช้อย่างช้า ๆ เมื่อเปรียบเทียบกับกลูโคส นอกจากนี้ในกรณีของโซลูเบิลสตาร์ชอาจเป็นไปได้ว่า *L. strigosus* ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ประเภทที่ไฮโดรไลซ์สารจำพวกสตาร์ชได้ ทำให้กิจกรรมเอนไซม์แลคเคสมีค่าไม่สูงมากนัก และเมื่อพิจารณาจากผลการทดลองข้างต้นรวมทั้งรายงานการศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์แลคเคสโดยทั่วไปของราไวต์รอตที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว (Submerged culture) จึงอาจกล่าวได้ว่า การพิจารณาเลือกแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แลคเคสโดยเชื้อราขาวขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อราขาวด้วย

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

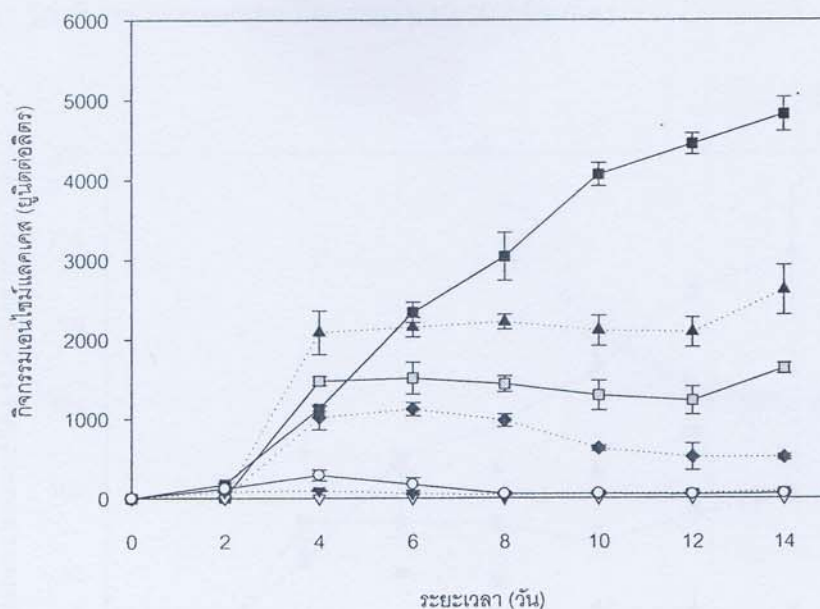


รูปที่ 4.5 ความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมเอนไซม์แอมโมนิแอสเปอร์ออกซิเดส (ยูนิต/ลิตร) ที่ผลิตโดย *L. strigosus* เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร MM และระยะเวลา (วัน) ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน ดังนี้
(—○— กลูโคส; —●— ฟรุคโตส; ...○... ซูโครส; ...▲... มอลโตส; —□— แลคโตส; —■— เซลโลไบโอส; ...▽... โซลูเบลิสตาร์ช และ ...◆... 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 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 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 โดยกิจกรรมเอนไซม์แลคเคสเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจากวันที่ 2 ของการทดลองไปจนถึงวันที่ 4 ของการทดลอง จากนั้นกิจกรรมเอนไซม์ค่อนข้างคงที่ (รูปที่ 4.6)



รูปที่ 4.6 ความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมเอนไซม์แลคเคส (ยูนิต/ลิตร) ที่ผลิตโดย *L. strigosus*

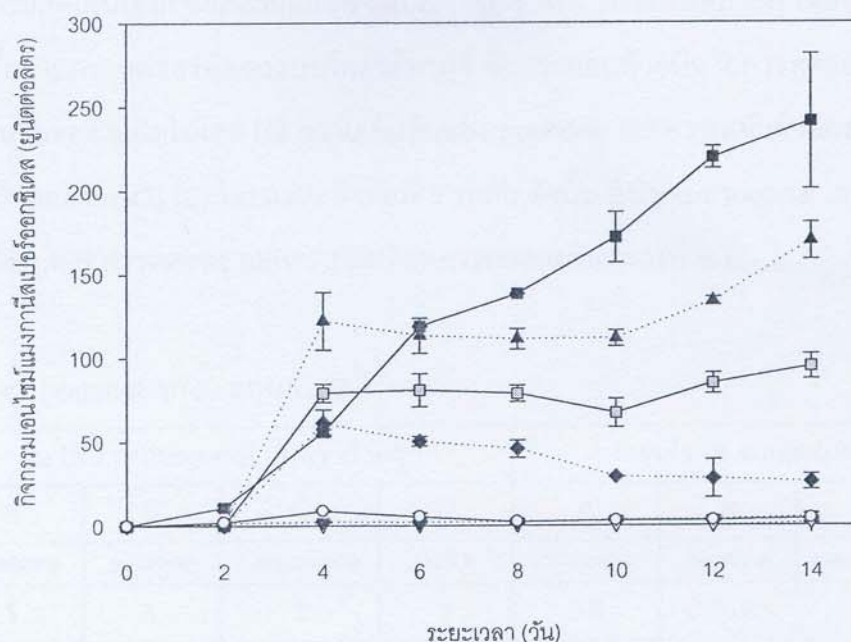
เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร MM และระยะเวลา (วัน) ที่มีแหล่งไนโตรเจนต่างชนิดกัน ดังนี้

(—□— Yeast extract; —■— L-Asparagine; ...▲... Peptone; ...◆... Beef extract; ...▽... Urea;
...▼... NH₄NO₃ และ —○— (NH₄)₂SO₄)

ส่วนการเพาะเลี้ยง *L. strigosus* ในอาหาร MM ที่มี urea NH₄NO₃ และ (NH₄)₂SO₄ เป็นแหล่งไนโตรเจนพบว่า กิจกรรมเอนไซม์แลคเคสตลอดระยะเวลา 14 วัน ของการทดลอง มีค่าต่ำกว่า 300 ยูนิต/ลิตร โดยกิจกรรมเอนไซม์แลคเคสของ *L. strigosus* เมื่อใช้ urea NH₄NO₃ และ (NH₄)₂SO₄ 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 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 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 —○— $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)

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* ตามการทดลองที่ออกแบบโดยวิธีทากูชิ

การผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินจาก *L. strigosus* ในระดับฟลาสก์ โดยใช้องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อตามการทดลองที่ออกแบบโดยวิธีทากูชิ 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

โดยเมื่อทำการทดลองโดยเฉพาะเลี้ยง *L. strigosus* ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหาร MM (องค์ประกอบแตกต่างกันในแต่ละชุดการทดลอง) pH 5.5 จำนวน 200 มิลลิลิตร เติมหักเชื้อของ *L. strigosus* จำนวน 20 ชิ้นวัน 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 ของการทดลองภายใต้องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกันตามการทดลองโดยวิธีฮากุชิ

Run	levels of variables (กรัม/ลิตร)				Lac activity (ยูนิต/ลิตร)		
No.	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 กิจกรรมเอนไซม์แอมโมนิัสเปอร์ออกซิเดสของ *L. strigosus* ในวันที่ 12 ของการทดลอง ภายใต้องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกันตามการทดลองโดยวิธีทากูชิ

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* ในระดับพลาสติกภายใต้ องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่แปรผัน 4 ปัจจัย (9 ชุดการทดลอง) ดังแสดงในตารางที่ 5 และ 6 พบว่า ชุดการทดลองที่ 7 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสสูงที่สุด คือ 33,955.83 ยูนิต/ลิตร ในวันที่ 12 ของการทดลอง ซึ่งชุดการทดลองที่ 7 มีระดับของแต่ละปัจจัยในการทดลองดังนี้ คือ ความเข้มข้นของเซลโลไบโอส 15 กรัม/ลิตร ความเข้มข้นของ peptone 0.3125 กรัม/ลิตร ความเข้มข้นของ L-Asparagine 1.2500 กรัม/ลิตร และความเข้มข้นของ CuSO₄ 0.002 กรัม/ลิตร นอกจากนี้จากผลการทดลองยังพบว่ากิจกรรมเอนไซม์แอมโมนิัสเปอร์ออกซิเดสที่ผลิตโดย *L. strigosus* ในวันที่ 12 ของการทดลอง มีค่าสูงที่สุดเท่ากับ 3,764.57 ยูนิต/ลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร Minimal Medium ที่มีองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อตามชุดการทดลองที่ 7 เช่นเดียวกัน

2.2 การหาค่าประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินของ *L. strigosus* โดยวิธีทางกฤษิ

นำค่าเฉลี่ยของแต่ละระดับของปัจจัย มาหาค่าอิทธิพลของปัจจัย และระดับของปัจจัยที่เหมาะสมดังแสดงในตารางที่ 4.4 และ 4.5 โดยพิจารณาจากค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสและกิจกรรมเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส ตามลำดับ

ตารางที่ 4.4 ค่าอิทธิพลเฉลี่ยที่ได้จากการผลิตเอนไซม์แลคเคสของ *L. strigosus* เมื่อแปรผันปัจจัยที่ระดับต่าง ๆ ของแต่ละการทดลอง

ระดับ	ค่าอิทธิพล			
	เซลโลไบโอส	เปปโตน	แอลแอสฟาราจีน	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			
	เซลโลโบไอส	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 %

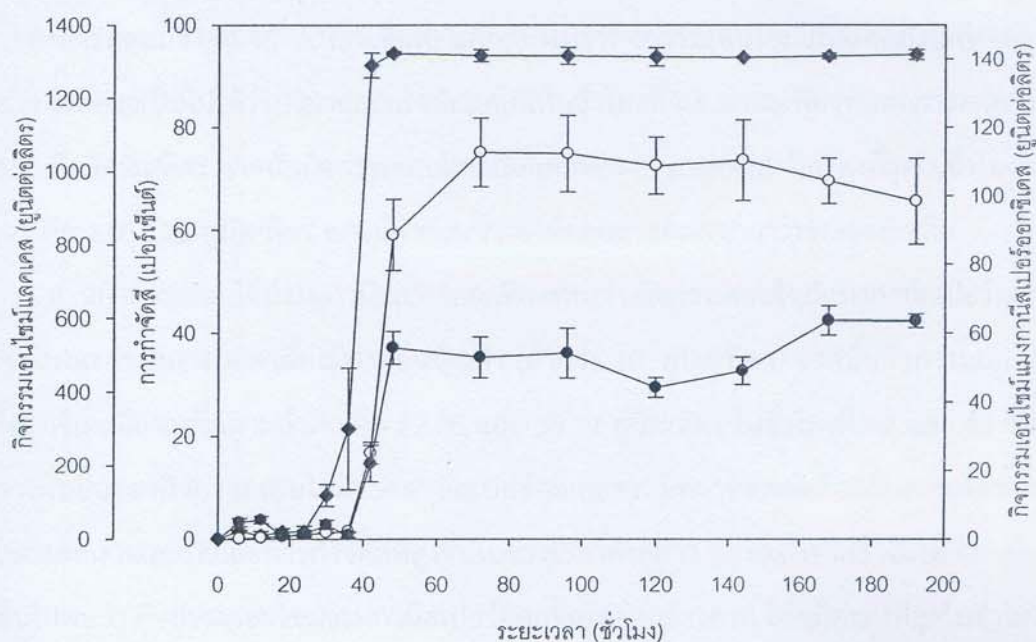
หมายเหตุ ¹ ค่าอิทธิพลเท่ากับผลต่างของค่าต่ำสุดและค่าสูงสุด

² % ค่าอิทธิพล คำนวณดังสูตรคำนวณในภาคผนวก ค โดยใช้ค่าอิทธิพลรวมเท่ากับ 4444.526

จากผลการวิเคราะห์อิทธิพลของแต่ละปัจจัยการทดลองจากค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสและกิจกรรมเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสในตารางที่ 5 และ 6 พบว่า เมื่อพิจารณาค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสสามารถเรียงลำดับร้อยละอิทธิพลของปัจจัยการทดลองจากมากไปน้อยได้ดังนี้ ความเข้มข้นของ L-Asparagine (37.95 เปอร์เซ็นต์) ความเข้มข้นของเซลโลโบไอส (28.91 เปอร์เซ็นต์) ความเข้มข้นของ CuSO₄ (23.56 เปอร์เซ็นต์) และความเข้มข้นของ peptone (9.58 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับเมื่อพิจารณาค่ากิจกรรมเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสสามารถเรียงลำดับร้อยละอิทธิพลของปัจจัยการทดลองจากมากไปน้อยได้ดังนี้ ความเข้มข้นของ L-Asparagine (40.26 เปอร์เซ็นต์) ความเข้มข้นของเซลโลโบไอส (27.61 เปอร์เซ็นต์) ความเข้มข้นของ CuSO₄ (23.95 เปอร์เซ็นต์) และความเข้มข้นของ peptone (8.18 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าความเข้มข้นของ L-Asparagine มีอิทธิพลต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินทั้ง 2 ชนิด ของ *L. strigosus* มากที่สุด

3. การทดสอบการบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนลิกลินโดยเอนไซม์ย่อยสลายลิกลินของ *L. strigosus*

จากการศึกษาความสามารถของ *L. strigosus* ในการกำจัดสีของน้ำเสียจากอุตสาหกรรมการผลิตเยื่อและกระดาษ ที่ความเข้มข้นลิกลินเริ่มต้น 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 การกำจัดสีจากลิกลินโดย *L. strigosus* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MM โดยแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการกำจัดสี (◆) กิจกรรมเอนไซม์แลคเคส (○) และกิจกรรมเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (●)

โดยทั่วไปแล้วการลดความเข้มของลิกลินโดยเชื้อราขาวเกิดขึ้นด้วยกลไกหลัก 2 ชนิดคือ การดูดซับทางชีวภาพ (Biosorption) และการย่อยสลายทางชีวภาพโดยเอนไซม์ ดังนั้นเพื่อเป็นการยืนยันว่ากลไกหลักของการลดความเข้มสีของลิกลินโดย *L. strigosus* เป็นการย่อยสลายทางชีวภาพโดยการทำงานของเอนไซม์

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

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

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

4. การศึกษาการบำบัดสีจากน้ำทิ้งอุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษของเชื้อราขาว *L. strigosus* ภายในถังปฏิกรณ์เยื่อกรอง

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

อุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษให้แกระบบ เมื่อเลี้ยงเชื้อราขาว *L. strigosus* ดังกล่าวต่อไประยะหนึ่งจนปริมาณเชื้อราขาว *L. strigosus* สามารถปรับตัวได้ดี จึงทำการควบคุมสัณฐานไว้ที่ 3 5 10 20 30 วัน และระยะเวลาอนันต์ (ไม่มีการดิงสัณฐานออก) โดยจะใช้พารามิเตอร์ที่ควบคุมระบบ คือ อัตราการทิ้งสัณฐาน เนื่องจากเป็นตัวกำหนดประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสีย และน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดมาวิเคราะห์ปริมาณสีและสารอินทรีย์ของน้ำทิ้งภายหลังการบำบัดเพื่อวิเคราะห์ประสิทธิภาพของระบบดังกล่าว

4.1 ประสิทธิภาพการกำจัดสีและสารอินทรีย์ของเชื้อราขาว *L. strigosus* ภายในถังปฏิกรณ์เยื่อกรอง

ผลการศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดสารสีและสารอินทรีย์ในน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษ ที่ควบคุมค่าอายุสัณฐานต่างๆ กัน คือ 5 10 20 30 วัน และอายุสัณฐานอนันต์ ภายใต้สภาวะแบบแอโรบิกเป็นหลัก โดยไม่มีการเจือจางความเข้มข้นของน้ำเสีย (ความเข้มข้นสีเริ่มต้นเท่ากับ 500 หน่วย และซีไอดีเริ่มต้นเท่ากับ 210 มิลลิกรัมต่อลิตร)

จากการทดลองเพื่อหาประสิทธิภาพในการกำจัดสีและสารอินทรีย์ในรูปซีไอดีที่ระบบสามารถรองรับได้โดยการเพิ่มอายุสัณฐาน 5 10 20 30 วัน และค่าอายุสัณฐานอนันต์ (ไม่มีการดิงตะกอนออก) ให้ผลการทดลองดังรายละเอียดดังตารางที่ 4.6

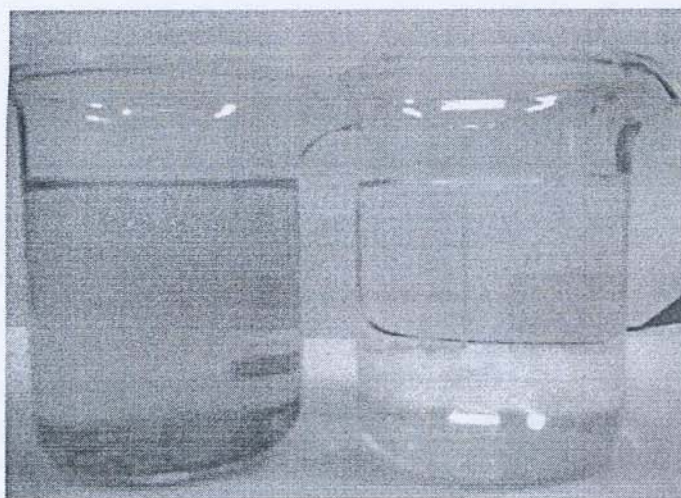
ตารางที่ 4.6 ประสิทธิภาพในการบำบัดสีและสารอินทรีย์เมื่อทำการควบคุมระบบที่ SRT ต่างๆ

SRT (วัน)	COD in (มก./ล.)	COD out (มก./ล.)	% การกำจัด ซีไอดี	สี in (หน่วย)	สี out (หน่วย)	% การกำจัด สี
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 กรณีเริ่มต้นระบบน้ำตัวอย่างมีค่าซีไอดีเฉลี่ย 210±10.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ควบคุมที่ค่าอายุสัณฐาน 5 10 20 30 วันและอายุอนันต์ ตามลำดับ โดยหลังจากผ่านระบบน้ำแพร่ผ่านเมมเบรนมีค่าซีไอดีเฉลี่ยเท่ากับ 22.9 16.2 41.4 36.3 และ 7.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ คิดเป็นประสิทธิภาพการกำจัดซีไอดีได้เฉลี่ยร้อยละ 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 แต่เมื่อนำน้ำเสียมาผ่านกระบวนการบำบัดน้ำเสียด้วยเชื้อราขาว *L. strigosus* ภายในถังปฏิกรณ์เยื่อกรองที่ใช้เมมเบรนที่มีขนาดรูพรุน 0.4 ไมครอน ส่งผลให้ลักษณะสมบัติของน้ำที่ผ่านการบำบัดแล้วจะมีลักษณะใส ปริมาณของแข็งแขวนลอยหลุดปนออกมากับน้ำน้อยมากหรือแทบจะไม่มีของแข็งปนหลุดออกมา ดังนั้นการบำบัดน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษด้วยเชื้อราขาว *L. strigosus* ภายในถังปฏิกรณ์เยื่อกรองจะส่งผลให้น้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดได้มีคุณภาพได้มาตรฐานน้ำทิ้ง

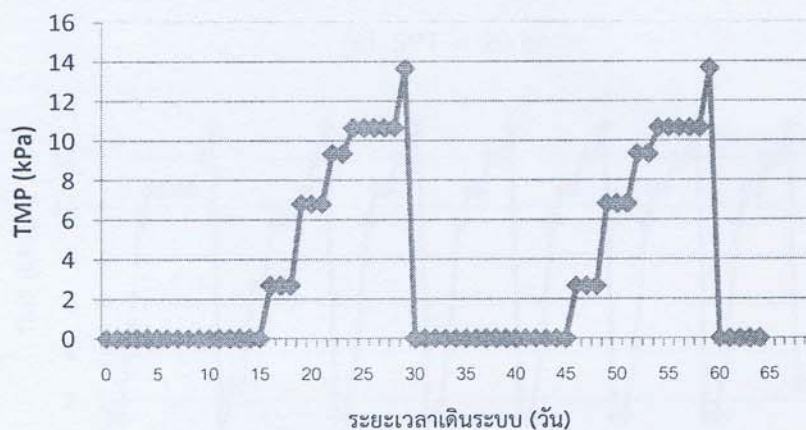


รูปที่ 4.9 ลักษณะของน้ำเสียก่อน (a) และหลังการบำบัด (b) ด้วยเชื้อราขาว *L. strigosus* ภายในถังปฏิกรณ์เยื่อกรองที่ใช้เมมเบรนที่มีขนาดรูพรุน 0.4 ไมครอน

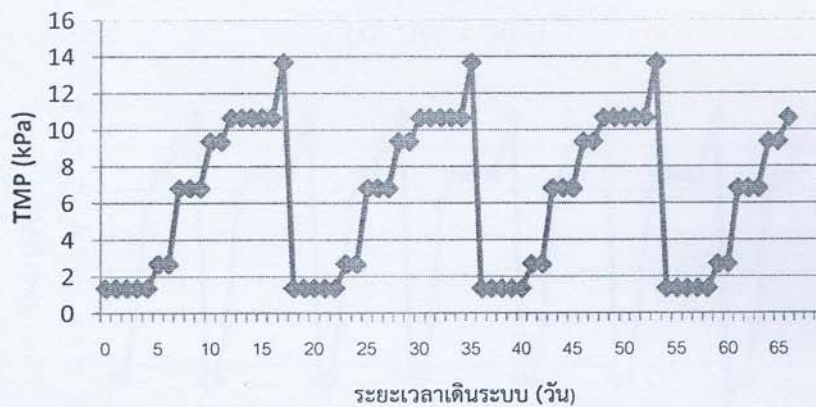
สำหรับการประยุกต์ใช้ถังปฏิกรณ์เยื่อกรองร่วมกับการบำบัดน้ำเสียโดย เชื้อราขาว *L. strigosus* การใช้เมมเบรนสำหรับกรองเชื้อราและน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดแล้วในระยะแรกจะเป็นเมมเบรนที่ไม่ได้ผ่านการใช้งานมาก่อน โดยเมื่อใช้งานกรองน้ำเสียภายในถังปฏิกรณ์เยื่อกรองเมมเบรนจะทำให้เกิดการอุดตัน (fouling) ที่ผิวหน้าของเมมเบรนเพิ่มมากขึ้นส่งผลให้ค่าความดันคร่อมเมมเบรน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

เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการเดินระบบ ซึ่งในการศึกษาได้มีการควบคุมไม่ให้เมมเบรนมีความดันคร่อมเกิน 15 kPa ซึ่งหากเกินกว่านี้แล้วจะทำให้เมมเบรนอุดตัน และปั๊มน้ำทำงานหนัก จึงต้องมีการนำเมมเบรนออกมาล้างทำความสะอาดด้วยสารทำความสะอาดด้วยสารละลาย NaOCl เป็นช่วงๆ

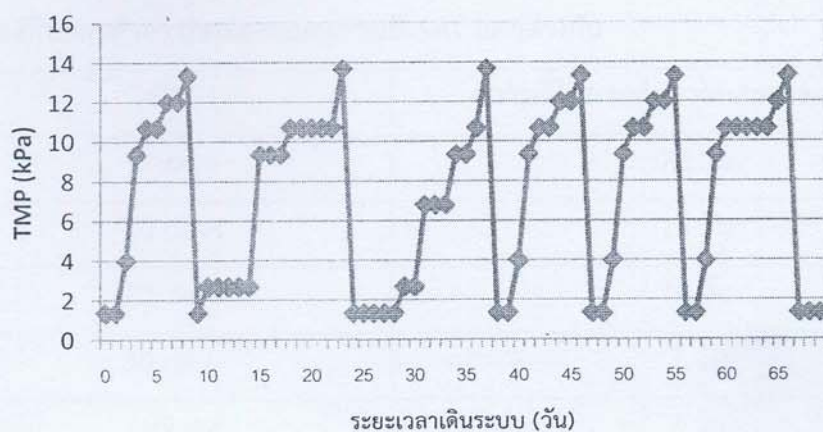
รูปที่ 4.10 แสดงผลของความดันคร่อมเมมเบรนที่ SRT แตกต่างกันในช่วงที่ระบบเข้าสู่สภาวะสมดุลแล้ว ซึ่งในแต่ละการทดลองจะเห็นการเพิ่มขึ้นของ TMP ที่แตกต่างกัน จากผลการทดลองดังกล่าวจะทำให้สามารถกำหนดระยะเวลาในการทำความสะอาดของเมมเบรนในระบบได้ดังตารางที่ 4.7



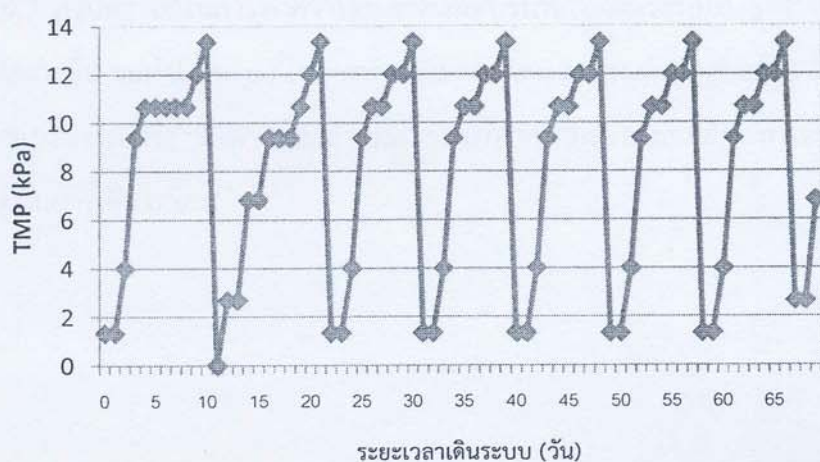
(ก) SRT = 5 d



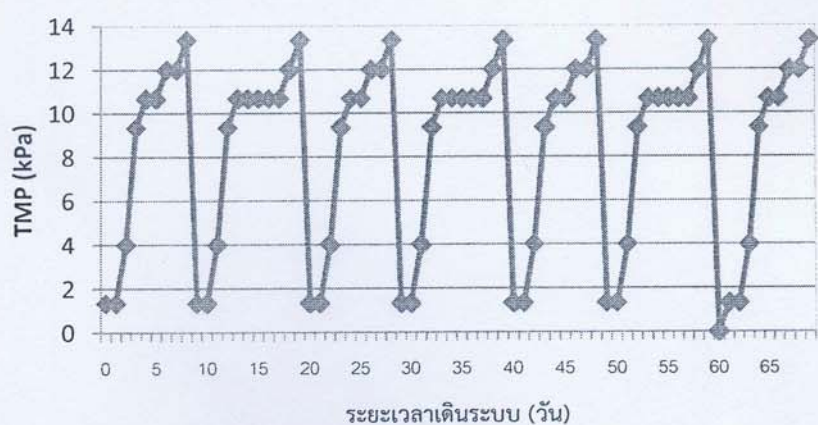
(ข) SRT = 10 d



(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 ทำให้เกิดความไม่สะดวก และเกิดค่าใช้จ่ายสูงในการเดินระบบ

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

- (1) การเจริญเติบโตและช่วงเวลาของการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินของ *Lentinus strigosus* ในอาหาร Minimal Medium (MM) ที่มีกลูโคสและ yeast extract เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ตามลำดับพบว่า กิจกรรมเอนไซม์แลคเคสและเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสมีค่าสูงสุด 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 $L_9 (3^4)$ 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* 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

- (5) การประยุกต์ใช้เชื้อราขาว *L. strigosus* ในถังปฏิกรณ์เยื่อกรอง พบว่า เมื่อควบคุมน้ำตัวอย่างที่เข้าสู่ระบบให้มีค่าซีไอดีเฉลี่ย 210 ± 10.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของสีในน้ำเสียเท่ากับ 500 ± 20.0 หน่วย เมื่อควบคุมที่ระบบค่าอายุสัลต์จ์ 5 10 20 30 วันและอายุอนันต์ ตามลำดับ พบว่าประสิทธิภาพในการบำบัดสารอินทรีย์ในรูปซีไอดีมีประสิทธิภาพมากกว่าร้อยละ 80.0 และประสิทธิภาพการกำจัดสีของน้ำทิ้งได้เฉลี่ยมากกว่าร้อยละ 85.0 โดยเมื่อควบคุมอายุสัลต์จ์ที่อายุอนันต์จะมีประสิทธิภาพในการบำบัดสารอินทรีย์ในรูปของซีไอดีและสีของน้ำทิ้งสูงสุด
- (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 cultures, 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.
- Hernández, 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 *Streptomyces* 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 4th 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 properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. *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.