บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

วัสดุและอุปกรณ์

1. เชื้อรา Phanerochaete chrysosporium ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร.หรรษา ปุณณะพยัคฆ์

2. เยื่อกระดาษที่ยังไม่ได้ฟอก 2 ชนิด คือเยื่อยูคาลิปตัสและเยื่อชานอ้อย โดยเยื่อยูคาลิปตัสได้รับความอนุเคราะห์จาก บริษัทสยามเซลลูโลส จำกัด จังหวัดกาญจนบุรี และเยื่อชานอ้อยได้รับความอนุเคราะห์ จากบริษัทเยื่อกระดาษสยาม จำกัด (มหาชน) จังหวัดราชบุรี

3. สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อรา
   - 3.1 สารเคมีของบริษัท M&B (May&Baker LTD. Dagenhan England) Analyticals grade
   - 3.2 Potato dextrose agar (Difco, U.S.A.)
   - 3.3 Potato dextrose broth (Difco, U.S.A.)
   - 3.4 Potato dextrose Broth (Bangkok MIRCEN, 1979) (ภาคผนวก ก)
   - 3.5 Potato Dextrose Agar (Bangkok MIRCEN, 1979) (ภาคผนวก ก)

4. อุปกรณ์และครุภัณฑ์

ชนิดเครื่องมือ	แบบรุ่น	บริษัทผู้ผลิต
4.1 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิได้	G25	NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC CO. INC
4.2 เครื่องเขย่าแบบธรรมดา	Shaker	ศูนย์เครื่องคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
4.3 เครื่องวัด brightness	ELREPHO2000	Datacolor Ltd. Swisszerland
4.4 เครื่อง Pressure	No.73.03-01	Testing Machines Inc. U.S.A.
4.5 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ	ไฟฟ้า	Ta Chang Medical Instrument Factory Taiching, Taiwan R.O.C.
4.6 ตู้บ่มเชื้อ (incubator)	Memmert	Memmert, Western Germany
4.7 ตู้ถ่ายเชื้อ	"ISSCO" Laminar Flow model H-124	International Scientific Supply Co., Thailand
4.8 เครื่องชั่งละเอียด	Precisd 80 A-200 M	Memmert, Western Germany
4.9 pH meter (Digital)		Beckman สหรัฐอเมริกา
และของ Meiji	Model-5002	Meiji-Labax Japan
4.10 Spectrophotometer สำหรับวิเคราะห์สีน้ำเสีย	Model 7800	Jasco Corporation ประเทศญี่ปุ่น

รูปที่ 1 เชื้อรา P. chrysosporium เจริญบนอาหาร PDA(potato dextrose broth

PRESSURE ON
POWER
START
STOP

รูปที่ 2 เครื่อง Pressure ทำแผ่นเยื่อสำหรับวัด Brightness

UV
elrepho
2000
datacolor
SPOT

รูปที่ 3 เครื่องวัด brightness

วิธีการวิจัย

1. การศึกษาการฟอกเยื่อโดยใช้สารเคมี

การศึกษาการฟอกเยื่อกระดาษโดยใช้สารเคมี โดยใช้กระบวนการ CEHH ซึ่งแบ่งออกได้เป็น 4 ขั้นตอน ดังนี้

ขั้นตอน C สารเคมีที่ใช้ คือ คลอรีน
สภาวะในการฟอก : ความข้นของเยื่อ 3.0 % โดยน้ำหนัก
เวลาในการฟอก 60 นาที
อุณหภูมิในการฟอก 38 °c

ขั้นตอน E สารเคมีที่ใช้ คือ โซดาไฟและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เล็กน้อย
สภาวะในการฟอก : ความข้นของเยื่อ 10.0 % โดยน้ำหนัก
เวลาในการฟอก 120 นาที
อุณหภูมิในการฟอก 65 °c

ขั้นตอน H สารเคมีที่ใช้ คือ โซเดียมไฮโปรคลอไรต์และโซดาไฟเล็กน้อย
สภาวะในการฟอก : ความข้นของเยื่อ 10.0 % โดยน้ำหนัก
เวลาในการฟอก 150 นาที
อุณหภูมิในการฟอก 50 °c

2. การฟอกเยื่อกระดาษด้วยวิธีทางชีวภาพโดยเชื้อรา *Phanerochaete chrysosporium* ดังนี้

2.1 การเตรียมเชื้อรา P. chrysosporium ในอาหารเหลว

นำเอาเชื้อรา P. chrysosporium ซึ่งเก็บไว้ในหลอดเชื้อที่มีอาหาร 2 % malt extract agar (ภาคผนวก ก) ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส นำเชื้อราไปเพิ่มปริมาณเส้นใย โดยถ่ายเชื้อไปเลี้ยงในจานเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) (ภาคผนวก ก) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ตัดวุ้นที่มีเส้นใยเชื้อรา P. chrysosporium บริเวณรอบนอกสุดของโคโลนีที่มีการเจริญดีด้วยเครื่องเจาะจุกคอร์ค แล้วใช้เข็มเขี่ยตักชิ้นเชื้อดังกล่าวย้ายไปลงบนอาหารเหลว potato dextrose broth(PDB)(ภาคผนวก ก) 100 มิลลิลิตร ในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องบนเครื่องเขย่า เป็นเวลา 7 วัน จะได้สารแขวนลอยเส้นใย หลังจากนั้นจึงนำไปใช้ในการฟอกเยื่อด้วยวิธีทางชีวภาพต่อไป

การใส่เชื้อ(inoculation) ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ใช้คือ 10 มิลลิลิตรต่อเยื่อ 1 กรัมแห้ง (ภาคผนวก ก) หรือ 100 มิลลิลิตร ของสารละลายเยื่อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

2.2 ศึกษาการเจริญของเชื้อรา P. chrysosporium ในอาหารเหลว

โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับในข้อ 2.1 แล้วทำการเก็บผลผลิตเชื้อราเป็นน้ำหนักแห้งเฉลี่ยทุกวันเป็นเวลา 15 วัน โดยการกรองด้วย vacuum pump แล้วนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ด้วย hot air oven แล้วนำข้อมูลที่ได้ทำ growth curve เพื่อหาระยะต่างๆของการเจริญของเชื้อรา

2.3 ศึกษาความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการฟอกเยื่อกระดาษทั้ง 2 ชนิด

ทำการเตรียมสารละลายเยื่อ โดยแปรผันความเป็นกรดด่างเป็น 3.0 , 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5,6.0,6.5 และ 7.0 ตามลำดับ โดยทำให้ปราศจากเชื้อเติมสารแขวนลอยเส้นใย 100 มิลลิลิตร ลงในสารละลายที่มีเยื่ออยู่ 10 กรัมแห้ง ในฟลาสก์ขนาด 1 ลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่มีอัตราความเร็ว 120 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิห้อง (วัดได้ 30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน ทำการตรวจวัดอัตราการฟอกเยื่อกระดาษ เพื่อการวิเคราะห์ต่อไป

2.4 ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการฟอกเยื่อกระดาษทั้ง 2 ชนิด

เตรียมสารละลายเยื่อ ที่มีค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมจากข้อ 2.3 ที่ปราศจากเชื้อ แล้วใส่สารแขวนลอย
เส้นใย 100 มิลลิลิตร (จากข้อ 2.1) ลงในสารละลายที่มีเยื่ออยู่ 10 กรัมแห้ง ในฟลาสก์ขนาด 1 ลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว โดยศึกษาที่อุณหภูมิ 4 ระดับ คือ บ่มที่ 25 30 38 และ 42 องศาเซลเซียส ในเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิได้

ทำการตรวจวัดอัตราการฟอกเยื่อกระดาษ เพื่อการวิเคราะห์ต่อไป

2.5 ศึกษาหาปริมาณเชื้อราที่เหมาะสมในการฟอกเยื่อกระดาษทั้ง 2 ชนิด ในสภาวะที่เหมาะสมต่อการฟอกเยื่อกระดาษ

เตรียมสารละลายเยื่อเช่นเดียวกับข้อ 2.4 โดยมีการแปรผันปริมาณเชื้อซึ่งเป็นสารแขวนลอยเส้นใย ดังนี้ 50 100 200 300 และ 400 มิลลิลิตร (ปริมาณเชื้อ 0.5 1.0 2.0 3.0 และ 4.0 กรัม (น้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ โดยเติมลงในสารละลายที่มีเยื่ออยู่ 10 กรัมแห้ง ในฟลาสก์ขนาด 1 ลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่มีอัตราเร็ว 120 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 38 ± 2 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน ทำการตรวจวัดการฟอกเยื่อกระดาษ เพื่อการวิเคราะห์ต่อไป

2.6 ศึกษาผลของสภาพการฟอกเยื่อ โดยใช้เชื้อราในสภาพแบบนิ่ง(stationary) กับแบบเขย่า (shaken) ในสภาวะที่เหมาะสมต่อการฟอกเยื่อกระดาษ

โดยทำการฟอกเยื่อกระดาษในสภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 2.5 หลังจากนั้นมาศึกษาต่อที่สภาพการฟอกเยื่อกระดาษโดยใช้เชื้อรา 2 สภาพ คือ

ก. สภาพการฟอกแบบนิ่ง เป็นการฟอกเยื่อกระดาษโดยใช้เชื้อราในสภาพที่ไม่มีการเขย่า เป็นเวลา 7 วัน

ข. สภาพการฟอกแบบเขย่า โดยมีการเขย่าตลอด 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน ตามความเร็ว 120 รอบต่อนาที ทำการตรวจวัดการฟอก

เก็บผลการทดลองจากทั้ง 2 สภาพ เพื่อการวิเคราะห์ต่อไป

3. ศึกษาการฟอกเยื่อกระดาษ โดยใช้วิธีทางชีวภาพ(เชื้อรา)มาประยุกต์ใช้ร่วมกับวิธีทางเคมี ดังนี้

3.1 การใช้วิธีทางชีวภาพร่วมกับวิธีทางเคมีแบบทดแทน หรือลดขั้นตอนในกระบวนการ CEHH โดยทำการฟอกด้วยเชื้อรา(F) ในขั้นตอนแรกและตามด้วย ขั้นตอนการใช้สารเคมีซึ่งเป็นสารประกอบคลอรีน

สำหรับเยื่อยูคาลิปตัสจะใช้เชื้อรา(F)ในขั้นตอนแรก และตามด้วยขั้นตอน

H อีก 2 ขั้นตอน โดยขั้นตอน H ทั้ง 2 ขั้นตอนนี้จะใช้สารเคมีและสภาวะในการฟอกเช่นเดียวกันกับขั้นตอน H ในกระบวนการ CEHH ดังนั้นการฟอกโดยใช้วิธีทางชีวภาพร่วมกับวิธีทางเคมีของเยื่อยูคาลิปตัสนี้จะเรียกว่ากระบวนการ FHH

สำหรับเยื่อชานอ้อยจะใช้เชื้อรา(F)ในขั้นตอนแรก และตามด้วยขั้นตอน E และขั้นตอน H อีก 2 ขั้นตอน โดยขั้นตอน E และขั้นตอน H ทั้ง 2 ขั้นตอนนี้จะใช้สารเคมีและสภาวะในการฟอกเช่นเดียวกันกับขั้นตอน E และ HH ในกระบวนการ CEHH เช่นกันดังนั้นการฟอกโดยใช้วิธีทางชีวภาพร่วมกับวิธีทางเคมีของเยื่อชานอ้อยนี้จะเรียกว่ากระบวนการ FEHH

3.2 การใช้วิธีทางชีวภาพร่วมกับวิธีทางเคมีแบบไม่ใช้คลอรีนและสารประกอบคลอรีน

โดยนำเยื่อกระดาษที่ผ่านการฟอก ด้วยเชื้อราในสภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 2.6 มาฟอกต่อด้วยสารเคมีตามลำดับดังนี้คือ ขั้นตอน E โดยใช้ NaOH 2 % ที่ความข้นเยื่อ (Consistency) 10 % อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที และต่อด้วยขั้นตอนที่ใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์(P) โดยฟอกด้วย NaOH 2 % ความข้นเยื่อ 15 % เวลา 120 นาที อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส และเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยแปรผันไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ 1 % 2 % 3% 4% 5% ตามลำดับ

แล้วนำเยื่อที่ผ่านขบวนการฟอกด้วยเชื้อรา (F) ต่อด้วย ขบวนการที่ใช้โซดาไฟ (E) และต่อด้วยขบวนการที่ใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์(P) เป็น FEP มาวิเคราะห์คุณภาพของเยื่อที่ได้ต่อไป

4. การศึกษาคุณภาพน้ำทิ้งที่ได้หลังจากการฟอกเยื่อโดยใช้ขั้นตอน FEP และหลังจากการฟอกโดยใช้ขั้นตอนแบบ CE/PHH โดยทำการตรวจสภาพน้ำทิ้งจากทั้ง 2 กระบวนการดังนี้

4.1 วัดความเป็นกรดเป็นด่างด้วยเครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (Beckman pH meter, USA)

4.2 วิเคราะห์หาค่า COD โดยใช้วิธี Open Reflux Method ตามวิธีของ (APHA AWWA and WPCF, 1992) (ภาคผนวก ก)

4.3 ทำการวิเคราะห์หาค่า BOD โดยวิธี Dilution Method ตามวิธีของ (5-Day BOD Test) (APHA AWWA and WPCF, 1992) (ภาคผนวก ก)

4.4 วัดความเข้มของสีน้ำเสีย โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ตามวิธีของ American Public Health Association (APHA AWWA and APCF, 1992) (ภาคผนวก ก)

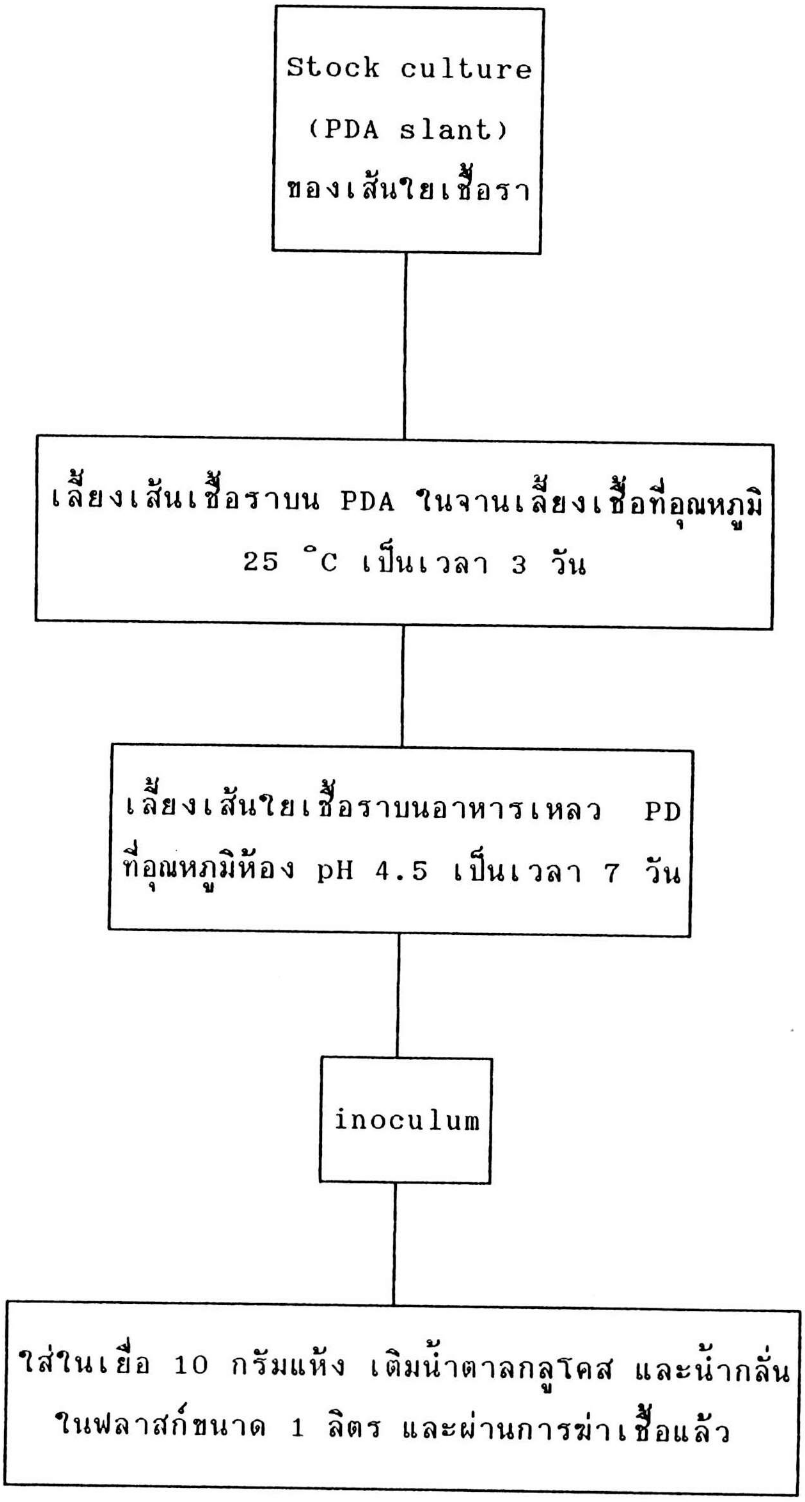
5. การวิเคราะห์คุณภาพของเยื่อ ดำเนินการหาค่าต่างๆ ดังนี้

5.1 ค่า Kappa number (ภาคผนวก ก) ตามมาตราฐาน Tappi T236 โดยจะทำการวิเคราะห์ค่า Kappa nummber ของเยื่อยูคาลิปตัสและเยื่อชานอ้อยซึ่งใช้เป็นวัตถุดิบเริ่มต้นในการทดลองฟอกเยื่อด้วยวิธีทางเคมี และการทดลองฟอกเยื่อด้วยวิธีทางชีวภาพโดยเชื้อรา *P. chrysosporium*

5.2 ค่า Permanganate number ของเยื่อยูคาลิปตัสและเยื่อชานอ้อยที่ผ่านขั้นตอน E ในกระบวนการ CEHH รวมทั้งเยื่อที่ผ่านขั้นตอนการฟอกด้วยเชื้อราในสภาวะที่เหมาะสมแล้ว

5.3 ค่า brightness (ภาคผนวก ก) ตามมาตราฐาน ISO 3688 และ ISO 2469 โดยจะทำการวิเคราะห์ค่า brightness ของเยื่อยูคาลิปตัสและเยื่อชานอ้อย ในเยื่อก่อนการฟอก เยื่อที่อยู่ระหว่างขั้นตอนการฟอก และเยื่อหลังการฟอกขั้นตอนสุดท้าย ทั้งโดยวิธีทางชีวภาพ วิธีทางเคมี และวิธีทางชีวภาพประยุกต์ใช้ร่วมกับวิธีทางเคมี

แผนภาพที่ 1 สรุปขั้นตอนการเตรียมเชื้อรา (inoculum) และการใส่เชื้อราในเยื่อกระดาษ


Stock culture
(PDA slant)
ของเส้นใยเชื้อรา
เลี้ยงเส้นเชื้อราบน PDA ในจานเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 3 วัน
เลี้ยงเส้นใยเชื้อราบนอาหารเหลว PD ที่อุณหภูมิห้อง pH 4.5 เป็นเวลา 7 วัน
inoculum
ใส่ในเยื่อ 10 กรัมแห้ง เติมน้ำตาลกลูโคส และน้ำกลั่น ในฟลาสก์ขนาด 1 ลิตร และผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

แผนภาพที่ 2 สรุปขั้นตอนการฟอกเยื่อ โดยนำเชื้อรามาประยุกต์ใช้ร่วมกับวิธีทางเคมี โดยไม่ใช้คลอรีน หรือสารประกอบคลอรีน โดยใช้วิธีที่เรียกว่า FEP ดังนี้

เยื่อกระดาษที่ผ่านขบวนการฟอกโดยใช้เชื้อรา (F) โดยฟอกที่ pH 4.5 อุณหภูมิ 30-38 °C ในสภาวะเขย่าหรือให้ออกซิเจนบ่ม เป็นเวลา 7 วัน

ฟอกเยื่อกระดาษโดยใช้ NaOH (E) โดยใช้ NaOH 2% ความข้นเยื่อ 10% อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 40 นาที

ฟอกเยื่อกระดาษโดยใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ร่วมกับโซดาไฟ (NaOH) (P) โดยใช้ NaOH 2% อุณหภูมิ 65 °C เวลา 120 นาที และ H_2O_2 (1-4%)