การกำจัดสีของน้ำทิ้งในการผลิตลิกนินโดยราไวต์รอต

นางสาว พิมพ์ชนก เต็งเจริญ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม (สหสาขาวิชา)

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2546

ISBN: 974-17-4049-2

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DECOLORIZATION OF WASTEWATER FROM LIGNIN PRODUCTION BY WHITE ROT FUNGI

Miss Pimchanok Tengcharoen

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Environmental Science (Inter-department)
Graduate School
Chulalongkorn University
Academic Year 2003

ISBN: 974-17-4049-2

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การกำจัดสีของน้ำทิ้งในการผลิตลิกนินโดยราไวต์รอต
โดย	นางสาว พิมพ์ชนก เต็งเจริญ
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. ประกิตติ์สิน สีหนนทน์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

………………………………………….. คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ศาสตราจารย์ ดร. สุชาดา กีระนันทน์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

…………………………………………… ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์)

………………………………………….. อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม)

……………………………………………อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(รองศาสตราจารย์ ดร. ประกิตติ์สิน สีหนนทน์)

……………………………………………กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. หรรษา ปุณณะพยัคฆ์)

……………………………………………กรรมการ

(ดร. สุรางค์ เธียรหิรัญ)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พิมพ์ชนก เต็งเจริญ : การกำจัดสีของน้ำทิ้งในการผลิตลิกนินโดยราไวต์รอต (DECOLORIZATION OF WASTEWATER FROM LIGNIN PRODUCTION BY WHITE ROT FUNGI) อ. ที่ปรึกษา: รองศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม: รองศาสตราจารย์ ดร. ประกิตติ์สิน สีหนนทน์, 113 หน้า. ISBN 974-17-4049-2

โรงงานอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษนั้นได้ปล่อยน้ำทิ้งที่ประกอบไปด้วยสีและลิกนินซึ่งเป็นปัญหาหลักอย่างหนึ่ง ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการลดสีและลิกนินของน้ำทิ้งในการผลิตลิกนินด้วยราที่แยกได้จากเห็ดและกิ่งไม้ผุ

จากการเก็บตัวอย่างเห็ดจำนวน 20 ตัวอย่าง และกิ่งไม้ผุจำนวน 22 ตัวอย่าง จากแหล่งต่างๆ ในประเทศไทย แล้วนำมาทดสอบความสามารถในการย่อยสลายลิกนินโดยใช้หลักการของ Poly-R agar clearance และ Tannic agar พบว่ารา Isolate A19 ที่แยกได้จากเห็ดจาก จ.ประจวบคีรีขันธ์ และรา Isolate B7 ที่แยกได้จากกิ่งไม้ผุจาก จ.ฉะเชิงเทรา สามารถเปลี่ยนสีของ Poly-R agar clearance จากสีชมพูม่วงเป็นสีเหลืองและสร้างโซนสีน้ำตาลบน Tannic agar เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ จัดได้ว่ารา Isolate A19 และรา Isolate B7 อยู่ในกลุ่มของ Basidiomycota รา Isolate A19 และรา Isolate B7 เข้าสู่ระยะ stationary phase ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose broth ที่อุณหภูมิห้องในวันที่ 12 และวันที่ 8 ตามลำดับ โดยสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงรา Isolate A19 และรา Isolate B7 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Czapex's Dox Medium คือ ใช้น้ำตาลซูโครสเป็นอาหารคาร์บอน และโซเดียมไนเตรตเป็นแหล่งอาหารไนโตรเจน ที่ความเป็นกรดด่าง 5 จากการทดลองการลดสีและลิกนินในอาหาร Czapex's Dox Medium ที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที พบว่าอัตราส่วนที่เหมาะสมของรา Isolate A19: รา Isolate B7: น้ำทิ้งที่ความเป็นกรดด่าง 5 เท่ากับ 1: 1: 5 โดยใช้ซูโครสเป็นแหล่งอาหารคาร์บอนความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ และโซเดียมไนเตรตเป็นแหล่งอาหารไนโตรเจนความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ หลังจากบ่มราเป็นเวลา 8 วัน มีประสิทธิภาพสูงสุดในการลดสีและลิกนิน 94.55 เปอร์เซ็นต์ และ 75.81 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

สหสาขาวิชา วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ลายมือชื่อนิสิต...

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.......................................

ปีการศึกษา 2546 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม................................

4489093620 : MAJOR INTER-DEPARTMENT OF ENVIRONMENTAL SCIENCE
KEY WORD : WHITE ROT FUNGI / LIGNIN /COLOR REMOVAL

PIMCHANOK TENGCHAROEN : DECOLORIZATION OF WASTEWATER FROM LIGNIN PRODUCTION BY WHITE ROT FUNGI. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. AMORN PETSOM, Ph.D., CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. PRAKITSIN SIHANONTH, Ph.D., 113 pp. ISBN 974-17-4049-2

Wastewater containing coloring materials and lignin is one of the major problem in paper pulp industry. This research was aimed to investigate the possibility of color and lignin removal of wastewater from lignin production using fungi isolated from mushroom and decayed wood.

Twenty specimens of mushroom and 22 specimens of decayed wood collected from various location in Thailand were screened for lignin degradation ability using Poly-R agar clearance and Tannic agar methods. It was found that fungus isolate A19 which was a mushroom from Prachuapkhirikhan province and fungus isolate B7 which was isolated from decayed wood from Chachoengsao province were able to change the color of Poly-R agar clearance from pink-purple to yellow color and produced brown diffusion zone on Tannic agar. Based on their morphology and cultural characteristics fungus isolate A19 and fungus isolate B7 were identified as Basidiomycota. The length of stationary phase of fungus isolate A19 and fungus isolate B7 were at 12 and 8 days respectively when grown in potato dextrose broth at room temperature. The optimum growing condition on Czapek's Dox medium for fungus isolate A19 and fungus isolate B7 were achieved using sucrose as a carbon source, sodium nitrate as a nitrogen source and pH 5. The decolorization and lignin removal experiments were carried out in Czapex's Dox medium at room temperature on a shaker at 150 rpm by using the ratio of fungus isolate A19: fungus isolate B7: wastewater pH 5 at 1: 1: 5. The carbon source was 0.5% sucrose and the nitrogen source was 0.1% sodium nitrate. After 8 days of cultivation, the maximum reduction of color and lignin were 94.55% and 75.81% respectively.

Inter-department Environmental Science .	Student's signature…………………………
Field of study Environmental Science .	Advisor's signature……………………...
Academic year 2003 .	Coadvisor's signature……………………..

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.อมร เพชรสม ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์ ดร.ประกิตติ์สิน สีหนนทน์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้คำปรึกษาและแนะนำแนวทางในการวิจัย ตลอดจนแก้ไขปัญหาต่างๆ ที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัย อีกทั้งสละเวลาช่วยตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้แก่ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์ ผู้อำนวยการหลักสูตรสหสาขาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.หรรษา ปุณณพยัคฆ์ และดร. สุรางค์ เธียรหิรัญ ที่กรุณาตรวจทาน ให้คำแนะนำและคำปรึกษาในการเขียนวิทยานิพนธ์ และขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร.จิตรตรา กาญจนประยุธที่ให้คำปรึกษาเสมอมา

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความสนับสนุนทุนอุดหนุนโครงการวิจัยหรือค้นคว้าเพื่อทำวิทยานิพนธ์ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ และภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ที่เอื้อเฟื้อสารเคมี เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย รวมถึงสถานที่ในการทำการทดลอง สหสาขาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม และภาควิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์ในการทำการวิจัย และขอขอบพระคุณทุกท่านที่ไม่ได้เอ่ยนาม ที่ช่วยในการศึกษาครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดาที่ให้โอกาส และให้ความอุปการะทางด้านทุนการศึกษาและสนับสนุนในการวิจัย ตลอดจนญาติพี่น้อง พี่ๆ เพื่อนๆ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ และสหสาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อมที่ให้กำลังใจ และอำนวยความสะดวกเสมอมา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ญ
สารบัญรูป	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ขอบเขตการวิจัย	2
1.4 สมมติฐานการวิจัย	3
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 องค์ประกอบทางเคมีของเส้นใย	4
2.2 ลิกนิน	7
2.3 กระบวนการผลิตเยื่อกระดาษ	8
2.4 ลักษณะและองค์ประกอบทางเคมีของน้ำดำ	12
2.5 การใช้ประโยชน์จากน้ำดำ	13
2.6 ราไวต์รอต (white rot fungi)	14
2.7 กรดแทนนิก (Tannic acid) และ Poly R-478	17
2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	18
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	23
3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย	23
3.2 สารเคมีสำหรับการวิจัย	23
3.3 วิธีดำเนินการวิจัย	25
3.3.1 การเก็บตัวอย่างจากแหล่งต่างๆ ในประเทศไทย	25
3.3.2 การแยกเส้นใยราจากตัวอย่าง	25
3.3.3 ทดสอบราที่มีความสามารถในการย่อยสลายลิกนิน	25

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.3.4 การศึกษาการเจริญของราแต่ละชนิดในอาหาร Potato dextrose agar (PDB)...... 26

3.3.5 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงรา ให้มีความสามารถในการลดความเข้มข้นของลิกนินและความเข้มข้นของสีของน้ำทิ้งในการผลิตลิกนิน...... 26

3.3.6 การศึกษาองค์ประกอบและความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการลดความเข้มข้นของลิกนินและความเข้มข้นของสีของน้ำทิ้งในการผลิตลิกนิน...... 27

3.3.7 นำรา Isolate A19 และรา Isolate B7 มาทดลองใช้กับน้ำทิ้งในการผลิตลิกนิน...... 29

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง 30

4.1 การเก็บตัวอย่างจากแหล่งต่างๆ ในประเทศไทย...... 30

4.2 ลักษณะของราตัวอย่างและผลการทดสอบความสามารถในการเกิดปฏิกิริยากับอาหาร Poly-R agar clearance และ Tannic agar...... 32

4.3 ผลการสร้างโซนที่มีการเปลี่ยนสีบนอาหารเลี้ยงเชื้อของรา Isolate A19 และรา Isolate B7...... 40

4.4 ผลการศึกษาการเจริญของรา Isolate A19 และรา Isolate B7 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose broth (PDB)...... 43

4.5 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงรา Isolate A19 และรา Isolate B7 ให้มีความสามารถในการลดความเข้มข้นของลิกนินและความเข้มข้นของสีของน้ำทิ้งในการผลิตลิกนิน...... 44

บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ 63

5.1 สรุปผลการทดลอง...... 63

5.2 ข้อเสนอแนะ...... 66

รายการอ้างอิง...... 68

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

ภาคผนวก... 73

ภาคผนวก ก การเตรียมอาหาร.. 74

ภาคผนวก ข วิธีการวิเคราะห์ลิกนินและสี.. 77

ภาคผนวก ค ข้อมูลการทดลอง... 82

ภาคผนวก ง การวิเคราะห์ทางสถิติ.. 100

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์... 113

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 แสดงองค์ประกอบทางเคมีของเส้นใย.......... 4
2.2 แสดงส่วนประกอบของธาตุในน้ำดำ (น้ำหนักแห้ง).......... 12
2.3 แสดงเอนไซม์ที่ย่อยสลายลิกนินและปฏิกิริยาหลัก.......... 15
4.1 ตัวอย่างเห็ดที่เก็บจากแหล่งต่างๆ.......... 30
4.2 ตัวอย่างกิ่งไม้ผุที่เก็บจากแหล่งต่างๆ.......... 31
4.3 ลักษณะและอัตราการเจริญของราที่แยกได้จากเห็ด และผลการทดสอบความสามารถในการย่อยสาร Poly R-478 จากสีชมพูม่วงเป็นสีเหลือง และสร้างโซนสีน้ำตาลบน Tannic agar ในเวลา 9 วัน.......... 32
4.4 ลักษณะและอัตราการเจริญของราที่แยกได้จากกิ่งไม้ และผลการทดสอบความสามารถในการย่อยสาร Poly R-478 จากสีชมพูม่วงเป็นสีเหลือง และสร้างโซนสีน้ำตาลบน Tannic agar ในเวลา 9 วัน.......... 36
4.5 ผลการวัดขนาดโซนของรา Isolate A19 และรา Isolate B7 ที่มีการเปลี่ยนสีเมื่อทดสอบกับอาหาร Poly-R agar clearance.......... 40
4.6 ผลการวัดขนาดโซนของรา Isolate A19 และรา Isolate B7 ที่มีการเปลี่ยนสีเมื่อทดสอบกับอาหาร Tannic agar.......... 41

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

2.1 ลักษณะหน่วยย่อยของสารลิกนิน........ 6
2.2 โครงสร้างโมเลกุลของลิกนิน........ 6
2.3 การนำน้ำดำกลับมาใช้ในกระบวนการ........ 13
2.4 แสดงปฏิกิริยาของ lignin peroxidase........ 16
2.5 แสดงปฏิกิริยาของ manganese peroxidase (MnP) และ laccase........ 17
4.1 ตัวอย่างเห็ด A19 ที่นำมาแยกรา........ 34
4.2 ลักษณะโคโลนีของรา Isolate A19 บนอาหาร potato dextrose agar........ 35
4.3 ลักษณะเส้นใยของรา Isolate A19 เมื่อศึกษาดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1,000 เท่า (รูปมีขนาด 0.05 เท่าจากรูปจริง)........ 35
4.4 ตัวอย่างกิ่งไม้ B7 ที่นำมาแยกรา........ 38
4.5 ลักษณะโคโลนีของรา Isolate B7 บนอาหาร potato dextrose agar........ 39
4.6 ลักษณะเส้นใยของรา Isolate B7 เมื่อศึกษาดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1,000 เท่า (รูปมีขนาด 0.05 เท่าจากรูปจริง)........ 39
4.7 ลักษณะการเปลี่ยนสีบนอาหาร Poly-R agar clearance ของรา Isolate A19........ 40
4.8 ลักษณะการเปลี่ยนสีบนอาหาร Poly-R agar clearance ของรา Isolate B7........ 41
4.9 ลักษณะการสร้างโซนสีน้ำตาลของ รา Isolate A19 บนอาหาร tannic agar........ 42
4.10 ลักษณะการสร้างโซนสีน้ำตาลของ Isolate B7 บนอาหาร tannic agar........ 42
4.11 การเจริญเติบโตของรา Isolate A19 และรา Isolate B7 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose broth (PDB)........ 43
4.12 แสดงการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการลดลิกนินของรา Isolate A19 โดยใช้ รา Isolate A19 เริ่มต้นในปริมาณที่แตกต่างกัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงจากสูตร Czapek's Dox Medium บ่มที่อุณหภูมิห้องและเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 วัน........ 45
4.13 แสดงการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการลดสีของรา Isolate A19 โดยใช้รา Isolate A19 เริ่มต้นในปริมาณที่แตกต่างกัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงจากสูตร Czapek's Dox Medium บ่มที่อุณหภูมิห้องและเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 วัน........ 45

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

4.14 แสดงการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการลดลิกนินของรา Isolate B7 โดยใช้ รา Isolate B7 เริ่มต้นในปริมาณที่แตกต่างกัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงจากสูตร Czapek's Dox Medium บ่มที่อุณหภูมิห้องและเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 วัน........ 46

4.15 แสดงการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการลดสีของรา Isolate B7 โดยใช้ รา Isolate B7 เริ่มต้นในปริมาณที่แตกต่างกัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงจากสูตร Czapek's Dox Medium บ่มที่อุณหภูมิห้องและเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 วัน........ 47

4.16 แสดงการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการลดลิกนิน เมื่อใช้รา Isolate A19 และรา Isolate B7 ผสมกันในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงจากสูตร Czapek's Dox Medium บ่มที่อุณหภูมิห้องและเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 วัน........ 48

4.17 แสดงการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการลดสี เมื่อใช้รา Isolate A19 และรา Isolate B7 ผสมกันในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงจากสูตร Czapek's Dox Medium บ่มที่อุณหภูมิห้องและเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 วัน........ 48

4.18 แสดงการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการลดลิกนินของรา Isolate A19 และ รา Isolate B7 เมื่อทำการปรับความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีระดับต่างกัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงจากสูตร Czapek's Dox Medium บ่มที่อุณหภูมิห้อง และเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 วัน........ 50

4.19 แสดงการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการลดสีของรา Isolate A19 และ ราIsolate B7 เมื่อทำการปรับความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีระดับต่างกัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงจากสูตร Czapek's Dox Medium บ่มที่อุณหภูมิห้อง และเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 วัน........ 50

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

4.20 แสดงการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการลดลิกนิน เมื่อเลี้ยงรา Isolate A19 และ รา Isolate B7 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผันแปรแหล่งอาหารคาร์บอน 2 ชนิด คือ น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลซูโครส ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงจากสูตร Czapek's Dox Medium บ่มที่อุณหภูมิห้องและเขย่าด้วย เครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 วัน ที่ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.................................... 52

4.21 แสดงการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการลดสี เมื่อเลี้ยงรา Isolate A19 และ รา Isolate B7 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผันแปรแหล่งอาหารคาร์บอน 2 ชนิด คือ น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลซูโครสในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงจากสูตร Czapek's Dox Medium บ่มที่อุณหภูมิห้อง และเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 วัน ที่ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5……………………….. 52

4.22 แสดงการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการลดลิกนิน เมื่อเลี้ยงรา Isolate A19 และ รา Isolate B7 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งอาหารคาร์บอน ผันแปรความเข้มข้นต่างๆ กัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงจากสูตร Czapek's Dox Medium บ่มที่อุณหภูมิห้องและเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 วันที่ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5……………………………………………. 54

4.23 แสดงการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการลดสี เมื่อเลี้ยงรา Isolate A19 และ รา Isolate B7 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งอาหารคาร์บอน ผันแปรความเข้มข้นต่างๆ กัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงจากสูตร Czapek's Dox Medium บ่มที่อุณหภูมิห้อง และเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 วัน ที่ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5………………………………………….. 55

4.24 แสดงการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการลดลิกนิน เมื่อเลี้ยงรา Isolate A19 และ รา Isolate B7 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผันแปรแหล่งอาหารไนโตรเจน 2 ชนิด คือ โซเดียมไนเตรต และแอมโมเนียมคลอไรด์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงจากสูตร Czapek's Dox Medium บ่มที่อุณหภูมิห้อง และเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 วัน ที่ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5…………………………… 56

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

4.25 แสดงการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการลดสี เมื่อเลี้ยงรา Isolate A19 และ รา Isolate B7ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผันแปรแหล่งอาหารไนโตรเจน 2 ชนิด คือ โซเดียมไนเตรต และแอมโมเนียมคลอไรด์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงจากสูตร Czapek's Dox Medium บ่มที่อุณหภูมิห้อง และเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 วัน ที่ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5........................... 56
4.26 แสดงการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการลดลิกนิน เมื่อเลี้ยงรา Isolate A19 และ รา Isolate B7ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้โซเดียมไนเตรตเป็นแหล่งอาหารไนโตรเจน ผันแปรความเข้มข้นต่างๆ กัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงจากสูตร Czapek's Dox Medium บ่มที่อุณหภูมิห้อง และเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 วัน ที่ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5............................ 58
4.27 แสดงการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการลดสี เมื่อเลี้ยงรา Isolate A19 และ รา Isolate B7ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้โซเดียมไนเตรตเป็นแหล่งอาหารไนโตรเจน ผันแปรความเข้มข้นต่างๆ กัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงจากสูตร Czapek's Dox Medium บ่มที่อุณหภูมิห้อง และเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 วัน ที่ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5............................ 59
4.28 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพในการลดลิกนินและประสิทธิภาพ ในการลดสี เมื่อเลี้ยงรา Isolate A19 และ รา Isolate B7 ในสภาวะที่เหมาะสม............. 59
4.29 แสดงการเปรียบเทียบสีของน้ำทิ้งที่ปรับสภาวะให้เหมาะสม โดยชุดควบคุมที่ไม่เติมรา Isolate A19 และรา Isolate B7 และชุดที่เติมรา Isolate A19 และรา Isolate B7............ 60
4.30 แสดงการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการลดลิกนิน เมื่อนำรา Isolate A19 และ รา Isolate B7 มาทดลองใช้กับน้ำทิ้งในการผลิตลิกนินที่ปรับสภาวะให้เหมาะสม โดยเตรียมชุดการทดลอง 2 ชุด ชุดแรกเป็นชุดควบคุมไม่มีการเติมราลงไป ส่วนชุดที่สองใส่รา Isolate A19 และรา Isolate B7 บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 12 วัน.......... 61
4.31 แสดงการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการลดสี เมื่อนำรา Isolate A19 และ รา Isolate B7 มาทดลองใช้กับน้ำทิ้งในการผลิตลิกนินที่ปรับสภาวะให้เหมาะสม โดยเตรียมชุดการทดลอง 2 ชุด ชุดแรกเป็นชุดควบคุมไม่มีการเติมราลงไป ส่วนชุดที่สองใส่รา Isolate A19 และรา Isolate B7 บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 12 วัน............. 62

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

อุตสาหกรรมกระดาษและเยื่อกระดาษจัดเป็นอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ ที่มีความสำคัญต่อการพัฒนาเศรษฐกิจซึ่งสามารถทดแทนการนำเข้าได้เป็นอย่างมาก อัตราการขยายตัวของอุตสาหกรรมนี้เป็นตัวบ่งชี้ในด้านความเจริญก้าวหน้าทางสังคมและการขยายตัวทางเศรษฐกิจของประเทศได้เป็นอย่างดี โดยความต้องการเยื่อกระดาษภายในประเทศมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นทุกปี อุตสาหกรรมเยื่อกระดาษ อุตสาหกรรมกระดาษ และอุตสาหกรรมสิ่งพิมพ์เป็นอุตสาหกรรมที่มีความต่อเนื่องกัน ซึ่งอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษต้องมีกำลังการผลิตเยื่อใยสั้นและใยยาวให้มากพอที่จะรองรับอุตสาหกรรมต่อเนื่องได้อย่างสมดุลเพื่อลดการนำเข้าจากต่างประเทศและเพื่อการส่งออก

การผลิตเยื่อกระดาษนอกจากจะใช้เงินลงทุนสูงแล้วยังใช้ทรัพยากรธรรมชาติ เช่น น้ำ และพืชผลทางการเกษตรในปริมาณสูงด้วย โดยจะใช้น้ำปริมาณมากในขั้นตอนการผลิตต่างๆ ระหว่าง 31–54 ลูกบาศก์เมตรต่อตันเยื่อและมีปริมาณน้ำทิ้งระหว่าง 29–40 ลูกบาศก์เมตรต่อตันเยื่อ (กรมควบคุมมลพิษ, 2543) น้ำทิ้งที่ไม่ได้ทำการบำบัดหรือบำบัดบางส่วนจะก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมได้ง่ายหากขาดการจัดการสิ่งแวดล้อมที่ถูกวิธี และอาจเกิดความเป็นพิษต่อมนุษย์ได้หากร่างกายได้รับในระยะยาวอันเป็นผลมาจากลิกนินและอนุพันธ์ของลิกนิน (Roald, 1977) น้ำดำ (Black Liquor) เป็นน้ำทิ้งสีดำจากกรรมวิธีผลิตเยื่อกระดาษด้วยอย่างหนึ่งที่ควรมีการนำกลับมาใช้ประโยชน์และบำบัดอย่างถูกต้อง โดยน้ำดำเกิดจากการผลิตเยื่อกระดาษด้วยกระบวนการเคมี (Chemical Pulping) ของการต้มเยื่อกระดาษ ซึ่งในปัจจุบันได้มีการนำน้ำดำกลับมาใช้ใหม่เพื่อลดการใช้เชื้อเพลิงจากธรรมชาติอันได้แก่น้ำมันเตา เศษเปลือกไม้ ถ่านหิน ฯลฯ โดยนำไปประเหยน้ำออกแล้วเผาให้เป็นแหล่งพลังงานในหม้อไอน้ำใช้ในขั้นตอนต่อไป แต่อย่างไรก็ตามเนื่องจากน้ำดำประกอบไปด้วยสารอินทรีย์จำนวนมาก เช่น สารประกอบคาร์โบไฮเดรต เซลลูโลส และลิกนิน (Niclas and others, 2003) เมื่อนำไปเผาทำให้สารเหล่านี้เสียมูลค่าไป จึงได้มีการวิจัยแยกลิกนินออกมาจากน้ำดำเพื่อเปลี่ยนให้เป็นวัตถุดิบที่มีประโยชน์สำหรับอุตสาหกรรมอื่น เช่น ใช้ผสมกับหินเพื่อลดการฟุ้งกระจายของฝุ่น ใช้ในการสังเคราะห์สารเคมีต่างๆ เช่น วานิลลิน (Vanillin) และสารประกอบฟีนอล (Phenolic compound) ใช้ผสมกับดินหรือทรายเพื่อช่วยเพิ่มความแข็งแรง ใช้เป็นส่วนผสมเพื่อผลิตสีย้อม ยาฆ่าแมลง และยาฆ่าวัชพืช ฯลฯ ซึ่งน้ำทิ้งที่ผ่านการแยกลิกนินออกแล้วยังมีความเข้มข้นของสีอยู่มาก นอกจากจะดูไม่งามตาแล้วหากปล่อยออกสู่ภายนอกอาจลดการส่องผ่านของแสงในแหล่งน้ำ ทำให้ลดปริมาณผลผลิต ยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์แสงตามธรรมชาติและส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศวิทยาของสัตว์น้ำได้ การนำวิธีการทางชีวภาพมาใช้บำบัดสีน้ำทิ้งจากการผลิตลิกนินจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่ใช้แทนการบำบัดด้วยวิธีการทางกาย

ภาพและทางเคมีที่สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายสูงและอาจมีผลตกค้างในสิ่งแวดล้อมได้ ซึ่งวิธีการทางชีวภาพนั้นได้มีการพัฒนานำจุลชีพชนิดต่างๆ มาใช้ ได้แก่ แบคทีเรีย สาหร่าย และรา โดยราไวต์รอต ให้ประสิทธิภาพสูง สามารถย่อยสลายลิกนินอย่างสมบูรณ์ และลดสีในน้ำทิ้งได้อย่างรวดเร็ว (Belsare and Prasad, 1988; Eaton and others, 1980; Kirk and others, 1976) ชนิดของราไวต์รอตที่ได้พัฒนามาประยุกต์ใช้ ได้แก่ *Schizophyllum commune* และ *Phanerochaete chrysosporium* เป็นต้น

งานวิจัยนี้จะทำการศึกษาถึงแนวทางการกำจัดสีของน้ำทิ้งในการผลิตลิกนินโดยวิธีการชีวภาพด้วยราที่แยกได้จากเห็ด และกิ่งไม้ ซึ่งได้ศึกษาถึงการคัดเลือกราที่สามารถย่อยสลายลิกนินตลอดจนประสิทธิภาพของราที่คัดเลือกในการลดความเข้มข้นของสีและลิกนินที่มีอยู่ในน้ำทิ้งของขั้นตอนการผลิตลิกนิน เพื่อการประยุกต์ใช้สู่ภาคอุตสาหกรรมต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อแยกหาราไวต์รอตที่สามารถย่อยสลายลิกนินได้
2. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการลดความเข้มข้นของสีและลิกนิน ของน้ำทิ้งในการผลิตลิกนินโดยราที่แยกได้
3. เพื่อศึกษาความเข้มข้นของลิกนินของน้ำทิ้งในการผลิตลิกนินหลังจากการใช้ราที่แยกได้ช่วยบำบัด
4. เพื่อศึกษาความเข้มข้นของสีของน้ำทิ้งในการผลิตลิกนินหลังจากการใช้ราที่แยกได้ช่วยบำบัด

1.3 ขอบเขตการวิจัย

1. เก็บตัวอย่างเห็ดและกิ่งไม้ผุ คัดแยกราไวต์รอต โดยทดสอบความสามารถในการย่อยสลายลิกนินด้วยอาหาร Poly - R agar clearance และ Tannic agar
2. น้ำทิ้งในการผลิตลิกนินได้มาจากการตกตะกอนน้ำดำโดยปรับความเป็นกรดด่างให้ได้ 3 ด้วยกรดซัลฟิวริก
3. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายลิกนิน
4. ทดสอบประสิทธิภาพของราที่แยกได้ในการลดความเข้มข้นของลิกนินและสีจากน้ำทิ้งในการผลิตลิกนิน

1.4 สมมติฐานการวิจัย

ราบางชนิดสามารถลดความเข้มข้นของลิกนินของน้ำทิ้งในการผลิตลิกนิน และสามารถลดปริมาณความเข้มข้นของสีของน้ำทิ้งในการผลิตลิกนินได้

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ราสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายลิกนิน และลดปริมาณความเข้มข้นของสีของน้ำทิ้งในการผลิตลิกนิน
2. เป็นทางเลือกใหม่ที่นำมาใช้ในการบำบัดน้ำเสียของโรงงานอุตสาหกรรมกระดาษ ทั้งในแง่ของการลดปริมาณสารอินทรีย์ และลดปริมาณสี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 องค์ประกอบทางเคมีของเส้นใย

เส้นใยธรรมชาติ (Natural fibers) เป็นอินทรีย์วัตถุที่สำคัญ หาได้ง่ายจากธรรมชาติเนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม มีปริมาณมาก และมีราคาถูกกว่าเส้นใยสังเคราะห์ โครงสร้างโดยทั่วไปของเส้นใยธรรมชาติประกอบด้วยเซลลูโลส (Cellulose) เฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose) ลิกนิน (Lignin) และสารประกอบอื่นๆ โดยมีองค์ประกอบทางเคมีของเส้นใยดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 แสดงองค์ประกอบทางเคมีของเส้นใย

องค์ประกอบทางเคมีของเส้นใย	ปริมาณ (เปอร์เซ็นต์)	
	ไม้เนื้ออ่อน (softwood)	ไม้เนื้อแข็ง (hardwood)
Cellulose	45	43
Hemicellulose	5-20	15-30
Lignin	24-32	17-25

ที่มา: สาวิตรี ผาตยานนท์, 2542.

2.1.1 เซลลูโลส (Cellulose)

เป็นคาร์โบไฮเดรตชนิดโพลิแซคคาไรด์ (Polysaccharides) เชิงเส้นตรงที่ประกอบด้วยหน่วยซ้ำๆ กัน ประกอบด้วยโมเลกุลของ D-glucose ในรูป β-D-glucopyranose เชื่อมต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะ β-1,4-glucosidic ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 1 กับคาร์บอนตำแหน่งที่ 4 ในโมเลกุลถัดไป มีสูตรโมเลกุลทั่วไปคือ $(C_6H_{12}O_6)_n$ เป็นโครงสร้างในเนื้อเยื่อพืช โดยพบรวมกับลิกนิน เพนโตแซนกัม แทนนิน ไขมัน สารที่ทำให้เกิดสี เป็นต้น เซลลูโลสมีหมู่ไฮดรอกซิลถึง 3 หมู่ โดยสามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนได้ แรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลของเซลลูโลสจึงมีมาก โครงสร้างของเซลลูโลสจัดเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบจึงทำให้มีอุณหภูมิการหลอมตัวสูง และมีความสามารถในการละลายต่ำ เซลลูโลสไม่ละลายน้ำแต่จะละลายในกรดเข้มข้นเช่น กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid) กรดซัลฟิวริก (Sulfuric acid) เป็นต้น โดยเซลลูโลสจะเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสอย่างรวดเร็วในสารละลายกรดที่

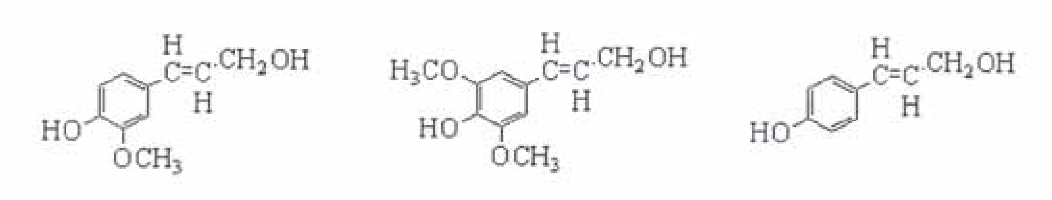
อุณหภูมิห้อง และละลายในสารละลายของเกลือเข้มข้นบางชนิด เช่น สารละลายอัลคาไลน์ไฮดรอกไซด์ (Alkali hydroxide)

2.1.2 เฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose)

เป็นโพลิแซคคาไรด์ชนิดหนึ่งคล้ายเซลลูโลส มีลักษณะเป็นเฮเทอร์โรจีเนียส (heterogenous) โดยประกอบด้วยน้ำตาลหลายชนิดมารวมกัน เฮมิเซลลูโลสมีโครงสร้างส่วนใหญ่เป็นกิ่งก้านสาขาไม่เป็นระเบียบ ซึ่งแตกต่างจากเซลลูโลสที่เป็นเส้นตรงอย่างมีระเบียบ จึงสามารถดูดซึมน้ำได้ดี โดยมีสูตรโมเลกุลทั่วไป คือ $(C_6H_{12}O_5)_{2n}$

2.1.3 ลิกนิน (Lignin)

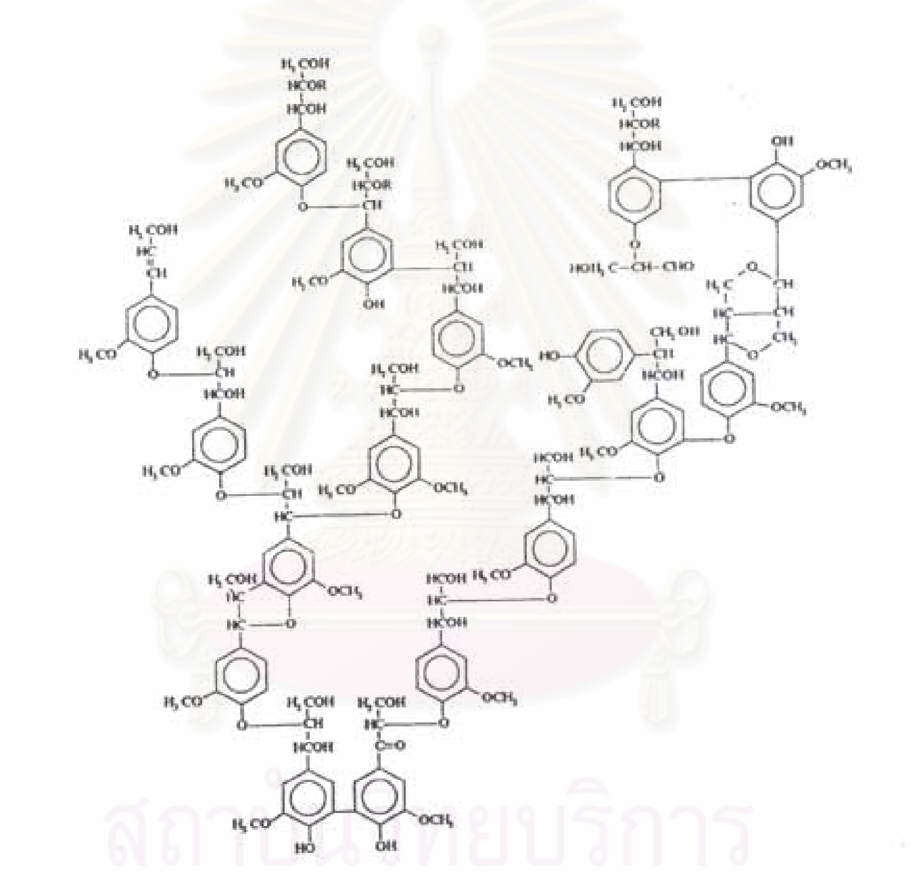
เป็นสารประกอบอะโรมาติกเชิงซ้อนมีน้ำหนักโมเลกุลสูง พบได้ในผนังเซลล์ของพืชรองลงมาจากเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส ซึ่งจะทำหน้าที่เสมือนตัวเชื่อมประสานเส้นใยเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสทำให้เกิดเป็นโครงสร้างที่แข็งแรงของไม้ ลิกนินเป็นสารที่ประกอบด้วย คาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจนรวมกันเป็นหน่วยย่อยหลายชนิดโดยสามารถแบ่งหน่วยย่อยของลิกนินได้ 3 ชนิด ได้แก่ p-coumaryl alcohol, coniferyl alcohol และ sinapyl alcohol ดังแสดงในรูปที่ 2.1 (Winkelemenn, 1992) โดยการจัดเรียงตัวกันของธาตุในโครงสร้างของโมเลกุลนั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด เนื่องจากลิกนินจะไม่อยู่ในลักษณะแบบเดียวแต่จะเกาะกันเป็นสายยาวซึ่งมีอยู่หลายแบบมีส่วนที่สำคัญคือส่วนของโครงสร้างอะโรมาติก (aromatic structure) ที่ประกอบด้วยหมู่เมทอกซี (methoxy group, $-OCH_3$) เป็นส่วนประกอบประมาณร้อยละ 14 หมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group, -OH) และมีหมู่ฟีโนลิค (phenolic group) เป็นส่วนประกอบด้วย (สมศักดิ์, 2528) ซึ่งลักษณะโครงสร้างของลิกนินนั้นแสดงในรูปที่ 2.2 ลิกนินไม่ละลายน้ำ ไม่มีคุณสมบัติทางการยืดหยุ่น เพราะฉะนั้นจึงทำให้พืชที่มีลิกนินมากมีความแข็งแรงทนทาน ซึ่งไม้แต่ละชนิดจะมีอัตราส่วนระหว่างเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินไม่เท่ากัน และนอกจากนี้ยังพบว่าพืชแต่ละชนิดหรือแม้แต่พืชชนิดเดียวกัน แต่มีอายุและการเจริญในสภาพที่ต่างกันก็มีผลทำให้มีลิกนินเป็นองค์ประกอบต่างกันด้วย โดยเมื่อไม้มีอายุมากขึ้นปริมาณลิกนินจะเพิ่มขึ้นด้วย



Coniferyl alcohol Sinapyl alcohol p-coumaryl alcohol

รูปที่ 2.1 ลักษณะหน่วยย่อยของสารลิกนิน

ที่มา: Winkelmenn, 1992.



รูปที่ 2.2 โครงสร้างโมเลกุลของลิกนิน

ที่มา: Kirk and Obst, 1988.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2 ลิกนิน

2.2.1 การแยกประเภทของลิกนิน

หากแยกลิกนินตามชนิดที่พบในพืชที่นำมาใช้เป็นสารตั้งต้นจะแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม (Eugenia, Sanchez and Hernandez, 2000) คือ

1. ลิกนินจากไม้เนื้ออ่อน (Softwood lignin) ได้แก่ ลิกนินจากไม้ที่มีลักษณะใบเขียวตลอดปี ซึ่งได้แก่ ไม้ใบแคบ จำพวกสน ไม้ชนิดนี้เมื่อนำไปทำเยื่อกระดาษจะได้เยื่อใยยาว ซึ่งมีคุณสมบัติทำให้กระดาษมีความเหนียวและแข็งแรง ต้านทานแรงดึงหรือแรงฉีกขาด ซึ่งจะมีความยาวเฉลี่ยของเส้นใยระหว่าง 2-4 มิลลิเมตร เช่น สนสองใบ สนสามใบ เป็นต้น

2. ลิกนินจากไม้เนื้อแข็ง (Hardwood lignin) ได้แก่ ลิกนินจากไม้ที่มีใบกว้าง ผลัดใบทุกปี ส่วนมากเป็นไม้ในเขตเมืองร้อน เช่น ไม้เบญจพรรณต่างๆ ไม้ชนิดนี้นิยมนำมาผลิตเยื่อใยสั้น ซึ่งจะมีความยาวเฉลี่ยของเส้นใยระหว่าง 0.5-1.5 มิลลิเมตร เช่น ยูคาลิปตัส เป็นต้น

3. ลิกนินจากหญ้าหรือพืชล้มลุก (Grass lignin) ได้แก่ ลิกนินจากไม้เส้นใยสั้นที่มีคุณภาพดี เช่น ฝ้าย ปอ ฟางข้าว หญ้าขจรจบ กก ต้นอ้อ ไม้ไผ่ ชานอ้อย เป็นต้น

เยื่อกระดาษที่ผลิตจากไม้ทั้ง 3 ประเภท เรียกว่า Primary Fibre หรือ Virgin Pulp ซึ่งในปัจจุบันมีราคาสูงขึ้นและมีปริมาณค่อนข้างจำกัด ขณะที่ความต้องการใช้เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ดังนั้นจึงมีการนำเยื่อที่เคยใช้งานมาแล้วคือ Secondary Fibre หรือ Recycled Pulp กลับมาใช้อีกเช่นเยื่อจากเศษกระดาษ แม้ว่าเยื่อกระดาษจะผลิตได้จากไม้ทุกชนิด แต่เยื่อที่ได้จากไม้พันธุ์เดียวกันจะมีคุณภาพดีกว่าเยื่อที่ผลิตจากไม้หลายพันธุ์ และเยื่อที่ผลิตจากไม้หลายพันธุ์จะมีคุณภาพดีกว่าเยื่อที่ผลิตจากหญ้าหรือพืชล้มลุก และการผลิตกระดาษซึ่งผลิตจากเยื่อใยสั้นเพียงชนิดเดียวจะทำให้กระดาษมีคุณสมบัติไม่ดีพอ จึงต้องมีการนำเอาเยื่อใยยาวมาผสมในอัตราส่วนที่เหมาะสม เพื่อเพิ่มคุณภาพของกระดาษ เช่น การผลิตกระดาษพิมพ์เขียนมักจะใช้เยื่อกระดาษใยยาวผสมกับเยื่อใยสั้นในอัตราส่วน 3:7 ในขณะที่การผลิตกระดาษคราฟท์จะใช้เยื่อกระดาษใยยาวผสมกับเยื่อใยสั้นและเศษกระดาษในอัตราส่วน 1:3:16 เป็นต้น

ชนิดของลิกนินที่แบ่งตามกรรมวิธีการเตรียมทางเคมีสามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภทคือ

1. ซัลไฟต์ลิกนิน (Sulfite lignin) หรือ ลิกโนซัลโฟเนต (Lignosulfonate) เป็นลิกนินที่ผลิตขึ้นจากน้ำดำที่ได้จากการผลิตเยื่อกระดาษแบบกระบวนการซัลไฟต์ ซึ่งน้ำดำที่ได้จากกระบวนการนี้มีลิกโนซัลโฟเนตอยู่ประมาณ 40–60 เปอร์เซ็นต์ โดยจะละลายในน้ำแต่ไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์

2. อัลคาไลน์ลิกนิน (Alkaline lignin) เป็นลิกนินที่ผลิตขึ้นจากน้ำดำที่ได้จากการผลิตเยื่อกระดาษแบบกระบวนซัลเฟตหรือคราฟท์ หรืออาจเรียกน้ำดำนี้ว่า Soda black liquor หรือ Sulfate

black liquor และ Kraft black liquor โดยทั่วไปอัลคาไลน์ลิกนินจะเป็นผงสีน้ำตาลละลายในเบสและตัวทำละลายอินทรีย์

2.2.2 ประโยชน์ของลิกนิน

ลิกนินสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้หลายทางและนำมาใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ ได้ เช่น ใช้เป็นสารช่วยในการเกาะติด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการซ่อมผิวหน้าของถนนลาดยางมะตอย ใช้ผสมกับหินเพื่อลดปัญหาฝุ่นที่ฟุ้งกระจาย ใช้เป็นสารผสมกับดินทราย ดินสำหรับปั้นอิฐ หรือคอนกรีตในอุตสาหกรรมการหล่อเพื่อช่วยเพิ่มความแข็งแรง ผลิตภัณฑ์เซรามิก เม็ดสี สีย้อมต่างๆ ยาฆ่าแมลง และยาฆ่าวัชพืช ใช้เป็นส่วนผสมของอาหารสัตว์ และกระดาษแข็ง (Ellen, 1991) ใช้เป็นสารเพิ่มความแข็งแรงในยางที่ต้องการให้มีน้ำหนักเบา หรือเป็นสารที่ทำให้เกิดรูพรุนในแผ่นยิปซั่ม (Gypsum) ใช้เป็น Dispersing agent ในอุตสาหกรรมผลิตซีเมนต์ ใช้เป็นส่วนผสมเพื่อผลิต Carbon black ใช้เป็นสารรักษาระดับอุณหภูมิให้คงที่ในอุตสาหกรรม เป็นสารหล่อลื่นในการขุดเจาะน้ำมัน ใช้เป็น Emulsifier สารที่เร่งให้ตะกอนลอยตัว ใช้กำจัดไขมันที่ลอยอยู่บนผิวหน้าของน้ำ ใช้ในการกำจัดเกลือในน้ำที่ทำให้เกิดน้ำกระด้าง ใช้ผลิตแทนนิน (Tannin) เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมฟอกหนัง นอกจากนี้ยังใช้ในการสังเคราะห์สารเคมีต่างๆ เช่น วานิลลิน (Vanillin) และสารประกอบฟีนอล (Phenolic compound) (บุณยรัชต์และรวินทร์, 2535)

2.3 กระบวนการผลิตเยื่อกระดาษ

การผลิตเยื่อกระดาษเป็นการนำไม้มาย่อยสลาย แล้วแยกส่วนที่เป็นเส้นใยออกเพื่อผลิตเป็นกระดาษชนิดต่างๆ โดยทั่วไปวัตถุดิบที่นำมาผลิตมักมีส่วนผสมดังนี้

1. โพลิแซคคาไรด์ (Polysaccharides) ได้แก่ สารประกอบโพลิเมอร์ของคาร์โบไฮเดรต ได้แก่ แป้ง น้ำตาล และเซลลูโลส ซึ่งมีอยู่ประมาณ 60–80 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักของวัตถุดิบ ในระหว่างการย่อยเยื่อแป้งและน้ำตาลจะถูกละลายออกมาได้ สำหรับส่วนที่เป็นเซลลูโลสนั้นอาจถูกละลายออกมาได้บ้างในกระบวนการผลิต

2. ลิกนิน (Lignin) มีอยู่ประมาณ 20–40 เปอร์เซ็นต์ จะละลายออกมาจากเส้นใยในระหว่างกระบวนการย่อยสลาย เช่น ละลายในสารละลายกรดซึ่งเป็นกระบวนการผลิตเยื่อกระดาษแบบซัลไฟต์ หรือละลายในด่างร้อนในกระบวนการผลิตเยื่อกระดาษแบบซัลเฟตหรือกระบวนการคราฟท์

3. สารประกอบอื่นๆ (Extraneous component) ในส่วนนี้มีอยู่ประมาณ 2–10 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ สารประกอบที่ละลายในน้ำได้เป็นส่วนใหญ่ ได้แก่ เกลืออนินทรีย์ และสารอินทรีย์ เป็นต้น

ในการทำเยื่อกระดาษมีหลายวิธีขึ้นอยู่กับชนิดของวัตถุดิบที่ใช้ กระบวนการทั่วไปแยกออกเป็น 3 วิธีด้วยกันคือ

กระบวนการผลิตเยื่อกระดาษเชิงกล (Mechanical Pulping)

กระบวนการผลิตเยื่อกระดาษแบบกึ่งเคมี (Semi-Chemical Pulping)

และกระบวนการผลิตเยื่อกระดาษแบบเคมี (Chemical Pulping)

ซึ่งการจะเลือกกระบวนการแบบใดขึ้นกับชนิดของวัตถุดิบที่ใช้ทำ และคุณลักษณะของเยื่อกระดาษที่ต้องการ นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับราคาของวัตถุดิบด้วย การทำเยื่อกระดาษของแต่ละกระบวนการมีดังนี้

2.3.1 กระบวนการผลิตเยื่อกระดาษเชิงกล (Mechanical Pulping)

เยื่อกระดาษแบบนี้มีชื่อเรียกว่า กราวนด์วูด (groundwood) ได้จากการบดเนื้อไม้ด้วยเครื่องบดเฉพาะ โดยอาศัยน้ำฉีดอยู่ขณะที่บดตลอดเวลา เพื่อกระจายเส้นใยในเนื้อไม้ออกจากกัน เยื่อกระดาษที่ได้จากกระบวนการนี้จะมีลักษณะเป็นไม้แท้อยู่มากแต่มีคุณสมบัติไม่ดีเพราะไม่ใช่เยื่อเซลลูโลสบริสุทธิ์ การบดแบบนี้จะทำให้ได้เยื่อกระดาษมากที่สุดคือร้อยละ 85 ขึ้นไป (ปิยะนันท์, 2539) เยื่อกระดาษบดนี้ทำได้ถูกกว่าเยื่อกระดาษชนิดอื่นๆ โดยเฉพาะสำหรับในประเทศที่สามารถผลิตกระแสไฟฟ้าได้ในราคาถูก โดยทั่วไปเยื่อกระดาษบดนี้มักใช้ผสมกับเยื่อกระดาษเคมีที่มีความเหนียวดี เยื่อกระดาษนี้มีความทึบแสงสูงใช้ได้ดีสำหรับกรณีที่ไม่ต้องการความเหนียว ความขาวสะอาดมากนัก ส่วนใหญ่ใช้สำหรับผลิตกระดาษหนังสือพิมพ์ กระดาษอนามัยบางชนิด กระดาษกั้นสำหรับบรรจุสิ่งของกันแตกภายในกล่อง กระดาษฝาผนัง กระดาษเช็ดมือ และกระดาษห่อของอย่างเลว

2.3.2 กระบวนการผลิตเยื่อกระดาษแบบกึ่งเคมี (Semi-Chemical Pulping)

เยื่อกระดาษแบบกึ่งเคมีทำได้โดยใช้กระบวนการเคมีและการบดเหมือนการทำเยื่อกระดาษบด แต่ใช้ปริมาณสารเคมีมากกว่าและใช้พลังงานในการบดเยื่อกระดาษน้อยกว่า เยื่อกระดาษที่ได้จากกระบวนการนี้จะมีลิกนินปนอยู่แต่ไม่มากเท่าวิธีบด เคมีภัณฑ์ที่ใช้ไม่ทำให้เกิดการสูญเสียเยื่อกระดาษมากนัก ในปัจจุบันกระบวนการแบบนี้ใช้กันอย่างแพร่หลายเนื่องจากสามารถใช้ได้กับไม้หลายชนิดโดยเฉพาะไม้เนื้อแข็ง ราคาใช้จ่ายไม่แพง ได้เยื่อกระดาษมากและสามารถใช้เยื่อกระดาษนี้สำหรับผลิตกระดาษได้หลายชนิด ตั้งแต่กระดาษหนังสือพิมพ์จนกระทั่งถึงกระดาษปอนด์อย่างดี

การผลิตเยื่อกระดาษแบบนี้มีหลายวิธีด้วยกัน แล้วแต่การใช้เคมีภัณฑ์ ซึ่งได้แก่

กระบวนการกราวนด์วูดเคมี (chemi-groundwood process) ใช้สำหรับไม้ใบกว้าง โดยต้มท่อนไม้ด้วยน้ำยาซัลไฟท์ภายใต้ความดัน แล้วจึงบดไม้ด้วยเครื่องบดเยื่อ

กระบวนการโซดาไฟ (cold caustic soda) ต้มไม้ที่ตัดเป็นท่อนเล็กๆ ด้วยน้ำยาโซดาไฟแล้วแยกเยื่อกระดาษออกโดยใช้เครื่องย่อย วิธีนี้ถูกกว่าการบดเยื่อกระดาษโดยตรงเพราะเยื่อกระดาษที่ต้มแล้วบดง่ายกว่า

กระบวนการโซเดียมซัลไฟท์ (neutral sulphite semichemical process) วิธีนี้ใช้น้ำยาโซเดียมซัลไฟท์และก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์เป็นน้ำยาต้ม

กระบวนการซัลเฟต (sulphate semichemical process หรือ kraft semichemical process) น้ำยาต้มเยื่อกระดาษสำหรับวิธีนี้ใช้น้ำยาผสมของโซเดียมซัลไฟท์และโซดาไฟ กระบวนการนี้อาจนำไปใช้ดัดแปลงสำหรับโรงงานที่ทำเยื่อกระดาษเหนียวได้

2.3.3 กระบวนการผลิตเยื่อกระดาษแบบเคมี (Chemical Pulping)

การทำเยื่อกระดาษโดยกระบวนการทางเคมีทำโดยการต้มย่อยไม้หรือเส้นใยต่างๆ ด้วยเคมีภัณฑ์ภายใต้ความดันจนกระทั่งแยกเยื่อออกจากสิ่งอื่นได้ง่ายเมื่อนำไปล้าง ซึ่งจะให้เยื่อกระดาษที่มีปริมาณลิกนินเจือปนอยู่น้อยมากจึงเหมาะสำหรับทำกระดาษคุณภาพดีและมีความเหนียว แต่ปริมาณเยื่อที่ได้จากการทำเยื่อกระดาษแบบเคมีจะมีปริมาณน้อย คือ ประมาณ 45–60 เปอร์เซ็นต์ (ปิยะนันท์, 2539)

การผลิตเยื่อกระดาษแบบนี้แบ่งออกเป็น 3 ลักษณะ ตามการใช้เคมีภัณฑ์ ดังนี้

1) กระบวนการโซดา (Soda Process) ซึ่งใช้โซดาไฟหรือโซดาแผดเผา (Sodium Hydroxide) เป็นสารเคมีในการต้มเยื่อกระดาษภายใต้ความดัน แล้วจึงล้างและฟอกเยื่อกระดาษต่อไป เยื่อกระดาษแบบนี้ส่วนมากใช้สำหรับทำกระดาษพิมพ์เขียน กระดาษจดหมาย และกระดาษที่ต้องการความนุ่ม

2) กระบวนการซัลเฟต (Sulphate Process) หรือ กระบวนการคราฟท์ (kraft process) เป็นกระบวนการที่ใช้ได้กับพันธุ์ไม้ทุกชนิด สารเคมีที่ใช้ในการต้มไม้หรือวัตถุดิบอื่นๆ คือ โซดาไฟและโซเดียมซัลไฟด์อย่างละเท่าๆ กัน เยื่อกระดาษที่ได้จะมีความเหนียวมาก เยื่อกระดาษซัลเฟตชนิดไม่ฟอกสีใช้ทำถุงกระดาษ กระดาษห่อของและกระดาษผิวกล่อง ส่วนเยื่อกระดาษซัลเฟตชนิดฟอกขาวใช้ทำกระดาษพิมพ์เขียน กระดาษหนังสือคุณภาพดี และกระดาษอนามัย

3) กระบวนการซัลไฟต์ (Sulphite Process) กระบวนการนี้เหมาะสำหรับทำเยื่อกระดาษจากพันธุ์ไม้เนื้อแข็งและไม้จำพวกหญ้า สารเคมีที่ใช้คือ สารละลายไบซัลไฟต์ของแคลเซียม แมกนีเซียม หรือแอมโมเนียม ใช้ได้กว้างขวางสำหรับการทำเยื่อกระดาษที่เหนียวมากจนกระทั่งเยื่อกระดาษที่นุ่ม กระบวนการนี้ไม่เหมาะสำหรับไม้ที่มีเรซินหรือยางมาก

เมื่อได้เยื่อกระดาษแล้ว ขั้นต่อไปมีลำดับดังนี้

1. การล้างเยื่อกระดาษให้สะอาด (Washing) และร่อนเอาเยื่อกระดาษหยาบออก (screening) เยื่อกระดาษที่ได้จากกรรมวิธีต่างๆ ที่กล่าวมา ต้องนำเข้าเครื่องล้างเยื่อกระดาษเพื่อล้างน้ำยาเคมีออกให้หมด จะได้เยื่อกระดาษทั้งหยาบและละเอียดและมีสิ่งสกปรกปนอยู่ ฉะนั้นต้องนำเข้าเครื่องร่อนเพื่อร่อนเอาเยื่อกระดาษหยาบไปผ่านกรรมวิธีทำเยื่อกระดาษอีกครั้งหนึ่ง ส่วนเยื่อกระดาษละเอียดที่มีสิ่งสกปรกปนอยู่ จะนำเข้าสู่เครื่องทำความสะอาดเพื่อแยกเอาเยื่อกระดาษละเอียดไว้ และกำจัดสิ่งสกปรกออกให้หมด เพราะจะทำให้กระดาษมีตำหนิและคุณภาพไม่ดี

2. ฟอกสีเยื่อกระดาษ (Bleaching) เยื่อกระดาษที่สะอาดและละเอียดจะนำไปฟอกให้ขาวด้วยน้ำยาคลอรีน เพื่อให้ได้กระดาษที่มีความมันวาวสูง ดังนั้นในการฟอกสีต้องควบคุมความเป็นกรดด่าง ความเข้มข้นของเยื่อกระดาษ ปริมาณสารเคมีที่ใช้ในการฟอก และเวลา

3. ผสมกับเยื่อกระดาษชนิดอื่นๆ (Mixing) ในกรณีที่ผลิตกระดาษจากชานอ้อย เนื่องจากเยื่อของชานอ้อยเป็นเยื่อเส้นใยสั้นและใยปานกลางจึงมีความแข็งแรงทนทานต่ำ ต้องผสมกับเยื่อที่มีเส้นใยยาว

4. ตีหรือบดเยื่อกระดาษ (Beating) ในเครื่องตีเยื่อมีแผ่นเหล็กใบมีดเพื่อตีเยื่อให้ผสมกัน และเส้นใยพองตัวมีลักษณะอ่อนตัวลงไม่กระด้าง เมื่อนำไปผลิตกระดาษจะได้กระดาษที่มีความเหนียวและทนทาน นอกจากนี้ยังช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวของเยื่อกระดาษ จึงเป็นประโยชน์ในการย้อมสี ทำให้สีเกาะได้มากขึ้น

5. เติมสารอื่นๆ (Paper additive) การเติมสารอื่นเพื่อปรับปรุงคุณภาพของเยื่อกระดาษให้เหมาะสมในการนำเยื่อไปผลิตเป็นกระดาษ สารที่เติมลงไปได้แก่ ชันสน เพื่อทำให้กระดาษที่ผลิตออกมาไม่ดูดน้ำมากเกินไป สารส้ม เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการซึมและทำให้เยื่อกระดาษขาวขึ้น และแป้งมันสำปะหลัง เพื่อช่วยยึดเส้นใยให้ประสานกัน ทำให้กระดาษทนต่อการลบไม่ยุ่ยง่าย และช่วยทำให้เส้นใยสั้นๆ มาผสมผสานกันมากขึ้น

6. เข้าเครื่องเดินแผ่น (Paper maching) เมื่อเยื่อกระดาษผ่านกระบวนการต่างๆ จนสามารถนำไปทำเป็นแผ่นกระดาษได้จึงส่งไปส่วนเดินแผ่น ซึ่งมีส่วนประกอบสำคัญคือ ส่วนตะแกรง (wire section) ส่วนที่ทำหน้าที่บีบอัด (press section) และส่วนที่ทำให้แห้ง (dryer section)

2.4 ลักษณะและองค์ประกอบทางเคมีของน้ำดำ

น้ำดำ เป็นน้ำทิ้งสีดำที่เกิดจากการต้มเยื่อกระดาษด้วยกระบวนการทางเคมี ซึ่งโดยทั่วไปแล้วจะมีสารอินทรีย์จำพวกลิกนินอยู่ประมาณ 12–20 เปอร์เซ็นต์ และสารอินทรีย์อื่นๆ 3.55 เปอร์เซ็นต์ และมีสารอนินทรีย์จำพวกโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2.44 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคาร์บอเนต 2.76 เปอร์เซ็นต์ และสารอนินทรีย์อื่นๆ 2.77 เปอร์เซ็นต์ (บุนยรัชต์และรวินทร์, 2535) หากวิเคราะห์ถึงน้ำหนักแห้งของน้ำดำส่วนใหญ่จะประกอบไปด้วยธาตุคาร์บอน ออกซิเจน โซเดียม และซัลเฟอร์ ดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 แสดงส่วนประกอบของธาตุในน้ำดำ (น้ำหนักแห้ง)

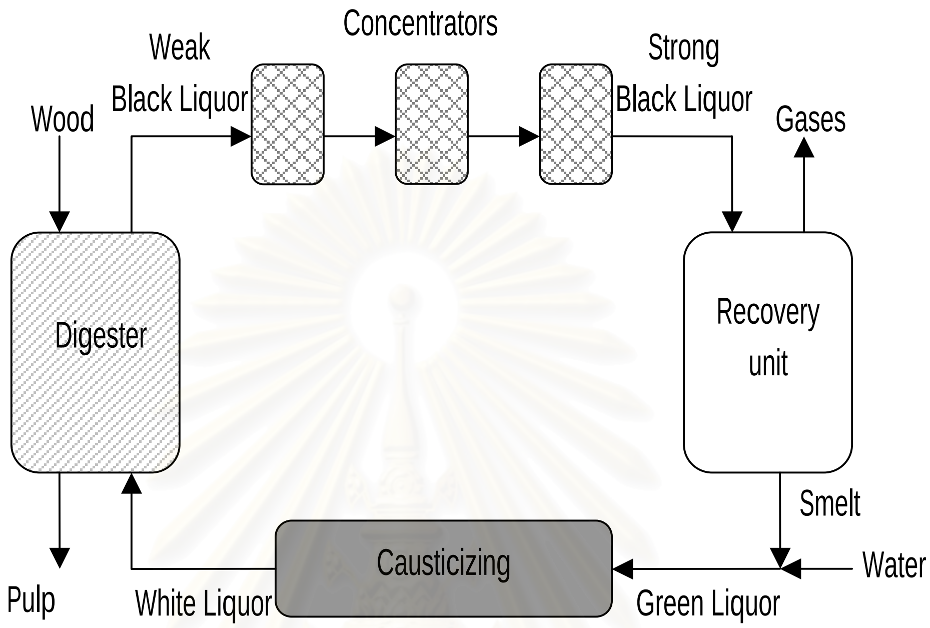
Element	w/w (เปอร์เซ็นต์)
C	36.40
Na	18.60
S	4.80
H	3.50
K	2.02
Cl	0.24
N	0.14
O	34.30
Total	100.00

ที่มา: Markland Magnus, 2001.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.5 การใช้ประโยชน์จากน้ำดำ

2.5.1 การนำกลับมาใช้ในกระบวนการ (Black Liquor Recovery)



รูปที่ 2.3 การนำน้ำดำกลับมาใช้ในกระบวนการ
ที่มา: Markland Magnus, 2001.

น้ำดำนับเป็นเชื้อเพลิงที่สำคัญอย่างหนึ่งที่ได้จากกระบวนการผลิตเยื่อกระดาษ ซึ่งในปัจจุบันได้มีการนำน้ำดำที่ยังมีสารต่างๆ ประกอบอยู่ด้วยกลับมาใช้ หลังจากแยกเส้นใยเซลลูโลสออกเมื่อผ่านการต้มเยื่อกระดาษ โดยกระบวนการเริ่มจากเศษไม้ถูกลำเลียงเข้าไปเพื่อทำการย่อย (digester) โดยป้อนน้ำยา (white liquor) เพื่อทำปฏิกิริยากับลิกนินและสารอินทรีย์อื่นๆ เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการย่อยจะแยกเยื่อกระดาษนำไปผ่านกระบวนการผลิตเยื่อกระดาษ และได้น้ำดำที่มีของแข็งประมาณ 15 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำน้ำดำนี้เข้าไปในหน่วยทำให้เข้มข้น (concentrators) ด้วยการระเหยจนได้น้ำดำเข้มข้นมาเผาในหม้อน้ำนำสารกลับคืน (recovery boiler) สารอินทรีย์ในน้ำดำเข้มข้นจะติดไฟและให้พลังงานความร้อนออกมา ซึ่งจะถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของไอน้ำและนำไปใช้ในหน่วยทำให้เข้มข้นต่อไป แต่ผลจากการเผาเพื่อให้ได้พลังงานนี้จะปล่อยก๊าซชนิดต่างๆ ออกมาด้วย โดยมีก๊าซที่สำคัญคือคาร์บอนมอนอกไซด์ มีเทน คาร์บอนไดออกไซด์ (Grace, 1992) ส่วนที่เหลือจากการเผาคือสารอินทรีย์จะละลายเป็นของเหลวไหลสู่ด้านล่างของหม้อน้ำนำสารกลับคืน ผสมกับน้ำกลายเป็นของเหลวสีเขียว (green liquor) ส่งต่อไปยังหน่วยทำด่าง (Causticizing) เพื่อทำปฏิกิริยากับปูนขาวกลายเป็นน้ำยากลับสู่การต้มเยื่อกระดาษต่อไป กระบวนการนำน้ำดำกลับมาใช้แสดงดังรูปที่ 2.3

2.5.2 แยกลิกนินออกจากน้ำดำโดยการตกตะกอน

เนื่องจากลิกนินที่มีอยู่ในน้ำดำสามารถแยกออกและนำไปใช้ประโยชน์ได้หลายทาง ซึ่งให้คุณค่าทางเศรษฐกิจมากกว่าการนำน้ำดำไปเผาเพื่อเป็นเชื้อเพลิง หากไม่มีการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและทางเคมี ที่ถือว่าเป็นการเปลี่ยนแปลงทางโพลิเมอร์หรือเป็นการไฮโดรไลส์พันธะของลิกนินกับสารตัวอื่น ในปัจจุบันพบว่ามีหลายวิธีการที่สามารถแยกลิกนินออกมาจากน้ำดำ โดยที่มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างน้อยที่สุด โดยทั่วไปจะใช้วิธีการละลายลิกนินแล้วกรองแยกสารตัวอื่นออกหรืออาจใช้วิธีการละลายสารตัวอื่นทิ้งไปก็ได้ แต่หลักใหญ่ๆ คือใช้คุณสมบัติและปฏิกิริยาของลิกนินที่ต่างจากสารตัวอื่นในการแยก งานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับการตกตะกอนลิกนินมีหลายวิธี อย่างเช่นการตกตะกอนลิกนินด้วย สารละลายแอลกอฮอล์–เกลือแคลเซียม และจากคุณสมบัติของลิกนินที่ละลายได้ไม่ดีในกรด จึงมีการปรับสภาวะของน้ำดำให้อยู่ในช่วงความเป็นกรดโดยใช้กรดต่างๆ เช่น กรดซัลฟิวริก กรดไฮโดรคลอริก กรดคาร์บอนิก ซึ่งในแต่ละวิธีมีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกัน หากตกตะกอนลิกนินด้วยเกลือแคลเซียมถึงแม้ว่าจะมีราคาถูกแต่ตะกอนลิกนินที่ได้จะอยู่ในรูปคอลลอยด์ทำให้ยากต่อการกรองออกเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ เช่นเดียวกับกรดคาร์บอนิกที่นอกจากตะกอนจะเกิดในรูปของคอลลอยด์แล้ว ยังสามารถปรับค่าความเป็นกรดด่างได้แค่ 8-9 ส่วนการตกตะกอนด้วยกรดไฮโดรคลอริกจะทำให้เกิดไอออนลบที่ไม่ต้องการในกระบวนการ และการใช้กรดซัลฟิวริกเป็นสารเคมีที่หาได้ง่ายและมีราคาถูก นอกจากนี้ยังสามารถแยกตะกอนลิกนินโดยการกรองได้ดี โดยแบ่งการตกตะกอนออกเป็น 2 ขั้นตอนคือ ขั้นตอนแรกตกตะกอนน้ำดำที่ความเป็นกรดด่าง 6 เพื่อแยกสารที่เกิดจากการสลายตัวของโพลีแซคคาไรด์และของแข็งอื่นๆ ออกก่อนเป็นการทำให้ไม่เกิดการปนเปื้อนกับตะกอนของลิกนินที่จะแยกออกในขั้นตอนต่อไป หลังจากนั้นตกตะกอนลิกนินที่ความเป็นกรดด่าง 3 ตะกอนจะจมตัวลงด้านล่าง ซึ่งสามารถกรองตะกอนลิกนินที่ได้ด้วยกระดาษกรอง โดยลิกนินที่ได้นี้นำไปใช้ประโยชน์ได้หลายทางและนำมาใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ

2.6 ราไวต์รอต (white rot fungi)

ราไวต์รอต (white rot fungi) เป็นราที่จัดอยู่ใน Basidiomycota และ Ascomicotina มีความสามารถในการย่อยสลายลิกนิน และเซลลูโลส (Akhtar, Kirk and Blanchette, 1999) และมวลสารที่มีโมเลกุลสูงได้ ด้วยเหตุนี้จึงมีการนำราไวต์รอตมาใช้ในการเปลี่ยนสภาพสารประกอบบางชนิดที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับลิกนิน เพื่อไม่ให้เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม เช่น สารปรุงแต่งเชื้อเพลิง (Fuel additives) พวกเบนซีน (Benzene) โทลูอีน (Toluene) ไซลีน (Xylene) ยาฆ่าแมลงกลุ่มออร์แกโนคลอรีน (Organochlorine pesticides) พวกดีดีที (DDT) อัลดริน (Aldrin) ลินเดน (Lindane) ยาฆ่าแมลงกลุ่มออร์แกโนฟอสเฟต (Organophosphate pesticides) PAH (Polycyclic aromatic

hydrocarbon) สีย้อมสังเคราะห์ (Synthetic dyes) และโพลิเมอร์สังเคราะห์ (Synthetic polymers) (Pointing, 2001) เป็นต้น นอกจากนี้ยังนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมการฟอกเยื่อกระดาษ (biobleaching) และที่สำคัญคือนำมาใช้กับน้ำทิ้งจากขั้นตอนการผลิตและฟอกเยื่อกระดาษเพื่อกำจัดลิกนินซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักที่ทำให้เกิดสี (Feijoo, 1995, Royer and others, 1991)

ราไวต์รอตสามารถย่อยสลายลิกนินได้เนื่องจากผลิต extracellular enzymes ที่เข้าไปทำลายวงแหวนโพลิเมอร์ที่ซับซ้อนของลิกนิน อันได้แก่ lignin peroxidase (LiP) manganese peroxidase (MnP) และ laccase ซึ่งจะมี mediator และเกิดผลที่แตกต่างกันดังตารางที่ 2.3

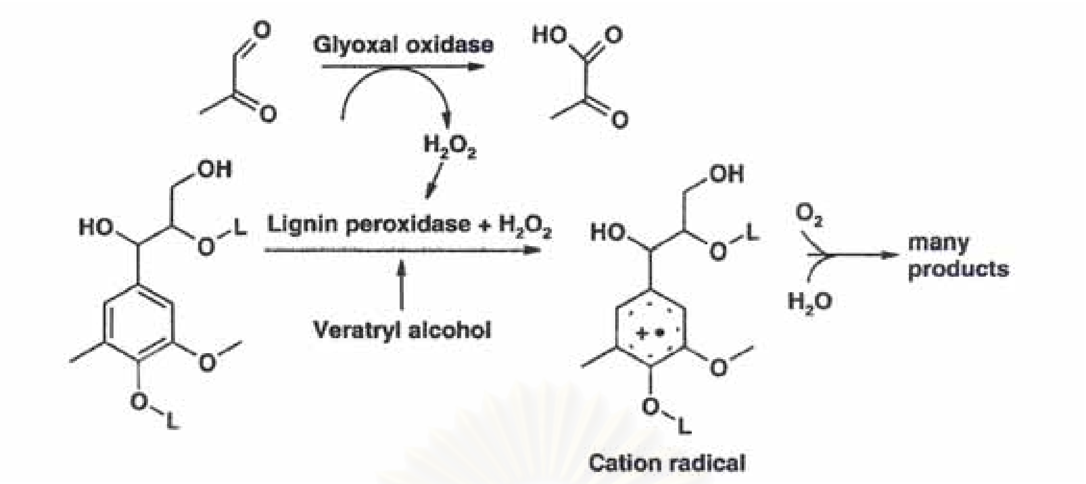
ตารางที่ 2.3 แสดงเอนไซม์ที่ย่อยสลายลิกนินและปฏิกิริยาหลัก

ชนิดเอนไซม์	ควบคุม	ปฏิกิริยาการย่อยสลาย
Lignin peroxidases (LiP)	H_2O_2, veratryl alcohol	aromatic ring oxidized to cation radical
Manganese peroxidase (MnP)	H_2O_2, Mn, organic acid as chelator	Mn (II) oxidized to Mn (III); chelated Mn (III) oxidizes phenolic compounds to phenoxyl radicals
laccase	O_2, hydroxybenzotriazole or ABTS	phenols are oxidizes to phenoxyl radicals

ที่มา: ดัดแปลงจาก Annele Hatakka, 2001.

2.6.1 ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (Lignin peroxidase: LiP)

LiP สามารถออกซิไดซ์ พันธะ $C_\alpha - C_\beta$ ทำให้วงแหวนของลิกนินเปิดออก และเมื่อมี H_2O_2 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา LiP สามารถออกซิไดซ์ nonphenolic aromatic ของลิกนินโดยมี veratryl alcohol เป็น mediator เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการอิเล็กตรอนหนึ่งตัวจะถูกปล่อยออก จึงมีผลให้ non – phenolic aromatic กลายเป็น aryl cation radical (Pointing, 2001) ดังรูปที่ 2.4 ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับ O_2 หรือ H_2O เกิดผลิตภัณฑ์มากมาย เช่น vanillin vanillic acid syringaldehyde isovanillic acid veratric acid เป็นต้น ตัวอย่างราไวต์รอตที่ผลิต LiP เช่น *Phanerochaete chrysosporium* (Srinivasan and others, 1995) เป็นต้น



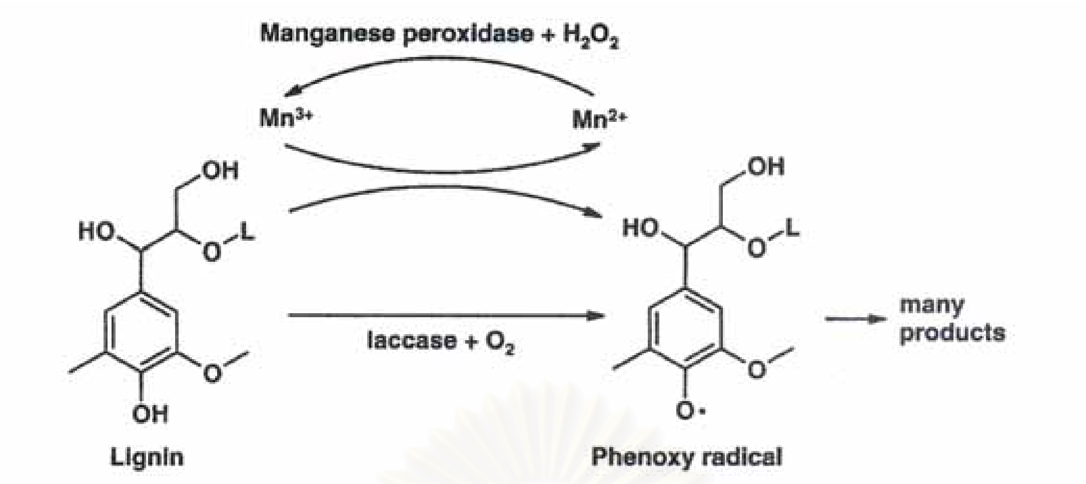
รูปที่ 2.4 แสดงปฏิกิริยาของ lignin peroxidase
ที่มา: Annele Hatakka, 2001.

2.6.2 แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (Manganese peroxidase: MnP)

MnP ไม่สามารถออกซิไดส์สารประกอบที่ไม่เป็น phenolic lignin เพราะต้องการสารที่มีกลุ่ม phenolic อิสระใน aromatic ring เป็นสับสเตรท MnP ในสภาวะที่มี H_2O_2 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะ ออกซิไดซ์ Mn (II) เป็น Mn (III) และจะไปออกซิไดซ์ ส่วนที่เป็น phenolic aromatic compound ของ lignin ให้กลายเป็น phenoxyl radical ซึ่งเป็นตัวที่ทำให้เกิดการสลายตัวเป็นสารประกอบอื่นต่อไปดังรูปที่ 2.5 ตัวอย่างราไวต์รอตที่ผลิต MnP เช่น *Trametes versicolor* (Reid, 1998) เป็นต้น

2.6.3 แลคเคส (Laccase)

laccase มีโมเลกุลของทองแดงเป็นองค์ประกอบ โดยจะรวมตัวกับ O_2 แล้วไป ออกซิไดซ์ phenolic aromatic compound ให้กลายเป็น phenoxyl radical ซึ่ง enzyme นี้จะไม่ขึ้นกับ H_2O_2 เช่นเดียวกับ LiP และ MnP และจะสามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิไดซ์ สารตั้งต้นที่เป็น nonphenolic lignin ได้ เมื่อมีสับสเตรทที่เป็นโมเลกุลอื่น หรือสภาวะที่มี 2, 2′- azinobis – (3 – ethylbensoline – 6 sulphonic acid) หรือ ABTS ซึ่ง ABTS นี้จัดเป็นสารประกอบพวกที่ไม่ใช่ฟีนอล (non – phenolic compound) (Bourbonnais and Paice, 1990) ตัวอย่างราไวต์รอตที่ผลิต laccase เช่น *Fomes annosus* และ *Phlebia radiate* (Gianfreda, Xu and Bollag, 1999) เป็นต้น ปฏิกิริยาของ MnP และ laccase แสดงในรูปที่ 5



รูปที่ 2.5 แสดงปฏิกิริยาของ manganese peroxidase (MnP) และ laccase
ที่มา: Annele Hatakka, 2001.

2.7 กรดแทนนิก (Tannic acid) และ Poly R-478

การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารลิกนินนั้นถูกริเริ่มโดย Bavendamm ตั้งแต่ช่วงปีค.ศ. 1928 ที่ค้นพบว่าราจะสร้างโซนสีน้ำตาลในวุ้นอาหารที่เติม กรดแกลลิก (gallic acid) หรือ กรดแทนนิก (tannic acid) 0.5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ซึ่งเป็นผลมาจากการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของ phenolic acid โดย extra หรือ intra-cellular phenoloxidase เรียกว่า Bavendamm reaction ซึ่งเป็นวิธีที่ดีในการจำแนกราในกลุ่ม Basidiomycetes (Freitag and Morrell, 1992) ต่อมา Davidson, Campbell and Blaisdell (1938) ได้สนับสนุนหลักการนี้เมื่อทดสอบไวต์รอตราทั้งหมด 210 สายพันธุ์ พบว่าเกิดผลบวกกับ tannic acid agar ถึง 96 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นในช่วงปี ค.ศ. 1960 ได้พัฒนาการใช้สารคาร์บอนที่ทำการติดฉลากด้วยไอโซโทป ^{14}C label lignin (Crawford, Crawford and Pometto, 1977) เพื่อทำการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ในการย่อยสลายลิกนินมาย่อยสลาย ^{14}C label lignin ไปเป็น $^{14}CO_2$ ซึ่งการวิเคราะห์โดยใช้สารคาร์บอนที่ทำการติดฉลากด้วยสารรังสีนี้ถึงแม้ว่าจะสามารถตรวจติดตามผลได้ค่อนข้างรวดเร็ว แต่ขั้นตอนการเตรียมคาร์บอนที่ทำการติดฉลากด้วยสารรังสีนั้นมีขั้นตอนการเตรียมที่ยุ่งยากซับซ้อนและมีราคาแพง ดังนั้นจึงได้มีการคิดค้นพัฒนาวิธีการคัดเลือกจุลินทรีย์ ที่สามารถผลิตเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายลิกนินได้โดยใช้สีย้อมสังเคราะห์ประเภทโพลีเมอริกเป็นสับสเตรท (Glenn and Gold, 1983) ซึ่งโครงสร้างจะประกอบไปด้วยวงแหวนอะโรมาติกหลายๆ วงต่อกันและทำการเตรียมได้ง่ายกว่าการใช้คาร์บอนที่ติดฉลากด้วยสารรังสี โดยที่สีย้อมสังเคราะห์ประเภทโพลีเมอริกมีราคาไม่แพง สามารถเตรียมให้อยู่ในรูปที่มีความบริสุทธิ์และมีความคงตัวสูง ละลายน้ำได้ดี มีความเป็นพิษต่ำ และสามารถตรวจวัดติดตามผลได้ง่าย และรวดเร็วโดย

การวัดการดูดกลืนแสง (Gold, Glenn and Alic, 1988) และตรวจวัดโซนของสีที่เปลี่ยนไปบนอาหารที่ผสมด้วยสีย้อมโพลีเมอริก สีย้อมประเภทโพลีเมอริกแบ่งเป็น 3 ชนิด ได้แก่ Poly B Poly R และ Poly Y ซึ่งเป็นสีย้อมที่มีโครงสร้างทางเคมีคล้ายกัน คือ จะประกอบด้วยวงแหวนอะโรมาติก แต่การเรียงตัวเลขและแขนงที่มาต่อกับวงแหวนอะโรมาติกแตกต่างกัน สีย้อมชนิด Poly B เมื่อถูกย่อยสลายจะเปลี่ยนแปลงจากสีน้ำเงินเป็นสีเหลืองทอง สีย้อมชนิด Poly R เมื่อถูกย่อยสลายจะเปลี่ยนแปลงจากสีชมพูม่วงเป็นสีเหลือง และสีย้อมชนิด Poly Y เมื่อถูกย่อยสลายจะเปลี่ยนแปลงจากสีเหลืองเป็นสีเขียวอมเหลือง (Glenn and Gold, 1983)

2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Freitag and Morrell (1992) ศึกษาการย่อยสีย้อม Poly R-478 ของราไวต์รอต (white rot fungi) ราบราวน์รอต (brown rot fungi) และราซอฟต์รอต (soft rot fungi) จำนวนทั้งสิ้น 170 สายพันธุ์ เพื่อทดสอบความสามารถในการย่อยสลายลิกนิน ด้วย malt extract agar ที่ประกอบด้วย Poly R-478 0.02 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ที่อุณหภูมิ 20 30 และ 40 องศาเซลเซียส บ่มในที่มืด พบว่ามีเฉพาะราไวต์รอตที่เปลี่ยนสีอาหารจากสีชมพูม่วงเป็นสีเหลือง โดยวัดอัตราส่วนของโซนที่มีการย่อยสลายสีและรัศมีของอัตราการเจริญของเส้นใยเป็นเวลา 14 วัน จะได้ค่าอัตราส่วนไม่เกิน 1

Hossain and others (2000) ได้คัดเลือกราจำนวน 100 สายพันธุ์ เพื่อทดสอบความสามารถในการย่อยสลายลิกนิน โดยใช้สีย้อมโพลีเมอริก Poly R-478 พบว่ามีรา 3 ชนิด ที่ให้ผลเป็นบวกคือเปลี่ยนจากสีชมพูม่วงเป็นสีเหลือง และเมื่อเลี้ยงราเหล่านี้ในอาหารเหลวที่ผสม Poly R-478 ที่ความเป็นกรดด่าง 5.5 ระดับการย่อยสลายของ *Phanerochaete chrysosporium* จะสูงที่สุด และที่ความเป็นกรดด่าง 4.5 จะเหมาะสมกับการย่อยสลายของ *Fomes lignosus*

Pasti and others (1994) ได้ทำการศึกษาในเรื่องการใช้สีย้อมเพื่อทดสอบเอนไซม์ MnP และ LiP ของ *Phanerochaete chrysosporium* โดยมีสีย้อมทั้งหมด 11 ชนิด บ่มราเป็นเวลา 3 นาที และ 24 ชั่วโมง แล้วตรวจสอบด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ พบว่าการทดสอบสีย้อม Poly R-478 ที่ 3 นาที ไม่มีการสร้างเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด แต่ที่ 24 ชั่วโมง มีเฉพาะ LiP ที่สามารถย่อยสลายสีลงได้ 9 เปอร์เซ็นต์

Cookson (1995) ได้ใช้สีย้อม Poly B-411 และ tannic acid ในการทดสอบการย่อยสลายลิกนินของราไวต์รอตใน Basidiomycota และราบราวน์รอตใน Basidiomycota โดยอาหารที่ผสม Poly B-411 เตรียมโดยใช้มอลต์สกัด 15 กรัม วุ้นผง 10 กรัม และ Poly B-411 0.2 กรัม ใช้เวลาบ่ม 4-5 วัน หากให้ผลบวกจะเปลี่ยนจากสีฟ้าไปเป็นสีชมพูหรือสีเหลืองอ่อน ส่วนอาหารที่ผสม tannic acid เตรียมโดยใช้มอลต์สกัด 15 กรัม วุ้นผง 10 กรัม และ tannic acid 1 กรัม บ่มนาน 3 วัน พบว่ามีราบราวน์รอตเพียง 1 สายพันธุ์ใน 110 สายพันธุ์ ที่ให้ผลบวกกับ Poly B-411 และให้ผลลบกับ tannic acid ทุกชนิด ส่วนราไวต์รอต มี 392 สายพันธุ์ใน 469 สายพันธุ์ที่ให้ผลบวกกับ Poly B-411 และ 155 สายพันธุ์ใน 199 สายพันธุ์ ที่ให้ผลบวกกับ tannic acid

Eaton, Chang and Kirk (1980) ได้นำราไวต์รอต *Phanerochaete chrysosporium* มาใช้ลดสีของน้ำทิ้งในขั้นตอนการสกัดด้วยด่างจากกระบวนการฟอกเยื่อกระดาษ โดยผลิตน้ำทิ้งสังเคราะห์และเก็บตัวอย่างน้ำจากโรงงานอุตสาหกรรมกระดาษ 3 แห่ง ปรับความเป็นกรดด่างให้เป็น 4.5 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกก่อนที่จะใส่สปอร์แขวนลอย ซึ่งใช้เซลลูโลส 1 เปอร์เซ็นต์ หรือกลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งอาหารคาร์บอน และใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ 2.2 มิลลิโมลาร์เป็นแหล่งอาหารไนโตรเจน ในอาหารที่ใช้สำหรับการเจริญเติบโตประกอบด้วยโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต แมงกานีสซัลเฟต แคลเซียมคลอไรด์ 2,2 ไดเมททิลซัคซิเนต พบว่าราไวต์รอตชนิดนี้สามารถลดสีได้ดีที่สุดเมื่อความเป็นกรดด่างอยู่ในช่วง 4.3-4.8 อุณหภูมิ 39-40 องศาเซลเซียส ภายใต้การเติมออกซิเจน 80 เปอร์เซ็นต์ ด้วยการเขย่า 150 ครั้งต่อนาที และสามารถใช้ราในระบบได้ 25 วัน ก่อนจะใช้แหล่งอาหารคาร์บอนหมด หลังจากนั้นถ้าเติมเซลลูโลส 0.3 เปอร์เซ็นต์ จะสามารถลดสีได้จนกระทั่งถึง 60 วัน

Livernoche and others (1983) ทำการคัดเลือกราจำนวน 150 สายพันธุ์ โดยใช้อาหารแข็งที่ผสมน้ำเสียจากกระบวนการคราฟท์ 1 ลิตร แล้วทดสอบต่อในอาหารเหลวที่ผสมน้ำเสียจากกระบวนการคราฟท์ 200 มิลลิลิตร พบว่ามีเพียง 6 สายพันธุ์ที่เปลี่ยนสีอาหารจากสีน้ำตาลเป็นสีเหลืองซึ่ง *Coriolus versicolor* ให้ผลรวดเร็วที่สุด คือในเวลา 2 วัน จะลดสีลงได้ 40 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำมาใช้ในการบำบัดสีของน้ำเสียในกระบวนการคราฟท์ โดยทดลองทั้งการใช้ราแบบไม่ยึดเกาะกับตัวกลางและยึดเกาะกับตัวกลาง ที่มีปริมาณราและปริมาณซูโครสต่างๆ กัน พบว่าปริมาณราที่ไม่ยึดเกาะกับตัวกลางที่เหมาะสมคือ 30 มิลลิลิตร ในน้ำทิ้ง 200 มิลลิลิตร และมีซูโครส 0.5 เปอร์เซ็นต์ จะสามารถลดสีได้ 60 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้อัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที และบ่มเป็นเวลา 6 วัน ส่วนการทดลองแบบใช้รายึดเกาะกับตัวกลางโดยใช้แหล่งอาหารคาร์บอนชนิดต่างๆ และผันแปรความเข้มข้นในช่วง 10 มิลลิโมลาร์ถึง 50 มิลลิโมลาร์ ได้แก่ ไซโลส กลูโคส ซูโครส กลีเซอรอล และเอทานอล หลังจากผ่านไป 1 วัน เมื่อใช้ไซโลสเป็นแหล่งอาหารคาร์บอนจะดีที่สุด แต่ในที่สุดแล้วหลัง

จาก 3 วัน การใช้ซูโครส 50 มิลลิโมลาร์ เป็นแหล่งอาหารคาร์บอนจะมีประสิทธิภาพในการลดสีดีที่สุด โดยสามารถลดสีลงได้ 80 เปอร์เซ็นต์

Nagarathnamma และ Bajpai (1999) ได้คัดเลือกราจำนวน 110 สายพันธุ์ โดยเลี้ยงในอาหาร potato dextrose broth แล้วทดสอบในอาหารที่ผันแปรชนิดและความเข้มข้นของแหล่งอาหารคาร์บอนและแหล่งอาหารไนโตรเจน และผันแปรความเป็นกรดด่างที่ 3-7 อุณหภูมิในช่วง 25-50 องศาเซลเซียส พบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือใช้ กลูโคส 1 กรัม แคลเซียมคลอไรด์ 1.5 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต 2 กรัม โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัม และแอมโมเนียมคลอไรด์ 0.15 กรัม ในน้ำทิ้งจากขั้นตอนการผลิตเยื่อกระดาษ ปริมาณ 1 ลิตร ที่มีค่าความเป็นกรดด่าง 3-4 ใช้อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลามากกว่า 48 ชั่วโมง พบว่าเมื่อใส่กลูโคสในอาหาร 0.1 เปอร์เซ็นต์ *Rhizopus oryzae* จะสามารถลดสีได้สูงสุด 92 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับเมื่อไม่ใส่กลูโคสจะลดสีได้ 78 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 24 ชั่วโมง และยังสามารถลดซีโอดีลงได้ 50 เปอร์เซ็นต์

Feijoo (1995) ได้ทำการทดลองในการลดสีและสารประกอบที่มีมวลโมเลกุลสูงจากน้ำทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรมกระดาษคราฟท์ โดยใช้ *Phanerochaete chrysosporium* เลี้ยงในอาหารที่มีน้ำทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรมกระดาษคราฟท์ โดยแบ่งออกเป็น 2 การทดลอง การทดลองที่ 1 ให้อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 56 มิลลิโมลาร์ต่อ 2.2 มิลลิโมลาร์ และการทดลองที่ 2 ให้อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 56 มิลลิโมลาร์ต่อ 4.4 มิลลิโมลาร์ นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส และให้อัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน พบว่าการทดลองที่ 1 จะช่วยลดสีได้ 79 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการทดลองที่ 2 จะช่วยลดสีลงได้ 58 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นนำชุดการทดลองที่ 1 มาเพิ่มอัตราส่วนของ ซีโอดีต่อไนโตรเจนต่อฟอสฟอรัสต่อซัลเฟอร์ เป็น 200 ต่อ 7 ต่อ 1 ต่อ 0.33 ในการบำบัดแบบไร้อากาศ (anaerobic treatment) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน พบว่าสารประกอบที่มีมวลโมเลกุลสูงลดลง 72 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับน้ำทิ้งที่ไม่ผ่านการบำบัดที่ลดลง 45 เปอร์เซ็นต์ และค่าซีโอดีลดลง 73 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับน้ำทิ้งที่ไม่ผ่านการบำบัดที่ลดลงเพียง 30 เปอร์เซ็นต์

Belsare and Prasad (1988) ได้ศึกษาการลดสีของน้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษที่ทำจากชานอ้อย โดยใช้ราไวต์รอต *Schizophyllum commune* ในน้ำทิ้ง 1 ลิตร ใช้แหล่งอาหารคาร์บอนแตกต่างกัน 4 ชนิด คือ กลูโคส เซลลูโลส ซูโครส และเยื่อกระดาษ และใช้แอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งอาหารไนโตรเจน ซึ่งเติมลงไปในน้ำทิ้งชนิดละ 1 มิลลิกรัม และทดลองปรับความเป็นกรดด่างในช่วง 2-6 และบ่มเป็นเวลานาน 5 วันที่อุณหภูมิห้อง โดยเติมอากาศครั้งละ 5 นาที

ทุกๆ 8 ชั่วโมง และใช้ระยะเวลาในการบ่ม 2 วัน พบว่าซูโครสเป็นแหล่งอาหารคาร์บอนที่ดีที่สุด รองลงมาคือ กลูโคส เซลลูโลส และเยื่อกระดาษ ตามลำดับ ที่ความเป็นกรดด่าง 4-5 จะสามารถลดสีในน้ำทิ้งได้ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ และยังสามารถลดค่าบีโอดีได้ 70 เปอร์เซ็นต์ และลดค่าซีโอดีได้ 72 เปอร์เซ็นต์อีกด้วย

Blanchette R.A.(1995) ทำการศึกษาเกี่ยวกับการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสในเนื้อไม้โดยรา พบว่าราไวต์รอตที่อยู่ใน basidiomycota มีความสามารถในการย่อยสลายส่วนประกอบของผนังเซลล์รวมถึงลิกนิน ซึ่งราไวต์รอตชนิดที่ไม่เลือกทำลายเฉพาะลิกนิน (nonselective delignification) จะย่อยสลายลิกนิน น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลไซโลส และน้ำตาลแมนโนส ได้ 70 53 94 และ 87 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนราไวต์รอตชนิดที่เลือกทำลายเฉพาะลิกนิน (selective delignification) จะย่อยสลายได้ 99 3 99 และ 99 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ก็มีบางชนิดที่เฉพาะเจาะจงในการเข้าไปย่อยสลาย และมีการทดลองนำ *Ceriporiopsis subvermispora* และ *Phanerochaete chrysosporium* มาช่วยในขั้นตอนการผลิตเยื่อกระดาษโดยใช้เครื่องจักร เป็นเวลา 2-4 สัปดาห์ ผลปรากฏว่าจะช่วยลดพลังงานลงได้ถึง 40 เปอร์เซ็นต์

Royer and others (1991) ศึกษาการใช้ *Coliolus versicolor* ในการย่อยสลายสีของน้ำดำจากกระบวนการคราฟท์แบบต่อเนื่อง โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งอาหารคาร์บอน 5 กรัมต่อลิตร *Coliolus versicolor* ที่เกาะตัวเป็นกลุ่มก้อนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 4 มิลลิเมตร ปริมาณ 5 กรัมต่อลิตร (น้ำหนักแห้ง) ที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส จะไม่มีการสูญเสียความสามารถในการย่อยสลายสี ซึ่งความเข้มข้นของน้ำทิ้งจากกระบวนการคราฟท์เริ่มต้นอยู่ที่ 400-5000 color units ต่อลิตร แต่ถ้าหากนำมาใช้ซ้ำในการทดลองแบบ batch จะเกิดการสูญเสียความสามารถในการย่อยสลายสี ซึ่งขึ้นอยู่กับความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำทิ้งด้วย โดยราที่เกาะตัวเป็นกลุ่มก้อนมีครึ่งชีวิตที่ 4.7 9.4 และ 10.2 วัน เมื่อความเข้มข้นของน้ำทิ้งเป็น 1380 31780 และ 6990 color units ต่อลิตร ตามลำดับ

Sumathi และ Phatak (1999) ศึกษาการใช้ *Aspergillus foetidus* เพื่อย่อยสลายสีในน้ำดำจากการฟอกเยื่อกระดาษแบบอัลคาไลน์ โดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมลิกนิน 0.05-0.1 เปอร์เซ็นต์ หรือน้ำดำเจือจาง หรือน้ำทิ้งจากการฟอกเยื่อกระดาษแบบอัลคาไลน์ มีกลูโคสเป็นแหล่งอาหารคาร์บอน จะช่วยลดสีลงได้ 90-95 เปอร์เซ็นต์

Prasad และ Joyce (1991) ได้ใช้ *Trichoderma* sp. ในการย่อยสลายสีน้ำทิ้งจากขั้นตอนการผลิตเยื่อกระดาษ ที่ใช้ไม้เนื้อแข็งเป็นวัตถุดิบ พบว่ากลูโคสมีผลต่อการใช้คาร์โบไฮเดรตของรา ส่วนไนโตรเจนไม่ได้กระตุ้นการย่อยสลายสีให้เพิ่มขึ้น และที่ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4.0 เหมาะสมใน

การย่อยสลายสีและการเจริญเติบโตมากที่สุด ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจะลดสีลงได้ 85 เปอร์เซ็นต์ และซีโอดี 25 เปอร์เซ็นต์ ภายหลังจาก 3 วัน

Bajpai และ Bajpai (1994) ได้กล่าวถึงการกำจัดสีของเยื่อกระดาษและน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมผลิตเยื่อกระดาษโดยใช้วิธีทางชีวภาพ โดยสีในน้ำทิ้งเกิดจากลิกนินและอนุพันธ์ของลิกนิน และกล่าวถึงการกำจัดสีโดยใช้แบคทีเรีย ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* และ *Pseudomonas ovalis* เป็นต้น การกำจัดสีโดยใช้สาหร่าย เช่น *Microcystis* sp. เป็นต้น และการใช้ราซึ่งมีประสิทธิภาพดีและมีการทดลองนำมาใช้มากที่สุด เช่น *Shizophyllum commune*, *Tinctoporia borbonica*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Aspergillus niger* และ *Trichoderma* sp. เป็นต้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

1. เครื่องชั่งละเอียด รุ่น AB 204 ของบริษัท Mettler Toledo
2. พีเอชมิเตอร์ (pH meter) รุ่น 320 ของบริษัท Mettler Toledo
3. Hot plate
4. UV/Visible Spectrophotometer รุ่น 6405 ของบริษัท Jenway
5. เครื่องเขย่าแบบธรรมดา ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
6. ตู้บ่มเชื้อ รุ่น 99514 ของบริษัท Contherm Scientific Ltd.
7. Safety Laboratory Hood ของบริษัท Asian Chemical and Engineering Co., Ltd.
8. ตู้อบความร้อน รุ่น UE 500 ของบริษัท Memmert, Western Germany
9. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ ของบริษัท Isuzu Seisakusho Japan
10. เครื่องดูดสุญญากาศ รุ่น G049020 ของบริษัท Jeio Tech
11. กล้องจุลทรรศน์ รุ่น B-Series ของบริษัท Novex Holland
12. อุปกรณ์เครื่องแก้วต่างๆ

3.2 สารเคมีสำหรับการวิจัย

1. สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ
   - 1.1 น้ำตาลกลูโคส (Glucose) (บริษัท บี.เอ็ล.ฮั้ว จำกัด)
   - 1.2 วุ้นผง (Agar) (บริษัท วุ้นบริสุทธิ์ จำกัด)
   - 1.3 โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) (Merck, Germany)
   - 1.4 แอมโมเนียมทาร์เทรต ($C_4H_{12}N_2O_6$) (Fluka, Germany)
   - 1.5 แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) (Merck, Germany)
   - 1.6 แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) (Merck, Germany)
   - 1.7 ยีสต์สกัด (Yeast Extract) (Himedia Laboratoris Limited, India)
   - 1.8 คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$) (Merck, Germany)
   - 1.9 ไอรอน (III) ซัลเฟต ($Fe_2(SO_4)_3$) (Merck, Germany)
   - 1.10 แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4$) (Merck, Germany)
   - 1.11 Polymeric dye R-478 (Fluka, Germany)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.12 กรดแทนนิก (Tannic acid) (Fluka, Germany)

1.13 มอลต์สกัด (Malt Extract) (Himedia Laboratoris Limited, India)

1.14 โซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$) (Asia Pacific Specialty Chemicals Limited, Australia)

1.15 ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) (Merck, Germany)

1.16 โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) (Merck, Germany)

1.17 ไอรอน (II) ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4.7H_2O$) (Merck, Germany)

1.18 น้ำตาลซูโครส (Sucrose)

1.19 แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) (Fluka, Germany)

2. สารเคมีสำหรับเตรียมสารละลายมาตรฐานคลอโรแพลททิเนท (Standard chloroplatinate solution)

2.1 โพแทสเซียมคลอโรแพลทิเนท (K_2PtCl_6) (Calro Erba Reagent, Italy)

2.2 โคบอลตัสคลอไรด์ ($CoCl_2.6H_2O$) (Calro Erba Reagent, Italy)

2.3 กรดไฮโดรคลอริก (HCl) (Fluka, Germany)

3. สารเคมีสำหรับเตรียมสารละลายมาตรฐานลิกนิน

3.1 อัลคาไลน์ลิกนิน (Alkali Lignin) (Aldrich, USA)

3.2 กรดบอริก (Boric acid) (Allied Chemical, USA)

3.3 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) (Merck , Germany)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.3.1 การเก็บตัวอย่างจากแหล่งต่างๆ ในประเทศไทย

เก็บตัวอย่างไม้ผุและเห็ดที่ขึ้นบนเนื้อไม้ กิ่งไม้ผุที่จะนำมาใช้ศึกษามีลักษณะเปื่อยยุ่ย น้ำหนักเบา และมีเนื้อไม้สีขาว และเก็บตัวอย่างเห็ดที่เจริญบนเนื้อไม้ หรือกิ่งไม้ที่มีลักษณะเช่นเดียวกันจากแหล่งต่างๆ

3.3.2 การแยกเส้นใยราจากตัวอย่าง

นำตัวอย่างเห็ดมาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ โดยใช้เนื้อเยื่อด้านในของดอกเห็ดที่ไม่ได้สัมผัส และใช้เนื้อเยื่อไม้ของกิ่งไม้มาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) (ภาคผนวก ก) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องประมาณ 3-5 วัน แล้วแยกโคโลนีเดี่ยวออกมาจนกว่าจะได้ราที่บริสุทธิ์ เก็บและรักษาเส้นใยราที่ได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดิม

3.3.3 ทดสอบราที่มีความสามารถในการย่อยสลายลิกนิน

3.3.3.1 เตรียม inoculum ของราทดสอบ

เพื่อทดสอบราที่แยกได้ในการย่อยสลายลิกนิน โดยนำราที่แยกได้จากข้อ 3.3.2 มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 5-7 วัน จนกระทั่งโคโลนีแผ่กระจายบนอาหารเลี้ยงเชื้อ นำเครื่องเจาะรูไม้คอร์ก (cork borer) ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร เจาะลงบนเส้นใยบริเวณขอบรอบนอกของโคโลนีและนำไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสีหรือสารเพื่อแสดงความสามารถในการย่อยสลายลิกนิน

3.3.3.2 ทดสอบกับอาหาร Poly-R agar clearance

นำ inoculum ราวางลงบนอาหาร Poly-R agar clearance (ภาคผนวก ก) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง และสังเกตสีของอาหารเลี้ยงเชื้อบริเวณรอบๆ โคโลนี ถ้าสามารถย่อยสลายลิกนินได้สีของอาหารเลี้ยงเชื้อจะจางลงหรือเป็นสีเหลือง โดยทำซ้ำ 2 ครั้ง วัดความกว้างของบริเวณที่สีถูกย่อยสลาย

3.3.3.3 ทดสอบกับอาหาร Tannic agar หรือ Gallic agar

นำ inoculum ราวางลงบนอาหาร Tannic agar (ภาคผนวก ก) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง และสังเกตสีของอาหารเลี้ยงเชื้อบริเวณรอบๆ โคโลนี ถ้าสามารถย่อยสลายลิกนินได้อาหารเลี้ยงเชื้อจะมีสีน้ำตาลเข้ม โดยทำซ้ำ 2 ครั้ง วัดความกว้างของบริเวณที่สร้างสีน้ำตาล

3.3.4 การศึกษาการเจริญของราแต่ละชนิดในอาหาร Potato dextrose broth (PDB)

คัดเลือกราที่มีประสิทธิภาพมาจากหัวข้อ 3.3.3 โดยสังเกตจากมีบริเวณการย่อยสี Poly-R หรือบริเวณที่มีการสร้างสารสีน้ำตาลสูง ซึ่งจากการทดลองได้แก่ รา Isolate A19 และรา Isolate B7 มาทำการศึกษาโดยผลิตเป็น inoculum ตามข้อ 3.3.3.1 ได้ inoculum จำนวน 2 ชิ้นลงในอาหาร PDB (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 100 มิลลิลิตรในขวดรูปกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นนำเส้นใยของเชื้อรามากรองด้วยกระดาษกรองโดยใช้เครื่องดูดสุญญากาศ แล้วนำเส้นใยที่กรองได้อบในตู้อบความร้อนที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นใน desiccator นำมาชั่งน้ำหนักโดยลบกับน้ำหนักแห้งของกระดาษกรอง โดยทำการทดลองวันละ 3 ซ้ำ บันทึกน้ำหนักแห้งของเส้นใยทุกวันจนครบ 14 วัน แล้วนำมาเขียนกราฟการเจริญเติบโต

3.3.5 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงรา ให้มีความสามารถในการลดความเข้มข้นของลิกนินและความเข้มข้นของสีของน้ำทิ้งในการผลิตลิกนิน

การเตรียม inoculum เพื่อทดสอบความสามารถในการลดความเข้มข้นของลิกนินและสีในน้ำทิ้ง ใช้ inoculum ที่เตรียมไว้ตามข้อ 3.3.3.1 จำนวน 2 ชิ้นวุ้น ย้ายลงในอาหาร PDB บ่มที่อุณหภูมิห้องที่อัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที โดยจากผลการทดลองในหัวข้อ 3.3.4 ทำให้ทราบเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงรา Isolate A19 เป็นเวลานาน 8 วัน และรา Isolate B7 เป็นเวลานาน 12 วัน

3.3.5.1 ศึกษาปริมาณเริ่มต้นที่เหมาะสมของรา Isolate A19 และรา Isolate B7

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงจากสูตร Czapek's Dox Medium (ภาคผนวก ก) จำนวน 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร โดยถ่าย รา Isolate A19 และ รา Isolate B7 ในปริมาณที่แตกต่างกัน คือ 5 10 15 20 มิลลิลิตร และถ่ายราทั้งสองชนิดผสมกันในอัตราส่วน รา Isolate A19: รา Isolate B7 เท่ากับ 2.5: 2.5 5.0: 5.0 7.5: 7.5 10.0: 10.0 และ 12.5: 12.5

มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องและเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 วัน ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ เก็บผลการทดลองโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV/Visible Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรและ 465 นาโนเมตร ตามลำดับเพื่อวัดค่าความเข้มข้นของลิกนินและค่าความเข้มข้นของสี

3.3.5.2 ศึกษาความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่เหมาะสมของรา Isolate A19 และรา Isolate B7

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงจากสูตร Czapek's Dox Medium (ภาคผนวก ก) จำนวน 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร โดยทำการปรับความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีระดับต่างกัน คือ 3 5 7 9 และ 11 โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ แล้วถ่ายรา Isolate A19 และรา Isolate B7 ในปริมาณที่เหมาะสมดังข้อ 3.3.5.1 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิห้องและเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 วัน ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ เก็บผลการทดลองโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV/Visible Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรและ 465 นาโนเมตร ตามลำดับเพื่อวัดค่าความเข้มข้นของลิกนินและค่าความเข้มข้นของสีที่คงอยู่

3.3.6 ศึกษาองค์ประกอบและความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการลดความเข้มข้นของลิกนินและความเข้มข้นของสีของน้ำทิ้งในการผลิตลิกนิน

3.3.6.1 การหาชนิดของแหล่งอาหารคาร์บอนที่เหมาะสมของรา Isolate A19 และรา Isolate B7

โดยเลี้ยงราด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผันแปรแหล่งอาหารคาร์บอน 2 ชนิด ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลซูโครส โดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงจากสูตร Czapek's Dox Medium (ภาคผนวก ก) จำนวน 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วผันแปรแหล่งอาหารคาร์บอนทั้งสองชนิด ถ่ายรา Isolate A19 และรา Isolate B7 ในปริมาณที่เหมาะสมดังข้อ 3.3.5.1 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิห้องและเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 วัน ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ เก็บผลการทดลองโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV/Visible Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรและ 465 นาโนเมตร ตามลำดับเพื่อวัดค่าความเข้มข้นของลิกนินและค่าความเข้มข้นของสีที่คงอยู่

3.3.6.2 ศึกษาความเข้มข้นของแหล่งอาหารคาร์บอนที่เหมาะสมของรา Isolate A19 และรา Isolate B7

โดยเลี้ยงรา Isolate A19 และรา Isolate B7 ในปริมาณที่เหมาะสมดังข้อ 3.3.5.1 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แหล่งอาหารคาร์บอนที่เหมาะสมดังหัวข้อ 3.3.6.1 ผันแปรความเข้มข้นต่างๆ กัน คือ 0 0.5 1.0 1.5 2.0 และ 2.5 เปอร์เซ็นต์ ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ แล้ววัดค่าความเข้มข้นของลิกนินและค่าความเข้มข้นของสีที่คงอยู่ด้วย UV/Visible Spectrophotometer

3.3.6.3 การหาชนิดของแหล่งอาหารไนโตรเจนที่เหมาะสมของรา Isolate A19 และรา Isolate B7

โดยเลี้ยงรา Isolate A19 และรา Isolate B7 ในปริมาณที่เหมาะสมดังข้อ 3.3.5.1 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผันแปรแหล่งอาหารไนโตรเจน 2 ชนิด คือ แอมโมเนียมคลอไรด์ และ โซเดียมไนเตรต โดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงจากสูตร Czapek's Dox Medium (ภาคผนวก ก) จำนวน 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วผันแปรแหล่งอาหารไนโตรเจนทั้งสองชนิด ถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิห้องและเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 วัน ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ เก็บผลการทดลองโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV/Visible Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรและ 465 นาโนเมตร ตามลำดับเพื่อวัดค่าความเข้มข้นของลิกนินและค่าความเข้มข้นของสีที่คงอยู่

3.3.6.4 ศึกษาความเข้มข้นของแหล่งอาหารไนโตรเจนที่เหมาะสมของรา Isolate A19 และรา Isolate B7

โดยเลี้ยงรา Isolate A19 และรา Isolate B7 ในปริมาณที่เหมาะสมดังข้อ 3.3.5.1 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แหล่งอาหารไนโตรเจนที่เหมาะสมดังหัวข้อ 3.3.6.3 ผันแปรความเข้มข้นต่างๆ กัน คือ 0 0.1 0.2 0.3 0.4 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ แล้ววัดค่าความเข้มข้นของลิกนินและค่าความเข้มข้นของสีที่คงอยู่ด้วย UV/Visible Spectrophotometer

3.3.7 นำรา Isolate A19 และรา Isolate B7 มาทดลองใช้กับน้ำทิ้งในการผลิตลิกนิน

โดยเตรียมชุดการทดลอง 2 ชุด ชุดแรกเป็นชุดควบคุมไม่มีการเติมรา Isolate A19 และรา Isolate B7 ลงไป ส่วนชุดที่สองใส่ราที่ทดสอบแล้วว่าย่อยสลายลิกนินได้ แล้วเก็บตัวอย่างน้ำทุกวันจนครบ 12 วัน เพื่อนำมาวิเคราะห์ค่าความเข้มข้นของลิกนินที่เหลืออยู่ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และค่าความเข้มข้นของสีที่เหลืออยู่ที่ความยาวคลื่น 465 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV/Visible spectrophotometer

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การเก็บตัวอย่างจากแหล่งต่างๆ ในประเทศไทย

เก็บตัวอย่างเห็ดจากแหล่งต่างๆ ในประเทศจำนวน 20 ตัวอย่าง ตามตารางที่ 4.1 และกิ่งไม้ผุจากแหล่งต่างๆ ในประเทศจำนวน 22 ตัวอย่าง ตามตารางที่ 4.2

4.1.1 ผลการเก็บตัวอย่างเห็ดจากแหล่งต่างๆ ในประเทศไทย

ตารางที่ 4.1 ตัวอย่างเห็ดที่เก็บจากแหล่งต่างๆ

รหัสเห็ดตัวอย่าง	รหัสเส้นใยจากเห็ดตัวอย่าง	สถานที่เก็บ
A1	Isolate A1	อ. พนมสารคาม จ. ฉะเชิงเทรา
A2	Isolate A2	อ. พนมสารคาม จ. ฉะเชิงเทรา
A3	Isolate A3	เขตบางกะปิ กรุงเทพมหานคร
A4	Isolate A4	เขตบางกะปิ กรุงเทพมหานคร
A5	Isolate A5	เขตบางกะปิ กรุงเทพมหานคร
A6	Isolate A6	เขตบางกะปิ กรุงเทพมหานคร
A7	Isolate A7	เขตบางกะปิ กรุงเทพมหานคร
A8	Isolate A8	เขตบางกะปิ กรุงเทพมหานคร
A9	Isolate A9	เขตธนบุรี กรุงเทพมหานคร
A10	Isolate A10	เขตธนบุรี กรุงเทพมหานคร
A11	Isolate A11	เขตธนบุรี กรุงเทพมหานคร
A12	Isolate A12	อ. เมือง จ. เชียงใหม่
A13	Isolate A13	อ. เมือง จ. เชียงใหม่
A14	Isolate A14	อ. เมือง จ. เชียงใหม่
A15	Isolate A15	อ. เมือง จ. เชียงใหม่
A16	Isolate A16	อ. เมือง จ. เชียงใหม่
A17	Isolate A17	อ. เมือง จ. เชียงใหม่
A18	Isolate A18	อ. เมือง จ. เชียงใหม่
A19	Isolate A19	อ. เมือง จ. ประจวบคีรีขันธ์
A20	Isolate A20	อ. อัมพวา จ. สมุทรสงคราม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.1.2 ผลการเก็บตัวอย่างกิ่งไม้ผุจากแหล่งต่างๆ ในประเทศไทย

ตารางที่ 4.2 ตัวอย่างกิ่งไม้ผุที่เก็บจากแหล่งต่างๆ

รหัสกิ่งไม้ตัวอย่าง	รหัสเส้นใยจากกิ่งไม้ตัวอย่าง	สถานที่เก็บ
B1	Isolate B1	อ. พนมสารคาม จ. ฉะเชิงเทรา
B2	Isolate B2	อ. พนมสารคาม จ. ฉะเชิงเทรา
B3	Isolate B3	อ. พนมสารคาม จ. ฉะเชิงเทรา
B4	Isolate B4	อ. พนมสารคาม จ. ฉะเชิงเทรา
B5	Isolate B5	อ. พนมสารคาม จ. ฉะเชิงเทรา
B6	Isolate B6	อ. พนมสารคาม จ. ฉะเชิงเทรา
B7	Isolate B7	อ. พนมสารคาม จ. ฉะเชิงเทรา
B8	Isolate B8	อ. พนมสารคาม จ. ฉะเชิงเทรา
B9	Isolate B9	อ. พนมสารคาม จ. ฉะเชิงเทรา
B10	Isolate B10	เขตบางกะปิ กรุงเทพมหานคร
B11	Isolate B11	เขตบางกะปิ กรุงเทพมหานคร
B12	Isolate B12	เขตบางกะปิ กรุงเทพมหานคร
B13	Isolate B13	เขตปทุมวัน กรุงเทพมหานคร
B14	Isolate B14	เขตปทุมวัน กรุงเทพมหานคร
B15	Isolate B15	เขตปทุมวัน กรุงเทพมหานคร
B16	Isolate B16	อ. เมือง จ. เชียงใหม่
B17	Isolate B17	อ. เมือง จ. เชียงใหม่
B18	Isolate B18	อ. เมือง จ. เชียงใหม่
B19	Isolate B19	อ. เมือง จ. เชียงใหม่
B20	Isolate B20	อ. เมือง จ. ประจวบคีรีขันธ์
B21	Isolate B21	อ. เมือง จ. สระบุรี
B22	Isolate B22	อ. เมือง จ.สระบุรี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2 ลักษณะของราตัวอย่าง และผลการทดสอบความสามารถในการเกิดปฏิกิริยากับอาหาร Poly-R agar clearance และ Tannic agar

4.2.1 ลักษณะของราที่แยกได้จากเห็ด และผลการทดสอบความสามารถในการเกิดปฏิกิริยากับอาหาร Poly-R agar clearance และ Tannic agar

การคัดเลือกราจากเห็ดเพื่อนำมาแยกได้สายพันธุ์ที่บริสุทธิ์จำนวน 20 Isolate เมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการย่อยสลาย Poly R-478 และ Tannic agar พบว่ามีเพียง 1 สายพันธุ์ที่สามารถเปลี่ยนสีของ Poly R-478 จากสีชมพูม่วงเป็นสีเหลือง และมี 12 สายพันธุ์ที่สามารถสร้างโซนสีน้ำตาลบน Tannic agar จึงมีรา Isolate A19 เพียงสายพันธุ์เดียว ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างเห็ดดังรูปที่ 4.1 ที่สามารถย่อยสลายได้ทั้ง Poly R-478 และ Tannic agar ดังตารางที่ 4.3 และมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนที่เกิดปฏิกิริยามากกว่าราอื่นๆ ดังนั้นจึงคัดเลือกรา Isolate A19 มาทำการทดลองในขั้นต่อไป เมื่อบ่ม รา Isolate A19 บนอาหาร potato dextrose agar จะมีลักษณะเป็นเส้นใยสีขาวละเอียด เส้นใยติดอยู่บนผิวหน้าอาหาร ไม่ฟู และไม่เหนียว แสดงในรูปที่ 4.2 และจากการทำ slide culture แล้วส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์จะเห็นผนังกั้นเส้นใย และ clamp connection อย่างชัดเจน ดังในรูปที่ 4.3 แสดงว่าอยู่ในกลุ่มของ Basidiomycota

ตารางที่ 4.3 ลักษณะและอัตราการเจริญของราที่แยกได้จากเห็ด และผลการทดสอบความสามารถในการย่อยสาร Poly R-478 จากสีชมพูม่วงเป็นสีเหลือง และสร้างโซนสีน้ำตาลบน Tannic agar ในเวลา 9 วัน

รหัสเส้นใยจากเห็ดตัวอย่าง	ลักษณะเส้นใยบนอาหาร PDA	อัตราการเจริญ	เส้นผ่านศูนย์กลางโซนสีเหลืองบน Poly-R agar clearance (เซนติเมตร)	เส้นผ่านศูนย์กลางโซนสีน้ำตาลบน Tannic agar (เซนติเมตร)
Isolate A1	เส้นใยขาวฟู เป็นกระจุกสีขาวขุ่นอยู่ตรงกลาง	+++	-	4.5
Isolate A2	เส้นใยขาวใส ขอบคล้ายแขนงใบไม้	+	-	-
Isolate A3	เส้นใยขาวฟูมากจนถึงฝาบนของ Petri dish	+	-	-
Isolate A4	เส้นใยขาวไม่ฟู เกิดบริเวณผิวหน้าของอาหาร	+	-	5.0
Isolate A5	เส้นใยขาวหนา ลักษณะย่น	++	-	-

ตารางที่ 4.3 (ต่อ) ลักษณะและอัตราการเจริญของราที่แยกได้จากเห็ด และผลการทดสอบความสามารถในการย่อยสาร Poly R-478 จากสีชมพูม่วงเป็นสีเหลือง และสร้างโซนสีน้ำตาลบน Tannic agar ในเวลา 9 วัน

รหัสเส้นใยจากเห็ดตัวอย่าง	ลักษณะเส้นใยบนอาหาร PDA	อัตราการเจริญ	เส้นผ่านศูนย์กลางโซนสีเหลืองบน Poly-R agar clearance (เซนติเมตร)	เส้นผ่านศูนย์กลางโซนสีน้ำตาลบน Tannic agar (เซนติเมตร)
Isolate A6	เส้นใยขาวและยาว	++	-	5.2
Isolate A7	เส้นใยขาว ฟูปานกลาง	++	-	-
Isolate A8	เส้นใยขาวบางๆ กระจายทั่ว	++	-	-
Isolate A9	เส้นใยด้านในหนาสีขาวขุ่นเส้นใย	+++	-	4.5
Isolate A10	ขาว ฟูปานกลาง	+	-	4.7
Isolate A11	เส้นใยขาวละเอียดไม่ฟู ขึ้นอย่างหนาแน่น	++	-	5.1
Isolate A12	เส้นใยขาว ฟูปานกลาง	+++	-	-
Isolate A13	เส้นใยขาว ฟูปานกลาง	+++	-	3.8
Isolate A14	เส้นใยขาว ละเอียดมาก	+++	-	3.3
Isolate A15	เส้นใยขาว ฟูมาก	++	-	4.2
Isolate A16	เส้นใยขาว ไม่ฟู	++	-	4.3
Isolate A17	เส้นใยขาว ลักษณะเป็นวงๆ	+++	-	-
Isolate A18	เส้นใยขาว ฟูปานกลาง	++	-	4.4
* Isolate A19	เส้นใยขาวละเอียด เกิดบริเวณผิวหน้าของอาหาร	+++	9.0	5.7
Isolate A20	เส้นใยขาวสั้น ขึ้นตั้งฉากกับผิวอาหาร	++	-	-

หมายเหตุ

อัตราการเจริญ

+ หมายถึง ราเจริญเต็มจานเพาะเชื้อบนอาหาร PDA ภายในเวลา 4 วัน

++ หมายถึง ราเจริญเต็มจานเพาะเชื้อบนอาหาร PDA ภายในเวลา 6 วัน

+++ หมายถึง ราเจริญเต็มจานเพาะเชื้อบนอาหาร PDA ภายในเวลา 8 วัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปฏิกิริยากับ Poly-R agar clearance

\+ หมายถึง ราสามารถย่อยสลายสี Poly R-478 โดยเปลี่ยนอาหารจากสีชมพูม่วงเป็นสีเหลือง

\- หมายถึง ราไม่สามารถย่อยสลายสี Poly R-478

ปฏิกิริยากับ Tannic agar

\+ หมายถึง ราสามารถสร้างโซนสีน้ำตาลบน Tannic agar

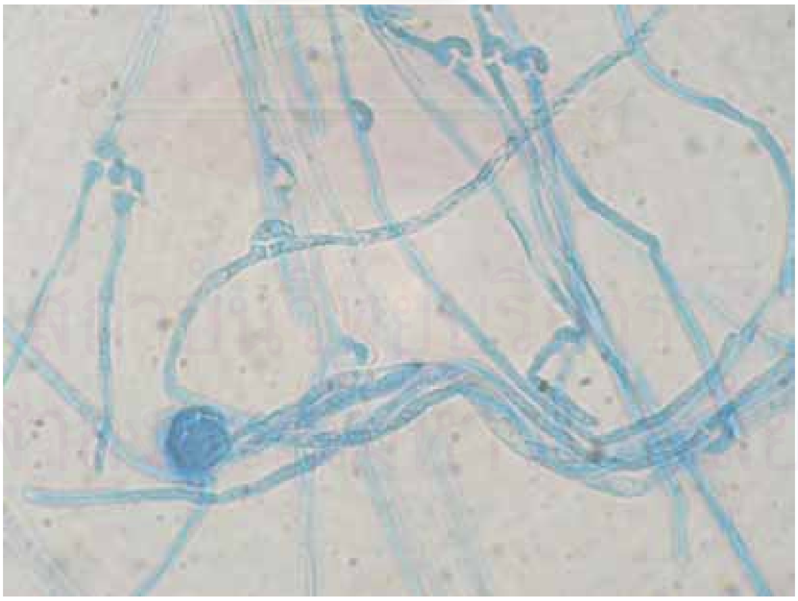
\- หมายถึง ราไม่สามารถสร้างโซนสีน้ำตาลบน Tannic agar

* หมายถึง ราที่สามารถย่อยสลายได้ทั้ง Poly R-478 และ Tannic agar

รูปที่ 4.1 ตัวอย่างเห็ด A19 ที่นำมาแยกรา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4.2 ลักษณะโคโลนีของรา Isolate A19 บนอาหาร potato dextrose agar



รูปที่ 4.3 ลักษณะเส้นใยของรา Isolate A19 เมื่อศึกษาดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1,000 เท่า (รูปมีขนาด 0.05 เท่าจากรูปจริง)

4.2.2 ลักษณะของราที่แยกได้จากกิ่งไม้ และผลการทดสอบความสามารถในการเกิดปฏิกิริยากับอาหาร Poly-R agar clearance และ Tannic agar

การคัดเลือกราจากกิ่งไม้เพื่อนำมาแยกได้สายพันธุ์ที่บริสุทธิ์จำนวน 22 Isolate เมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการย่อยสลาย Poly R-478 และ Tannic agar พบว่ามีเพียง 1 สายพันธุ์ที่สามารถเปลี่ยนสีของ Poly R-478 จากสีชมพูม่วงเป็นสีเหลือง และมี 5 สายพันธุ์ที่สามารถสร้างโซนสีน้ำตาลบน Tannic agar จึงมีรา Isolate B7 เพียงสายพันธุ์เดียว ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างกิ่งไม้ดังรูปที่ 4.4 ที่สามารถย่อยสลายได้ทั้ง Poly R-478 และ Tannic agar ดังตารางที่ 4.4 และมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนที่เกิดปฏิกิริยาสูงสุดมากกว่าราอื่นๆ ดังนั้นจึงคัดเลือกรา Isolate B7 มาทำการทดลองในขั้นต่อไป เมื่อบ่มรา Isolate B7 บนอาหาร potato dextrose agar จะมีลักษณะเป็นเส้นใยหนาสีขาวขุ่นขึ้นเป็นวงๆ เหนียวมาก ค่อนข้างฟู และบริเวณขอบไม่เรียบ แสดงในรูปที่ 4.5 และจากการทำ slide culture แล้วส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์จะเห็นผนังกั้นเส้นใย และ clamp connection ดังในรูปที่ 4.6 แสดงว่าอยู่ในกลุ่มของ Basidiomycota

ตารางที่ 4.4 ลักษณะและอัตราการเจริญของราที่แยกได้จากกิ่งไม้ และผลการทดสอบความสามารถในการย่อยสาร Poly R-478 จากสีชมพูม่วงเป็นสีเหลือง และสร้างโซนสีน้ำตาลบน Tannic agar ในเวลา 9 วัน

รหัสเส้นใยจากกิ่งไม้ตัวอย่าง	ลักษณะเส้นใยบนอาหาร PDA	อัตราการเจริญ	เส้นผ่านศูนย์กลางโซนสีเหลืองบน Poly-R agar clearance (เซนติเมตร)	เส้นผ่านศูนย์กลางโซนสีน้ำตาลบน Tannic agar (เซนติเมตร)
Isolate B1	เส้นใยขาวบาง ลักษณะแตกเป็นแขนง	+	-	- -
Isolate B2	เส้นใยขาวขุ่น	+	-	-
Isolate B3	เส้นใยขาว ฟูมาก	+	-	-
Isolate B4	เส้นใยขาวละเอียด ปุยเล็กน้อย	++	-	-
Isolate B5	เส้นใยขาว ปุยลามทั่วผิวหน้าอาหาร	+	-	-
Isolate B6	เส้นใยขาวบางใส	++	-	4.0
* Isolate B7	เส้นใยขาวขุ่นหนา ขึ้นเป็นวงๆ เหนียวมาก	++	8.4	5.6

ตารางที่ 4.4 (ต่อ) ลักษณะและอัตราการเจริญของราที่แยกได้จากกิ่งไม้ และผลการทดสอบความสามารถในการย่อยสาร Poly R-478 จากสีชมพูม่วงเป็นสีเหลือง และสร้างโซนสีน้ำตาลบน Tannic agar ในเวลา 9 วัน

รหัสเส้นใยจากกิ่งไม้ตัวอย่าง	ลักษณะเส้นใยบนอาหาร PDA	อัตราการเจริญ	เส้นผ่านศูนย์กลางโซนสีเหลืองบน Poly-R agar clearance (เซนติเมตร)	เส้นผ่านศูนย์กลางโซนสีน้ำตาลบน Tannic agar (เซนติเมตร)
Isolate B8	เส้นใยขาวกระจายทั่วผิวหน้าอาหาร	+	-	-
Isolate B9	เส้นใยขาว ฟูปานกลาง	++	-	-
Isolate B10	เส้นใยขาว ฟูปานกลาง	++	-	-
Isolate B11	เส้นใยขาวปนสีเหลืองเล็กน้อย	+++	-	-
Isolate B12	เส้นใยขาว ฟูปานกลาง	++	-	-
Isolate B13	เส้นใยขาว ฟูปานกลาง	++	-	-
Isolate B14	เส้นใยขาวบาง ฟูมาก	+	-	-
Isolate B15	เส้นใยขาวขึ้นเป็นชั้นๆ	+	-	5.0
Isolate B16	เส้นใยขาว ฟูปานกลาง	++	-	-
Isolate B17	เส้นใยขาวบางใส	++	-	-
Isolate B18	เส้นใยขาวขุ่น ฟูปานกลาง	++	-	-
Isolate B19	เส้นใยขาว ฟูเล็กน้อย	++	-	4.3
Isolate B20	เส้นใยขาว ฟูมาก	+	-	3.8
Isolate B21	เส้นใยขาว ฟูเล็กน้อย	+	-	-
Isolate B22	เส้นใยขาว จับตัวกันเป็นกลุ่ม	+++	-	-

หมายเหตุ

อัตราการเจริญ

\+ หมายถึง ราเจริญเต็มจานเพาะเชื้อบนอาหาร PDA ภายในเวลา 4 วัน

++ หมายถึง ราเจริญเต็มจานเพาะเชื้อบนอาหาร PDA ภายในเวลา 6 วัน

+++ หมายถึง ราเจริญเต็มจานเพาะเชื้อบนอาหาร PDA ภายในเวลา 8 วัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปฏิกิริยากับ Poly-R agar clearance

\+ หมายถึง ราสามารถย่อยสลายสี Poly R-478 โดยเปลี่ยนอาหารจากสีชมพูม่วงเป็นสีเหลือง

\- หมายถึง ราไม่สามารถย่อยสลายสี Poly R-478

ปฏิกิริยากับ Tannic agar

\+ หมายถึง ราสามารถสร้างโซนสีน้ำตาลบน Tannic agar

\- หมายถึง ราไม่สามารถสร้างโซนสีน้ำตาลบน Tannic agar

* หมายถึง ราที่สามารถย่อยสลายได้ทั้ง Poly R-478 และ Tannic agar

รูปที่ 4.4 ตัวอย่างกิ่งไม้ B7 ที่นำมาแยกรา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4.5 แสดงลักษณะโคโลนีของรา Isolate B7 บนอาหาร potato dextrose agar

รูปที่ 4.6 แสดงลักษณะเส้นใยของรา Isolate B7เมื่อศึกษาดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1,000 เท่า (รูปมีขนาด 0.05 เท่าจากรูปจริง)

4.3 ผลการสร้างโซน ที่มีการเปลี่ยนสีบนอาหารเลี้ยงเชื้อของรา Isolate A19 และรา Isolate B7

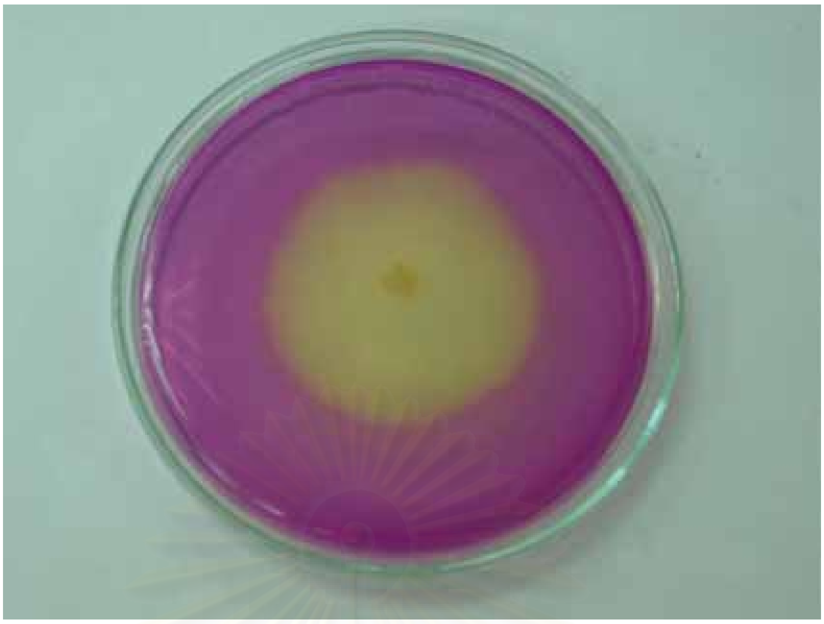
4.3.1 ผลการวัดขนาดของโซนที่มีการเปลี่ยนสีของอาหาร Poly-R agar clearance ของรา Isolate A19 และรา Isolate B7

จากผลการทดลองวัดขนาดของโซนที่มีการเปลี่ยนสีของรา Isolate A19 และ B7 บนอาหาร Poly-R agar clearance เป็นดังตารางที่ 4.5 ซึ่งรา Isolate A19 จะเกิดปฏิกิริยาในการย่อยสลายสี Poly R-478 ได้สูงกว่ารา Isolate B7 เริ่มตั้งแต่วันที่ 3 เป็นต้นไปจนถึงวันที่ 9 โดย รา Isolate A19 มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนที่มีการเปลี่ยนสีสูงสุด 9.0 เซนติเมตร ส่วนรา Isolate B7 มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนที่มีการเปลี่ยนสีสูงสุด 8.4 เซนติเมตร รูปที่ 4.7 และรูปที่ 4.8 แสดงลักษณะการเกิดโซนที่มีการเปลี่ยนสีของรา Isolate A19 และรา Isolate B7 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.5 ผลการวัดขนาดโซนของรา Isolate A19 และรา Isolate B7 ที่มีการเปลี่ยนสีเมื่อทดสอบกับอาหาร Poly-R agar clearance

Isolate	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนที่มีการเปลี่ยนสี (เซนติเมตร)								
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6	วันที่ 7	วันที่ 8	วันที่ 9
A19	0	0	2.0	4.0	4.6	6.4	7.8	8.8	9.0
B7	0	0	1.4	3.0	4.2	5.8	7.0	8.2	8.4

รูปที่ 4.7 ลักษณะการเปลี่ยนสีบนอาหาร Poly-R agar clearance ของรา Isolate A19



รูปที่ 4.8 ลักษณะการเปลี่ยนสีบนอาหาร Poly-R agar clearance ของรา Isolate B7

4.3.2 ผลการวัดขนาดของ โซนสีน้ำตาลของอาหาร Tannic agar ของรา Isolate A19 และรา Isolate B7

จากผลการทดลองวัดขนาดของโซนสีน้ำตาลของรา Isolate A19 และ B7 บนอาหาร Tannic agar เป็นดังตารางที่ 4.6 ซึ่งรา Isolate A19 จะเกิดปฏิกิริยาในการสร้างโซนสีน้ำตาลได้สูงกว่ารา Isolate B7 เริ่มตั้งแต่วันที่ 1 เป็นต้นไปจนถึงวันที่ 9 โดยรา Isolate A19 มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนสูงสุด 5.7 เซนติเมตร ส่วนรา Isolate B7 มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนสูงสุด 5.6 เซนติเมตร รูปที่ 4.9 และรูปที่ 4.10 แสดงลักษณะการเกิดโซนสีน้ำตาลของรา Isolate A19 และรา Isolate B7 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.6 ผลการวัดขนาดโซนของรา Isolate A19 และ รา Isolate B7 ที่มีการเปลี่ยนสีเมื่อทดสอบกับอาหาร Tannic agar

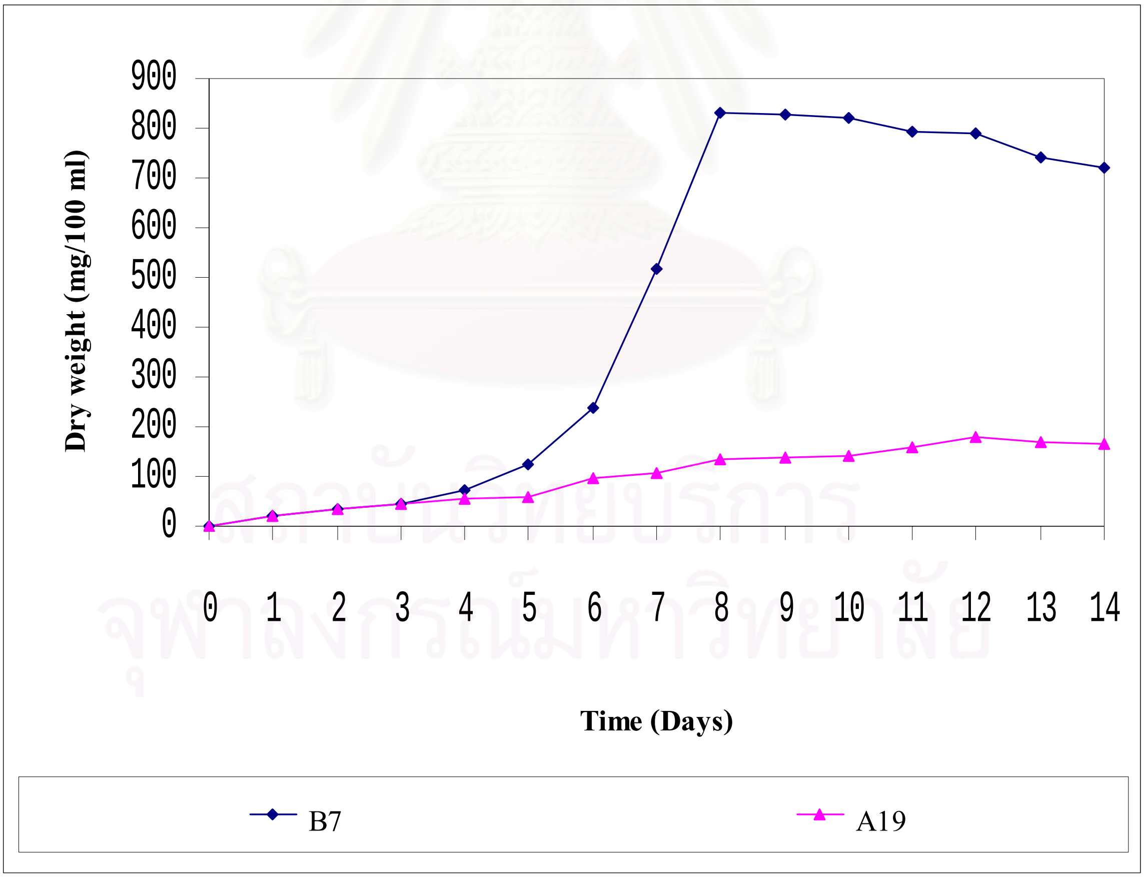
Isolate	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนที่มีการเปลี่ยนสี (เซนติเมตร)								
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6	วันที่ 7	วันที่ 8	วันที่ 9
A19	1.4	2.6	3.8	4.4	5.0	5.2	5.4	5.6	5.7
B7	1.2	2.4	3.4	4.0	4.4	4.6	5.0	5.4	5.6

รูปที่ 4.9 ลักษณะการสร้างโซนสีน้ำตาลของรา Isolate A19 บนอาหาร Tannic agar

รูปที่ 4.10 ลักษณะการสร้างโซนสีน้ำตาลของรา Isolate B7 บนอาหาร Tannic agar

4.4 ผลการศึกษาการเจริญของรา Isolate A19 และรา Isolate B7 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose broth (PDB)

จากการทดลองเลี้ยงรา Isolate A19 และรา Isolate B7 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose broth (PDB) แล้วนำข้อมูลน้ำหนักแห้งของเส้นใยมาเขียนกราฟแสดงการเจริญเติบโตในแต่ละวัน พบว่าเส้นใยของรา Isolate A19 มีแนวโน้มของน้ำหนักแห้งเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ทีละน้อย จนถึงวันที่ 11 และวันที่ 12 จะมีน้ำหนักแห้งสูงสุดคือ 179.0 มิลลิกรัม หลังจากนั้นจะเริ่มคงที่ ส่วนเส้นใยของรา Isolate B7 ในช่วงวันที่ 4-7 น้ำหนักแห้งจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และมีน้ำหนักแห้งสูงสุดวันที่ 8 คือ 830.0 มิลลิกรัม หลังจากนั้นจะเริ่มคงที่ ดังกราฟในรูปที่ 4.11 (ข้อมูลการทดลองแสดงในภาคผนวก ค) ดังนั้นระยะ stationary phase ของรา Isolate A19 คือ 12 วัน และรา Isolate B7 คือ 8 วัน ซึ่งเป็นระยะที่เหมาะสมในการนำมาใช้ในการย่อยสลายสีและลิกนิน เนื่องจากกระบวนการย่อยสลายลิกนินจะเกิดในระยะ secondary metabolism (Annele, 2001, Eaton and others, 1980) ที่ราไวต์รอตจะผลิต extracellular enzymes เข้าไปทำลายวงแหวนโพลิเมอร์ที่ซับซ้อนของลิกนินอันได้แก่ LiP MnP และ Laccase



รูปที่ 4.11 การเจริญเติบโตของรา Isolate A19 และรา Isolate B7 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose broth (PDB)

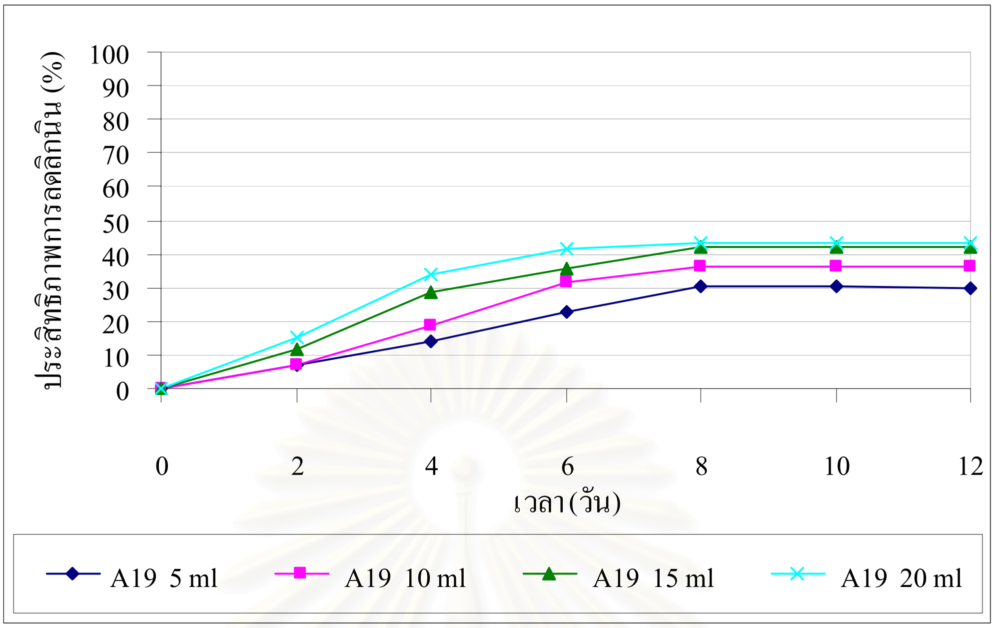
4.5 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงรา Isolate A19 และรา Isolate B7 ให้มีความสามารถในการลดความเข้มข้นของลิกนินและความเข้มข้นของสีของน้ำทิ้งในการผลิตลิกนิน

น้ำทิ้งที่นำมาใช้ในการทดลองนั้นเป็นน้ำทิ้งในการผลิตลิกนินโดยการตกตะกอนน้ำดำที่ความเป็นกรดด่าง 3 ด้วยกรดซัลฟิวริก โดยได้รับความอนุเคราะห์น้ำดำจากบริษัท แอดวานซ์ อะโกร จำกัด (มหาชน) อ. ศรีมหาโพธิ์ จ. ปราจีนบุรี น้ำทิ้งในการผลิตลิกนินมีค่าความเข้มข้นของลิกนินเริ่มต้นเฉลี่ย 7.46 กรัมต่อลิตร และค่าความเข้มข้นของสีเริ่มต้นเฉลี่ย 1833.33 Pt.Co unit

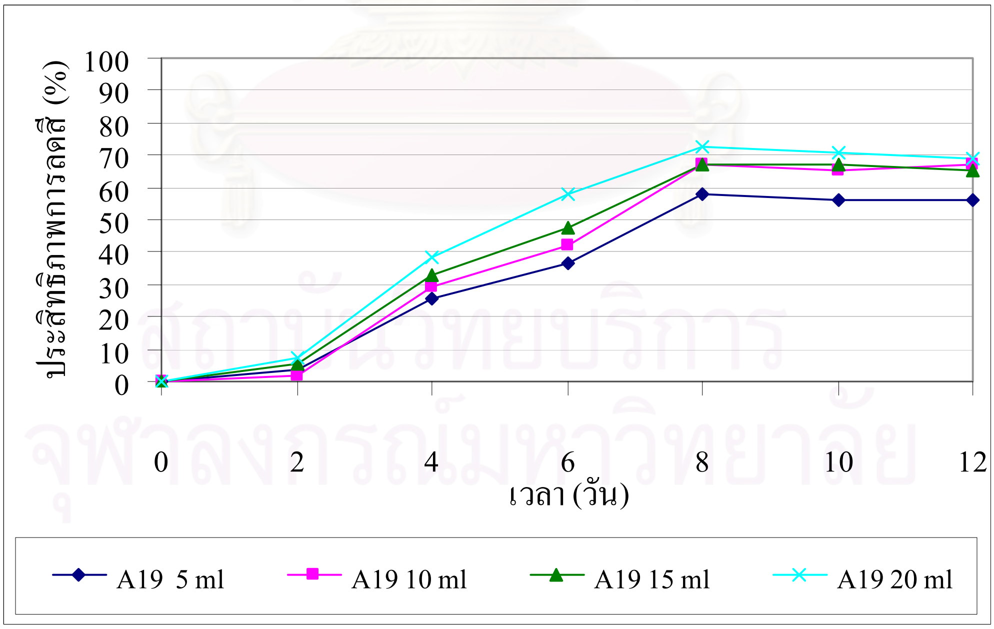
4.5.1 ผลการศึกษาปริมาณเริ่มต้นที่เหมาะสมของรา Isolate A19 และรา Isolate B7

จากการทดลองเลี้ยงรา Isolate A19 และรา Isolate B7 ในปริมาณที่แตกต่างกัน คือ 5 10 15 และ 20 มิลลิลิตร และถ่ายเชื้อราทั้งสองชนิดผสมกันในอัตราส่วนรา Isolate A19: รา Isolate B7 เท่ากับ 2.5: 2.5 5: 5 7.5: 7.5 10: 10 และ 12.5: 12.5 มิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงจากสูตร Czapek's Dox Medium (ภาคผนวก ก) จำนวน 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 5 บ่มที่อุณหภูมิห้องและเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 วัน แล้ววัดค่าความเข้มข้นของลิกนินและค่าความเข้มข้นของสีที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรและ 465 นาโนเมตร ตามลำดับ เพื่อหาปริมาณราเริ่มต้นที่น้อยที่สุดที่รามีความสามารถในการลดความเข้มข้นของลิกนินและสี จากผลการศึกษาพบว่ารา Isolate A19 มีประสิทธิภาพในการลดความเข้มข้นของลิกนินเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนถึงวันที่ 8 หลังจากนั้นจะมีประสิทธิภาพคงที่ (รูปที่ 4.12) ซึ่งการใช้รา Isolate A19 ปริมาณ 20 มิลลิลิตร จะให้ประสิทธิภาพในการลดลิกนินสูงสุดในเวลา 8 วัน รองลงมาคือราปริมาณ 15 มิลลิลิตร 10 มิลลิลิตร และ 5 มิลลิลิตร ตามลำดับ และจากการทดสอบทางสถิติพบว่าราปริมาณ 15 มิลลิลิตรไม่มีความแตกต่างกับราที่ปริมาณ 20 มิลลิลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาคผนวก ง)

ส่วนความสามารถในการลดสีพบว่ารา Isolate A19 มีความสามารถในการลดสีที่ปริมาณ 20 มิลลิลิตรมากที่สุดเช่นกัน รองลงมาคือ 15 มิลลิลิตร และ 10 มิลลิลิตร ที่มีความสามารถในการลดสีใกล้เคียงกันและไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาคผนวก ง) โดยที่รา 5 มิลลิลิตรจะลดสีลงได้น้อยที่สุด ดังรูปที่ 4.13 เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพที่ดีที่สุดในวันที่ 8 ของปริมาณราต่างๆ กันในการลดลิกนินและสีจากมากไปหาน้อยของรา Isolate A19 ได้ผลเป็นดังนี้ ราปริมาณ 20 มิลลิลิตร สามารถลดลิกนินได้ 43.55 เปอร์เซ็นต์ ลดสีได้ 72.73 เปอร์เซ็นต์ ราปริมาณ 15 มิลลิลิตร สามารถลดลิกนินได้ 42.17 เปอร์เซ็นต์ ลดสีได้ 67.27 เปอร์เซ็นต์ ราปริมาณ 10 มิลลิลิตร สามารถลดลิกนินได้ 36.40 เปอร์เซ็นต์ ลดสีได้ 67.27 เปอร์เซ็นต์ และราปริมาณ 5 มิลลิลิตร สามารถลดลิกนินได้ 30.18 เปอร์เซ็นต์ ลดสีได้ 58.18 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาคผนวก ค)

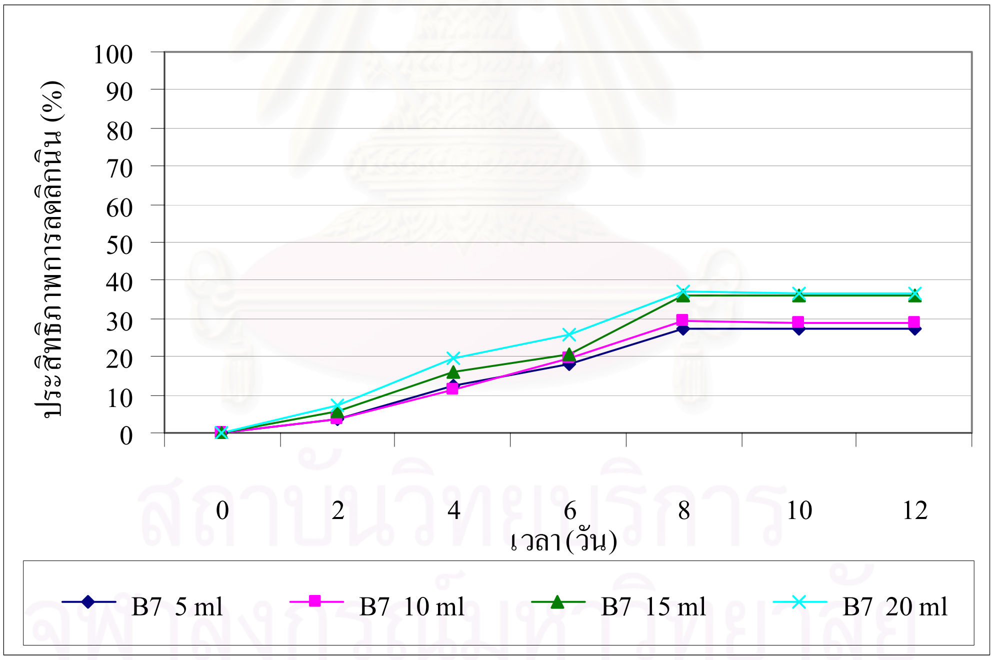


รูปที่ 4.12 แสดงการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการลดลิกนินของรา Isolate A19 โดยใช้รา Isolate A19 เริ่มต้นในปริมาณที่แตกต่างกัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงจากสูตร Czapek's Dox Medium บ่มที่อุณหภูมิห้องและเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 วัน

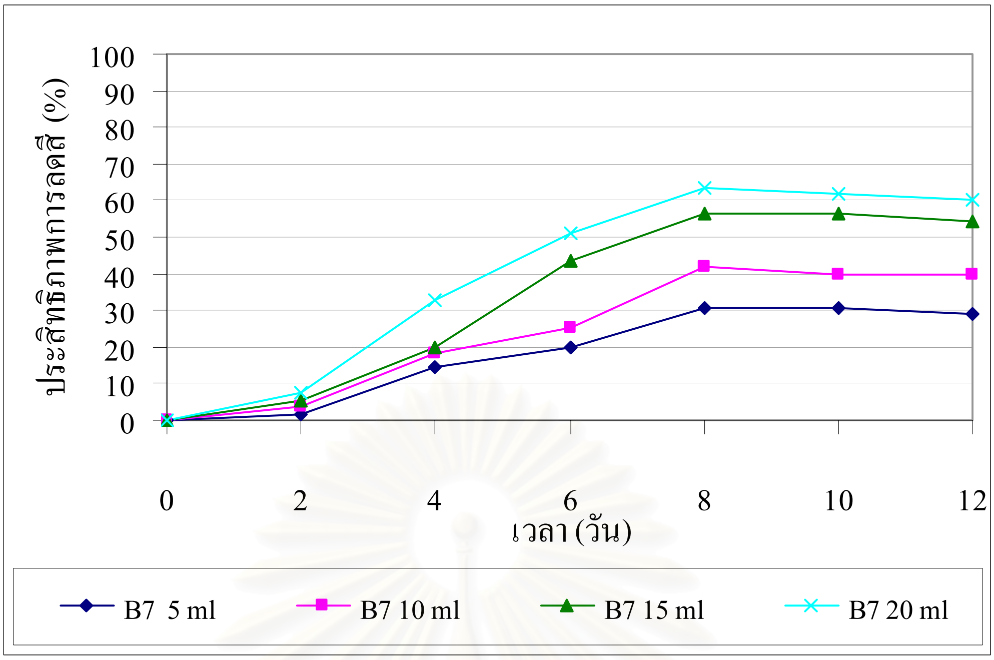


รูปที่ 4.13 แสดงการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการลดสีของรา Isolate A19 โดยใช้รา Isolate A19 เริ่มต้นในปริมาณที่แตกต่างกัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงจากสูตร Czapek's Dox Medium บ่มที่อุณหภูมิห้องและเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 วัน

จากการศึกษาประสิทธิภาพในการลดความเข้มข้นของลิกนินและสีของรา Isolate B7 พบว่า รา Isolate B7 ปริมาณ 20 มิลลิลิตร และ 15 มิลลิลิตรมีความสามารถในการลดลิกนินได้ใกล้เคียงกันและไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาคผนวก ง) รองลงมาได้แก่ราปริมาณ 10 มิลลิลิตร และ 5 มิลลิลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 4.14) และประสิทธิภาพในการลดสีก็ให้ผลเช่นเดียวกันคือ รา Isolate B7 ที่สามารถลดสีได้มากที่สุดคือปริมาณ 20 มิลลิลิตร และ 15 มิลลิลิตรซึ่งมีความสามารถในการลดสีได้ใกล้เคียงกันไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ รองลงมาได้แก่ราปริมาณ 10 มิลลิลิตร และ 5 มิลลิลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 4.15) แต่ถึงอย่างไรก็ตามทั้งการลดลิกนินและสีของ รา Isolate B7 ยังมีประสิทธิภาพไม่ดีเท่ารา Isolate A19 เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพที่ดีที่สุดในวันที่ 8 ของปริมาณราต่างๆ กันในการลดลิกนินและสีจากมากไปหาน้อยของรา Isolate B7 ได้ผลเป็นดังนี้ รา ปริมาณ 20 มิลลิลิตร สามารถลดลิกนินได้ 36.86 เปอร์เซ็นต์ ลดสีได้ 63.64 เปอร์เซ็นต์ ราปริมาณ 15 มิลลิลิตร สามารถลดลิกนินได้ 36.18 เปอร์เซ็นต์ ลดสีได้ 56.36 เปอร์เซ็นต์ ราปริมาณ 10 มิลลิลิตร สามารถลดลิกนินได้ 29.26 เปอร์เซ็นต์ ลดสีได้ 41.82 เปอร์เซ็นต์ และราปริมาณ 5 มิลลิลิตร สามารถลดลิกนินได้ 27.19 เปอร์เซ็นต์ ลดสีได้ 30.91 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาคผนวก ค)



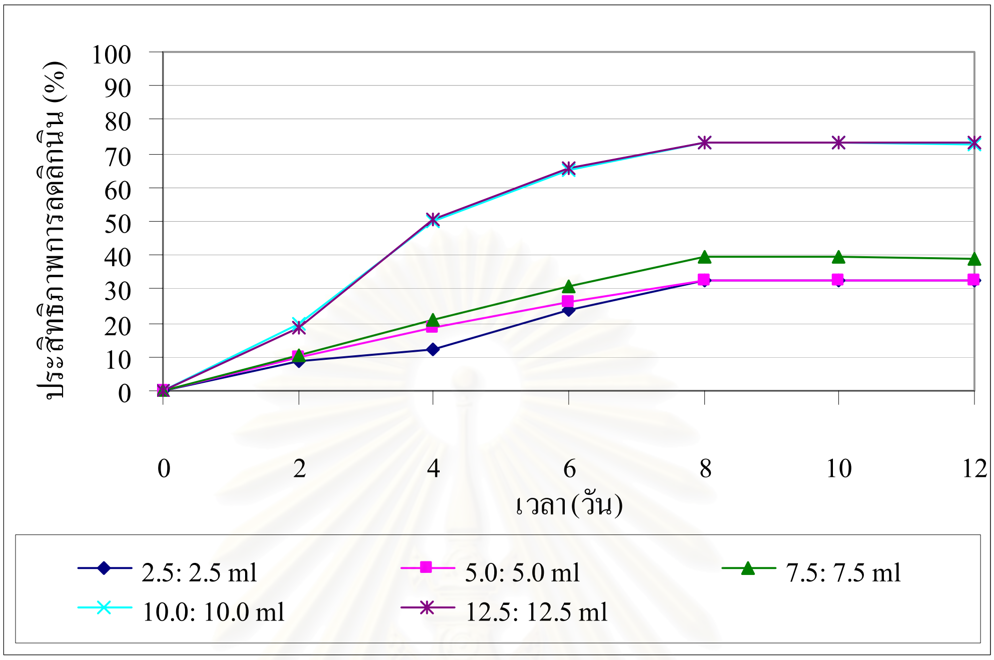
รูปที่ 4.14 แสดงการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการลดลิกนินของรา Isolate B7 โดยใช้ รา Isolate B7 เริ่มต้นในปริมาณที่แตกต่างกัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงจากสูตร Czapek's Dox Medium บ่มที่อุณหภูมิห้องและเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 วัน



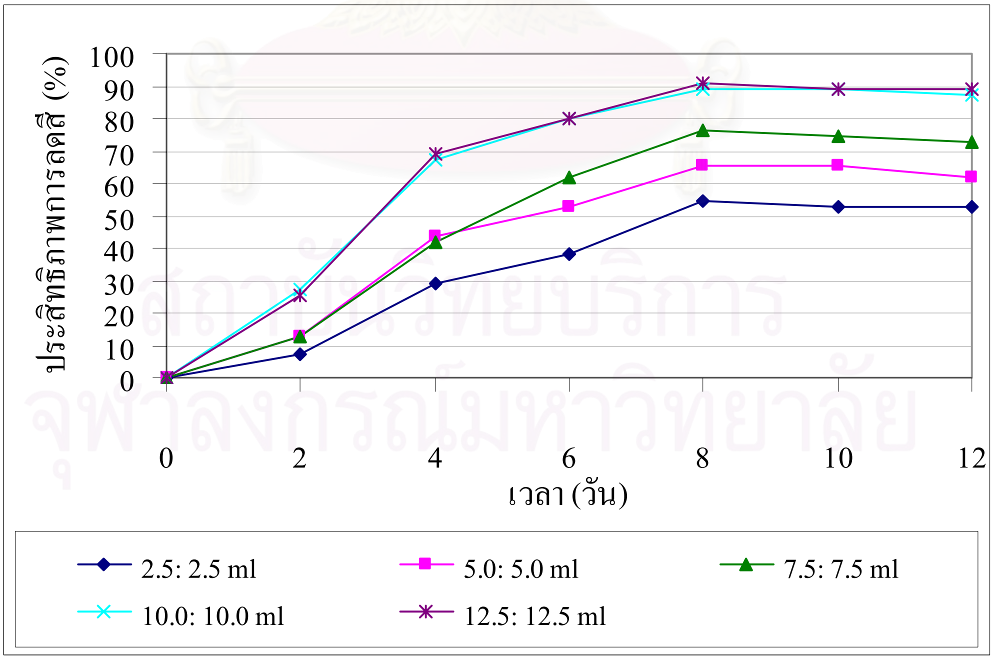
รูปที่ 4.15 แสดงการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการลดสีของรา Isolate B7 โดยใช้รา Isolate B7 เริ่มต้นในปริมาณที่แตกต่างกัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงจากสูตร Czapek's Dox Medium บ่มที่อุณหภูมิห้องและเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 วัน

ในการใช้เชื้อผสมระหว่างรา Isolate A19: รา Isolate B7 ที่มีอัตราส่วนเท่ากับ 10.0: 10.0 และ 12.5: 12.5 มิลลิลิตร มีประสิทธิภาพในการลดลิกนินและสีได้มากที่สุดและไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาคผนวก ง) รองลงมาเป็นราอัตราส่วน 7.5: 7.5 5.0: 5.0 และ 2.5: 2.5 มิลลิลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 4.16 และ รูปที่ 4.17) ซึ่งราไวต์รอตนั้นสามารถย่อยสลายลิกนินได้เนื่องจากผลิต extracellular enzymes ที่เข้าไปทำลายวงแหวนโพลิเมอร์ที่ซับซ้อนของลิกนินทำให้ค่าความเข้มข้นของลิกนินลดลง และทำให้ค่าความเข้มข้นของสีลดลงด้วยเช่นกัน เป็นที่สังเกตว่าราที่ผสมกันระหว่างรา Isolate A19 และรา Isolate B7 จะสามารถลดลิกนินและสีได้ดีกว่าการใช้ราชนิดใดชนิดหนึ่ง ดังนั้นจึงเลือกอัตราส่วนรา Isolate A19: รา Isolate B7 เท่ากับ 10.0: 10.0 มิลลิลิตร เป็นอัตราส่วนเริ่มต้นที่เหมาะสมในการทำการทดลองขั้นต่อไป เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพที่ดีที่สุดในวันที่ 8 ของอัตราส่วนราต่างๆ กันในการลดลิกนินและสีจากมากไปหาน้อยของรา Isolate A19: รา Isolate B7 ได้ผลเป็นดังนี้ ราอัตราส่วน 10.0: 10.0 มิลลิลิตร สามารถลดลิกนินได้ 73.04 เปอร์เซ็นต์ ลดสีได้ 85.45 เปอร์เซ็นต์ ราอัตราส่วน 12.5: 12.5 มิลลิลิตร สามารถลดลิกนินและลดสีได้เท่ากับที่ราอัตราส่วน 10.0: 10.0 มิลลิลิตร คือลดลิกนินได้ 73.04 เปอร์เซ็นต์ และลดสีได้ 85.45 เปอร์เซ็นต์ ราอัตราส่วน 7.5: 7.5 มิลลิลิตร สามารถลดลิกนินได้ 39.40 เปอร์เซ็นต์ ลดสีได้ 76.36 เปอร์เซ็นต์ ราอัตราส่วน 5.0: 5.0 มิลลิลิตร

สามารถลดลิกนินได้ 32.49 เปอร์เซ็นต์ ลดสีได้ 65.45 เปอร์เซ็นต์ และราอัตราส่วน 2.5: 2.5 มิลลิลิตร สามารถลดลิกนินได้ 32.72 เปอร์เซ็นต์ ลดสีได้ 54.55 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาคผนวก ค)



รูปที่ 4.16 แสดงการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการลดลิกนิน เมื่อใช้รา Isolate A19 และ รา Isolate B7 ผสมกันในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงจากสูตร Czapek's Dox Medium บ่มที่อุณหภูมิห้องและเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 วัน

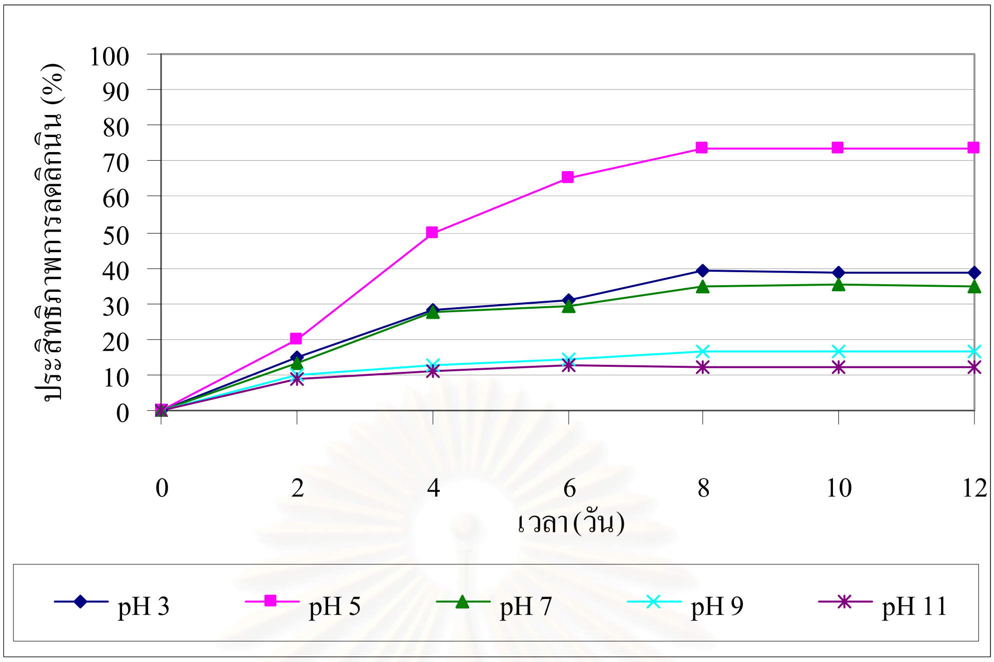


รูปที่ 4.17 แสดงการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการลดสี เมื่อใช้รา Isolate A19 และ รา Isolate B7 ผสมกันในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงจากสูตร Czapek's Dox Medium บ่มที่อุณหภูมิห้องและเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 วัน

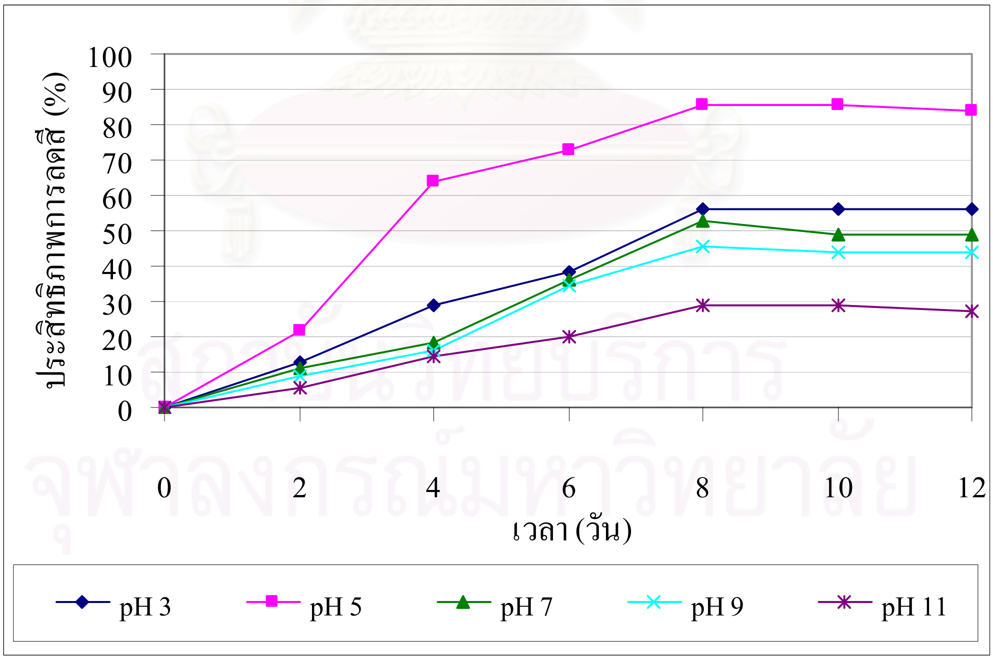
4.5.2 ผลการศึกษาความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่เหมาะสมของรา Isolate A19 และรา Isolate B7

จากการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงจากสูตร Czapek's Dox Medium (ภาคผนวก ก) จำนวน 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร โดยทำการปรับความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีระดับต่างกัน คือ 3 5 7 9 และ 11 แล้วถ่ายรา Isolate A19: รา Isolate B7 อัตราส่วน 10.0: 10.0 มิลลิลิตรลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิห้องและเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 วัน แล้ววัดค่าความเข้มข้นของลิกนินและค่าความเข้มข้นของสีที่คงอยู่ พบว่าที่ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5 มีประสิทธิภาพในการลดลิกนินและสีได้ดีที่สุดและมีความแตกต่างกับที่ความเป็นกรดด่างอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาคผนวก ง) ที่ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 3 สามารถลดลิกนินและสีได้มากกว่าที่ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7 เล็กน้อยและไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และเมื่อความเป็นกรดด่างสูงขึ้นเท่ากับ 9 และ 11 จะมีประสิทธิภาพในการลดลิกนินและสีได้ต่ำมาก (รูปที่ 23 และรูปที่ 24) แสดงว่าที่ความเป็นกรดด่างสูงเป็นสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการย่อยสลายลิกนินและสีของรา ทั้งนี้เนื่องจากราไวต์รอตส่วนใหญ่สามารถย่อยสลายลิกนินที่ภาวะเป็นกลางค่อนข้างเป็นกรดเล็กน้อย ที่ความเป็นกรดด่างประมาณ 5 (Bajpai and Bajpai, 1994) จากงานวิจัยโดยใช้ราไวต์รอตอื่นๆ ก็ให้ผลการศึกษาในทำนองเดียวกัน ได้แก่ *Schizophyllum commune* มีความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในช่วง 4-5 (Belsare and Prasad, 1988) และ *Phanerochaete chrysosporium* มีความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในช่วง 4.3-4.8 (Eaton and others, 1980) เป็นต้น เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพที่ดีที่สุดหลังจากปรับความเป็นกรดด่างในระดับต่างๆ กันในการลดลิกนินและสีจากมากไปหาน้อย ได้ผลเป็นดังนี้ ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5 สามารถลดลิกนินได้ 73.27 เปอร์เซ็นต์ ลดสีได้ 85.45 เปอร์เซ็นต์ ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 3 สามารถลดลิกนินได้ 39.17 เปอร์เซ็นต์ ลดสีได้ 56.36 เปอร์เซ็นต์ ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7 สามารถลดลิกนินได้ 34.79 เปอร์เซ็นต์ ลดสีได้ 52.73 เปอร์เซ็นต์ ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 9 สามารถลดลิกนินได้ 16.59 เปอร์เซ็นต์ ลดสีได้ 45.45 เปอร์เซ็นต์ และความเป็นกรดด่างเท่ากับ 11 สามารถลดลิกนินได้ 12.21 เปอร์เซ็นต์ ลดสีได้ 29.09 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาคผนวก ค)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.18 แสดงการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการลดลิกนินของรา Isolate A19 และรา Isolate B7 เมื่อทำการปรับความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีระดับต่างกัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงจากสูตร Czapek's Dox Medium บ่มที่อุณหภูมิห้องและเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 วัน



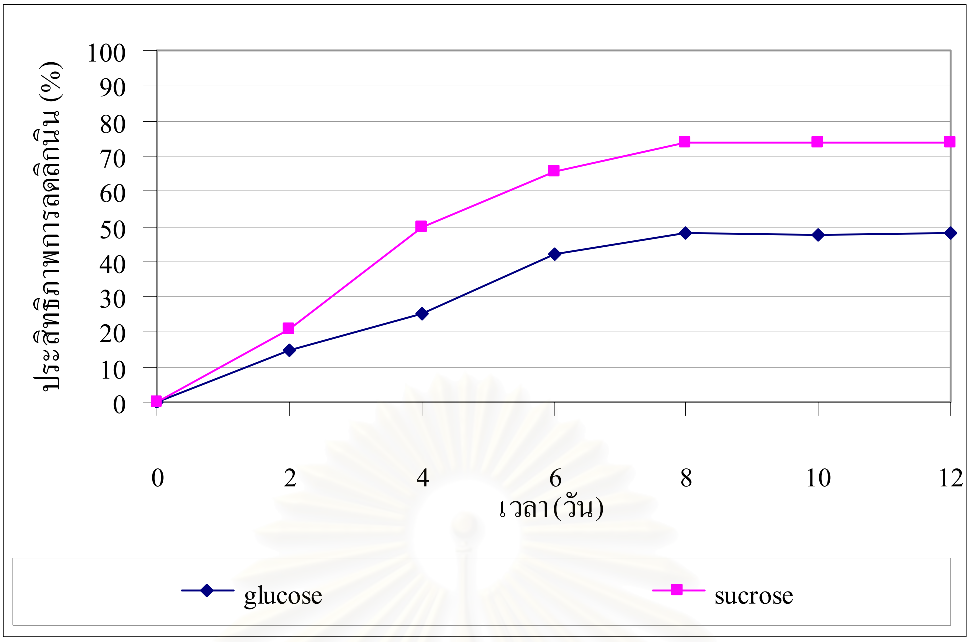
รูปที่ 4.19 แสดงการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการลดสีของรา Isolate A19 และรา Isolate B7 เมื่อทำการปรับความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีระดับต่างกัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงจากสูตร Czapek's Dox Medium บ่มที่อุณหภูมิห้องและเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 วัน

4.5.3 ผลการศึกษาองค์ประกอบและความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการลดค่าความเข้มข้นของลิกนินและค่าความเข้มข้นของสีของน้ำทิ้งในการผลิตลิกนิน

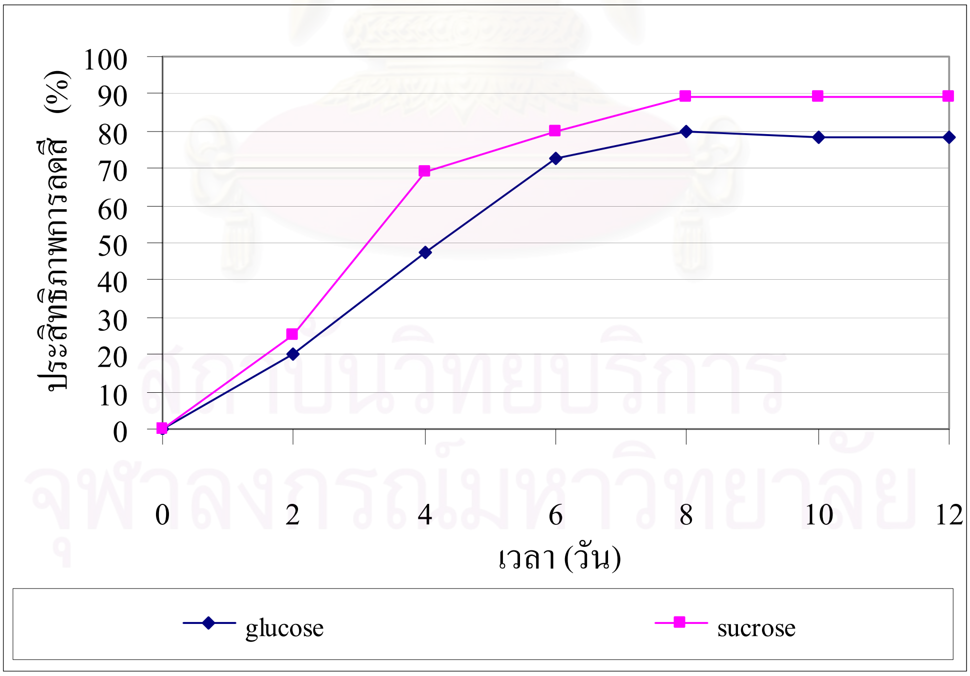
4.5.3.1 ผลการศึกษาการหาชนิดของแหล่งอาหารคาร์บอนที่เหมาะสมของรา Isolate A19 และรา Isolate B7

จากการเลี้ยงราด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผันแปรแหล่งอาหารคาร์บอน 2 ชนิด คือ น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลซูโครส โดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงจากสูตร Czapek's Dox Medium (ภาคผนวก ก) จำนวน 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ผันแปรแหล่งอาหารคาร์บอนทั้งสองชนิด ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5 ถ่ายรา Isolate A19: รา Isolate B7 อัตราส่วน 10.0: 10.0 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิห้องและเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 วัน แล้ววัดค่าความเข้มข้นของลิกนินและค่าความเข้มข้นของสีที่คงอยู่ พบว่าน้ำตาลซูโครสมีประสิทธิภาพดีกว่าเล็กน้อยในช่วง 2 วันแรก หลังจากนั้นประสิทธิภาพในการลดลิกนินและสีจะเพิ่มขึ้น (รูปที่ 4.20 และรูปที่ 4.21) เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพที่ดีที่สุดในวันที่ 8 โดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งอาหารคาร์บอน ได้ผลเป็นดังนี้ สามารถลดลิกนินได้ 47.93 เปอร์เซ็นต์ ลดสีได้ 80.00 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งอาหารคาร์บอน ได้ผลเป็นดังนี้ สามารถลดลิกนินได้ 73.50 เปอร์เซ็นต์ ลดสีได้ 89.09 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ค) ดังนั้นจึงเลือกใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งอาหารคาร์บอนที่จะทำการทดลองในขั้นต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.20 แสดงการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการลดลิกนินของรา Isolate A19 และรา Isolate B7 เมื่อเลี้ยงราด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผันแปรแหล่งอาหารคาร์บอน 2 ชนิด คือ น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลซูโครส ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงจากสูตร Czapek's Dox Medium บ่มที่อุณหภูมิห้องและเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 วัน ที่ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5

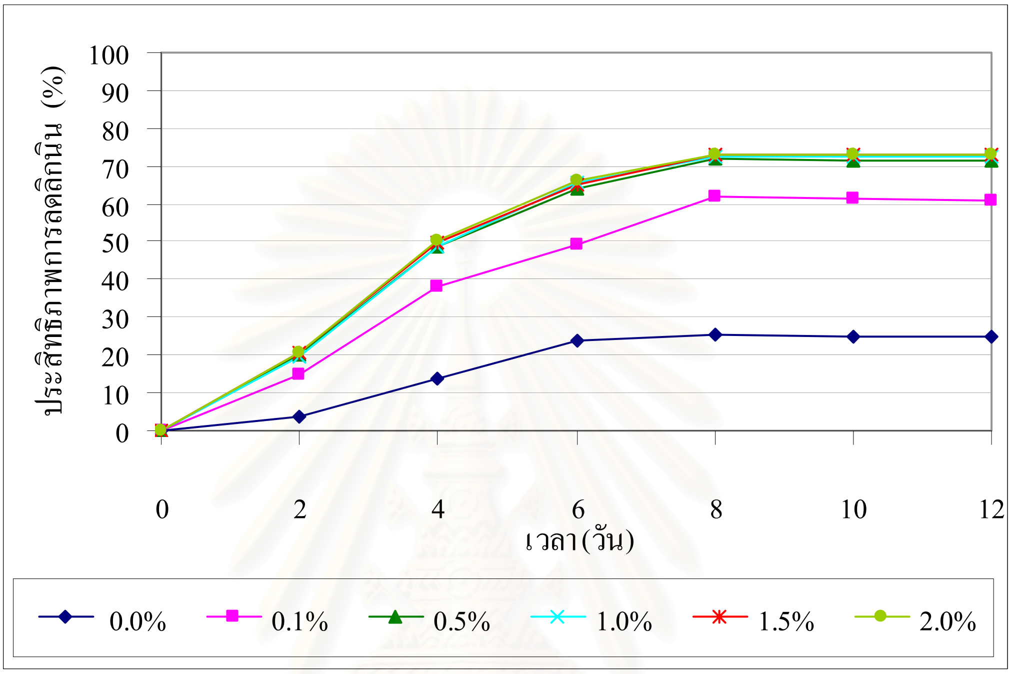


รูปที่ 4.21 แสดงการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการลดสีของรา Isolate A19 และรา Isolate B7 เมื่อเลี้ยงราด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผันแปรแหล่งอาหารคาร์บอน 2 ชนิด คือ น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลซูโครส ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงจากสูตร Czapek's Dox Medium บ่มที่อุณหภูมิห้องและเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 วัน ที่ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5

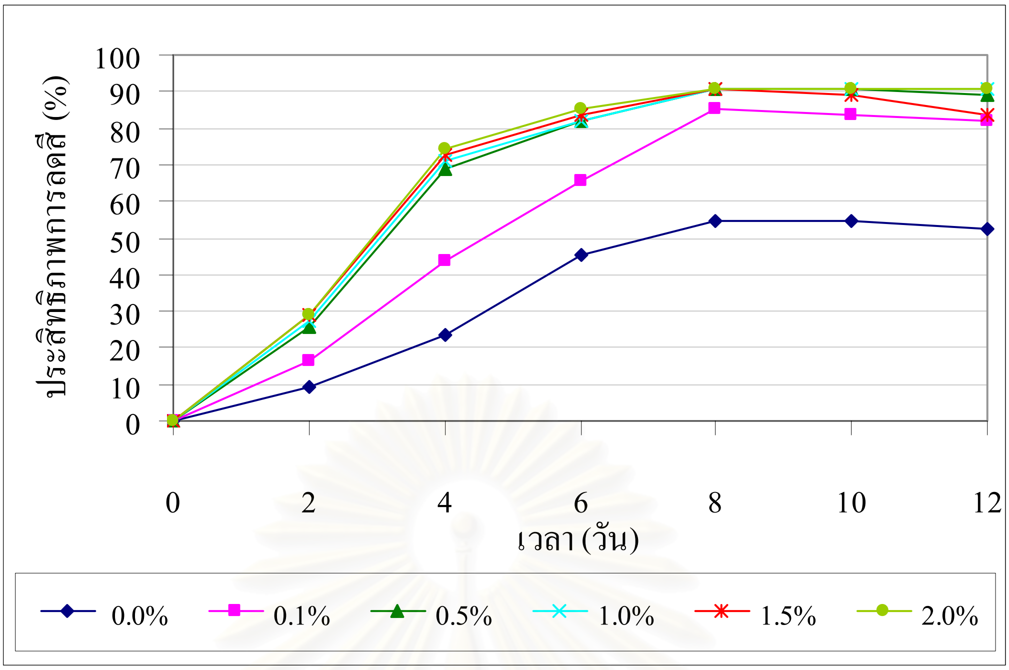
4.5.3.2 ผลการศึกษาความเข้มข้นของแหล่งอาหารคาร์บอนที่เหมาะสมของรา Isolate A19 และรา Isolate B7

จากการเลี้ยงราด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แหล่งอาหารคาร์บอนที่เหมาะสมดังหัวข้อ 4.5.3.1 ซึ่งได้แก่น้ำตาลซูโครส ผันแปรความเข้มข้นต่างๆ กัน คือ 0.0 0.1 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงจากสูตร Czapek's Dox Medium (ภาคผนวก ก) จำนวน 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5 แล้วถ่ายรา Isolate A19: รา Isolate B7 อัตราส่วน 10.0: 10.0 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิห้องและเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 วัน แล้ววัดค่าความเข้มข้นของลิกนินและค่าความเข้มข้นของสีที่คงอยู่ พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของแหล่งอาหารคาร์บอนเท่ากับ 0.0 เปอร์เซ็นต์ จะมีประสิทธิภาพในการลดลิกนินและสีที่น้อยที่สุด ประสิทธิภาพในการลดลิกนินเมื่อความเข้มข้นของแหล่งอาหารคาร์บอนเท่ากับ 0.5-2.0 เปอร์เซ็นต์ มีค่าใกล้เคียงกันมาก ส่วนประสิทธิภาพในการลดสีจะแตกต่างกันบ้างเล็กน้อยซึ่งเมื่อทดสอบทางสถิติถือว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และที่ความเข้มข้นของแหล่งอาหารคาร์บอนเท่ากับ 0.1 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพในการลดลิกนินและสีได้ดีกว่าที่ 0.0 เปอร์เซ็นต์ แต่น้อยกว่าที่ 0.5-2.0 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4.22 และรูปที่ 4.23) เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการลดลิกนินและสี ในกรณีที่ไม่ได้เพิ่มแหล่งอาหารคาร์บอนที่ 0.0 เปอร์เซ็นต์ และเพิ่มแหล่งอาหารคาร์บอนที่ระดับ 0.1 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเมื่อเพิ่มแหล่งอาหารคาร์บอนในทุกระดับความเข้มข้นจะสามารถลดลิกนินและสีได้มากกว่าที่ 0.0 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้เนื่องจากราไวต์รอตไม่สามารถเจริญเติบโตได้โดยใช้ลิกนินเป็นแหล่งอาหารคาร์บอนเพียงชนิดเดียว แต่ยังต้องการการเพิ่มแหล่งอาหารคาร์บอนเพื่อเป็น co-substrate ด้วย (Eaton and others, 1980) จึงอาจกล่าวได้ว่าแหล่งอาหารคาร์บอนเป็นปัจจัยสำคัญในการเกิดกระบวนการย่อยสลายลิกนิน (Belsare and Prasad, 1980) สอดคล้องกับรายงานการวิจัยที่เมื่อเพิ่มแหล่งอาหารคาร์บอน ราไวต์รอตจะมีประสิทธิภาพลดสีได้ 92 เปอร์เซ็นต์ แต่หากไม่เพิ่มแหล่งอาหารคาร์บอนจะมีประสิทธิภาพลดสีลงได้น้อยกว่าที่ 78 เปอร์เซ็นต์ (Nagarathnamma and Bajpai, 1999) นอกจากนี้ในงานวิจัยของ Archibald และคณะ (1990) พบว่าหากไม่มีการเพิ่มแหล่งอาหารคาร์บอนจะไม่มีประสิทธิภาพในการลดสีเลย และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแหล่งอาหารคาร์บอนเป็น 0.5-2.0 เปอร์เซ็นต์ จะมีประสิทธิภาพในการลดลิกนินและสีไม่แตกต่างกันมากนัก อาจสรุปได้ว่าความเข้มข้นของแหล่งอาหารคาร์บอนเริ่มต้นที่ 0.5 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณมากเพียงพอต่อความต้องการในการย่อยสลายลิกนินและสีของเชื้อผสม รา Isolate A19 และ รา Isolate B7 เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพที่ดีที่สุดซึ่งผันแปรความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสในระดับต่างๆ กันจากมากไปหาน้อย ได้ผลเป็นดังนี้ ที่ความเข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ สามารถลดลิกนินได้ 73.27 เปอร์เซ็นต์ ลดสีได้ 90.91 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ สามารถลดลิกนินได้ 73.04 เปอร์เซ็นต์ ลดสีได้ 90.91 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์

สามารถลดลิกนินได้ 72.58 เปอร์เซ็นต์ ลดสีได้ 90.91 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ สามารถลดลิกนินได้ 71.88 เปอร์เซ็นต์ ลดสีได้ 90.91 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ สามารถลดลิกนินได้ 61.74 เปอร์เซ็นต์ ลดสีได้ 85.45 เปอร์เซ็นต์ และความเข้มข้น 0.0 เปอร์เซ็นต์ สามารถลดลิกนินได้ 25.35 เปอร์เซ็นต์ ลดสีได้ 54.55 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาคผนวก ค)



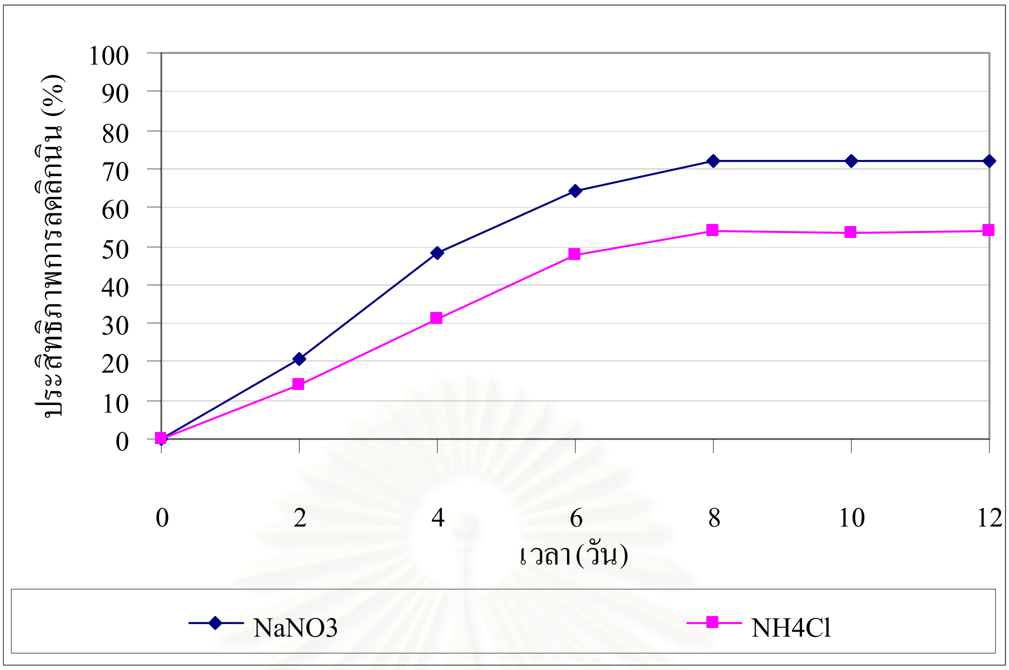
รูปที่ 4.22 แสดงการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการลดลิกนิน เมื่อเลี้ยงรา Isolate A19 และรา Isolate B7 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งอาหารคาร์บอนผันแปรความเข้มข้นต่างๆ กัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงจากสูตร Czapek's Dox Medium บ่มที่อุณหภูมิห้องและเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 วัน ที่ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5



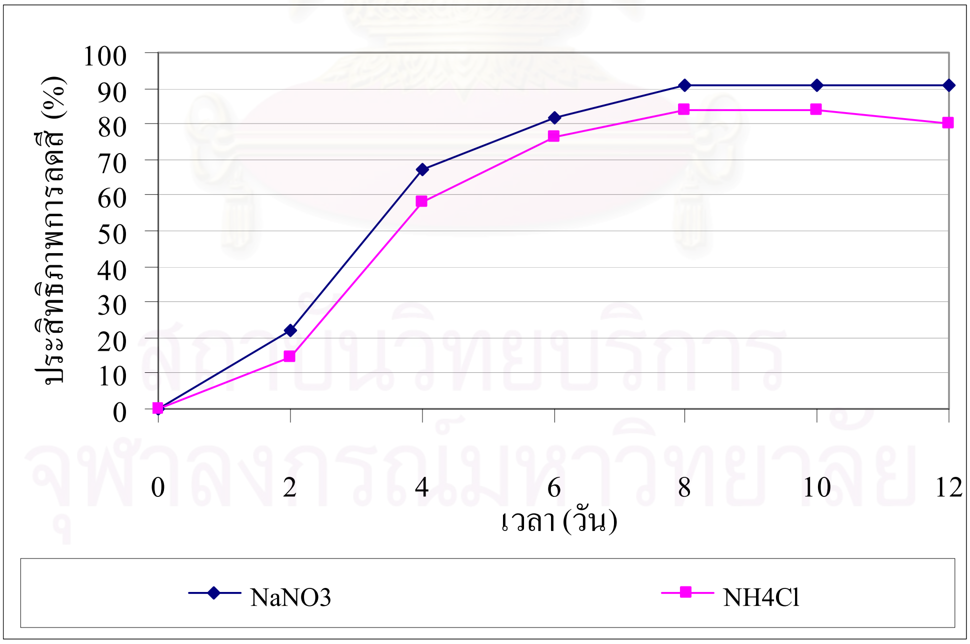
รูปที่ 4.23 แสดงการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการลดสี เมื่อเลี้ยงรา Isolate A19 และรา Isolate B7 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งอาหารคาร์บอนผันแปรความเข้มข้นต่างๆ กัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงจากสูตร Czapek's Dox Medium บ่มที่อุณหภูมิห้องและเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 วัน ที่ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5

4.5.3.3 ผลการศึกษาการหาชนิดของแหล่งอาหารไนโตรเจนที่เหมาะสมของรา Isolate A19 และรา Isolate B7

จากการเลี้ยงราด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผันแปรแหล่งอาหารไนโตรเจน 2 ชนิด คือ แอมโมเนียมคลอไรด์ และ โซเดียมไนเตรต โดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงจากสูตร Czapek's Dox Medium (ภาคผนวก ก) จำนวน 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร โดยใช้ซูโครสเป็นแหล่งอาหารคาร์บอนความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5 แล้วถ่ายรา Isolate A19: รา Isolate B7 อัตราส่วน 10.0: 10.0 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิห้องและเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 วัน แล้ววัดค่าความเข้มข้นของลิกนินและค่าความเข้มข้นของสีที่คงอยู่ พบว่าโซเดียมไนเตรตเป็นแหล่งอาหารไนโตรเจนที่เหมาะสมมากกว่าแอมโมเนียมคลอไรด์ เพราะมีประสิทธิภาพในการลดลิกนินและสีได้ดีกว่า (รูปที่ 4.24 และรูปที่ 4.25) เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพที่ดีที่สุดซึ่งใช้โซเดียมไนเตรตเป็นแหล่งอาหารไนโตรเจนได้ผลเป็นดังนี้ สามารถลดลิกนินได้ 72.12 เปอร์เซ็นต์ ลดสีได้ 90.91 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ เป็นแหล่งอาหารไนโตรเจนได้ผลเป็นดังนี้ สามารถลดลิกนินได้ 53.92 เปอร์เซ็นต์ ลดสีได้ 83.64 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ค)



รูปที่ 4.24 แสดงการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการลดลิกนิน เมื่อเลี้ยงรา Isolate A19 และรา Isolate B7 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผันแปรแหล่งอาหารไนโตรเจน 2 ชนิด คือ โซเดียมไนเตรต และแอมโมเนียมคลอไรด์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงจากสูตร Czapek's Dox Medium บ่มที่อุณหภูมิห้องและเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 วัน ที่ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5



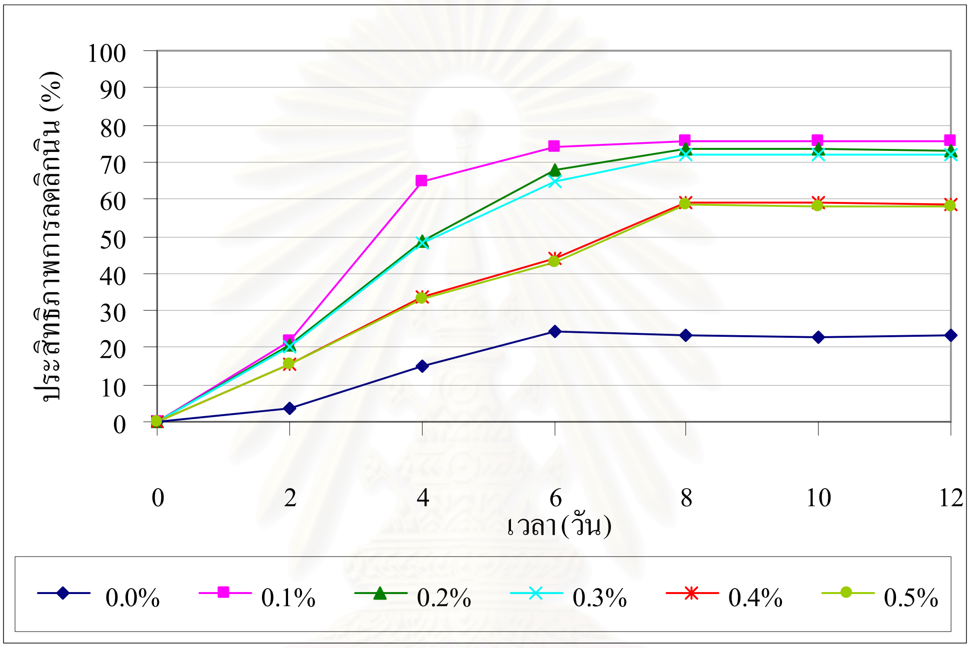
รูปที่ 4.25 แสดงการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการลดสี เมื่อเลี้ยงรา Isolate A19 และรา Isolate B7 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผันแปรแหล่งอาหารไนโตรเจน 2 ชนิด คือ โซเดียมไนเตรต และแอมโมเนียมคลอไรด์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงจากสูตร Czapek's Dox Medium บ่มที่อุณหภูมิห้องและเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 วัน ที่ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5

4.5.3.4 ผลการศึกษาความเข้มข้นของแหล่งอาหารไนโตรเจนที่เหมาะสมของรา Isolate A19 และรา Isolate B7

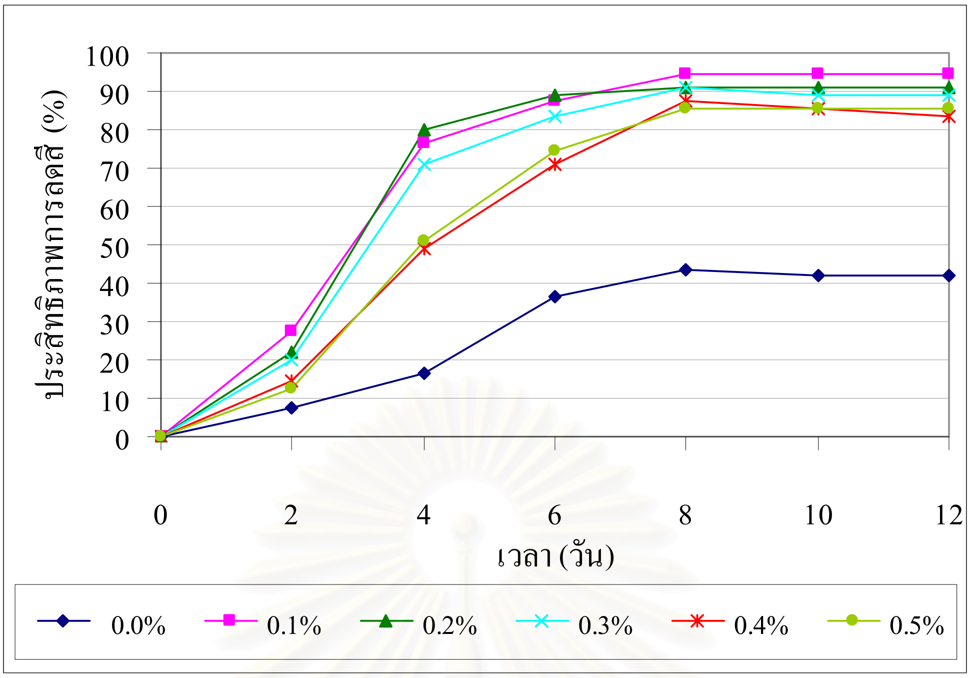
จากการเลี้ยงรา Isolate A19 และรา Isolate B7 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แหล่งอาหารไนโตรเจนที่เหมาะสมดังหัวข้อ 4.5.3.3 ซึ่งได้แก่โซเดียมไนเตรต ผันแปรความเข้มข้นต่างๆ กัน คือ 0.0 0.1 0.2 0.3 0.4 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ซูโครสเป็นแหล่งอาหารคาร์บอนความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงจากสูตร Czapek's Dox Medium (ภาคผนวก ก) จำนวน 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5 แล้วถ่ายรา Isolate A19: รา Isolate B7 อัตราส่วน 10.0: 10.0 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิห้องและเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 วัน แล้ววัดค่าความเข้มข้นของลิกนินและค่าความเข้มข้นของสีที่คงอยู่ พบว่าที่ความเข้มข้นของแหล่งอาหารไนโตรเจนเท่ากับ 0.1 เปอร์เซ็นต์มีประสิทธิภาพในการลดลิกนินและสีดีที่สุด รองลงมาคือที่ความเข้มข้น 0.2 และ 0.3 เปอร์เซ็นต์มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกัน และที่ความเข้มข้น 0.4 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพน้อยลงตามลำดับ (รูปที่ 4.26 และรูปที่ 4.27) แสดงให้เห็นว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแหล่งอาหารไนโตรเจน ประสิทธิภาพในการลดสีและลิกนินจะลดน้อยลงและขณะที่หากเมื่อไม่มีการเพิ่มแหล่งอาหารไนโตรเจนเลย ที่ 0.0 เปอร์เซ็นต์ จะมีประสิทธิภาพในการลดลิกนินและสีได้น้อยที่สุด มีรายงานว่าราไวต์รอตจะสามารถผลิต extracellular enzymes ได้ในสภาวะที่มีปริมาณไนโตรเจนที่เพียงพอ (Pointing, 2001, Eaton and others, 1980) ซึ่งในกระบวนการย่อยสลายลิกนินนั้นต้องการปริมาณไนโตรเจนเพียงเล็กน้อยในระหว่างการเกิด secondary metabolism (Annele, 2001) จึงอาจกล่าวได้ว่าแหล่งอาหารไนโตรเจนเป็นปัจจัยสำคัญในการเกิดกระบวนการย่อยสลายลิกนินเช่นกัน (Belsare and Prasad, 1988) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่ความเข้มข้นของแหล่งอาหารไนโตรเจนเท่ากับ 0.1 เปอร์เซ็นต์จะมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายลิกนินและสีได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพที่ดีที่สุดเมื่อผันแปรความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรตในระดับต่างๆ กันจากมากไปหาน้อย ได้ผลเป็นดังนี้ ที่ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ สามารถลดลิกนินได้ 75.81 เปอร์เซ็นต์ ลดสีได้ 94.55 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ สามารถลดลิกนินได้ 73.50 เปอร์เซ็นต์ ลดสีได้ 90.91 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ สามารถลดลิกนินได้ 72.12 เปอร์เซ็นต์ ลดสีได้ 90.91 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ สามารถลดลิกนินได้ 58.99 เปอร์เซ็นต์ ลดสีได้ 87.27 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ สามารถลดลิกนินได้ 58.29 เปอร์เซ็นต์ ลดสีได้ 85.45 เปอร์เซ็นต์ และความเข้มข้น 0.0 เปอร์เซ็นต์ สามารถลดลิกนินได้ 23.50 เปอร์เซ็นต์ ลดสีได้ 43.64 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาคผนวก ค)

จากการหาความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพในการลดลิกนินและประสิทธิภาพในการลดสีเมื่อเลี้ยงรา Isolate A19 และรา Isolate B7 ในสภาวะที่เหมาะสม พบว่าค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์

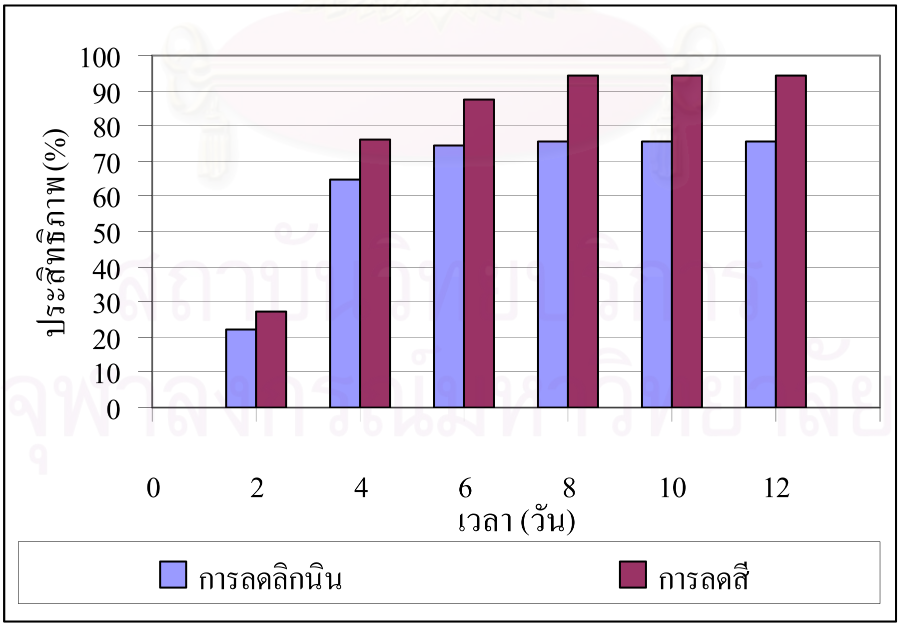
ระหว่างประสิทธิภาพในการลดลิกนินและประสิทธิภาพในการลดสี มีค่าเป็น .998 มีค่า Sig. เท่ากับ .000 แสดงว่าประสิทธิภาพในการลดลิกนินและประสิทธิภาพในการลดสีมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ .01 (ภาคผนวก ง) โดยรูปที่ 4.28 แสดงประสิทธิภาพในการลดลิกนินและประสิทธิภาพในการลดสี เมื่อเลี้ยงรา Isolate A19 และรา Isolate B7 ในสภาวะที่เหมาะสม และเมื่อปรับสภาวะของน้ำทิ้งให้เหมาะสมแล้วเปรียบเทียบระหว่างชุดควบคุมและชุดที่เติมรา Isolate A19 และรา Isolate B7 แสดงดังรูปที่ 4.29



รูปที่ 4.26 แสดงการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการลดลิกนิน เมื่อเลี้ยงรา Isolate A19 และรา Isolate B7 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้โซเดียมไนเตรตเป็นแหล่งอาหารไนโตรเจนผันแปรความเข้มข้นต่างๆ กันในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงจากสูตร Czapek's Dox Medium บ่มที่อุณหภูมิห้องและเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 วัน ที่ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5



รูปที่ 4.27 แสดงการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการลดสี เมื่อเลี้ยงรา Isolate A19 และรา Isolate B7 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้โซเดียมไนเตรตเป็นแหล่งอาหารไนโตรเจนผันแปรความเข้มข้นต่างๆ กัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงจากสูตร Czapek's Dox Medium บ่มที่อุณหภูมิห้องและเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 วัน ที่ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5



รูปที่ 4.28 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพในการลดลิกนินและประสิทธิภาพในการลดสี เมื่อเลี้ยงรา Isolate A19 และ รา Isolate B7 ในสภาวะที่เหมาะสม

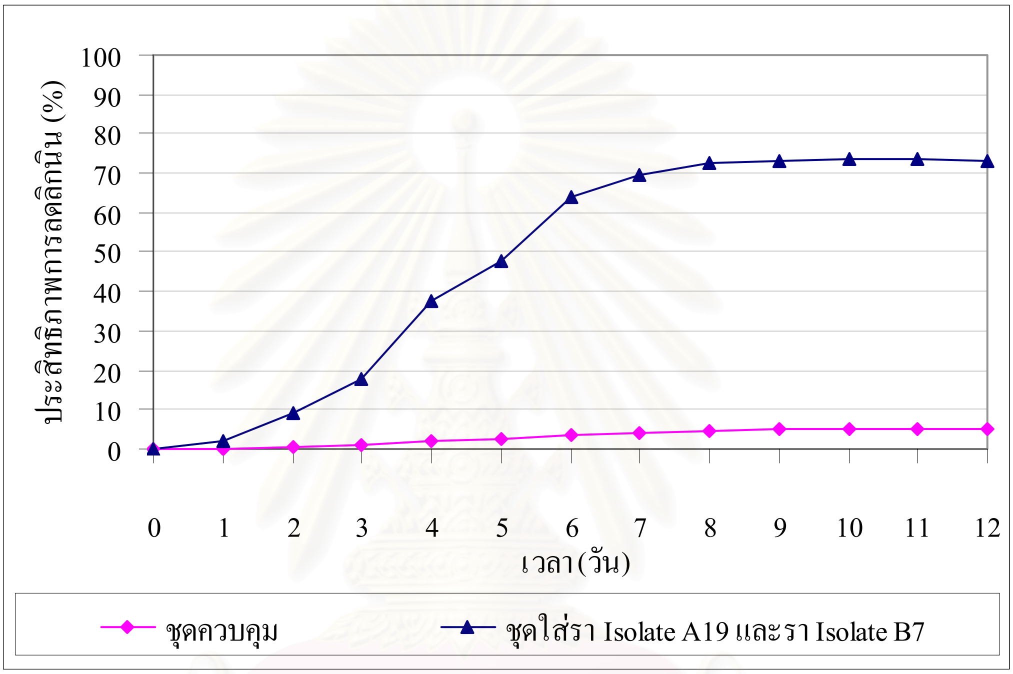
ชุดควบคุม ชุดที่เติมรา Isolate A19 และรา Isolate B7

รูปที่ 4.29 แสดงการเปรียบเทียบสีของน้ำทิ้งที่ปรับสภาวะให้เหมาะสม โดยชุดควบคุมที่ไม่เติมรา Isolate A19 และรา Isolate B7 และชุดที่เติมรา Isolate A19 และรา Isolate B7

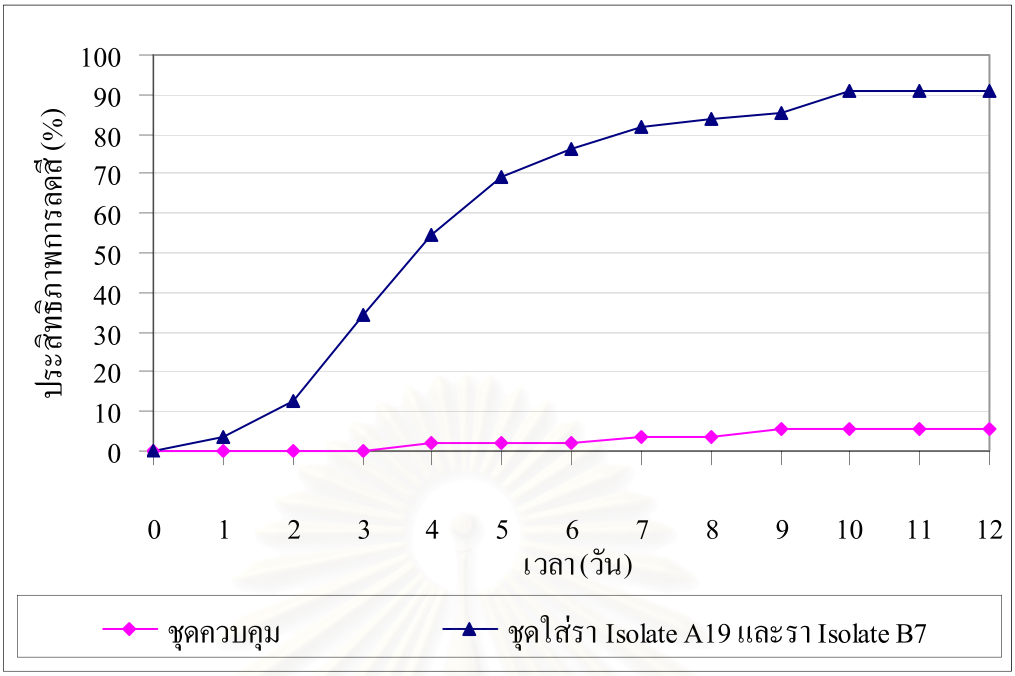
4.5.4 ผลการศึกษาการนำรา Isolate A19 และรา Isolate B7 มาทดลองใช้กับน้ำทิ้งในการผลิตลิกนิน

จากการเตรียมชุดการทดลอง 2 ชุด ชุดแรกเป็นชุดควบคุมไม่มีการเติมราลงไป ส่วนชุดที่สองใส่รา Isolate A19 และ รา Isolate B7 โดยปรับสภาวะให้เหมาะสมคือใช้ซูโครสเป็นแหล่งอาหารคาร์บอนความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมไนเตรตเป็นแหล่งอาหารไนโตรเจนความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5 บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 วัน แล้วเก็บตัวอย่างน้ำทุกวันจนครบ 2 สัปดาห์ เพื่อนำมาวิเคราะห์ค่าความเข้มข้นของลิกนินที่เหลืออยู่ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และค่าความเข้มข้นของสีที่เหลืออยู่ที่ความยาวคลื่น 465 นาโนเมตร พบว่าชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมสารอาหารใดๆ จะสามารถลดลิกนินได้บ้างเล็กน้อยเห็นได้จากความเข้มข้นของลิกนินในน้ำทิ้งที่ลดลงจากค่าเริ่มต้น 7.457 กรัม/ลิตร เหลือความเข้มข้นของลิกนิน 7.096 กรัม/ลิตร ในวันที่ 10 มีประสิทธิภาพในการลดสิกนิน 4.84 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4.30) และสามารถลดสีได้เล็กน้อยเช่นกันจากความเข้มข้นของสีในน้ำทิ้งเริ่มต้น 1833.333 Pt.Co unit เหลือความเข้มข้นของสี 1733.333 Pt.Co unit ในวันที่ 10 มีประสิทธิภาพใน

การลดสี 5.45 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4.31) แสดงว่าน้ำทิ้งมีความสามารถในการบำบัดตัวเองได้บ้างเล็กน้อย ส่วนชุดที่ใส่รา Isolate A19 และ รา Isolate B7 พบว่าในช่วง 2-7 วันแรกจะสามารถลดลิกนินและสีในน้ำทิ้งได้อย่างรวดเร็ว และเพิ่มขึ้นอีกเล็กน้อยจนถึงวันที่ 10 จากความเข้มข้นของลิกนินและสีในน้ำทิ้งเท่ากับในชุดควบคุม ประสิทธิภาพในการลดลิกนินของชุดใส่เชื้อที่ดีที่สุดคือเหลือความเข้มข้นของลิกนินในน้ำทิ้ง 1.976 กรัม/ลิตร มีประสิทธิภาพในการลดลิกนิน 73.50 เปอร์เซ็นต์ และเหลือความเข้มข้นของสีในน้ำทิ้ง 300.000 Pt.Co unit มีประสิทธิภาพในการลดสี 90.91 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 4.30 แสดงการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการลดลิกนิน เมื่อนำรา Isolate A19 และรา Isolate B7 มาทดลองใช้กับน้ำทิ้งในการผลิตลิกนินที่ปรับสภาวะให้เหมาะสม โดยเตรียมชุดการทดลอง 2 ชุด ชุดแรกเป็นชุดควบคุมไม่มีการเติมราลงไป ส่วนชุดที่สองใส่รา Isolate A19 และ รา Isolate B7 บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 12 วัน



รูปที่ 4.31 แสดงการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการลดสี เมื่อนำรา Isolate A19 และรา Isolate B7 มาทดลองใช้กับน้ำทิ้งในการผลิตลิกนินที่ปรับสภาวะให้เหมาะสม โดยเตรียมชุดการทดลอง 2 ชุด ชุดแรกเป็นชุดควบคุมไม่มีการเติมราลงไป ส่วนชุดที่สองใส่รา Isolate A19 และ รา Isolate B7 บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 12 วัน

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

5.1.1 ลักษณะของรา และผลการทดสอบความสามารถในการเกิดปฏิกิริยากับอาหาร Poly-R agar clearance และ Tannic agar

จากการเก็บตัวอย่างเห็ดจากแหล่งต่างๆ ในประเทศจำนวน 20 ตัวอย่าง และกิ่งไม้ผุจากแหล่งต่างๆ ในประเทศจำนวน 22 ตัวอย่าง นำมาแยกจนได้สายพันธุ์ที่บริสุทธิ์ แล้วทดสอบความสามารถในการย่อยสลายลิกนินกับอาหาร Poly-R agar clearance และ Tannic agar พบว่ามีราเพียงสองชนิดที่สามารถย่อยสลายได้ทั้ง Poly R-478 และ Tannic agar คือ รา Isolate A19 ซึ่งแยกได้จากเห็ด และ รา Isolate B7 ซึ่งแยกได้จากกิ่งไม้ ราทั้งสองชนิดมีเส้นใยสีขาว และจากการทำ slide culture แล้วส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์จะเห็นผนังกั้นเส้นใย และ clamp connection ซึ่งเป็นลักษณะสำคัญในกลุ่มของ Basidiomycota

5.1.2 การศึกษาการเจริญของรา Isolate A19 และรา Isolate B7 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

นำมาศึกษาการเจริญของราโดยใช้น้ำหนักแห้งของเส้นใยพบว่าระยะ stationary phase ของ รา Isolate A19 คือ 12 วัน และ Isolate B7 คือ 8 วัน

5.1.3 การศึกษาปริมาณเริ่มต้นที่เหมาะสมในการลดความเข้มข้นของลิกนินและความเข้มข้นของสีโดยรา Isolate A19 และรา Isolate B7

จากการทดลองเพื่อหาปริมาณราเริ่มต้นที่น้อยที่สุดที่รามีความสามารถในการลดลิกนินและสี ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงจากสูตร Czapek's Dox Medium จำนวน 50 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 5 บ่มที่อุณหภูมิห้องและเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 วัน พบว่าเมื่อใช้รา Isolate A19 เพียงชนิดเดียวมีประสิทธิภาพสูงสุดเมื่อใช้ราปริมาณ 20 มิลลิลิตร มีประสิทธิภาพในการลดลิกนิน 43.55 เปอร์เซ็นต์ และมีประสิทธิภาพในการลดสี 72.73 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้รา Isolate B7 เพียงชนิดเดียวมีประสิทธิภาพสูงสุดเมื่อใช้ราปริมาณ 20 มิลลิลิตร มีประสิทธิภาพในการลดลิกนิน 36.86 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพในการลดสี 63.64 เปอร์เซ็นต์ และอัตราส่วนรา Isolate A19: รา Isolate B7 เท่ากับ 10.0: 10.0

มิลลิลิตร เป็นปริมาณที่มีความเหมาะสมมากที่สุดซึ่งมีประสิทธิภาพสูงสุดในการลดลิกนินและสีในเวลา 8 วัน คือมีประสิทธิภาพในการลดลิกนิน 73.04 เปอร์เซ็นต์ และมีประสิทธิภาพในการลดสี 85.45 เปอร์เซ็นต์

5.1.4 การศึกษาความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่เหมาะสมในการลดความเข้มข้นของลิกนินและความเข้มข้นของสีโดยรา Isolate A19 และรา Isolate B7

จากการทดลองเพื่อหาค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมที่รามีความสามารถในการลดลิกนินและสีสูงสุด ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงจากสูตร Czapek's Dox Medium จำนวน 50 มิลลิลิตร อัตราส่วนรา Isolate A19: รา Isolate B7 เท่ากับ 10.0: 10.0 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องและเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 วัน พบว่าที่ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5 มีประสิทธิภาพในการลดลิกนินและสีได้สูงสุด คือ มีประสิทธิภาพในการลดลิกนิน 73.27 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพในการลดสี 85.45 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาที่ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 3 7 9 และ 11 ตามลำดับ

5.1.5 การศึกษาการหาชนิดของแหล่งอาหารคาร์บอนที่เหมาะสมในการลดความเข้มข้นของลิกนินและความเข้มข้นของสีโดยรา Isolate A19 และรา Isolate B7

จากการทดลองเพื่อหาชนิดของแหล่งอาหารคาร์บอนที่เหมาะสมที่รามีความสามารถในการลดลิกนินและสีสูงสุด ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงจากสูตร Czapek's Dox Medium จำนวน 50 มิลลิลิตร อัตราส่วนรา Isolate A19: รา Isolate B7 เท่ากับ 10.0: 10.0 มิลลิลิตร ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5 บ่มที่อุณหภูมิห้องและเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 วัน พบว่าเมื่อใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งอาหารคาร์บอนจะมีประสิทธิภาพในการลดลิกนินและสีได้สูงสุดคือ มีประสิทธิภาพในการลดลิกนิน 73.50 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพในการลดสี 89.09 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งอาหารคาร์บอนที่มีประสิทธิภาพในการลดลิกนิน 47.93 เปอร์เซ็นต์ และมีประสิทธิภาพในการลดสี 80.00 เปอร์เซ็นต์

5.1.6 การศึกษาความเข้มข้นของแหล่งอาหารคาร์บอนที่เหมาะสมในการลดความเข้มข้นของลิกนินและความเข้มข้นของสีโดยรา Isolate A19 และรา Isolate B7

จากการทดลองเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งอาหารคาร์บอนซึ่งได้แก่น้ำตาลซูโครสที่ราจะมีความสามารถในการลดลิกนินและสีสูงสุด ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงจากสูตร Czapek's Dox Medium จำนวน 50 มิลลิลิตร อัตราส่วนรา Isolate A19: รา Isolate B7 เท่ากับ 10.0: 10.0 มิลลิลิตร ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5 บ่มที่อุณหภูมิห้องและเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 วัน พบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่ 0.5 เปอร์เซ็นต์มีความเหมาะสมที่สุดในการลดลิกนินและสี ซึ่งมีประสิทธิภาพในการลดลิกนิน 71.88 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพในการลดสี 90.91 เปอร์เซ็นต์ และที่ความเข้มข้น 0.0 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพในการลดลิกนินและสีต่ำสุด คือ มีประสิทธิภาพในการลดลิกนิน 25.35 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพในการลดสี 54.55 เปอร์เซ็นต์

5.1.7 การศึกษาการหาชนิดของแหล่งอาหารไนโตรเจนที่เหมาะสมในการลดความเข้มข้นของลิกนินและความเข้มข้นของสีโดยรา Isolate A19 และรา Isolate B7

จากการทดลองเพื่อหาชนิดของแหล่งอาหารไนโตรเจนที่เหมาะสมที่รามีความสามารถในการลดลิกนินและสีสูงสุด ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงจากสูตร Czapek's Dox Medium จำนวน 50 มิลลิลิตร โดยมีซูโครสเป็นแหล่งอาหารคาร์บอนความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ อัตราส่วนรา Isolate A19: รา Isolate B7 เท่ากับ 10.0: 10.0 มิลลิลิตร ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5 บ่มที่อุณหภูมิห้องและเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 วัน พบว่าเมื่อใช้โซเดียมไนเตรตเป็นแหล่งอาหารไนโตรเจนจะมีประสิทธิภาพในการลดลิกนินและสีได้สูงสุดคือ มีประสิทธิภาพในการลดลิกนิน 72.12 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพในการลดสี 90.91 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้แอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งอาหารไนโตรเจนที่มีประสิทธิภาพในการลดลิกนิน 53.92 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพในการลดสี 83.64 เปอร์เซ็นต์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5.1.8 การศึกษาความเข้มข้นของแหล่งอาหารไนโตรเจนที่เหมาะสมในการลดความเข้มข้นของลิกนินและความเข้มข้นของสีโดยรา Isolate A19 และรา Isolate B7

จากการทดลองเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งอาหารไนโตรเจนซึ่งได้แก่โซเดียมไนเตรตที่ราจะมีความสามารถในการลดลิกนินและสีสูงสุด ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงจากสูตร Czapek's Dox Medium จำนวน 50 มิลลิลิตร โดยมีซูโครสเป็นแหล่งอาหารคาร์บอนความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ อัตราส่วน รา Isolate A19: รา Isolate B7 เท่ากับ 10.0: 10.0 มิลลิลิตร ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5 บ่มที่อุณหภูมิห้องและเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 วัน พบว่าความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรตที่ 0.1 เปอร์เซ็นต์มีความเหมาะสมที่สุดในการลดลิกนินและสีซึ่งมีประสิทธิภาพในการลดลิกนิน 75.81 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพในการลดสี 94.55 เปอร์เซ็นต์ และที่ความเข้มข้น 0.0 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพในการลดลิกนินและสีต่ำสุด คือ มีประสิทธิภาพในการลดลิกนิน 23.50 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพในการลดสี 43.64 เปอร์เซ็นต์

5.1.9 การศึกษานำรา Isolate A19 และรา Isolate B7 มาทดลองใช้กับน้ำทิ้งในการผลิตลิกนิน

โดยทำการปรับสภาวะของน้ำทิ้งให้เหมาะสมซึ่งมีซูโครสเป็นแหล่งอาหารคาร์บอนความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมไนเตรตเป็นแหล่งอาหารไนโตรเจนความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5 บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 วัน ในวันที่ 10 ของชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมราลงไปมีประสิทธิภาพในการลดสิกนิน 4.84 เปอร์เซ็นต์ และมีประสิทธิภาพในการลดสี 5.45 เปอร์เซ็นต์ ส่วนชุดที่สองใส่รา Isolate A19 และ รา Isolate B7 มีประสิทธิภาพในการลดลิกนินสูงสุดที่ 73.50 เปอร์เซ็นต์ และมีประสิทธิภาพในการลดสีสูงสุด 83.64 เปอร์เซ็นต์

5.2 ข้อเสนอแนะ

แนวทางการวิจัยนี้เป็นการนำวิธีการทางชีวภาพมาใช้ในการกำจัดสีของน้ำทิ้งในการผลิตลิกนิน ถือเป็นทางเลือกหนึ่งที่คำนึงถึงสิ่งแวดล้อมในการกำจัดสีในน้ำทิ้งหลังจากนำลิกนินที่แยกได้ไปใช้ประโยชน์ แต่ถึงอย่างไรก็ตามยังต้องพิจารณาในด้านเศรษฐศาสตร์ในการปรับสภาวะของน้ำทิ้งที่จะทำการบำบัดให้เหมาะสมต่อการย่อยสลายของราที่คัดเลือกได้ และอาจนำราที่คัดเลือกได้ไปประยุกต์ใช้กับเทคโนโลยีอื่นๆ ซึ่งอาจมีประสิทธิภาพในการลดสีได้ดี หรือใช้ระยะเวลาในการบำบัดได้รวดเร็ว นอกเหนือจากนี้ส่วนของงานวิจัยในห้องปฏิบัติการควรมีการพัฒนาการ

คัดเลือกสายพันธุ์ราที่มีศักยภาพในการช่วยบำบัดสารอื่นๆ มีรายงานว่าราไวต์รอตไม่เพียงแต่สามารถย่อยสลายลิกนินและอนุพันธ์ของลิกนินเท่านั้น ยังสามาถย่อยสลายมวลสารหรือสารประกอบจำพวกฮาโลจิเนต (Halogenated compound) เช่น ลินเดน (Lindane) ดีดีที (DDT) น้ำมันดำจากถ่านหิน (Coal tars) (Bumpus and others, 1985) ยาฆ่าแมลง รวมถึงสารเคมีที่เป็นพิษ เช่น ไซยาไนด์ (Cyanides) เอไซด์ (Azide) และเพนตะคลอโรฟีนอล (Pentachlorophenol) (Aust and Benson, 1993) ซึ่งจะเป็นประโยชน์หากสามารถนำราที่คัดเลือกได้ไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอื่นๆ ต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กรมควบคุมมลพิษ. **โครงการจัดทำดัชนีด้านสิ่งแวดล้อมอุตสาหกรรม.** กรุงเทพมหานคร: กระทรวงวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม, 2543.

กัณฑรีย์ ศรีพงศ์พันธุ์. **มลพิษทางน้ำ พิมพ์ครั้งที่ 1.** นครปฐม: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์, 2540.

คณะกรรมการจัดทำคู่มือวิเคราะห์น้ำเสีย สมาคมวิศวกรสิ่งแวดล้อมแห่งประเทศไทย. **คู่มือวิเคราะห์น้ำเสีย พิมพ์ครั้งที่ 3.** กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์เรือนแก้วการพิมพ์, 2540.

บุนยรัชต์ กิติยานันท์ และ รวินทร์ พลานันทกุลธร. **ซัลโฟเนชันของลิกโนเซลลูโลส.** วิทยานิพนธ์ปริญญาบัณฑิต ภาควิชาเคมีเทคนิค คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2535.

ปิยะนันท์ สุวรรณเมนะ. **ลู่ทางและโอกาสการส่งออกและผลกระทบจากการมีเขตการค้าเสรีอาเซียน (สำหรับอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษ).** กรุงเทพมหานคร: สถาบันเพื่อการพัฒนาประเทศไทย, 2539.

เรือนแก้ว ประพฤติ. **การฟอกเยื่อกระดาษโดยวิธีการทางชีวภาพ โดย** *Phanerochaete chrysosporium* **และ** *Ganoderma lucidum*. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีทางชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2541.

สมศักดิ์ วังใน. **จุลินทรีย์และกิจกรรมในดิน.** กรุงเทพมหานคร: ไทยวัฒนาพานิช, 2528.

ภาษาอังกฤษ

Akhtar, M., Kirk, T.K. and Blanchette, R.A. **Advances in Applied and Fundamental Research, Proceedings of the 6th International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry**, pp.187-192. USA, 1999.

American Public Health Association. **American Water Works Association and Water Pollution Control Federation: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 18th ed.**, USA: Washington, 1992.

Andersson, N., David, I.W., Germgard, V. and Lindstrom, T. **Organic Matter Content in Black Liquor Inside and Outside Chips During Kraft Cooking.** Sweden: Karlstad University, 2003.

Archibald, F., Paice, M.G. and Jurasek, L. Decolorization of kraft bleaching effluent chromophores by *Coriolus versicolor*. **Enzyme Microbiology Technology** 12(1990): 846-853.

Aust, S.D. and Benson, J.T. The Fungus among Us: Use of White Rot Fungi to Biodegrade Environmental Pollutants. **Environmental Health Perspectives** 101(3 August 1993): 166-170.

Bajpai, P. and Bajpai, P.K. Biological color removal of pulp and paper-mill wastewaters. **Journal of Biotechnology** 33(3 April 1994): 211-220.

Belsare, D. K. and Prasad, D. Y. Decolorization of effluent from the bagasse-based pulp mills by white-rot fungus, *Schizophyllum commune*. **Applied Microbiology and Biotechnology** 28(1988): 301-304.

Blanchette, R. A. Degradation of the Lignocellulose Complex in Wood. **Canadian Journal of Botany – Revue Canadienne De Botanique** 73(1995): S999-S1010.

Bourbonnais, R. and Paice, M.G. Oxidation of non-phenolic substrates: An expanded role for laccase in lignin biodegradation. **FEBS Lett** 267(1990): 99-102.

Bumpus, J.A., Tien, M., Wright, D. and Aust, S.D. Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus. **Science** 228(1985): 1434-1436.

Cookson, L.J. Reliability of Poly B-411, a Polymeric Anthraquinone-Based Dye, in Determining the Rot Type Caused by Wood-Inhabiting Fungi. **Applied and Environmental Microbiology** 61(2 Febuary 1995): 801-803.

Crawford , D.L., Crawford, R.L. and Pometto, A.L. Preparation of specifically labeled ^{14}C-(lignin)- and ^{14}C–(cellulose)-lignocelluloses and their decomposition by the microflora of soil. **Applied and Environmental Microbiology** 33(1985): 1247-1251.

Davidson, R.W., Campbell, W.A. and Blaisdell, D.J. Differentiation of wood-decaying fungi by their reactions on gallic or tannic acid medium. **Journal of Agricultural Research** 57(1938): 683-695.

Eaton, D., Chang, H.M. and Kirk, T.K. Fungal Decolorization of Kraft Bleach Plant Effluents. **Tappi** 63, No.10 (October 1980): 103-106.

Eugenia, J.O., Gloria, S. and Elizabeth, H. **Environmental Biotechnology and Cleaner Bioprocesses.** London: Taylor and Francis, 2000.

Feijoo, G., Vidal, G., Moreira, M.T., Mendez, R., Lema, J. M. Degradation of High – Molecular – Weight Compounds of Kraft Pulp–Mill Effluents by a Combined Treatment with Fungi and Bacteria. **Biotechnology Letters** 17(November 1995): 1261-1266.

Freitag, M. and Morrell, J.J. Decolorization of the polymeric dye Poly R-478 by wood-inhabiting fungi. **Canadian Journal of Microbiology** 38(1992): 811-822.

Gianfreda, L., Xu, F. and Bollag, J.M. Laccases: A Useful group of Oxidoreductive Enzymes. **Bioremediation Journal** 3(1999): 1-25.

Gilarranz, M.A., Rodriguez, F., Oliet, M. and Revenga, J.A. Acid Precipitation and Purification of Wheat Straw Lignin. **Separation Science and Technology** 33(1998): 1359-1377.

Glenn, J.K. and Gole, M.H. Decolorization of several polymeric dyes by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium.* **Applied and Environmental Microbiology** 45(1983): 1741-1747.

Gold, M.H., Glenn, J.K. and Alic, M. Use of polymeric dyes in lignin biodegradation assays. **Methods in Enzymology** 161(1988): 74-78.

Grace, T.M. “Chemical Recovery Process Chemistry” Chemical Recovery in the Alkaline Pulping Processes. **Tappi** 3(1992): 57-78.

Hatakka, A. Biodegradation of Lignin. **Biopolymers V.1: Lignin, Humic Substrance and Coal.** Weinheim: Wiley-VCH, 2001.

Hossain, F., Halim, M.A., Talukder, S.H. and Mogiuddin, G. Isolation and screening of lignin-degrading microorganisms. **Bangladesh Journal of Botany** 29(1 June 2000): 35-41.

Kirk, T.K., Connors, W.J. and Zeikus, J.G. Requirement for a growth substrate during lignin decomposition by two wood rotting fungi. **Applied and Environmental Microbiology** 32(1976): 192-194.

Kirk, T.K. and Obst, J.R. Lignin determination. **Method in Enzymology** 16(1988): 87-100.

Lema, J. M., Moreira, M. T., Palma, C. and Feijoo, G. Clean Biological Bleaching Processes in the Pulp and Paper Industry, **Environmental Biotechnology and cleaner bioprocesses**, pp. 211-226. London: Taylor and Francis Limited, 2000.

Livernoche, D., Jurasek, L., Desrochers, M. and Dorica, J. Removal of Color from Kraft Mill Wastewaters with Cultures of white-rot fungi and with Immobilized Mycelium of *Coriolus versicolor*. **Biotechnology and Bioengineering** 25(1983): 2055-2065.

Magnus, M. **Numerical Modeling of the CHEMREC Black Liquor Gasification Process: Conceptual Design Study of the Burner in a Pilot Gasification Reactor.** Master's Thesis, Department of Fluid Mechanics, Mechanical Engineering, Lulea University of Technology, 2001.

Mccrady, E. The Nature of Lignin. **Alkaline Paper Advocate** 4(4 November 1991): 1-4.

Negarathnamma, R., Bajpai, P. Decolorization and Detoxification of Extraction – Stage Effluent from Chlorine Bleaching of Kraft Pulp by *Rhizopus oryzae*. **Applied and Environmental Microbiology** 65(Mar 1999): 1078-1082.

Pasti, M.B., Paszczynski, A., Goszczynski, S., Crawford, D.L. and Crawford, R.L. Use of dyes in assaying *Phanerochaete chrysosporium* Mn(II)-peroxidase and ligninase. **Proceedings of the University of Idaho, Institule for Molecular and Agricultural Genetic Engineering** 1(January 1994): 1-12.

Prasad, D.Y. and Joyce, T.W. Colour removal from kraft bleach plant effluents by *Trichoderma* sp. **Tappi** 74(1991): 165-169.

Pointing, S. B. Lignin Modifying Enzyme Assays. **Fungal Diversity** 2(March 1999): 25-33.

Pointing, S.B. Exploiting the Versatile Ligninolytic System of White-Rot Fungi. **Fungal Diversity Research** 6(2001): 253-290.

Reid, I.D. Fate of Residual Lignin during Delignification of Kraft Pulp by *Trametes versicolor*. **Applied and Environmental Microbiology** 64(6 June 1998): 2117-2125.

Richard, T.H. and Miguel, U. **Atlas of Introductory Mycology (Second Edition).** USA, 1988.

Roald, B.O. Effect of sublethal concentration of lignin sulphonates on growth, intestinal flora and some digestive enzymes of rainbow trout. **Aquaculture** 12(1977): 327-332.

Royer, G., Yerushalmi, L., Rouleau, D. and Desrochers, M. Continuous decolorization of bleached kraft effluents by *Coriolus versicolor* in the form of pellets. **Journal of Industrial Microbiology** 7(1991): 269-278.

Srinivasan, C., D'souza, T.M., Boominathan, K. and Reddy, C.A. Demonstration of Laccase in the White Rot Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F1767. **Applied and Environmental Microbiology** 61(12 December 1995): 4274-4277.

Sumathi, S. and Phatak, V. Fungal treatment of bagasse based pulp and paper mill wastes. **Environmental Technology** 20(1 January 1999): 93-98.

Winkelmenn, G. **Microbial Degradation of Natural Product.** New York: VCH Publisher, 1992.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหาร

Potato dextrose agar (PDA)

มันฝรั่ง	200	กรัม
น้ำตาลกลูโคส (Glucose)	20	กรัม
วุ้น (Agar)	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ล้างมันฝรั่งให้สะอาดแล้วหั่นเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมลูกเต๋าขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ต้มในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร จนมันฝรั่งสุกซึ่งสังเกตได้จากเมื่อใช้มือบีบแล้วมันฝรั่งจะแตกออกได้ง่าย หลังจากนั้นใช้ผ้าขาวบางกรองเอากากมันฝรั่งทิ้งไป เอาเฉพาะน้ำมันฝรั่งมาเติมส่วนผสมทั้งหมดให้ครบและคนให้ละลายจนหมด แล้วเติมน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

Potato dextrose broth (PDB)

มันฝรั่ง	200	กรัม
น้ำตาลกลูโคส (Glucose)	20	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ต้มมันฝรั่งในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร จนมันฝรั่งสุก หลังจากนั้นใช้ผ้าขาวบางกรองเอากากมันฝรั่งทิ้งไป เอาเฉพาะน้ำมันฝรั่งมาเติมน้ำตาล คนให้ละลายจนหมด แล้วเติมน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Poly-R agar clearance (Pointing, 1999)

LME basal medium (LBM)

โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	1	กรัม
แอมโมเนียมทาร์เทรต ($C_4H_{12}N_2O_6$)	0.5	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$)	0.5	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$)	0.01	กรัม
ยีสต์สกัด (Yeast Extract)	0.01	กรัม
คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$)	0.001	กรัม
ไอรอน (III) ซัลเฟต ($Fe_2(SO_4)_3$)	0.001	กรัม
แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4$)	0.001	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

เตรียม LME basal medium แล้วเติม Poly-R dye 478 0.02% w/v และวุ้นผง (agar) 1.6% w/v คนให้ละลายเข้ากันนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที นำเอาออกมาเติมสารละลายกลูโคสที่ปราศจากเชื้อ ปริมาณ 10 มิลลิลิตร 20% w/v โดยทำการทดลองแบบปลอดเชื้อ แล้วเทลงใน Petri dish

Tannic acid agar หรือ Gallic acid agar (Richard and Miguel, 1988)

กรดแทนนิก (Tannic acid หรือ Gallic acid)	5	กรัม
มอลต์สกัด (Malt extract)	15	กรัม
วุ้นผง (Agar)	20	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

นำมอลต์สกัดผสมกับวุ้นผง เติมน้ำกลั่นปริมาณ 850 มิลลิลิตร และแยกตวงน้ำกลั่นปริมาณ 150 มิลลิลิตร นำส่วนทั้งสองนี้ไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที หลังจากนั้นเติมกรดแทนนิกลงในน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วละลายให้เข้ากัน แล้วจึงนำทั้งสองส่วนมาเทรวมกัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Czapek's Dox Medium

(ดัดแปลงจากสูตรของ American Public Health Association, 1992)

โซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$)	3	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	1	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$)	0.5	กรัม
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.5	กรัม
ไอรอน (II) ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4.7H_2O$)	0.01	กรัม
น้ำตาลกลูโคส (Glucose)	30	กรัม
น้ำเสียที่ผ่านการตกตะกอน	1	ลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำเสียที่ผ่านการตกตะกอนปริมาณ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

ภาคผนวก ข

วิธีการวิเคราะห์ลิกนินและสี

วิธีการวิเคราะห์ลิกนิน (Gilarranz and others, 1998)

การเตรียมสารละลาย

สารละลายบอริก 0.1 โมล

ละลายกรดบอริก 6.183 กรัม ลงในน้ำกลั่นปรับปริมาตรจนได้ 1000 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำมาปรับ pH ให้เป็น 12 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์

สารละลายลิกนิน 1000 ppm

ละลายอัลคาไลน์ลิกนินที่อบให้แห้งที่ 103 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หนัก 1 กรัม ลงในสารละลายบอริก แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายกรดบอริก 0.1 โมล

สารละลายลิกนิน 10 20 30 40 และ 50 ppm

ปิเปตสารละลายลิกนินความเข้มข้น 1000 ppm มาปริมาณ 1 2 3 4 และ 5 มิลลิลิตรตามลำดับใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรดบอริก 0.1 โมล แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร

วิธีการเทียบมาตรฐานของเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์

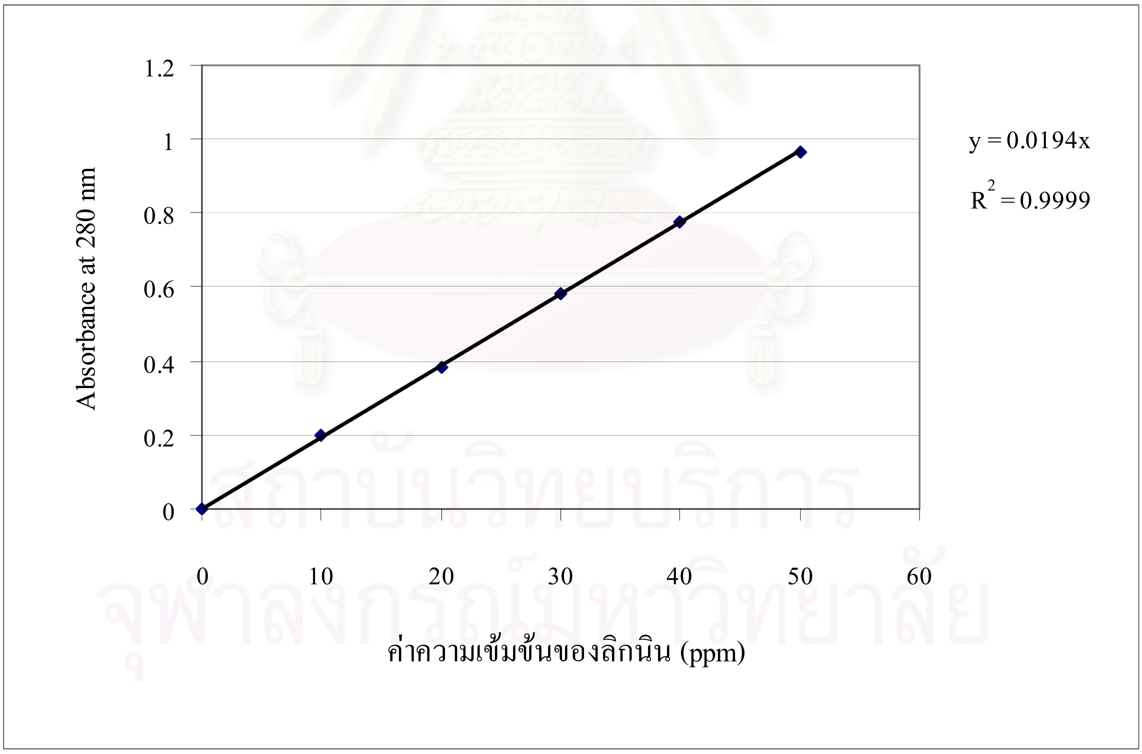
1. นำสารละลายลิกนินที่มีความเข้มข้น 10 20 30 40 และ 50 ppm ตามลำดับ ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร
2. นำข้อมูลที่ได้ไปเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและค่าความเข้มข้นของลิกนินซึ่งมีหน่วยเป็น ppm

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเทียบมาตรฐานของเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์เพื่อใช้ในการคำนวณความเข้มข้น ของลิกนิน

ตารางที่ ข-1 ข้อมูลการเทียบมาตรฐานของเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและค่าความเข้มข้นของลิกนิน (ppm)

ความเข้มข้น (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร
10	0.200
20	0.384
30	0.584
40	0.776
50	0.966



รูปที่ ข-1 กราฟในการเทียบมาตรฐานเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์เพื่อใช้ในการคำนวณความเข้มข้นลิกนิน

การเทียบมาตรฐานของเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์เพื่อใช้ในการคำนวณความเข้มข้นของสี

สีของน้ำตามธรรมชาติมักเป็นสีเหลืองน้ำตาลหรือสีชา เกิดขึ้นจากการเน่าเปื่อยของพืช เมื่อสลายตัวจะให้สารแทนนิน (Tannin) กรดฮิวมิค (Humic acid) และ สารฮิวเมต (Humates) ซึ่งทำให้น้ำมีสีเหลืองชา นอกจากนี้สีเหลืองน้ำตาลยังเกิดขึ้นจากอิออนของโลหะในน้ำ เช่น เหล็ก แมงกานีส จากการปนเปื้อนของน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม สีของน้ำที่แตกต่างกันเกิดจากการสะท้อนของแสง ซึ่งจำแนกได้เป็น 2 ประเภท (กัณฑรีย์, 2540) คือ

1. สีปรากฏ (Apparent Color) เป็นสีของน้ำที่ปรากฏให้เห็นแก่สายตาเป็นส่วนใหญ่ โดยเกิดจากการสะท้อนของแสงจากสารแขวนลอยในน้ำ พื้นท้องน้ำ และจากท้องฟ้า ซึ่งสามารถกำจัดออกได้โดยวิธีทางกายภาพ เช่น การกรอง หรือการตกตะกอน เป็นต้น

2. สีจริง (True Color) เป็นสีของน้ำที่เกิดจากการมีสารต่างๆ ในน้ำละลายจนกลายเป็นเนื้อเดียวกับน้ำ สารที่มีผลต่อการเกิดสีจริงส่วนใหญ่มักเกิดจากการย่อยสลายของพืช หรืออนุภาคคอลลอยด์ หรือสารละลายชนิดต่างๆ โดยอาจจะเป็นสารอินทรีย์ เช่น โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต และธาตุอาหารพืช หรือสารอนินทรีย์ เช่น แร่ธาตุต่างๆ ซึ่งจะทำให้เกิดสีของน้ำต่างๆ กัน ขึ้นอยู่กับลักษณะและคุณสมบัติเฉพาะตัวของสารดังกล่าว

สามารถแยกสีทั้งสองประเภทออกจากกันได้ โดยการกำจัดสารแขวนลอย และความขุ่นออกจากน้ำด้วยวิธีทำให้ตกตะกอน หรือทำการเหวี่ยงแยก ซึ่งตัวอย่างน้ำดังกล่าวจะมีแต่เฉพาะสีจริงเท่านั้น

วิธีการวิเคราะห์สี

วิธีวิเคราะห์หรือตรวจสีของน้ำ สามารถทำได้โดยใช้วิธีเปรียบเทียบสีกับสารละลายมาตรฐาน (standard solution) ที่ทราบระดับความเข้มข้น ซึ่งมีหน่วยวัดเป็น unit โดย 1 color unit มีค่าเท่ากับ 1 มิลลิกรัม/ลิตร ของโลหะแพลททินัม (platinum, Pt) ในรูปของ chloroplatinate ion (คณะกรรมการจัดทำคู่มือวิเคราะห์น้ำเสีย, 2540) โดยมีวิธีการในการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์สีของน้ำดังนี้

1. ปรับค่าความเป็นกรดด่างของน้ำตัวอย่างให้เป็น 7.6 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ที่มีความเข้มข้น 1 โมลาร์

2. กรองตะกอนออกด้วยกระดาษกรองโดยใช้เครื่องดูดสุญญากาศ

3. นำส่วนน้ำที่กรองได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 465 นาโนเมตร

การเตรียมสารละลายมาตรฐานคลอโรแพลททิเนท (Standard chloroplatinate solution)

ละลายโพแทสเซียมคลอโรแพลททิเนท (K_2PtCl_6) 1.246 กรัม กับโคบอลตัสคลอไรด์ ($CoCl_2.6H_2O$) 1.0 กรัม ในน้ำกลั่น เติมกรดไฮโดรคลอริก (HCl) เข้มข้นปริมาณ 100 มิลลิลิตรลงไป แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เท่ากับ 1 ลิตร สารละลายนี้จะมีค่าความเข้มข้นเท่ากับ 500 color units เก็บสารละลายนี้ในขวดที่ป้องกันการระเหยและไม่มีการเจือปนจากสิ่งอื่นๆ และนำสารละลายนี้มาทำการเจือจางให้มีความเข้มข้นของสีเท่ากับ 50-450 color units

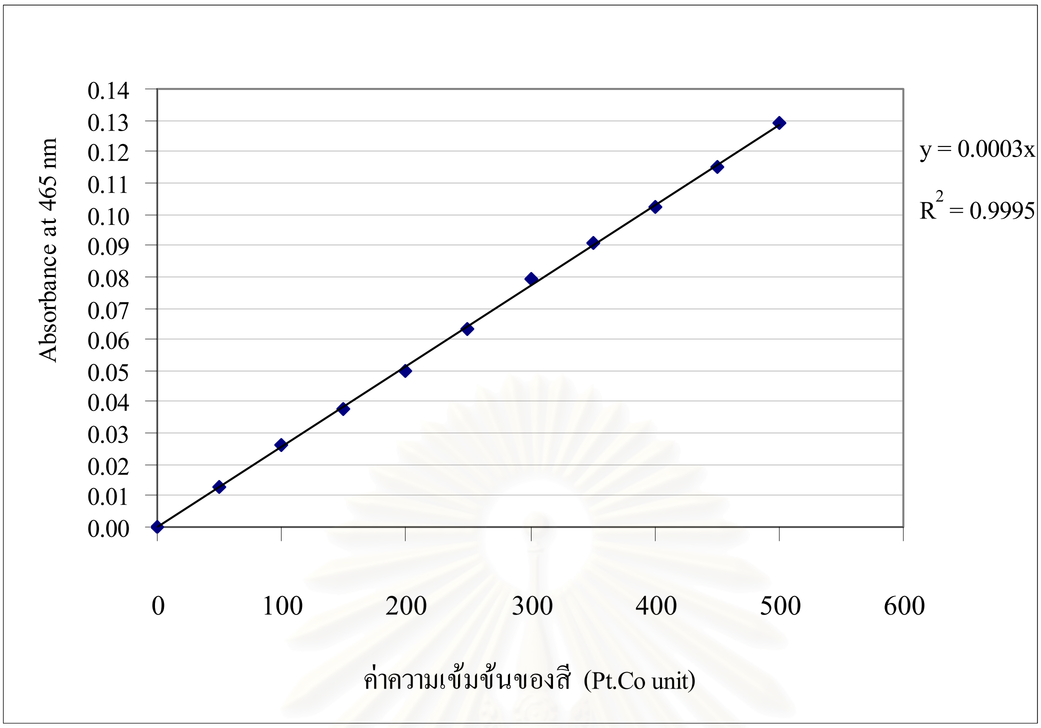
วิธีการเทียบมาตรฐานของเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์

1. นำสารละลายมาตรฐานคลอโรแพลททิเนท ที่มีความเข้มข้น 50-500 color units ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 465 นาโนเมตร
2. นำข้อมูลที่ได้ไปเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและค่าความเข้มข้นของสี ซึ่งมีหน่วยเป็น platinum cobalt color unit หรือ Pt.Co unit

การเทียบมาตรฐานของเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์เพื่อใช้ในการคำนวณค่าความเข้มข้นของสี

ตารางที่ ข-2 ข้อมูลการเทียบมาตรฐานของเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและค่าความเข้มข้นของสี (Pt.Co unit)

ค่าความเข้มข้นของสี (Pt.Co unit)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 465 นาโนเมตร
50	0.013
100	0.026
150	0.038
200	0.050
250	0.063
300	0.079
350	0.091
400	0.102
450	0.115
500	0.129



รูปที่ ข-2 กราฟในการเทียบมาตรฐานเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์เพื่อใช้ในการคำนวณค่าความเข้มข้นของสี

ภาคผนวก ค

ข้อมูลการทดลอง

ตารางที่ ค-1 ข้อมูลการทดลองการเจริญเติบโตของรา Isolate A19 และรา Isolate B7 เมื่อเลี้ยงในอาหาร Potato dextrose broth

เวลา (วัน)	น้ำหนักแห้ง (มิลลิกรัม/ 100 มิลลิลิตร)	
	รา Isolate A19	รา Isolate B7
1	19.4	19.1
2	33.5	33.5
3	44.0	46.4
4	54.7	73.7
5	60.1	124.0
6	95.2	237.9
7	106.4	518.7
8	133.1	830.0
9	139.1	828.3
10	143.0	820.0
11	157.7	792.0

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ค-2 ข้อมูลการทดลองศึกษาประสิทธิภาพในการลดลิกนินของรา Isolate A19 โดยใช้รา Isolate A19 เริ่มต้นในปริมาณที่แตกต่างกัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงจากสูตร Czapek's Dox Medium ปรับค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 5 บ่มที่อุณหภูมิห้องและเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 วัน

เวลา (วัน)	รา Isolate A19 5 มิลลิลิตร		รา Isolate A19 10 มิลลิลิตร		รา Isolate A19 15 มิลลิลิตร		รา Isolate A19 20 มิลลิลิตร	
	ค่าความเข้มข้นของลิกนินเฉลี่ย (กรัม/ลิตร)	ประสิทธิภาพการลดลิกนิน (%)	ค่าความเข้มข้นของลิกนินเฉลี่ย (กรัม/ลิตร)	ประสิทธิภาพการลดลิกนิน (%)	ค่าความเข้มข้นของลิกนินเฉลี่ย (กรัม/ลิตร)	ประสิทธิภาพการลดลิกนิน (%)	ค่าความเข้มข้นของลิกนินเฉลี่ย (กรัม/ลิตร)	ประสิทธิภาพการลดลิกนิน (%)
0	7.457	0.00	7.457	0.00	7.457	0.00	7.457	0.00
2	6.924	7.14	6.924	7.14	6.564	11.98	6.306	15.44
4	6.409	14.05	6.048	18.89	5.326	28.57	4.931	33.87
6	5.739	23.04	5.120	31.34	4.794	35.72	4.364	41.47
8	5.206	30.18	4.742	36.40	4.313	42.17	4.210	43.55
10	5.206	30.18	4.759	36.18	4.313	42.17	4.210	43.55
12	5.223	29.95	4.759	36.18	4.313	42.17	4.227	43.32

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ค-3 ข้อมูลการทดลองศึกษาประสิทธิภาพในการลดลิกนินของรา Isolate B7 โดยใช้รา Isolate B7 เริ่มต้นในปริมาณที่แตกต่างกัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงจากสูตร Czapek’s Dox Medium ปรับค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 5 บ่มที่อุณหภูมิห้องและเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 วัน

เวลา (วัน)	รา Isolate B7 5 มิลลิลิตร		รา Isolate B7 10 มิลลิลิตร		รา Isolate B7 15 มิลลิลิตร		รา Isolate B7 20 มิลลิลิตร	
	ค่าความเข้มข้นของลิกนินเฉลี่ย (กรัม/ลิตร)	ประสิทธิภาพการลดลิกนิน (%)	ค่าความเข้มข้นของลิกนินเฉลี่ย (กรัม/ลิตร)	ประสิทธิภาพการลดลิกนิน (%)	ค่าความเข้มข้นของลิกนินเฉลี่ย (กรัม/ลิตร)	ประสิทธิภาพการลดลิกนิน (%)	ค่าความเข้มข้นของลิกนินเฉลี่ย (กรัม/ลิตร)	ประสิทธิภาพการลดลิกนิน (%)
0	7.457	0.00	7.457	0.00	7.457	0.00	7.457	0.00
2	7.199	3.46	7.182	3.69	7.049	5.47	6.907	7.37
4	6.546	12.21	6.615	11.29	6.271	15.90	6.014	19.36
6	6.100	18.20	5.997	19.58	5.928	20.50	5.550	25.58
8	5.430	27.19	5.275	29.26	4.759	36.18	4.708	36.86
10	5.430	27.19	5.292	29.03	4.777	35.94	4.725	36.64
12	5.430	27.19	5.292	29.03	4.777	35.94	4.725	36.64

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ค-4 ข้อมูลการทดลองศึกษาประสิทธิภาพในการลดลิกนิน เมื่อใช้รา Isolate A19 และ รา Isolate B7 ผสมกันในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงจากสูตร Czapek's Dox Medium ปรับค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 5 บ่มที่อุณหภูมิห้องและเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 วัน

เวลา (วัน)	รา Isolate A19: รา Isolate B7 เท่ากับ 2.5: 2.5 มิลลิลิตร		รา Isolate A19: รา Isolate B7 เท่ากับ 5.0: 5.0 มิลลิลิตร		รา Isolate A19: รา Isolate B7 เท่ากับ 7.5: 7.5 มิลลิลิตร		รา Isolate A19: รา Isolate B7 เท่ากับ 10.0: 10.0 มิลลิลิตร		รา Isolate A19: รา Isolate B7 เท่ากับ 12.5: 12.5 มิลลิลิตร	
	ค่าความเข้มข้นของลิกนินเฉลี่ย (กรัม/ลิตร)	ประสิทธิภาพการลดลิกนิน (%)	ค่าความเข้มข้นของลิกนินเฉลี่ย (กรัม/ลิตร)	ประสิทธิภาพการลดลิกนิน (%)	ค่าความเข้มข้นของลิกนินเฉลี่ย (กรัม/ลิตร)	ประสิทธิภาพการลดลิกนิน (%)	ค่าความเข้มข้นของลิกนินเฉลี่ย (กรัม/ลิตร)	ประสิทธิภาพการลดลิกนิน (%)	ค่าความเข้มข้นของลิกนินเฉลี่ย (กรัม/ลิตร)	ประสิทธิภาพการลดลิกนิน (%)
0	7.457	0.00	7.457	0.00	7.457	0.00	7.457	0.00	7.457	0.00
2	6.821	8.52	6.718	9.91	6.667	10.60	5.997	19.58	6.048	18.89
4	6.564	11.98	6.082	18.43	5.876	21.20	3.746	49.77	3.694	50.46
6	5.687	23.73	5.515	26.04	5.172	30.65	2.595	65.20	2.577	65.44
8	5.017	32.72	5.034	32.49	4.519	39.40	2.010	73.04	2.010	73.04
10	5.017	32.72	5.034	32.49	4.519	39.40	2.010	73.04	2.010	73.04
12	5.034	32.49	5.034	32.49	4.536	39.17	2.027	72.81	2.010	73.04

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ค-5 ข้อมูลการทดลองศึกษาประสิทธิภาพในการลดลิกนินของรา Isolate A19 และรา Isolate B7 เมื่อทำการปรับความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีระดับต่างกัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงจากสูตร Czapek's Dox Medium บ่มที่อุณหภูมิห้องและเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 วัน

เวลา (วัน)	pH 3		pH 5		pH 7		pH 9		pH 11	
	ค่าความเข้มข้นของลิกนินเฉลี่ย (กรัม/ลิตร)	ประสิทธิภาพการลดลิกนิน (%)	ค่าความเข้มข้นของลิกนินเฉลี่ย (กรัม/ลิตร)	ประสิทธิภาพการลดลิกนิน (%)	ค่าความเข้มข้นของลิกนินเฉลี่ย (กรัม/ลิตร)	ประสิทธิภาพการลดลิกนิน (%)	ค่าความเข้มข้นของลิกนินเฉลี่ย (กรัม/ลิตร)	ประสิทธิภาพการลดลิกนิน (%)	ค่าความเข้มข้นของลิกนินเฉลี่ย (กรัม/ลิตร)	ประสิทธิภาพการลดลิกนิน (%)
0	7.457	0.00	7.457	0.00	7.457	0.00	7.457	0.00	7.457	0.00
2	6.340	14.97	5.962	20.04	6.460	13.37	6.735	9.68	6.787	8.98
4	5.361	28.11	3.729	50.00	5.378	27.88	6.512	12.67	6.615	11.29
6	5.155	30.87	2.612	64.98	5.275	29.26	6.375	14.51	6.529	12.44
8	4.536	39.17	1.993	73.27	4.863	34.79	6.220	16.59	6.546	12.21
10	4.553	38.94	1.993	73.27	4.828	35.25	6.237	16.36	6.564	11.98
12	4.553	38.94	1.993	73.27	4.880	34.56	6.237	16.36	6.564	11.98

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ค-6 ข้อมูลการทดลองศึกษาประสิทธิภาพในการลดลิกนิน เมื่อเลี้ยงรา Isolate A19 และรา Isolate B7 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผันแปรแหล่งอาหารคาร์บอน 2 ชนิด คือ น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลซูโครส ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงจากสูตร Czapek's Dox Medium บ่มที่อุณหภูมิห้องและเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 วัน ที่ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5

เวลา (วัน)	น้ำตาลกลูโคส		น้ำตาลซูโครส	
	ค่าความเข้มข้นของลิกนินเฉลี่ย (กรัม/ลิตร)	ประสิทธิภาพการลดลิกนิน (%)	ค่าความเข้มข้นของลิกนินเฉลี่ย (กรัม/ลิตร)	ประสิทธิภาพการลดลิกนิน (%)
0	7.457	0.00	7.457	0.00
2	6.340	14.97	5.911	20.74
4	5.584	25.11	3.729	50.00
6	4.330	41.93	2.577	65.44
8	3.883	47.93	1.976	73.50
10	3.900	47.70	1.976	73.50
12	3.883	47.93	1.976	73.50

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ค-7 ข้อมูลการทดลองศึกษาประสิทธิภาพในการลดลิกนิน เมื่อเลี้ยงรา Isolate A19 และรา Isolate B7 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งอาหารคาร์บอนผันแปรความเข้มข้นต่างๆ กัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงจากสูตร Czapek's Dox Medium บ่มที่อุณหภูมิห้องและเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 วัน ที่ ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5

เวลา (วัน)	น้ำตาลซูโครส 0.0%		น้ำตาลซูโครส 0.1%		น้ำตาลซูโครส 0.5%		น้ำตาลซูโครส 1.0%		น้ำตาลซูโครส 1.5%		น้ำตาลซูโครส 2.0%	
	ค่าความเข้มข้นของลิกนินเฉลี่ย (กรัม/ลิตร)	ประสิทธิภาพการลดลิกนิน (%)	ค่าความเข้มข้นของลิกนินเฉลี่ย (กรัม/ลิตร)	ประสิทธิภาพการลดลิกนิน (%)	ค่าความเข้มข้นของลิกนินเฉลี่ย (กรัม/ลิตร)	ประสิทธิภาพการลดลิกนิน (%)	ค่าความเข้มข้นของลิกนินเฉลี่ย (กรัม/ลิตร)	ประสิทธิภาพการลดลิกนิน (%)	ค่าความเข้มข้นของลิกนินเฉลี่ย (กรัม/ลิตร)	ประสิทธิภาพการลดลิกนิน (%)	ค่าความเข้มข้นของลิกนินเฉลี่ย (กรัม/ลิตร)	ประสิทธิภาพการลดลิกนิน (%)
0	7.457	0.00	7.457	0.00	7.457	0.00	7.457	0.00	7.457	0.00	7.457	0.00
2	7.200	3.45	6.340	14.98	5.963	20.03	5.979	19.82	5.928	20.50	5.928	20.50
4	6.443	13.59	4.603	38.27	3.833	48.59	3.814	48.85	3.729	50.00	3.711	50.23
6	5.670	23.96	3.797	49.09	2.663	64.28	2.577	65.44	2.612	64.98	2.526	66.13
8	5.567	25.35	2.853	61.74	2.097	71.88	2.045	72.58	2.010	73.04	1.993	73.27
10	5.601	24.88	2.870	61.51	2.113	71.66	2.045	72.58	2.027	72.81	1.993	73.27
12	5.584	25.11	2.903	61.07	2.113	71.66	2.045	72.58	2.010	73.04	1.993	73.27

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ค-8 ข้อมูลการทดลองศึกษาประสิทธิภาพในการลดลิกนิน เมื่อเลี้ยงรา Isolate A19 และรา Isolate B7 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผันแปรแหล่งอาหารไนโตรเจน 2 ชนิด คือ โซเดียมไนเตรต และแอมโมเนียมคลอไรด์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงจากสูตร Czapek's Dox Medium บ่มที่อุณหภูมิห้องและเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 วัน ที่ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5

เวลา (วัน)	โซเดียมไนเตรต		แอมโมเนียมคลอไรด์	
	ค่าความเข้มข้นของลิกนินเฉลี่ย (กรัม/ลิตร)	ประสิทธิภาพการลดลิกนิน (%)	ค่าความเข้มข้นของลิกนินเฉลี่ย (กรัม/ลิตร)	ประสิทธิภาพการลดลิกนิน (%)
0	7.457	0.00	7.457	0.00
2	5.928	20.50	6.426	13.83
4	3.849	48.39	5.120	31.34
6	2.663	64.28	3.918	47.46
8	2.079	72.12	3.436	53.92
10	2.079	72.12	3.471	53.46
12	2.096	71.89	3.454	53.69

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ค-9 ข้อมูลการทดลองศึกษาประสิทธิภาพในการลดลิกนิน เมื่อเลี้ยงรา Isolate A19 และรา Isolate B7 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้โซเดียมไนเตรตเป็นแหล่งอาหารไนโตรเจนผันแปรความเข้มข้นต่างๆ กัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงจากสูตร Czapek's Dox Medium บ่มที่อุณหภูมิห้องและเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 วัน ที่ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5

เวลา (วัน)	โซเดียมไนเตรต 0.0%		โซเดียมไนเตรต 0.1%		โซเดียมไนเตรต 0.2%		โซเดียมไนเตรต 0.3%		โซเดียมไนเตรต 0.4%		โซเดียมไนเตรต 0.5%	
	ค่าความเข้มข้นของลิกนินเฉลี่ย (กรัม/ลิตร)	ประสิทธิภาพการลดลิกนิน (%)	ค่าความเข้มข้นของลิกนินเฉลี่ย (กรัม/ลิตร)	ประสิทธิภาพการลดลิกนิน (%)	ค่าความเข้มข้นของลิกนินเฉลี่ย (กรัม/ลิตร)	ประสิทธิภาพการลดลิกนิน (%)	ค่าความเข้มข้นของลิกนินเฉลี่ย (กรัม/ลิตร)	ประสิทธิภาพการลดลิกนิน (%)	ค่าความเข้มข้นของลิกนินเฉลี่ย (กรัม/ลิตร)	ประสิทธิภาพการลดลิกนิน (%)	ค่าความเข้มข้นของลิกนินเฉลี่ย (กรัม/ลิตร)	ประสิทธิภาพการลดลิกนิน (%)
0	7.457	0.00	7.457	0.00	7.457	0.00	7.457	0.00	7.457	0.00	7.457	0.00
2	7.182	3.69	5.825	21.89	5.911	20.74	5.945	20.28	6.289	15.67	6.306	15.44
4	6.340	14.97	2.646	64.52	3.814	48.85	3.849	48.39	4.931	33.87	5.000	32.95
6	5.634	24.45	1.924	74.19	2.405	67.74	2.629	64.74	4.158	44.24	4.244	43.09
8	5.704	23.50	1.804	75.81	1.976	73.50	2.079	72.12	3.058	58.99	3.110	58.29
10	5.739	23.04	1.804	75.81	1.976	73.50	2.096	71.89	3.058	58.99	3.127	58.07
12	5.722	23.27	1.804	75.81	1.993	73.27	2.096	71.89	3.076	58.75	3.127	58.07

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ค-10 ข้อมูลการทดลองศึกษาประสิทธิภาพในการลดสี เมื่อใช้รา Isolate A19 เริ่มต้นในปริมาณที่แตกต่างกัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงจากสูตร Czapek's Dox Medium ปรับค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 5 บ่มที่อุณหภูมิห้องและเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 วัน

เวลา (วัน)	รา Isolate A19 5 มิลลิลิตร		รา Isolate A19 10 มิลลิลิตร		รา Isolate A19 15 มิลลิลิตร		รา Isolate A19 20 มิลลิลิตร	
	ค่าความเข้มข้นของสีเฉลี่ย (Pt.Co unit)	ประสิทธิภาพการลดสี (%)	ค่าความเข้มข้นของสีเฉลี่ย (Pt.Co unit)	ประสิทธิภาพการลดสี (%)	ค่าความเข้มข้นของสีเฉลี่ย (Pt.Co unit)	ประสิทธิภาพการลดสี (%)	ค่าความเข้มข้นของสีเฉลี่ย (Pt.Co unit)	ประสิทธิภาพการลดสี (%)
0	1833.333	0.00	1833.333	0.00	1833.333	0.00	1833.333	0.00
2	1766.667	3.64	1800.000	1.82	1733.333	5.45	1700.000	7.27
4	1366.667	25.45	1300.000	29.09	1233.333	32.73	1133.333	38.18
6	1166.667	36.36	1066.667	41.82	966.667	47.27	766.667	58.18
8	766.667	58.18	600.000	67.27	600.000	67.27	500.000	72.73
10	800.000	56.36	633.333	65.45	600.000	67.27	533.333	70.91
12	800.000	56.36	600.000	67.27	633.333	65.45	566.667	69.09

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ค-11 ข้อมูลการทดลองศึกษาประสิทธิภาพในการลดสี เมื่อใช้รา Isolate B7 เริ่มต้นในปริมาณที่แตกต่างกัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงจากสูตร Czapek's Dox Medium ปรับค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 5 บ่มที่อุณหภูมิห้องและเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 วัน

เวลา (วัน)	รา Isolate B7 5 มิลลิลิตร		รา Isolate B7 10 มิลลิลิตร		รา Isolate B7 15 มิลลิลิตร		รา Isolate B7 20 มิลลิลิตร	
	ค่าความเข้มข้นของสีเฉลี่ย (Pt.Co unit)	ประสิทธิภาพการลดสี (%)	ค่าความเข้มข้นของสีเฉลี่ย (Pt.Co unit)	ประสิทธิภาพการลดสี (%)	ค่าความเข้มข้นของสีเฉลี่ย (Pt.Co unit)	ประสิทธิภาพการลดสี (%)	ค่าความเข้มข้นของสีเฉลี่ย (Pt.Co unit)	ประสิทธิภาพการลดสี (%)
0	1833.333	0.00	1833.333	0.00	1833.333	0.00	1833.333	0.00
2	1800.000	1.82	1766.667	3.64	1733.333	5.45	1700.000	7.27
4	1567.667	14.49	1500.000	18.18	1466.667	20.00	1233.333	32.73
6	1466.667	20.00	1366.667	25.45	1033.333	43.64	900.000	50.91
8	1266.667	30.91	1066.667	41.82	800.000	56.36	666.667	63.64
10	1266.667	30.91	1100.000	40.00	800.000	56.36	700.000	61.82
12	1300.000	29.09	1100.000	40.00	833.333	54.55	733.333	60.00

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ค-12 ข้อมูลการทดลองศึกษาประสิทธิภาพในการลดสี เมื่อใช้รา Isolate A19 และ รา Isolate B7 ผสมกันในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงจากสูตร Czapek's Dox Medium ปรับค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 5 บ่มที่อุณหภูมิห้องและเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 วัน

เวลา (วัน)	รา Isolate A19: รา Isolate B7 เท่ากับ 2.5: 2.5 มิลลิลิตร		รา Isolate A19: รา Isolate B7 เท่ากับ 5.0: 5.0 มิลลิลิตร		รา Isolate A19: รา Isolate B7 เท่ากับ 7.5: 7.5 มิลลิลิตร		รา Isolate A19: รา Isolate B7 เท่ากับ 10.0: 10.0 มิลลิลิตร		รา Isolate A19: รา Isolate B7 เท่ากับ 12.5: 12.5 มิลลิลิตร	
	ค่าความเข้มข้นของสีเฉลี่ย (Pt.Co unit)	ประสิทธิภาพการลดสี (%)	ค่าความเข้มข้นของสีเฉลี่ย (Pt.Co unit)	ประสิทธิภาพการลดสี (%)	ค่าความเข้มข้นของสีเฉลี่ย (Pt.Co unit)	ประสิทธิภาพการลดสี (%)	ค่าความเข้มข้นของสีเฉลี่ย (Pt.Co unit)	ประสิทธิภาพการลดสี (%)	ค่าความเข้มข้นของสีเฉลี่ย (Pt.Co unit)	ประสิทธิภาพการลดสี (%)
0	1833.333	0.00	1833.333	0.00	1833.333	0.00	1833.333	0.00	1833.333	0.00
2	1700.000	7.27	1600.000	12.73	1600.000	12.73	1400.000	23.64	1366.667	25.45
4	1300.000	29.09	1033.333	43.64	1066.667	41.82	866.667	52.73	900.000	50.91
6	1133.333	38.18	866.667	52.73	700.000	61.82	500.000	72.73	533.333	70.91
8	833.333	54.55	633.333	65.45	433.333	76.36	266.667	85.45	266.667	85.45
10	866.667	52.73	633.333	65.45	466.667	74.55	300.000	83.64	333.333	81.82
12	866.667	52.73	700.000	61.82	500.000	72.73	300.000	83.64	266.667	85.45

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ค-13 ข้อมูลการทดลองศึกษาประสิทธิภาพในการลดสีของรา Isolate A19 และรา Isolate B7 เมื่อทำการปรับความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีระดับต่างกัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงจากสูตร Czapek's Dox Medium บ่มที่อุณหภูมิห้องและเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 วัน

เวลา (วัน)	pH 3		pH 5		pH 7		pH 9		pH 11	
	ค่าความเข้มข้นของสีเฉลี่ย (Pt.Co unit)	ประสิทธิภาพการลดสี (%)	ค่าความเข้มข้นของสีเฉลี่ย (Pt.Co unit)	ประสิทธิภาพการลดสี (%)	ค่าความเข้มข้นของสีเฉลี่ย (Pt.Co unit)	ประสิทธิภาพการลดสี (%)	ค่าความเข้มข้นของสีเฉลี่ย (Pt.Co unit)	ประสิทธิภาพการลดสี (%)	ค่าความเข้มข้นของสีเฉลี่ย (Pt.Co unit)	ประสิทธิภาพการลดสี (%)
0	1833.333	0.00	1833.333	0.00	1833.333	0.00	1833.333	0.00	1833.333	0.00
2	1600.000	12.73	1433.333	21.82	1633.333	10.91	1666.667	9.09	1733.333	5.45
4	1300.000	29.09	666.667	63.64	1500.000	18.18	1533.333	16.36	1566.667	14.55
6	1133.333	38.18	500.000	72.73	1166.667	36.36	1200.000	34.55	1466.667	20.00
8	800.000	56.36	266.667	85.45	866.667	52.73	1000.000	45.45	1300.000	29.09
10	800.000	56.36	266.667	85.45	933.333	49.09	1033.333	43.64	1300.000	29.09
12	800.000	56.36	300.000	83.64	933.333	49.09	1033.333	43.64	1333.333	27.27

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ค-14 ข้อมูลการทดลองศึกษาประสิทธิภาพในการลดสี เมื่อเลี้ยงรา Isolate A19 และ รา Isolate B7 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผันแปรแหล่งอาหารคาร์บอน 2 ชนิด คือ น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลซูโครส ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงจากสูตร Czapek's Dox Medium บ่มที่อุณหภูมิห้องและเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 วัน ที่ ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5

เวลา (วัน)	กลูโคส		ซูโครส	
	ค่าความเข้มข้นของสีเฉลี่ย (Pt.Co unit)	ประสิทธิภาพการลดสี (%)	ค่าความเข้มข้นของสีเฉลี่ย (Pt.Co unit)	ประสิทธิภาพการลดสี (%)
0	1833.333	0.00	1833.333	0.00
2	1466.667	20.00	1366.667	25.45
4	966.667	47.27	566.667	69.09
6	500.000	72.73	366.667	80.00
8	366.667	80.00	200.000	89.09
10	400.000	78.18	200.000	89.09
12	400.000	78.18	200.000	89.09

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ค-15 ข้อมูลการทดลองศึกษาประสิทธิภาพในการลดสี เมื่อเลี้ยงรา Isolate A19 และ รา Isolate B7 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งอาหารคาร์บอนผันแปรความเข้มข้นต่างๆ กัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงจากสูตร Czapek's Dox Medium บ่มที่อุณหภูมิห้องและเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 วัน ที่ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5

เวลา (วัน)	ซูโครส 0.0%		ซูโครส 0.1%		ซูโครส 0.5%		ซูโครส 1.0%		ซูโครส 1.5%		ซูโครส 2.0%	
	ค่าความเข้มข้นของสีเฉลี่ย (Pt.Co unit)	ประสิทธิภาพการลดสี (%)	ค่าความเข้มข้นของสีเฉลี่ย (Pt.Co unit)	ประสิทธิภาพการลดสี (%)	ค่าความเข้มข้นของสีเฉลี่ย (Pt.Co unit)	ประสิทธิภาพการลดสี (%)	ค่าความเข้มข้นของสีเฉลี่ย (Pt.Co unit)	ประสิทธิภาพการลดสี (%)	ค่าความเข้มข้นของสีเฉลี่ย (Pt.Co unit)	ประสิทธิภาพการลดสี (%)	ค่าความเข้มข้นของสีเฉลี่ย (Pt.Co unit)	ประสิทธิภาพการลดสี (%)
0	1833.333	0.00	1833.333	0.00	1833.333	0.00	1833.333	0.00	1833.333	0.00	1833.333	0.00
2	1666.667	9.09	1533.333	16.36	1366.667	25.45	1333.333	27.27	1300.000	29.09	1300.000	29.09
4	1400.000	23.64	1033.333	43.64	566.667	69.09	533.333	70.91	500.000	72.73	466.667	74.55
6	1000.000	45.45	633.333	65.45	333.333	81.82	333.333	81.82	300.000	83.64	266.667	85.45
8	833.333	54.55	266.667	85.45	166.667	90.91	166.667	90.91	166.667	90.91	166.667	90.91
10	833.333	54.55	300.000	83.64	166.667	90.91	166.667	90.91	200.000	89.09	166.667	90.91
12	866.667	52.73	333.333	81.82	200.000	89.09	166.667	90.91	300.000	83.64	166.667	90.91

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ค-16 ข้อมูลการทดลองศึกษาประสิทธิภาพในการลดสี เมื่อเลี้ยงรา Isolate A19 และ รา Isolate B7 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผันแปรแหล่งอาหารไนโตรเจน 2 ชนิด คือ โซเดียมไนเตรต และแอมโมเนียมคลอไรด์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงจากสูตร Czapek's Dox Medium บ่มที่อุณหภูมิห้องและเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 วัน ที่ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5

เวลา (วัน)	โซเดียมไนเตรต		แอมโมเนียมคลอไรด์	
	ค่าความเข้มข้นของสีเฉลี่ย (Pt.Co unit)	ประสิทธิภาพการลดสี (%)	ค่าความเข้มข้นของสีเฉลี่ย (Pt.Co unit)	ประสิทธิภาพการลดสี (%)
0	1833.333	0.00	1833.333	0.00
2	1433.333	21.82	1566.667	14.55
4	600.000	67.27	766.667	58.18
6	333.333	81.82	433.333	76.36
8	166.667	90.91	300.000	83.64
10	166.667	90.91	300.000	83.64
12	166.667	90.91	366.667	80.00

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ค-17 ข้อมูลการทดลองศึกษาประสิทธิภาพในการลดสี เมื่อเลี้ยงรา Isolate A19 และ รา Isolate B7 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้โซเดียมไนเตรตเป็นแหล่งอาหารไนโตรเจนผันแปรความเข้มข้นต่างๆ กัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงจากสูตร Czapek's Dox Medium บ่มที่อุณหภูมิห้องและเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 วัน

ที่ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5

เวลา (วัน)	โซเดียมไนเตรต 0.0%		โซเดียมไนเตรต 0.1%		โซเดียมไนเตรต 0.2%		โซเดียมไนเตรต 0.3%		โซเดียมไนเตรต 0.4%		โซเดียมไนเตรต 0.5%	
	ค่าความเข้มข้นของสีเฉลี่ย (Pt.Co unit)	ประสิทธิภาพการลดสี (%)	ค่าความเข้มข้นของสีเฉลี่ย (Pt.Co unit)	ประสิทธิภาพการลดสี (%)	ค่าความเข้มข้นของสีเฉลี่ย (Pt.Co unit)	ประสิทธิภาพการลดสี (%)	ค่าความเข้มข้นของสีเฉลี่ย (Pt.Co unit)	ประสิทธิภาพการลดสี (%)	ค่าความเข้มข้นของสีเฉลี่ย (Pt.Co unit)	ประสิทธิภาพการลดสี (%)	ค่าความเข้มข้นของสีเฉลี่ย (Pt.Co unit)	ประสิทธิภาพการลดสี (%)
0	1833.333	0.00	1833.333	0.00	1833.333	0.00	1833.333	0.00	1833.333	0.00	1833.333	0.00
2	1700.000	7.27	1333.333	27.27	1433.333	21.82	1466.667	20.00	1566.667	14.55	1600.000	12.73
4	1533.333	16.36	433.333	76.36	366.667	80.00	533.333	70.91	933.333	49.09	900.000	50.91
6	1166.667	36.36	233.333	87.27	200.000	89.09	300.000	83.64	533.333	70.91	466.667	74.55
8	1033.333	43.64	100.000	94.55	166.667	90.91	166.667	90.91	233.333	87.27	266.667	85.45
10	1066.667	41.82	100.000	94.55	166.667	90.91	200.000	89.09	266.667	85.45	266.667	85.45
12	1066.667	41.82	100.000	94.55	166.667	90.91	200.000	89.09	300.000	83.64	266.667	85.45

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ค-18 ข้อมูลการทดลองศึกษาประสิทธิภาพในการลดลิกนินและสี เมื่อนำรา Isolate A19 และ รา Isolate B7 มาทดลองใช้กับน้ำทิ้งในการผลิตลิกนินที่ปรับสภาวะให้เหมาะสม โดยเตรียมชุดการทดลอง 2 ชุด ชุดแรกเป็นชุดควบคุมไม่มีการเติมราลงไป ส่วนชุดที่สองใส่ รา Isolate A19 และ รา Isolate B7 บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 12 วัน

เวลา (วัน)	ชุดควบคุม				ชุดที่ใส่ รา Isolate A19 และ รา Isolate B7			
	ค่าความเข้มข้นของลิกนินเฉลี่ย (กรัม/ลิตร)	ประสิทธิภาพการลดลิกนิน (%)	ค่าความเข้มข้นของสีเฉลี่ย (Pt.Co unit)	ประสิทธิภาพการลดสี (%)	ค่าความเข้มข้นของลิกนินเฉลี่ย (กรัม/ลิตร)	ประสิทธิภาพการลดลิกนิน (%)	ค่าความเข้มข้นของสีเฉลี่ย (Pt.Co unit)	ประสิทธิภาพการลดสี (%)
0	7.457	0.00	1833.333	0.00	7.457	0.00	1833.333	0.00
1	7.457	0.00	1833.333	0.00	7.302	2.07	1766.667	3.64
2	7.423	0.46	1833.333	0.00	6.787	8.98	1600.000	12.73
3	7.388	0.92	1833.333	0.00	6.117	17.97	1200.000	34.55
4	7.320	1.84	1800.000	1.82	4.656	37.56	833.333	54.55
5	7.251	2.76	1800.000	1.82	3.918	47.46	566.667	69.09
6	7.182	3.69	1800.000	1.82	2.680	64.06	433.333	76.36
7	7.148	4.15	1766.667	3.64	2.268	69.59	333.333	81.82
8	7.113	4.61	1766.667	3.64	2.027	72.81	300.000	83.64
9	7.096	4.84	1733.333	5.45	2.010	73.04	266.667	85.45
10	7.096	4.84	1733.333	5.45	1.976	73.50	166.667	90.91
11	7.079	5.07	1733.333	5.45	1.976	73.50	166.667	90.91
12	7.079	5.07	1733.333	5.45	1.993	73.27	166.667	90.91

ภาคผนวก ง

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ตารางที่ ง-1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนการศึกษาประสิทธิภาพในการลดลิกนินของรา Isolate A19 โดยใช้รา Isolate A19 เริ่มต้นในปริมาณที่แตกต่างกัน

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	34.742	9	3.860	72.105	.000
Intercept	855.359	1	855.359	15977.447	.000
A19	3.546	3	1.182	22.080	.000
DAY	31.195	6	5.199	97.118	.000
Error	.964	18	5.354E-02		
Total	891.064	28			
Corrected Total	35.705	27			

a R Squared = .973 (Adjusted R Squared = .960)

Duncan		N	Subset		
	A19		1	2	3
	20 ml	7	5.1007		
	15 ml	7	5.2971		
	10 ml	7		5.6870	
	5 ml	7			6.0234
	Sig.		.130	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. Based on Type III Sum of Squares The error term is Mean Square(Error) = 5.354E-02.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 7.000.

b Alpha = .05.

ตารางที่ ง-2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนการศึกษาประสิทธิภาพในการลดลิกนินของรา Isolate B7 โดยใช้รา Isolate B7 เริ่มต้นในปริมาณที่แตกต่างกัน

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	25.751	9	2.861	122.695	.000
Intercept	1005.673	1	1005.673	43125.832	.000
B7	1.198	3	.399	17.122	.000
DAY	24.553	6	4.092	175.481	.000
Error	.420	18	2.332E-02		
Total	1031.844	28			
Corrected Total	26.170	27			

a R Squared = .984 (Adjusted R Squared = .976)

Duncan		N	Subset	
	B7		1	2
	20 ml	7	5.7266	
	15 ml	7	5.8597	
	10 ml	7		6.1586
	5 ml	7		6.2274
	Sig.		.120	.410

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. Based on Type III Sum of Squares The error term is Mean Square(Error) = 2.332E-02.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 7.000.

b Alpha = .05.

ตารางที่ ง-3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนการศึกษาประสิทธิภาพในการลดลิกนิน เมื่อใช้รา Isolate A19 และ รา Isolate B7 ผสมกันในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	104.741	10	10.474	23.366	.000
Intercept	853.780	1	853.780	1904.610	.000
เชื้อผสม	37.078	4	9.269	20.678	.000
DAY	67.663	6	11.277	25.157	.000
Error	10.758	24	.448		
Total	969.280	35			
Corrected Total	115.499	34			

a R Squared = .907 (Adjusted R Squared = .868)

Duncan		N	Subset	
	เชื้อผสม		1	2
	10.0: 10.0 ml	7	3.6866	
	12.5: 12.5 ml	7	3.6917	
	7.5:7.5 ml	7		5.5351
	5.0: 5.0 ml	7		5.8391
	2.5: 2.5 ml	7		5.9424
	Sig.		.989	.293

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. Based on Type III Sum of Squares The error term is Mean Square(Error) = .448.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 7.000.

b Alpha = .05.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ง-4 การวิเคราะห์ความแปรปรวนการศึกษาประสิทธิภาพในการลดลิกนินของรา Isolate A19 และ รา Isolate B7 เมื่อทำการปรับความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีระดับต่างกัน

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	71.618	10	7.162	12.398	.000
Intercept	1093.907	1	1093.907	1893.704	.000
pH	41.107	4	10.277	17.790	.000
DAY	30.512	6	5.085	8.803	.000
Error	13.864	24	.578		
Total	1179.389	35			
Corrected Total	85.482	34			

a R Squared = .838 (Adjusted R Squared = .770)

Duncan		N	Subset			
	pH		1	2	3	4
	5	7	3.6770			3.6770
	3	7		5.4221		
	7	7		5.5916		
	9	7			6.5390	
	11	7			6.7231	
	Sig.		1.000	.680	.654	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. Based on Type III Sum of Squares The error term is Mean Square(Error) = .578.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 7.000.

b Alpha = .05.

ตารางที่ ง-5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนการศึกษาประสิทธิภาพในการลดลิกนิน เมื่อเลี้ยงรา Isolate A19 และ รา Isolate B7 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งอาหารคาร์บอนผันแปรความเข้มข้นต่างๆ กัน

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	165.658	11	15.060	48.335	.000
Intercept	753.703	1	753.703	2419.026	.000
CONC.CARBON SOURCE	35.781	5	7.156	22.968	.000
DAY	129.876	6	21.646	69.473	.000
Error	9.347	30	.312		
Total	928.708	42			
Corrected Total	175.005	41			

a R Squared = .947 (Adjusted R Squared = .927)

Duncan		N	Subset		
	CONC.CARBON SOURCE		1	2	3
	0.5%	7	3.6573		
	1.0%	7	3.6819		
	0.1%	7	3.7089		
	2.0%	7	3.7484		
	1.5%	7		4.4033	
	0.0%	7			6.2174
	Sig.		.784	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. Based on Type III Sum of Squares The error term is Mean Square(Error) = .312.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 7.000.

b Alpha = .05.

ตารางที่ ง-6 การวิเคราะห์ความแปรปรวนการศึกษาประสิทธิภาพในการลดลิกนิน เมื่อเลี้ยงรา Isolate A19 และ รา Isolate B7 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้โซเดียมไนเตรตเป็นแหล่งอาหารไนโตรเจนผันแปรความเข้มข้นต่างๆ กัน

Dependent Variable: LIGNIN Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	158.115	11	14.374	36.604	.000
Intercept	798.429	1	798.429	2033.215	.000
CONC.NITROGEN SOURCE	39.727	5	7.945	20.233	.000
DAY	118.388	6	19.731	50.246	.000
Error	11.781	30	.393		
Total	968.325	42			
Corrected Total	169.896	41			

a R Squared = .931 (Adjusted R Squared = .905)

Duncan		N	Subset		
	CONC.NITROGEN SOURCE		1	2	3
	0.1%	7	3.3234		
	0.2%	7	3.6474		
	0.3%	7	3.7359		
	0.4%	7		4.5753	
	0.5%	7		4.6244	
	0.0%	7			6.2540
	Sig.		.255	.884	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. Based on Type III Sum of Squares The error term is Mean Square(Error) = .393.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 7.000.

b Alpha = .05.

ตารางที่ ง-7 การวิเคราะห์ความแปรปรวนการศึกษาประสิทธิภาพในการลดสีของรา Isolate A19 โดยใช้รา Isolate A19 เริ่มต้นในปริมาณที่แตกต่างกัน

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	6729958.580	9	747773.176	185.959	.000
Intercept	34247657.256	1	34247657.256	8516.850	.000
A19	157897.141	3	52632.380	13.089	.000
DAY	6572061.439	6	1095343.573	272.395	.000
Error	72380.964	18	4021.165		
Total	41049996.800	28			
Corrected Total	6802339.544	27			

a R Squared = .989 (Adjusted R Squared = .984)

Duncan		N	Subset		
	A19		1	2	3
	20 ml	7	1004.7619		
	15 ml	7		1085.7141	
	10 ml	7		1119.0476	
	5 ml	7			1214.2859
	Sig.		1.000	.338	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. Based on Type III Sum of Squares The error term is Mean Square(Error) = 4021.165.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 7.000.

b Alpha = .05.

ตารางที่ ง-8 การวิเคราะห์ความแปรปรวนการศึกษาประสิทธิภาพในการลดสีของรา Isolate B7 โดยใช้รา Isolate B7 เริ่มต้นในปริมาณที่แตกต่างกัน

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	4032136.980	9	448015.220	30.499	.000
Intercept	47582096.123	1	47582096.123	3239.167	.000
B7	642794.680	3	214264.893	14.586	.000
DAY	3389342.299	6	564890.383	38.455	.000
Error	264412.942	18	14689.608		
Total	51878646.045	28			
Corrected Total	4296549.922	27			

a R Squared = .938 (Adjusted R Squared = .908)

Duncan		N	Subset	
	B7		1	2
	20 ml	7	1109.5237	
	15 ml	7	1214.2380	
	10 ml	7		1390.4763
	5 ml	7		1500.1430
	Sig.		.123	.108

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. Based on Type III Sum of Squares The error term is Mean Square(Error) = 14689.608.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 7.000.

b Alpha = .05.

ตารางที่ ง-9 การวิเคราะห์ความแปรปรวนการศึกษาประสิทธิภาพในการลดสี เมื่อใช้รา Isolate A19 และ รา Isolate B7 ผสมกันในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	9309139.743	10	930913.974	15.787	.000
Intercept	26173459.164	1	26173459.164	443.877	.000
เชื้อผสม	2654157.245	4	663539.311	11.253	.000
DAY	6654982.498	6	1109163.750	18.810	.000
Error	1415174.448	24	58965.602		
Total	36897773.356	35			
Corrected Total	10724314.191	34			

a R Squared = .868 (Adjusted R Squared = .813)

Duncan		N	Subset		
	เชื้อผสม		1	2	3
	10.0: 10.0 ml	7	438.0954		
	12.5 : 12.5 ml	7	680.9523	680.9523	
	7.5: 7.5 ml	7		942.8571	942.8571
	5.0: 5.0 ml	7			1042.8570
	2.5: 2.5 ml	7			1219.0476
	Sig.		.074	.055	.054

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. Based on Type III Sum of Squares The error term is Mean Square(Error) = 58965.602.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 7.000.

b Alpha = .05.

.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ง-10 การวิเคราะห์ความแปรปรวนการศึกษาประสิทธิภาพในการลดสีของรา Isolate A19 และรา Isolate B7 เมื่อทำการปรับความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีระดับต่างกัน

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	7464315.265	10	746431.527	22.738	.000
Intercept	49921135.691	1	49921135.691	1520.687	.000
pH	2615682.321	4	653920.580	19.920	.000
DAY	4848632.944	6	808105.491	24.616	.000
Error	787872.510	24	32828.021		
Total	58173323.467	35			
Corrected Total	8252187.775	34			

a R Squared = .905 (Adjusted R Squared = .865)

Duncan		N	Subset		
	pH		1	2	3
	5	7	690.4761		
	3	7		1180.9523	
	7	7		1266.6666	
	9	7		1328.5713	1328.5713
	11	7			1504.7619
	Sig.		1.000	.162	.081

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. Based on Type III Sum of Squares The error term is Mean Square(Error) = 32828.021.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 7.000.

b Alpha = .05.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ง-11 การวิเคราะห์ความแปรปรวนการศึกษาประสิทธิภาพในการลดสี เมื่อเลี้ยงรา Isolate A19 และ รา Isolate B7 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งอาหารคาร์บอนผันแปรความเข้มข้นต่างๆ กัน

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	15363669.974	11	1396697.270	79.599	.000
Intercept	25148809.524	1	25148809.524	1433.249	.000
CONC.CARBON SOURCE	1790078.416	5	358015.683	20.404	.000
DAY	13573591.558	6	2262265.260	128.928	.000
Error	526401.547	30	17546.718		
Total	41038881.044	42			
Corrected Total	15890071.521	41			

a R Squared = .967 (Adjusted R Squared = .955)

Duncan		N	Subset		
	CONC.CARBON SOURCE		1	2	3
	0.5%	7	623.8097		
	1.0%	7	647.6190		
	1.5%	7	657.1429		
	2.0%	7	661.9049		
	0.1%	7		847.6189	
	0.0%	7			1204.7619
	Sig.		.629	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. Based on Type III Sum of Squares The error term is Mean Square(Error) = 17546.718.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 7.000.

b Alpha = .05.

ตารางที่ ง-12 การวิเคราะห์ความแปรปรวนการศึกษาประสิทธิภาพในการลดสี เมื่อเลี้ยงรา Isolate A19 และ รา Isolate B7 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้โซเดียมไนเตรตเป็นแหล่งอาหารไนโตรเจนผันแปรความเข้มข้นต่างๆ กัน

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	16602930.290	11	1509357.299	51.639	.000
Intercept	27254629.093	1	27254629.093	932.443	.000
CONC.NITROGEN SOURCE	2714418.298	5	542883.660	18.573	.000
DAY	13888511.993	6	2314751.999	79.193	.000
Error	876878.172	30	29229.272		
Total	44734437.556	42			
Corrected Total	17479808.463	41			

a R Squared = .950 (Adjusted R Squared = .931)

Duncan		N	Subset		
	CONC.NITROGEN SOURCE		1	2	3
	0.1%	7	590.4760		
	0.2%	7	619.0477	619.0477	
	0.3%	7	671.4286	671.4286	
	0.5%	7		800.0001	
	0.4%	7		809.5237	
	0.0%	7			1342.8571
	Sig.		.411	.065	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. Based on Type III Sum of Squares The error term is Mean Square(Error) = 29229.272.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 7.000.

b Alpha = .05.

ตารางที่ ง-13 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพในการลดลิกนินและประสิทธิภาพในการลดสี เมื่อเลี้ยงรา Isolate A19 และ รา Isolate B7 ในสภาวะที่เหมาะสม

Correlations

		LIGNIN	COLOR
LIGNIN	Pearson Correlation	1.000	.998*
	Sig. (2-tailed)	.	.000
	N	7	7
COLOR	Pearson Correlation	.998*	1.000
	Sig. (2-tailed)	.000	.
	N	7	7

** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวพิมพ์ชนก เต็งเจริญ เกิดวันที่ 20 มิถุนายน พ.ศ. 2523 ที่จังหวัดเพชรบูรณ์ จบการศึกษาวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร เมื่อปี พ.ศ. 2544 และเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม (สหสาขาวิชา) บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปี พ.ศ. 2544

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย