บทที่ 1

บทนำ

การฟอกเยื่อกระดาษโดยวิธีทางชีวภาพ(biological bleaching) เป็นกระบวนการย่อยสลายลิกนินออกจากเยื่อกระดาษ โดยใช้จุลินทรีย์ เช่น รา HiroiและEriksson(1976) และ Lundquist et al.(1977) ได้รายงานว่า white rot fungi สามารถที่จะย่อยสลาย ลิกนินได้ Kirk และ Yang (1979) ได้รายงานว่า Trametes versicolor และ Phanerochaete chrysosporium ซึ่งจัดว่าเป็น white rot fungi สามารถย่อยสลายส่วนของลิกนิน ออกจากเยื่อคราฟท์ของสน (pine kraft pulp)ได้

หลักการสำคัญของการฟอกเยื่อ คือ การลดปริมาณหรือแยกสารที่เป็นสาเหตุของการทำให้เยื่อมีสีออกไป โดยที่ไม่ทำให้คุณภาพของเยื่อกระดาษลดต่ำลง และกระดาษไม่กลับคืนสีง่ายเมื่อเก็บไว้เป็นเวลานาน ซึ่งสารนี้ส่วนใหญ่มาจากสารประกอบลิกนินในไม้ โดยทั่วๆไปการฟอกเยื่อกระดาษได้มีการใช้สารเคมี สารเคมีที่ใช้ฟอกเยื่อกระดาษกันมาก ได้แก่ คลอรีน โซดาไฟ ไฮโปคลอไรต์ คลอรีนไดออกไซด์ ไฮโดรเจน หรือ โซเดียมเปอร์ออกไซด์ การฟอกนี้จะแบ่งได้เป็นหลายขั้นตอน เช่น CEH โดยที่ C หมายถึง การฟอกโดยใช้ คลอรีน เพื่อแยกสลายลิกนิน E หมายถึงการสกัดเอาลิกนิน ที่เหลือจากเยื่อในขั้นตอน C ด้วยโซดาไฟ H หมายถึงการฟอกโดยใช้ไฮโปคลอไรต์(Singh,1979)

ปัจจุบันอุตสาหกรรมการทำกระดาษและเยื่อกระดาษ ได้เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงกระบวนการฟอกเยื่อกระดาษ โดยทำให้มีการใช้คลอรีนน้อยที่สุดเพื่อลดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม และสนองความต้องการของตลาดและผู้บริโภค และเป็นการเพิ่มทางเลือก ในการที่จะลดคลอรีนในกระบวนการฟอกเยื่อโดยวิธีทางเคมีนั้น เทคโนโลยีชีวภาพได้เข้ามามีบทบาทสำคัญ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้ white rot fungi ในการย่อยส่วนของลิกนินในเยื่อกระดาษที่ยังไม่ได้ฟอก (Kira, 1993) เนื่องจากสารประกอบคลอรีนต่าง ๆ ที่ใช้ในกระบวนการฟอกเยื่อกระดาษก่อให้เกิดพิษและการแปรผันทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต (Ander et

al,1977 และ Eriksson et al, 1979)

เป้าหมายการฟอกเยื่อโดยใช้เชื้อรานี้ ก็เพื่อดึงเอาส่วนของลิกนินออกจากเยื่อกระดาษ โดยเฉพาะเชื้อรา P. chrysosporium ซึ่งสร้างเอนไซม์ลิกนินเพอร์ออกซิเดสที่สามารถย่อยลิกนินได้ และควบคุมสภาวะที่ไม่ให้สร้างเอนไซม์เซลลูเลสมากเกินเพื่อไม่ให้ส่วนของโครงสร้างคาร์โบไฮเดรตโดยเฉพาะส่วนของเส้นใยเซลลูโลสถูกย่อยสลายไป หรือถูกย่อยสลายไปน้อยที่สุด(Boominathan and Reddy, 1992) เพื่อให้ได้ผลผลิตของเยื่อสูงขึ้น ประหยัดสารเคมี พลังงานและเกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมน้อยกว่าการฟอกเยื่อโดยวิธีทางเคมี ซึ่งการผลิตเยื่อกระดาษในประเทศไทย ยังมีการใช้สารประกอบคลอรีนอยู่มาก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ใช้เยื่อที่ได้จากชานอ้อย และเยื่อที่ได้จากไม้ยูคาลิปตัส ซึ่งเป็นวัตถุดิบที่ปลูกขึ้นได้ง่ายในประเทศไทย และใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตเยื่อกระดาษภายในประเทศ โดยทำการศึกษาทดลองและเปรียบเทียบวิธีทางชีวภาพและทางเคมี ทั้งในด้านคุณภาพของเยื่อที่ได้จากการฟอกและคุณภาพของน้ำเสียหลังการผลิตหรือนำเอาวิธีทางชีวภาพ มาประยุกต์ร่วมกับวิธีทางเคมี โดยใช้วิธีทางชีวภาพแทนขั้นตอน C หรือ E และใช้วิธีทางเคมีในขั้นตอน H เพื่อศึกษาความเป็นไปได้และมีการเปรียบเทียบให้ทราบถึงข้อดีและข้อเสีย จากวิธีการฟอกเยื่อทั้ง 2 แบบ รวมทั้งยังเป็นแนวทางในการนำวิธีการฟอกเยื่อทางชีวภาพ มาประยุกต์ใช้ให้เข้ากับการผลิตเยื่อกระดาษในระดับอุตสาหกรรม และเป็นข้อมูลเบื้องต้น ในการค้นคว้าพัฒนางานด้านนี้ในประเทศไทยต่อไป

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นศึกษาถึงศักยภาพของการฟอกเยื่อกระดาษ โดยใช้เชื้อรา P. chrysosporium แล้วนำมาประยุกต์ใช้ทดแทนวิธีการฟอกเยื่อกระดาษทางเคมีหรือใช้ร่วมกับวิธีทางเคมี และเปรียบเทียบคุณภาพของเยื่อที่ฟอกได้จากทั้ง 2 วิธี รวมทั้งศึกษาคุณภาพของน้ำเสียที่ได้หลังจากการฟอก

การตรวจเอกสาร

การผลิตเยื่อ (pulping) และกระดาษจากไม้ เป็นอุตสาหกรรมที่สำคัญอย่างหนึ่ง การผลิตกระดาษทั่วโลกต่อปีประมาณ 125 ล้านเมตริกตัน ผลิตภัณฑ์กระดาษถูกใช้ในการพิมพ์ การเขียน การบรรจุภัณฑ์ และจุดประสงค์

จากเป็นการลดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมแล้ว วิธีทางชีวภาพจะช่วยลดค่าใช้จ่ายในการผลิต เนื่องจากลดการใช้ทั้งพลังงานและสารเคมีต่างๆ (Boominthan and Reddy ,1992) ในกระบวนการฟอกเยื่อทางชีวภาพนั้นจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารลิกนินเป็นปัจจัยสำคัญ และให้ประโยชน์สูงสุดต่ออุตสาหกรรมการผลิตเยื่อและกระดาษ จากรายงานการวิจัยต่าง ๆ ที่ผ่านมาได้แสดงให้เห็นว่าเชื้อราที่สามารถย่อยสลายลิกนินมีบทบาทสำคัญในการผลิตเยื่อโดยวิธีชีวภาพ การฟอกเยื่อโดยวิธีชีวภาพ การลดสีและการลดสารพิษปริมาณมาก ที่เกิดจากอุตสาหกรรมการผลิตเยื่อและกระดาษทั่วโลก(Kirk, 1989) นอกจากนี้รายงานการวิจัยต่างๆที่ตีพิมพ์เป็นจำนวนมากได้มีการบ่งชี้ว่า เชื้อราที่สามารถย่อยสลายลิกนินได้นั้นสามารถที่ย่อยสลายสารมลพิษต่าง ๆ ที่ก่อให้เกิดพิษต่อสิ่งแวดล้อม เช่น dioxins benzo(a) pyrenes และสารพิษอื่นๆซึ่งก่อให้เกิดอันตรายด้านสุขภาพอย่างรุนแรงต่อมวลมนุษย์และสัตว์ทั่วโลก (Tien,1987; Buswell and Odier 1987 และ Buswell,1991)

ด้วยงานวิจัยบุกเบิกของ Kirk และคณะ ในปี 1975 และผู้วิจัยคณะเดียวกันในปี 1978 ซึ่งศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับสอบวิเคราะห์ ligninolytic activity ของ P. chrysosporium จึงทำให้ลักษณะทางกายภาพของ white rot fungi ซึ่งสามารถย่อยสลายลิกนินได้รับความสนใจ มีการศึกษาตามหลักอนุกรมวิธานทำให้พบว่า P. chrysosporium เป็นราชนิดเดียวกับ Sporotrichum pulveruentum (Burdsall,1974) นอกจากนี้ยังได้มีการพัฒนาวิธีการสอบวิเคราะห์ ซึ่งมีความไวพอที่จะสอบวิเคราะห์ ligninolytic activities ของเชื้อราที่ย่อยสลายลิกนินได้ ภายในเวลาที่สั้นกว่าวิธีตามแบบธรรมดา และได้กำหนดค่าของ ligninolytic activities โดยการวัด $^{14}CO_2$ ซึ่งได้มาจาก DHP (dehydrogenated polymer of coniferyl alcohol) หรือลิกนินตามธรรมชาติแล้วติดฉลาก ^{14}C ที่โซ่ข้าง หรือ aromatic ring หรือ methoxy group Haider และ Trojanowski (1975)ได้พัฒนาวิธีสอบวิเคราะห์เช่นเดียวกัน โดยนำมาใช้ในกระบวนการต่างๆ ได้แก่ การย่อยสลาย kraft lignin lignin sulfonates (Lundguis et al., 1977) poplar wood lignin (Hatakka and Uusi-Rauva, 1983) และ wheat straw (Agosim, Daudin and Odier, 1985) ที่

มีการติดฉลาก ^{14}C ร่วมกับการใช้จุลินทรีย์ การตรวจวิเคราะห์ทำโดยการวัด ^{14}C ที่ติดกับ CO_2 อย่างไรก็ตามวิธีการสอบวิเคราะห์เช่นนี้ก็มีข้อจำกัดที่สำคัญ เนื่องจากลิกนินสังเคราะห์ที่ใช้ในการติดฉลาก มีราคาแพงและวิธีการใช้ยุ่งยาก นอกจากนี้ยังต้องแน่ใจด้วยว่าลิกนินสังเคราะห์ที่เตรียมได้มีลักษณะเป็นโพลีเมอร์ (polymer) ซึ่งเป็นปัญหาที่สำคัญของ DHP ในการใช้เป็นสารทดสอบ (Boominathan และ Reddy, 1992) นอกจากนี้ได้มีการใช้สีย้อมที่มีคุณสมบัติเป็น (polymeric dyes) ชนิดอื่น ๆ ในการทดสอบการย่อยสลายลิกนิน เช่น poly R poly B remazol blue ได้ถูกนำมาใช้ในการวัดการย่อยสลายลิกนิน เช่นกัน (Gold, Glenn และ Alic, 1988) แทน DHP แต่คุณภาพไม่ดีเท่ากับ ^{14}C ของ DHP

มีการศึกษาวิจัยมากมายที่ใช้ลิกนินสังเคราะห์ (lignin model compounds) ในการวิจัยแทนการใช้ลิกนินจากธรรมชาติจริงๆ ซึ่งมีโครงสร้างซับซ้อน (ส่วนมากลิกนินสังเคราะห์เป็นสารประกอบพวกโมโนเมอร์หรือ ไดเมอร์ และอาจเป็นพวกไตรเมอร์บ้าง) เพื่อศึกษากลไกการย่อยสลายลิกนิน การใช้สารประกอบลิกนินสังเคราะห์เหล่านี้ได้พิสูจน์แล้วว่าไม่สามารถที่จะอธิบายได้ชัดเจนถึงกระบวนการ ที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลาย lignin polymer หรือกลไกของบทบาทเอนไซน์ต่างๆที่ซับซ้อนในการย่อยสลายลิกนินจริงๆในธรรมชาติ (Higuchi, Chang and Kirk 1983 ; Kirk, Higuchi, and Chang , 1978 ; Buswell and Odier, 1987 ; Kirk and Farrell, 1987 ; Higuchi , 1985, 1990 และ Umezawa, 1988)

กลุ่มเชื้อราที่ใหญ่ที่สุดที่ทำให้เนื้อไม้ผุเป็นสีขาว (white rot) อยู่ในชั้นเบซิดิโอไมซิติส (Basidiomycetes) มีมากมายหลายชนิด ที่เป็นสาเหตุให้เกิดการย่อยสลายในฮาร์ดวูด (hard woods) และซอฟท์วูด (soft woods) (Gilbertson , 1980) นอกจากนี้ยังมีเชื้อราในชั้นแอสโคไมโคซิติส (Ascomycetes) ซึ่งสามารถย่อยสลายเนื้อไม้ให้ผุเป็นสีขาวได้เช่นกัน (Rogers , 1978 และ Kirk, 1983)

วิธีที่ง่ายที่สุดวิธีหนึ่ง ซึ่งยังคงใช้อยู่ทุกวันนี้สำหรับพิสูจน์ว่า เชื้อรานั้นเป็นประเภท white rot fungi หรือไม่ (Davidson et al.,1938 และ Nobles, 1958) คือการใช้ปฏิกิริยาออกซิเดส โดยศึกษาการเปลี่ยนสีของ

จากเป็นการลดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมแล้ว วิธีทางชีวภาพจะช่วยลดค่าใช้จ่ายในการผลิต เนื่องจากลดการใช้ทั้งพลังงานและสารเคมีต่างๆ (Boominthan and Reddy ,1992) ในกระบวนการฟอกเยื่อทางชีวภาพนั้นจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารลิกนินเป็นปัจจัยสำคัญ และให้ประโยชน์สูงสุดต่ออุตสาหกรรมการผลิตเยื่อและกระดาษ จากรายงานการวิจัยต่าง ๆ ที่ผ่านมาได้แสดงให้เห็นว่าเชื้อราที่สามารถย่อยสลายลิกนินมีบทบาทสำคัญในการผลิตเยื่อโดยวิธีชีวภาพ การฟอกเยื่อโดยวิธีชีวภาพ การลดสีและการลดสารพิษปริมาณมาก ที่เกิดจากอุตสาหกรรมการผลิตเยื่อและกระดาษทั่วโลก(Kirk, 1989) นอกจากนี้รายงานการวิจัยต่างๆที่ตีพิมพ์เป็นจำนวนมากได้มีการบ่งชี้ว่า เชื้อราที่สามารถย่อยสลายลิกนินได้นั้นสามารถที่ย่อยสลายสารมลพิษต่าง ๆ ที่ก่อให้เกิดพิษต่อสิ่งแวดล้อม เช่น dioxins benzo(a) pyrenes และสารพิษอื่นๆซึ่งก่อให้เกิดอันตรายด้านสุขภาพอย่างรุนแรงต่อมวลมนุษย์และสัตว์ทั่วโลก (Tien,1987; Buswell and Odier 1987 และ Buswell,1991)

ด้วยงานวิจัยบุกเบิกของ Kirk และคณะ ในปี 1975 และผู้วิจัยคณะเดียวกันในปี 1978 ซึ่งศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับสอบวิเคราะห์ ligninolytic activity ของ P. chrysosporium จึงทำให้ลักษณะทางกายภาพของ white rot fungi ซึ่งสามารถย่อยสลายลิกนินได้รับความสนใจ มีการศึกษาตามหลักอนุกรมวิธานทำให้พบว่า P. chrysosporium เป็นราชนิดเดียวกับ Sporotrichum pulveruentum (Burdsall,1974) นอกจากนี้ยังได้มีการพัฒนาวิธีการสอบวิเคราะห์ ซึ่งมีความไวพอที่จะสอบวิเคราะห์ ligninolytic activities ของเชื้อราที่ย่อยสลายลิกนินได้ ภายในเวลาที่สั้นกว่าวิธีตามแบบธรรมดา และได้กำหนดค่าของ ligninolytic activities โดยการวัด $^{14}CO_2$ ซึ่งได้มาจาก DHP (dehydrogenated polymer of coniferyl alcohol) หรือลิกนินตามธรรมชาติแล้วติดฉลาก ^{14}C ที่โซ่ข้างหรือ aromatic ring หรือ methoxy group Haider และ Trojanowski (1975) ได้พัฒนาวิธีสอบวิเคราะห์เช่นเดียวกัน โดยนำมาใช้ในกระบวนการต่างๆ ได้แก่ การย่อยสลาย kraft lignin lignin sulfonates (Lundguis et al., 1977) poplar wood lignin (Hatakka and Uusi-Rauva, 1983) และ wheat straw (Agosim, Daudin and Odier, 1985) ที่

สารประกอบโพลีฟีโนลิกในอาหารเลี้ยงเชื้อรา และยังมีอีกวิธีหนึ่งซึ่งเป็นวิธีที่ให้ผลชัดเจนกว่า คือ การสอบวิเคราะห์ฟีโนออกซิเดสแอคทิวิตี โดยการวัดปริมาณ $^{14}CO_2$ ที่ปล่อยออกมาจากกระบวนการดีคาร์บอกซิเลชั่นของแวนิลิคแอสิด (vanillic acid) (Ander และ Eriksson, 1987)

ลำดับความสามารถในการย่อยสลาย ลิกนิน เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิดของ white rot fungi และอาจจะขึ้นอยู่กับชนิดของไม้ที่ถูกย่อยสลายด้วย (Campbell , 1932 ; Kirk and Highley, 1973 และ Blanchette, 1984a,b) ปริมาณการย่อยสลายลิกนินและน้ำตาลต่างๆในไม้เบิร์ช (birch) และ ไม้สน (pine) จากเชื้อรา white rot fungi หลายชนิด ดังแสดงในตารางที่ 1 ผลของการย่อยสลายเกิดขึ้นพร้อมกันทั้งในลิกนินและเซลลูโลส โดยปริมาณการย่อยสลายเซลลูโลสแสดงโดยการสูญเสียกลูโคส และปริมาณการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลส แสดงโดยการสูญเสียไซโลส และแมนโนส (Eriksson, Blanchette และ Ander,1990) สมมุติฐานของ Dill และ Krapelin(1986)ได้เสนอว่าปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม เช่นความชื้น ออกซิเจน และความเข้มข้นของไนโตรเจนในไม้ อาจจะมีผลต่อการทำให้เกิดการย่อยสลายผุเป็นสีขาว ปริมาณไนโตรเจนที่ต่ำจะกระตุ้นให้เกิดการย่อยสลายลิกนิน (Fenn and Kirk, 1981 และ Reid,1983) ปัจจัยทางด้านความชื้น ออกซิเจน และอื่น ๆ ได้ถูกพิสูจน์ว่ามีผลต่อการย่อยสลายไม้โดย white rot fungi (Reid and Seifet, 1982 และ Highley et at., 1983)

ความสัมพันธ์ของปริมาณลิกนินและโพลีแซคคาไลด์ที่ถูกย่อยสลายและถูกใช้โดย white rot fungi แตกต่างกันตามความสามารถ ในการเข้าทำลายองค์ประกอบของเนื้อไม้(Eriksson, 1981c) อย่างไรก็ตามโพลีแซคคาไลด์ในเนื้อไม้จะถูกย่อยสลายในช่วงเมแทบอลิซึ่มปฐมภูมิของเชื้อรา ในขณะที่เมแทบอลิซึมของการย่อยสลายลิกนิน เกิดขึ้นเพียงในช่วงเมแทบอลิซึมทุติยภูมิ (Keyser et al., 1978 และ Kirk et al., 1978a, b) ระยะการเจริญเติบโตช่วงปฐมภูมิจะหยุดเมื่อภาวะทางสิ่งแวดล้อมที่เอื้อต่อเชื้อรามีจำกัด เช่น สารอาหารที่จำเป็น ได้แก่ ไนโตรเจน คาร์บอน ซัลเฟต หรือฟอสเฟต

เชื้อรา white rot fungi ชนิดหนึ่งซึ่งถูกแยกจากกองชิ้นไม้สับ

ตารางที่ 1 แสดงปริมาณลิกนิน และ น้ำตาลหลายชนิดในเนื้อไม้ เบิร์ช (Betula papyrifera) และไม้สน (Pinus strobus)ซึ่งสูญเสียไป หลังจากใช้ white rot fungi แต่ละชนิดย่อยสลาย 12 สัปดาห์ (Eriksson et al, 1990)

เชื้อรา	ไม้	% การสูยเสีย	
		น้ำหนัก	ลิกนิน
Basidiomycotina			
Coriolus versicolor	Birch	65.3	64.6
	Pine	25.3	35.4
Phanerochaete chrysosporium (BKM-F-1767)[b]	Birch	39.1	72.9
	Pine	19.5	30.5
Phanerochaete chrysosporium (HHB-11741)[b]	Birch	46.5	51.5
	Pine	5.8	4.7

เชื้อรา	ไม้	% การสูยเสีย		
		กลูโคส	ไซโลส	แมนโนส
Basidiomycotina				
Coriolus versicolor	Birch	65.4	68.8	71.7
	Pine	22.1	46.7	11.6
Phanerochaete chrysosporium (BKM-F-1767)[b]	Birch	15.1	55.1	0
	Pine	3.9	44.1	0
Phanerochaete chrysosporium (HHB-11741)[b]	Birch	48.8	58.0	44.5
	Pine	10.1	12.4	20.1

[b] เป็นสายพันธุ์คัดเลือก

ได้ถูกนำมาใช้มากในการศึกษาการย่อยสลายลิกนิน มีชื่อตามหลักอนุกรมวิธาน ว่า Chrysosporium lignorum (Bergman and Nilsson, 1966) ชื่อนี้ต่อมาเปลี่ยนเป็น Sporotrichum pulverulentum ใช้เรียกสำหรับระยะที่ไม่สมบูรณ์ (imperfect stage) (Von Hofsten and Von Hofsten, 1974) ต่อมาเชื้อราชนิดนี้ได้มีชื่อที่สามคือ P. chrysosporium ใช้เรียกในระยะที่สมบูรณ์ (perfect stage)(Burdsall and Eslyn,1974 และ Burdsall,1981) เชื้อราตัวนี้จัดอยู่ในพวกทนอุณหภูมิได้สูง (thermotolerant) นอกจากนี้ Kirk (1984) ได้นำมาใช้ศึกษาการย่อยสลายลิกนิน ในประเทศ สวีเดน เชื้อราชนิดนี้ก็ถูกแยกออกจากกองไม้สับเช่นเดียวกันและใช้ชื่อว่า Chrysosporium pulverulentum P127-1 (Bergman and Nilsson, 1966)และต่อมาเปลี่ยนชื่อใหม่เป็น Sporotrichum pulverulentum Novobranova เนื่องจากเชื้อราชนิดนี้ได้มีการแยกได้ในประเทศรัสเซีย และศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานโดย Novobranova(1972) ปัจจุบันนี้ P. chrysosporium เป็นชื่อที่ถูกเลือกใช้ โดยทั่วไป(Johnsrud and Eriksson , 1985) P. chrysosporium สร้างเบซิดิโอสปอร์ (basidiospore) (Johnsrud and Eriksson,1985) จึงถูกจัดอยู่ในชั้นเบซิดิโอไมซิติส นอกจากนี้ได้มีการปรับปรุงพันธุ์ของ Polyporus adustus โดยใช้รังสีอัลตราไวโอเลต (Eriksson and Goodell , 1974) และ Sporotichum pulverentum (Ander and Eriksson, 1975, 1976) โดยใช้รังสีอัลตราไวโอเลต ต่อมาได้มีการปรับปรุงพันธุ์โดยใช้เทคนิคการทำโปรโตพลาสฟิวชัน(protoplast fusion) กับP. chrysosporium โดย Gold และผู้ร่วมงาน (Gold and Cheng 1978 , Gold et al., 1982a,b และ Gold et al., 1983a) นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาเกี่ยวกับเจเนติกรีคอมบิเนชัน (Alic and Gold,1985 และ Alic et al.,1987) ใน P. chrysosporium เช่นกัน

ตามที่ Keyser และคณะ (1978) ได้แนะนำว่าระบบลิกนิโนไลติกเอนไซม์ (เมแทบอลิซึมทุติยภูมิ) ของ P. chrysosporium เกิดขึ้นเนื่องจากปัจจัยทางกายภาพหลายอย่าง ส่วนใหญ่ถูกชักนำให้เกิดโดยภาวะที่ขาดไนโตรเจน ลิกนิโนไลติก แอคทิวิตี้ การผลิต veratyl alcohol และเพอร์ออกซิเดส แอคทิวิตี้ เกิดขึ้นพร้อมกัน (Kirk 1980)และการย่อยสลายลิกนิน

ไม่เกิดในช่วงการเจริญเติบโตปฐมภูมิ เมแทบอลิซึมทุติยภูมิสามารถชักนำให้เกิดได้โดยการทำให้ขาดคาร์โบไฮเดรต และซัลเฟอร์ แต่ฟอสฟอรัสไม่มีผล (Jeffries et al., 1981 และ Buswell et al., 1984) ปรากฏการณ์นี้พบใน P. chrysosporium และ white rot fungi ชนิดอื่นอีกมาก อย่างไรก็ตามมี white rot fungi บางชนิดที่ไม่ถูกควบคุมเมแทบอลิซึมโดยภาวะขาดไนโตรเจน แต่สามารถย่อยสลายลิกนินได้ ในภาวะที่มีอาหารเพียงพอ (Freer and Detroy, 1982 และ Leatham and Kirk, 1983)

การยับยั้งการย่อยสลายลิกนินไปเป็น CO_2 (^{14}C-linin---$>$ $^{14}CO_2$) ด้วย P. chrysosporium และ Coriolus versicolor โดยสารประกอบไนโตรเจนตัวอย่าง เช่น NH_4NO_3 ถูกค้นพบครั้งแรกโดย Kirk และผู้ร่วมงาน (Kirk et al., 1978a และ Keyser et al., 1978) ต่อมา Fenn และคณะ (1981) และ Fenn และ Kirk (1981) แสดงให้เห็นว่ากรดอะมิโน หลายชนิดโดยเฉพาะ กลูตาเมต กลูตามีน และ ฮีสติดีน มีผลต่อการยับยั้งการย่อยสลายลิกนินมาก

ในปี 1966 Cowling และ Merril ได้อธิบายถึงอิทธิพลของไนโตรเจนที่มีอิทธิพลอย่างมากต่อการย่อยสลายลิกนินว่า ปริมาณของไนโตรเจนต่อคาร์บอนในสัดส่วนประมาณ 1:350-500 ซึ่งนับว่ามีปริมาณไนโตรเจนที่น้อยมาก แต่ด้วยปริมาณนี้ก็ยังเพียงพอสำหรับกระบวนการย่อยสลายลิกนินในเนื้อไม้ ดังนั้นการเพิ่มปริมาณไนโตรเจนลงไปแม้เพียงเล็กน้อย ก็จะมีผลในการยับยั้งการย่อยสลายลิกนิน ด้วยเหตุผลที่ว่าการเจริญเติบโตในช่วงปฐมภูมิซึ่งมีปริมาณไนโตรเจนสูงอยู่นั้นจะเกิดขึ้นเพียงระยะเวลาสั้น แต่เมื่อปริมาณไนโตรเจนต่ำมากหรือแทบไม่มีเหลืออยู่เลยภาวะเมแทบอลิซึมทุติยภูมิและการย่อยสลายลิกนินจะเริ่มขึ้น

ในช่วงเมแทบอลิซึมทุติยภูมินี้ Boominathan และ Reddy (1992) พบว่ามีการสร้าง extracellular peroxidases ซึ่งเป็นกลุ่มเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินใน P. chrysosporium ดังนั้นเป็นการยืนยันว่าการย่อยสลายลิกนินเป็นกระบวนการเมแทบอลิซึมทุติยภูมิ

การควบคุมการย่อยสลายลิกนิน ของเชื้อรา P. chrysosporium สามารถทำได้โดยการปรับแหล่งโพลีแซคคาไลด์ จากภายนอกเซล ซึ่งส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปกลูโคสและในสภาวะที่ขาดไนโตรเจน (Leisola et al., 1982

; Eriksson et al., 1986 และ Bes et al., 1987)

รายงานการวิจัยที่สำคัญรายงานหนึ่งของ Kirk และคณะ (1978a) แสดงให้เห็นว่าการกวนอาหารและเชื้อรา P. chrysosporium เป็นผลให้เส้นใยเชื้อรามีลักษณะเป็นก้อนเล็กๆ (pellet) ซึ่งมีผลยับยั้งการย่อยสลายลิกนินหลายปีต่อมา Reid และผู้ร่วมวิจัย (1985) พบว่าสายพันธุ์เดียวกันของ P. chrysosporium (ME-446) ซึ่งเคยถูกใช้โดย Kirk และผู้ร่วมงานนั้นสามารถย่อยสลายทั้ง DHP และลิกนินใน aspen wood ทำให้เกิดเป็น CO_2 ในสภาวะที่มีการกวน นอกจากนี้ Gold และคณะ (1984) ยังได้รายงานว่า P. chrysosporium สายพันธุ์ ME-446 ก็สามารถย่อยสลายลิกนินได้ในสภาวะที่มีการกวน

Leisola และ Fiechter (1985b) แสดงให้เห็นว่า P. chrysosporium ผลิตลิกนินเพอร์ออกซิเดสและย่อยสลาย DHP ภายใต้สภาวะที่มักมีการกวนโดยใส่สารต่าง ๆ ในรูปสารละลายอาหารประมาณ 150 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร หรือใส่สารอาหารต่างๆ ประมาณ 50 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์ขนาด 200 มิลลิลิตร

Paszczynski และคณะ (1986) ได้ทำการเลี้ยงเชื้อรา P. chrysosporium BKM-F-1767 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไนโตรเจนต่ำ Kirk et al., 1989 พบว่าลิกนินเพอร์ออกซิเดส และแมงกานีสเพอร์ออกซิเดสสามารถผลิตออกมาได้ในถังหมัก (fermentor) ซึ่งบรรจุสารอาหารปริมาตร 1 ลิตร

อิทธิพลของออกซิเจนต่อการย่อยสลายลิกนิน ได้ถูกศึกษาโดยใช้เชื้อ P. chrysosporium และ white rot fungi ชนิดอื่นจำนวนมาก Kirk และคณะ (1978a) ได้รายงานว่า P. chrysosporium สามารถย่อยสลาย DHP ไปเป็น $^{14}CO_2$ ได้มากกว่าเมื่อให้ออกซิเจน 100 % ในการทดลองเปรียบเทียบการให้อากาศ ซึ่งมีออกซิเจน 21 % Bar-Lev และ Kirk (1981) พบว่าออกซิเจนเป็นทั้งตัวชักนำให้เกิดลิกนิโนไลติกแอคทิวิตี้ และเพิ่มลิกนิโนไลติกแอคทิวิตี้ด้วย นอกจากนี้ตามรายงานของ Shimada และคณะ (1981) กล่าวว่าความเข้มข้นของออกซิเจนมีอิทธิพลมากต่อปริมาณของ veratryl alcohol ที่ถูกผลิตโดย P. chrysosporium

ปริมาณของออกซิเจนที่มีผลต่อการย่อยสลายลิกนินในไม้ได้มีการศึกษาในเชื้อราหลายชนิด Reid และ Seifert (1980) ได้รายงานว่า การย่อยสลายลิกนินใน aspen wood โดย P. chrysosporium จะเกิดขึ้นได้ดีที่ความดันที่ 1 หรือ 2 บรรยากาศของออกซิเจน ส่วนที่ความดัน 3 บรรยากาศจะให้ผลยับยั้งการเจริญของเชื้อรา เชื้อราอื่น ๆ หลายชนิดได้ถูกนำมาศึกษาโดย Reid และ Seifert (1982) และ Hatakka และ Uusi-Rauva (1983) เช่น Coriolus versicolor ซึ่งจะสร้าง $^{14}CO_2$ จากลิกนินของ aspen ที่มีติดฉลาก ในสภาพที่มีออกซิเจนบริสุทธิ์ ได้ดีกว่าในอากาศธรรมดา (Reid and Seifert, 1982) การย่อยสลาย ลิกโนซัลโฟเนต โดย P. chrysosporium จะเกิดในสภาวะที่มีการให้ออกซิเจน 100 % ดีกว่าสภาวะที่มีการให้อากาศ ถ้าเลี้ยงในสภาพใส่สารละลาย 30 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร (Kern, 1983b)

ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนได้มีการศึกษาการย่อยสลายลิกนินด้วย โดยใช้ไม้บีช(beech wood) ผลปรากฏว่า หลังจากที่ใช้เวลาหลายสัปดาห์หรือหลายเดือนในการย่อยสลาย แต่สามารถย่อยสลายลิกนินได้น้อยมาก ๆ (Holt and Jones, 1983 ; Oider and Monties, 1983 ; Benner et al., 1984; Benner and Hodson, 1985 และ Olberg and Young, 1985a) ระหว่างกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพโดยไม่ใช้ออกซิเจน (การหมัก) ของลิกนินนี้จะเกิดสารประกอบอินทรีย์ต่างๆ มากมาย ซึ่งได้มีการแสดงความเป็นไปได้ในอนาคตถึงการผลิตสารเคมีต่างๆ จากลิกนินที่เหลือไม่ได้ใช้ และเพื่อการกำจัดสารมลพิษและนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์ (Hanselman , 1982 ; Kaiser and Hanselman 1982 ; Taylor 1983 และ Colberg and Young, 1985b)

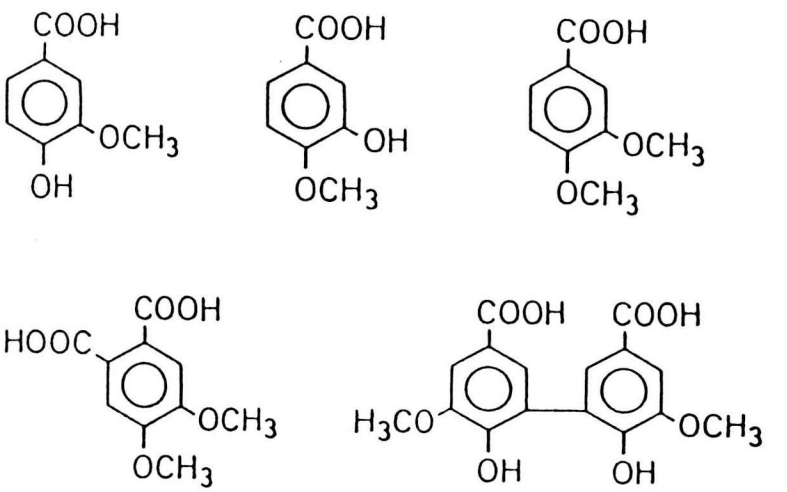
เมื่อลิกนินในไม้ถูกย่อยสลาย ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นมีหลายชนิด เช่น แวนิลิน(vanillin) และ กรดแวนิลิค (vanillic acid) ส่วนของลิกนินที่ถูกย่อยสลายจะละลายน้ำได้ง่ายและสามารถสกัดแยกออกจากลิกนิน ที่ยังไม่ได้ถูกย่อยสลายด้วยสารละลายอินทรีย์ที่เป็นกลาง (Chen and Chang, 1985) ลิกนินที่ถูกย่อยสลายแล้วจาก spruce (Picea glauca) และ birch (Betula papyrifera) ได้ถูกแยกและได้ศึกษาลักษณะ (Kirk and Chang 1974, 1975 ; Chen et al., 1982 ; Chua et al., 1982 ; Tai

et al., 1983 a,b และ Terazawa et al., 1983, 1987) เชื้อราที่ใช้คือ Coriolus versicolor Dichomitus squalens และ P. chrysosporium

Chen และผู้ร่วมวิจัย (1982,1983a)ได้ศึกษาสารเคมีที่เกิดจากการย่อยสลายลิกนินใน spruce wood โดย P. chrysosporium ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่ที่ได้โดยทั่วไป คือ กรดแวนิลิค, กรดไอโซแวนิลิค(isovanillic acid) veratric acid m-hemipinic acid และ dehydrodivanillic acid (ตามภาพที่ 1 และ นอกจากนี้ Hiroi และ Tamai (1983) ได้ศึกษาการย่อยสลาย beech wood โดย white rot fungus Grifola frondosa ประมาณ 1-6 เดือน พบผลิตภัณฑ์ที่ได้คือ syringic acid, vanillic acid และ vanillin ปริมาณเล็กน้อย Nagieb et al. (1988) ได้ใช้ P. chrysosporium และ Coriorus versicolor ย่อยสลายฟางข้าว และล่าต้นฝ้ายก็ได้ผลของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นเช่นเดียวกัน

ได้มีการวิจัยพบว่า white rot fungi เช่น Coriorus versicolor ตามธรรมชาติสามารถย่อยสลายลิกนินได้ดีกว่า brown rot fungi เช่น Poria placenta (Antai and Crawford, 1982) Kirk และ Highley (1973)ได้รายงานว่า brown rot fungi 3 ชนิด ย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตแต่ไม่ย่อยสลายลิกนินจากไม้สน 5 ชนิด soft rot fungi ก็สามารถย่อยสลายลิกนินได้มากกว่า brown rot fungi แต่ช้ากว่า white rot fungi มาก (Seifert, 1966) ตัวอย่างของเชื้อรา brown rot fungi ที่ย่อยสลายลิกนินได้ เช่น Gloeophyllum trabeum และ Poria placenta ส่วนตัวอย่างของ soft rot fungi ที่ย่อยสลายลิกนินได้คือ Chaetomium globosum Pialophora mutabilis Petriellidium boydii (Ander et al, 1984) Savory and Pinion, 1958 ; Levi and Preston, 1965) ; Seifert, 1966) นอกจากนี้มีรายงานว่าเชื้อแบคทีเรียในชั้นแอคติโนไมซิติส ซึ่งเป็นแบคทีเรียชนิดแกรมบวกสามารถย่อยสลายลิกนินได้ดีกว่า Brown-rot fungi โดยเฉพาะสกุล Streptomyces นอกจากนี้ก็มีสกุลอื่นที่ย่อยสลายลิกนินได้ เช่น Micromonosporai Microbispora Thermomonospora Nocardia Rhodococcus และ Arthrobacter

ภาพที่ 1 ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นเป็นส่วนมากได้แก่ vanillic acid, isovanillic acid, veratric acia, m-hemipinic acid, และ dehydrodivanillic acid) ซึ่งแยกได้หลังจากใช้เชื้อรา Phanerochaete chrysosporium ย่อยสลาย spruce wood (Chen et al. 1982 ; Kirk,1984)



(Crawford and Sutherland, 1979 ; Kuster, 1979 ; Mc Carthy and Broda 1984 และ McCarthy, 1987)

มีการวิจัยหลายแขนง ที่นำ white rot fungiไปประยุกต์ใช้ซึ่งสรุปได้ดังนี้

1. การแยกลิกนินออกจากชิ้นไม้สับ(pulping) ซึ่งจะช่วยลดพลังงานและสารเคมี

2. การแยกลิกนินออกในกระบวนบวนการที่ทำให้เยื่อขาวสว่างขึ้น (bleaching)

3. ศึกษาการแยกลิกนินออก และนำลิกนินไปใช้เป็นสารเคมี ที่เป็นประโยชน์มากขึ้น

4. ใช้บำบัดน้ำทิ้งของโรงงานฟอกเยื่อที่ใช้สารเคมี เพื่อลดความเป็นพิษและสารที่ทำให้เกิดการแปรผันทางพันธุกรรม

5. ใช้บำบัดน้ำเสียหรือดินเสีย เนื่องจากสารมลพิษอื่นๆ เช่น DDT และ dioxins(Eriksson 1981a-c, 1985, 1987; Kirk and Chang , 1981 ; Bowman,1983 ; Kirk ,1983a ; Kirk et al., 1983 a ; Eriksson and Kirk, 1985 ; Buswell and Odier 1987 ; Farrell , 1987a ; Boman et al. 1988)

ถึงแม้ลิกนินจะเป็นสารประกอบ ที่เป็นแหล่งคาร์บอนมากมาย แต่ลิกนินก็ไม่ใช่เป็นอาหารสำหรับใช้ในการเจริญเติบโตของจุลชีพ ซึ่งสามารถย่อยสลายลิกนินได้ เชื้อราที่สามารถย่อยสลายลิกนินได้ใช้ลิกนินเพียงแค่เป็นแหล่งพลังงานหรือแหล่งคาร์บอนเสริมอีกทางหนึ่ง (Buswell and Odier,1987 ; Buswell, 1991 และ Kirk and Farrell,1987) ดังนั้นการย่อยสลายลิกนินเมื่อพิจารณาแล้วเป็นเพียง "โคเมแทบอลิซึม (cometabolism)" ซึ่งเกิดขึ้นร่วมกับการใช้แหล่งพลังงาน หรือ แหล่งคาร์บอนอื่นๆ เช่น เซลโลไบโอส เฮมิเซลลูโลส คาร์โบไฮเดรตที่มีโครงสร้างไม่ซับซ้อน การย่อยสลายลิกนินโดย white rot fungi เช่น P. chrysosporium ไม่สามารถให้พลังงานเพียงพอ สำหรับการเจริญเติบโต (Crawford, 1981 ; Kirk, Higuchi and Chang, 1978 ; Buswell, 1991 และ Kuwahara and Asada, 1987) มีรายงานการวิจัย

เกี่ยวกับการใช้ลิกนิน เป็นแหล่งคาร์บอน สำหรับการเจริญเติบโตของ Polyporus versicolor เช่นเดียวกัน (Pelczar, Gottleib and Day , 1950) ซึ่งลิกนินไม่ได้เป็นแหล่งพลังงาน สำหรับการเจริญเติบโตอย่างแท้จริง (Kirk, Connors and Zeikus, 1976 ; Leisola, Ulmer, Haltmeir and Fiechter,1983 และ Ulmer, Leisola, Schmidt and Feichter ,1983) นอกจากนี้การย่อยสลายลิกนินเพียงอย่างเดียวระหว่างการย่อยสลายไม้ในธรรมชาติก็เป็นไปไม่ได้

ในอุตสาหกรรมการผลิตเยื่อและกระดาษ จะต้องใช้พลังงาน (ในเยื่อที่ผลิตโดยวิธีกล) และสารเคมี(ในเยื่อที่ผลิตโดยใช้สารเคมี) เนื่องจากกระบวนการผลิตจะต้องใช้อุณหภูมิที่สูง ความดัน และความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่รุนแรง การใช้เชื้อราช่วยในการแยกลิกนินออกจากชิ้นไม้สับ และเยื่อกระดาษที่ยังไม่ได้ฟอก จะช่วยประหยัดพลังงาน และลดการใช้สารเคมีในการผลิตเยื่อกระดาษทั้งโดยวิธีกลและวิธีเคมี (Eriksson,1985และ Eriksson and Kirk, 1985)

การศึกษาการใช้เชื้อรา ในการย่อยสลายลิกนิน ได้มีการศึกษาทั้งการย่อยสลายลิกนินในชิ้นไม้สับ และในเยื่อคราฟท์และเยื่อที่ผลิตโดยวิธีกลที่ยังไม่ได้ฟอกโดยได้ใช้ P. chrysosporium ศึกษาการย่อยสลายลิกนินในเยื่อชนิดต่างๆ (Kirk and Yang , 1979 ; Yang et al., 1980 และ Bar-Lev et al. 1982) โดยให้สภาวะในการย่อยสลายลิกนิน ในเยื่อกระดาษเหมือนกับการย่อยสลายลิกนินสังเคราะห์ตามรายงานการวิจัยต่างๆ ของ Kirk และคณะ (1978a) ต่อมา Tran and Chambers (1987) ได้ใช้เยื่อฮาร์ดวูดคราฟท์ (hardwood kraft) ที่ยังไม่ได้ฟอกซึ่งมีปริมาณลิกนินอยู่ในเยื่อ 2.4 เปอร์เซนต์ พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยลิกนินออกจากเยื่อ โดยเชื้อรา P. chrysosporium คือที่ pH 3.5 อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส ในขณะที่ Drew and Kadon (1979)รายงานว่าการย่อยสลายลิกนิน ^{14}C-คราฟท์ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ให้ผลการทดลองที่ดีกว่า 38 องศาเซลเซียส การย่อยสลายลิกนินในเยื่อคราฟ เยื่อเคมี และเยื่อกึ่งเคมี (CTMP) โดยเชื้อรา P. chrysosporium ภายใต้สภาวะเขย่า จะให้ผลดีกว่าสภาวะที่ไม่มีการเขย่า (Pellinen J, Abuhasan J,Joyce TW, Chang H-m, 1989) นอกจากนี้

Pilon และคณะ(1982a,b)รายงานว่าเยื่อที่ผลิตโดยวิธีกล เมื่อฟอกด้วยเชื้อรา white rot fungi แล้ว จะให้ค่าความแข็งแรง(strength) ของเยื่อเพิ่มขึ้น

Paice และคณะ (1989) ได้ใช้เชื้อรา white rot fungi คือ Trametes (Coriolus versicolor) ซึ่งพบว่าสามารถเพิ่มความขาวสว่างของเยื่อฮาร์ดวูดคราฟท์ได้โดยเลี้ยงในสภาวะกวน หรือให้อากาศ 5 วัน เชื้อ T. versicolor จะสามารถลดค่าคัปปานัมเบอร์(kappa number) ของเยื่อจาก 12 เป็น 8 และ เพิ่มค่าความขาวสว่างจาก 38 % เป็น 48 % และเมื่อใช้คลอรีนไดออกไซด์ฟอกต่อจะได้ค่าความขาวสว่างเป็น 82 % โดยไม่ใช้คลอรีน การฟอกเยื่อด้วยเชื้อรา T. versicolor นี้ก็เพิ่มความแข็งแรงของเยื่อมากขึ้นเช่นกัน (Paice et al. 1989 ; Reid et al., 1990)เส้นใยของเชื้อราอาจจะเป็นตัวเพิ่มพันธะระหว่างเส้นใยของเยื่อ(Reid et al., 1990)

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาถึงศักยภาพของการฟอกเยื่อกระดาษ โดยใช้เชื้อรา P. chrysosporium แล้วนำมาประยุกต์ใช้ทดแทนวิธีการฟอกเยื่อกระดาษทางเคมีหรือใช้ร่วมกับวิธีทางเคมี และเปรียบเทียบคุณภาพของเยื่อที่ฟอกได้จากทั้ง 2 วิธี รวมทั้งศึกษาคุณภาพของน้ำเสียที่ได้หลังจากการฟอก

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

สามารถนำเอาเชื้อรามาใช้ในการฟอกเยื่อกระดาษ เพื่อพัฒนาเทคโนโลยีการฟอกเยื่อกระดาษ โดยวิธีทางชีวภาพในประเทศไทย ช่วยประหยัดพลังงาน ลดการใช้สารเคมีในการผลิต ทำให้ของเสียที่ต้องกำจัดลดน้อยลง จึงลดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ยังลดต้นทุนการผลิตด้วย