บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 อุตสาหกรรมการผลิตเยื่อและกระดาษ (Pulp and Paper Industry)

กรรมวิธีการผลิตกระดาษในอุตสาหกรรมสามารถอาจแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอนใหญ่ๆ คือ การผลิตเยื่อกระดาษ และการผลิตกระดาษ วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเยื่อกระดาษคือ ไม้ และวัตถุเส้นใยอื่นๆ เช่น ฝ้าย, ลินิน, ป่าน, ปอกระเจา, ปอแก้ว, ฟางข้าว, กากอ้อย, ต้นแฟลคซ์ (flax), หญ้า วัตถุดิบเหล่านี้จะถูกนำมาแยกเส้นใยออกให้อยู่ในรูปเยื่อแล้วผ่านขั้นตอนการฟอกเยื่อให้ขาวแล้วนำเยื่อที่ฟอกแล้วมาปรุงแต่งและผสมผสานเส้นใยและสารเคมีแล้วผ่านเข้าขั้นตอนการผลิตกระดาษต่อไป แผนผังกระบวนการผลิตเยื่อและกระดาษแสดงดังรูป 2.1

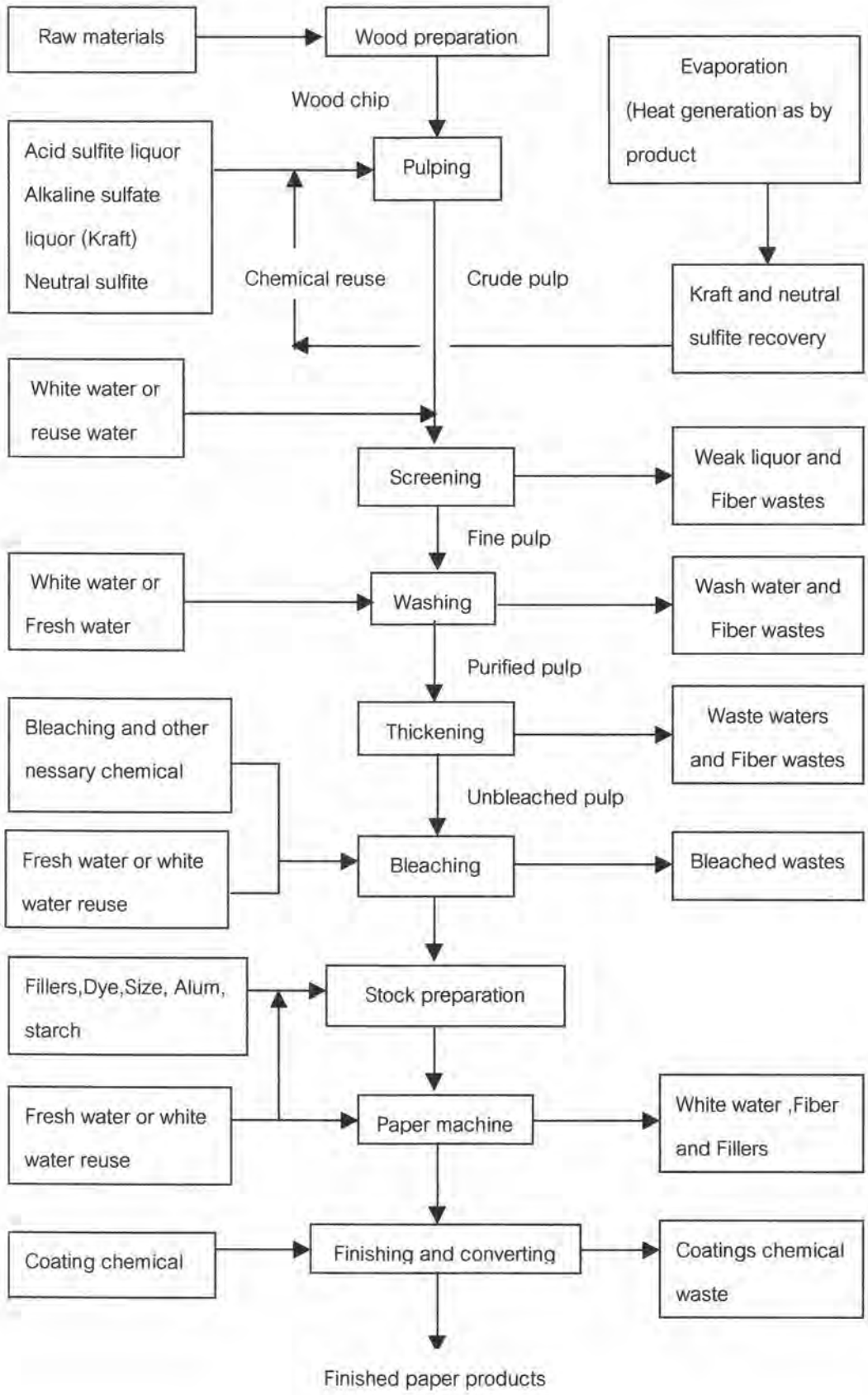
2.1.1 กระบวนการผลิตเยื่อ (Pulping process)

การผลิตเยื่อ คือ กระบวนการแยกเส้นใย (Fiber) ซึ่งเกาะติดกันอยู่ในเนื้อไม้หรือพืชวัตถุดิบให้แยกออกจากกัน วัตถุประสงค์ของการผลิตเยื่อ คือ การแยกสารลิกนินออกเพื่อให้ง่ายต่อการแยกเส้นใย, เป็นการเตรียมและปรับปรุงคุณภาพของเยื่อให้เหมาะสมในการผลิตกระดาษต่อไป

กระบวนการผลิตเยื่อแบ่งออกได้เป็น 3 ประเภท คือ

2.1.1.1 Mechanical pulping (Kurdin, 1980)

เป็นกระบวนการผลิตเยื่อที่ใช้พลังงานกลทำให้เส้นใยในเนื้อไม้แยกออกจากกัน โดยจะเน้นที่การบดเพื่อกระจายเส้นใยในเนื้อไม้ออกจากกัน เยื่อไม้บดที่ได้จะมีสมบัติคล้ายไม้และไม่ค่อยดีนักเนื่องจากไม่ใช่เยื่อเซลลูโลสบริสุทธิ์ เยื่อที่ได้จากกระบวนการนี้มีปริมาณสูงสุด คือได้ผลผลิต (yield) 95 % ขึ้นไป เยื่อที่ได้จะมีความทึบแสงสูง จึงนิยมใช้ทำกระดาษหนังสือพิมพ์ กระดาษอนามัยบางชนิด และกระดาษกั้นสำหรับบรรจุสิ่งของกันแตกภายในกล่อง ปัจจุบันได้มีการพัฒนาคุณภาพของเยื่อให้สูงขึ้น โดยใช้สารเคมีหรือความร้อนเข้าช่วย เช่น กระบวนการเคมี – เมคแคนิคัล (Chemi – Mechanical Pulping, CMP), กระบวนการเทอร์โมเมคแคนิคัล (Thermo – Mechanical Pulping, TMP) หรือทั้งสองอย่างรวมกัน เรียกว่า



รูป 2.1 กระบวนการผลิตเยื่อและกระดาษ (Nemerow, 1991)

กระบวนการเคมิเทอร์โมเมคแคนิคัล (Chemi – Thermo Mechanical Pulping, CTMP) ทำให้ลิกนินอ่อนตัวลงง่ายต่อการแยกเส้นใยออกจากกัน ลดพลังงานที่ใช้ในการบดเยื่อลง โดยได้เยื่อที่มีคุณภาพสูงขึ้น

2.1.1.2 Semi - Chemical pulping (Marteny, 1980)

เป็นกระบวนการที่ใช้พลังงานกล สารเคมี และพลังงานความร้อนร่วมกัน โดยที่สารเคมีและความร้อนจะช่วยให้ลิกนินในไม้อ่อนตัวลงและละลายออกบางส่วน แล้วนำมาบดให้เส้นใยแยกออกจากกันซึ่งบางชนิดอาจจะไม่ใช้ความร้อน เยื่อที่ได้จากกระบวนการนี้เรียกว่า Semichemical pulp ผลผลิต (yield) เยื่อที่ได้ประมาณ 65 – 90 % ถ้าสารเคมีที่ใช้เป็น Neutral Sodium Sulfite (Na_2SO_3 + Na_2CO_3 + $NaHCO_3$) ก็จะเรียกกระบวนการผลิตเยื่อนั้นว่า neutral sulfite semichemical Pulping (NSSC) เยื่อที่ได้จากกระบวนการ Semi – Chemical Pulping นี้จะมีลิกนินปนอยู่แต่ไม่มากเท่าเยื่อที่ได้จากกระบวนการ Mechanical Pulping

2.1.1.3 Chemical pulping (Bryce, 1980)

เป็นกระบวนการผลิตเยื่อที่ใช้ความร้อนและสารเคมี ทำให้ลิกนินที่เป็นตัวเชื่อมระหว่างเส้นใยให้ละลายออก เส้นใยก็จะแยกออกจากกัน เยื่อที่ได้จะมีปริมาณลิกนินเจือปนอยู่น้อยมากจึงเหมาะสำหรับทำกระดาษคุณภาพดีและมีความเหนียว แต่ปริมาณเยื่อที่ได้จะมีปริมาณน้อย คือ ประมาณ 45 – 60 % กระบวนการผลิตเยื่อแบบนี้ยังแยกตามชนิดของสารเคมีที่ใช้ คือ

1) **กระบวนการซัลไฟต์** (Sulfite Process)

กระบวนการนี้เหมาะสำหรับทำเยื่อจากไม้เนื้อแข็ง และพันธุ์ไม้จำพวกหญ้า สารเคมีที่ใช้เป็นน้ำยาต้มย่อยเยื่อ คือ สารละลายแคลเซียมไบซัลไฟต์ ($Ca(HSO_3)_2$) , สารละลายแมกนีเซียมไบซัลไฟต์ ($Mg(HSO_3)_2$), สารละลายแอมโมเนียมซัลไฟต์ (NH_4HSO_3) ซึ่งน้ำยาต้มเยื่อเหล่านี้มีฤทธิ์เป็นกรด ปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้นในกระบวนการนี้คือ Lignin sulfonation และ Dissolution

2) **กระบวนการด่าง** (Alkali pulping Process)

กระบวนการผลิตเยื่อแบบนี้ยังแยกย่อยออกเป็น 2 แบบ คือ

- **กระบวนการโซดา** (Soda Process) ซึ่งสารเคมีที่ใช้ในการต้มย่อยเยื่อ คือ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) นิยมใช้กับไม้เบญจพรรณต่างๆ เยื่อกระดาษที่ได้เมื่อนำไปฟอกขาวแล้วจะเหมาะสำหรับทำกระดาษพิมพ์เขียน กระดาษจดหมาย

- **กระบวนการซัลเฟต** (Sulfate Process) หรือ **กระบวนการคราฟท์** (Kraft Process) เป็นกระบวนที่ใช้ได้กับพันธุ์ไม้ทุกชนิด สารเคมีที่ใช้เป็นน้ำยาต้มย่อย คือ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) และโซเดียมซัลไฟด์ (Na_2S) และที่เรียกกระบวนการผลิตเยื่อนี้ว่า Kraft process เพราะว่าเยื่อที่ผลิตได้จากกระบวนการนี้จะมีความแข็งแรงสูงซึ่งความหมายในภาษาเยอรมันและสวีเดน คือ Kraft ข้อดีของ Kraft process ที่ดีกว่า Soda process คือ ผลผลิต, คุณภาพของเยื่อ, Rate of pulping และต้นทุนการผลิต

2.1.2 **การฟอกเยื่อ** (Pulp Bleaching) (Lorås, 1980)

การฟอกเยื่อจะทำหลังจากกระบวนการผลิตเยื่อ จุดประสงค์หลักของการฟอกเยื่อ คือ ทำให้เยื่อมีความขาวสว่างเพิ่มขึ้นจากการมองเห็นด้วยตาคน และยังมีจุดมุ่งหมายอื่นที่ต้องคำนึงถึง คือ ในการทำเยื่อให้ขาวขึ้นนั้นจะต้องไม่ทำลายความแข็งแรงของเยื่อ ความขาวสว่างของเยื่อ และความแข็งแรงของเยื่อจะต้องไม่ลดลงหลังจากที่เก็บไว้เป็นเวลานานๆ และที่สำคัญอีกประการหนึ่งคือ ต้องพยายามลดต้นทุนของการฟอกเยื่อลงให้ต่ำที่สุด ซึ่งหมายถึงต้องพยายามให้มีการสูญเสียเยื่อในการฟอกเยื่อน้อยที่สุดและเลือกสารเคมีที่ใช้ในการฟอกเยื่อให้ได้คุณภาพที่ต้องการ โดยใช้สารเคมีต่อหน่วยเยื่อฟอกต่ำ การที่เยื่อก่อนฟอกมีสีนั้นเกิดจาก chromophoric group ที่มีอยู่ในลิกนิน ซึ่งเยื่อที่ไม่ได้ฟอกหรือเยื่อก่อนฟอกที่ได้มาจาก chemical pulping process ไม่ว่าจะเป็น sulfite หรือ kraft process ก็ตามจะมีลิกนินเหลืออยู่ในเยื่อประมาณ 2 – 4 % จากที่มีอยู่ในเนื้อไม้ สำหรับเยื่อที่ได้จากกระบวนการ semichemical หรือ mechanical Pulping มีการแยกเอาลิกนินออกน้อยหรือไม่ได้เอาออกเลยก็จะมีลิกนินอยู่ในเยื่อมาก การทำเยื่อให้มีความขาวสว่างขึ้นนั้นทำได้โดยการแยกลิกนินออกโดยใช้สารเคมีทำปฏิกิริยากับลิกนิน การฟอกเยื่อประกอบด้วยหลายขั้นตอน มักจะใช้อักษรตัวหน้าเป็นสัญลักษณ์แทนขั้นตอนนั้น โดยสารเคมี สัญลักษณ์และชื่อขั้นตอนการฟอกต่างๆ แสดงดังตาราง 2.1

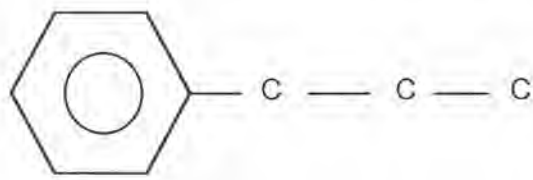
ตาราง 2.1 ขั้นตอนการฟอกเยื่อ (Bleaching sequences) และสารเคมีที่ใช้

Bleaching sequences	Chemical used
Chlorination (C)	Chlorine in acidic medium
Alkaline Extraction (E)	NaOH
Chlorine Dioxide (D)	ClO_2 in acidic medium
Oxygen (O)	Molecular of oxygen at high pressure in alkaline medium
Hypochlorite (H)	Hypochlorite in alkaline medium
Hydrogen Peroxide (P)	Hydrogen Peroxide in alkaline medium
Ozone (Z)	Ozone in acidic medium

2.2 ลิกนิน (Lignin)

2.2.1 โครงสร้างและลักษณะเฉพาะของลิกนิน

สารลิกนินเป็นองค์ประกอบที่สำคัญในเนื้อไม้ พบมากในผนังเซลล์ของพืชที่มีระบบลำเลียงจริง ในธรรมชาติลิกนินเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่พบมาก โดยทั่วไปในเนื้อไม้จะประกอบไปด้วย เซลลูโลส 30 - 40 % ลิกนิน 18 - 30 % และเฮมิเซลลูโลส 30 % โดยลิกนินจะรวมกันอยู่หนาแน่นระหว่างและภายในของชั้นนอกของเส้นใย ลิกนินจะเป็นตัวให้ความแข็งแกร่งของโครงสร้างเนื้อไม้ โดยการทำให้เส้นใยแข็งตึงและเกาะตัวกันแน่น ลิกนินเป็นสาร noncrystalline, ไม่ละลายน้ำ, มีความสามารถในการดูดซึมสูง และเป็นเทอร์โมพลาสติกโดยธรรมชาติ ลิกนินเป็นสารประกอบพอลิเมอร์ โครงสร้างโมเลกุลส่วนใหญ่ เป็นวงแหวนประกอบด้วย phenylpropane unit และไม่มีโครงสร้างโมเลกุลที่แน่นอนทั้งนี้ขึ้นอยู่กับการรวมตัวของ phenylpropane unit (Hammel,1995) โครงสร้างของ phenylpropane unit แสดงดังรูป 2.2



รูป 2.2 โครงสร้างของ phenylpropane unit

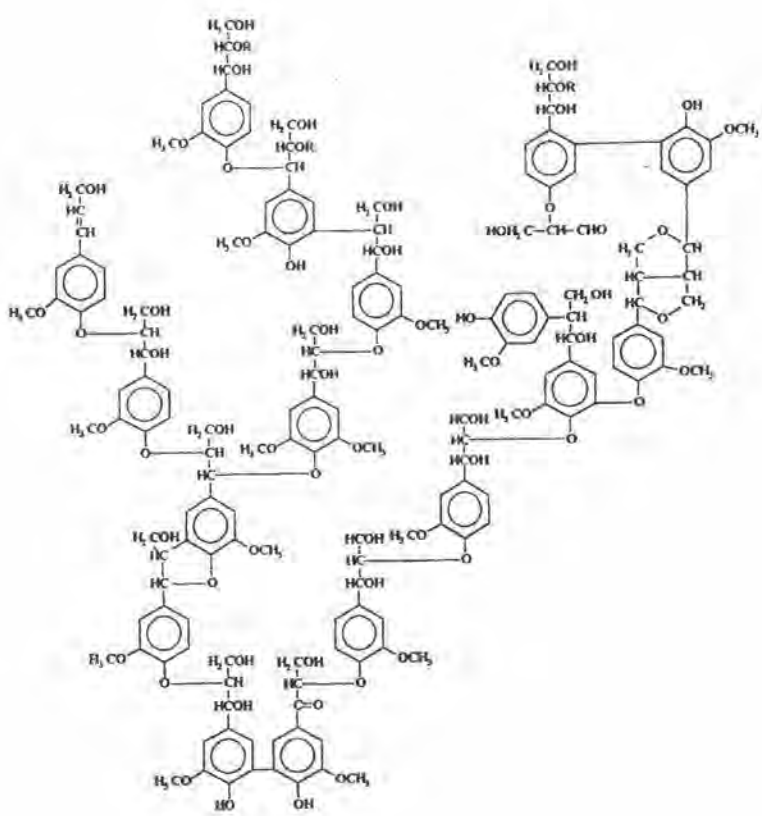
สารประกอบลิกนิน สารมารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มหลักโดยพิจารณาจากสัดส่วนของสารตั้งต้น (Precursors) แต่ละชนิดที่ถูกนำมาสร้างได้แก่

1) Hardwood lignin จะมี Precursors เป็น Coniferyl alcohol (50-75 %) และ Sinapyl alcohol (25-50%) ซึ่งจะให้ Quaiacyl unit และ Syringyl unit ตามลำดับในโครงสร้างของพอลิเมอร์

2) Softwood lignin จะมี Precursors เป็น Coniferyl alcohol เพียงอย่างเดียว

3) Grasses lignin จะมี Precursors เป็น Coniferyl alcohol, Sinapyl alcohol และ Coumaryl alcohol ซึ่ง Coumaryl alcohol นี้ จะให้ p-hydroxyphynyl unit ในโครงสร้างของพอลิเมอร์

โครงสร้างของสารลิกนินจะเป็นลักษณะ 3 มิติ ซึ่ง โมโนเมอร์ที่เป็น phenylpropane unit จะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะระหว่างอะตอมคาร์บอน-คาร์บอน (C–C) และพันธะอีเธอร์ (C-O-C) (Kirk และคณะ, 1988) โครงสร้างที่ซับซ้อนของสารลิกนิน แสดง ดังรูป 2.3



รูป 2.3 โครงสร้างโมเลกุลของลิกนิน (Kirk และคณะ, 1988)

เนื่องจากความซับซ้อนของโครงสร้างโมเลกุลของลิกนินที่ประกอบไปด้วยพันธะระหว่างคาร์บอน-คาร์บอนอะตอม ซึ่งมีความต้านทานต่อสารเคมีและการย่อยสลายทางชีวภาพสูง ทำให้ลิกนินย่อยสลายได้ยากในธรรมชาติ ในอุตสาหกรรมผลิตเยื่อกระดาษ ลิกนินจัดเป็นอุปสรรคสำคัญที่สุดที่ต้องกำจัดออกไป เพื่อให้เยื่อกระดาษที่ขาว สามารถนำไปผลิตกระดาษที่มีคุณภาพดีต่อไป ดังนั้นในขั้นตอนส่วนใหญ่ของอุตสาหกรรมผลิตเยื่อกระดาษ จึงมุ่งที่จะกำจัดลิกนินออกไปให้มากที่สุด ในกระบวนการผลิตเยื่อกระดาษและการฟอกเยื่อกระดาษนั้น พันธะระหว่าง propane side chain และวงแหวนเบนซีนจะถูกทำลายไปและจะเกิดเป็นพันธะใหม่ขึ้นเป็นสารอนุพันธ์ของลิกนินที่สามารถละลายน้ำได้ ชนิดของสารอนุพันธ์จะขึ้นอยู่กับกระบวนการในการผลิตเยื่อและการฟอกเยื่อ เช่นในการฟอกเยื่อโดยใช้สารเคมีพวกคลอรีน เช่น chlorine dioxide หรือสารประกอบคลอรีนชนิดอื่นๆ น้ำทิ้งจากการฟอกเยื่อนี้จะมีสารพวก chlorinated polycyclic aromatic hydrocarbon ตัวอย่างคือ chlorinated dioxin, chlorinated phenol ที่เกิดจากการออกซิเดชั่นลิกนินด้วยสารประกอบคลอรีน ทำให้น้ำทิ้งมีสีน้ำตาลเข้มและเป็นพิษด้วย สารอนุพันธ์ของลิกนินที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการผลิตเยื่อและการฟอกเยื่อแสดงดังตาราง 2.2

ตาราง 2.2 สารอนุพันธ์ของลิกนินจากกระบวนการผลิตเยื่อและการฟอกเยื่อ (Kirk **และคณะ**, 1988)

Chemical pulping /Bleaching process	Chemical	Lignin derivatives
Soda Pulping	NaOH	Alkaline lignin
Kraft Pulping	$NaOH + Na_2S$	Kraft lignin (Thio – lignin , Sulfate lignin)
Sulfite Pulping	$H_2SO_3 + HSO_3$	Ligno - sulphonate
Chlorine Bleaching	Cl_2	Chlorinated lignin

2.3 แหล่งของน้ำเสียที่มีลิกนินเจือปนอยู่

น้ำทิ้งจากโรงงานกระดาษมักก่อให้เกิดปัญหาเนื่องจากสีและความเป็นพิษของน้ำเสีย เพราะในระบบบำบัดน้ำเสียไม่สามารถกำจัดหรือแยกสีออกจากน้ำเสียได้หมด ในกระบวนการผลิตเยื่อและกระดาษ โดยเฉพาะในกระบวนการผลิตเยื่อนั้นโครงสร้างทางเคมีของลิกนินจะถูกทำลายและจะเกิดเป็นสารอนุพันธ์ต่างๆของลิกนิน ซึ่งน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตเยื่อจะมีสารเหล่านี้เจือ

ปนอยู่ทำให้น้ำทิ้งมีสีน้ำตาลเข้มและมีความเป็นพิษสูง แหล่งใหญ่ของน้ำเสียที่มีลิกนินเจือปนอยู่ในโรงงานผลิตเยื่อมีดังนี้

1) **น้ำทิ้งจากการย่อยเยื่อและการล้างเยื่อ** (Digester and washer)

น้ำทิ้งนี้จะเรียกว่า "black liquor" เพราะว่าน้ำจะมีลักษณะสีคล้ำดำ หรือมีสีน้ำตาลเข้มมากซึ่งเกิดจาก amophoric group ของลิกนิน

2) **น้ำ** white water **จากการแยกเยื่อ,ทำความสะอาดเยื่อและการทำเยื่อให้ข้น** (screening, cleaning and thickening)

น้ำจากแหล่งนี้จะมีปริมาณมาก ในกระบวนการผลิตเยื่อกระดาษแบบคราฟท์ น้ำทิ้งส่วนนี้จะเป็นส่วนที่ไม่สามารถ Recover สารลิกนินได้จากกระบวนการล้างเยื่อซึ่งก็ขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพในการล้างเยื่อ น้ำทิ้งจากจุดนี้จะมีของแขวนลอยซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นพวกเส้นใย

3) **น้ำทิ้งจากเครื่องล้างเยื่อในระบบฟอกเยื่อ** (Bleach plant washer)

น้ำทิ้งจากการฟอกเยื่อจะมีปริมาณสารอินทรีย์ประเภท สารประกอบ Chlorinated aromatic อยู่มาก ซึ่งแหล่งที่ก่อให้เกิดสารอินทรีย์เหล่านี้ส่วนใหญ่มาจากขั้นตอน Chlorination และ Alkaline extraction น้ำทิ้งจากขั้นตอนทั้งสองนี้จะมีค่าซีโอดี, ค่าบีโอดี และ ความเข้มของสีสูงมาก

ผลเสียของสีในแหล่งน้ำธรรมชาติ (ดร.เกรียงศักดิ์ อุดมสินโรจน์,2539)

- กั้นหรือขวางแสงแดดไม่ให้ส่องลงในน้ำ เป็นสาเหตุให้การสังเคราะห์แสงลดลง
- สีเป็นสิ่งที่มองเห็นด้วยตาเปล่า ทำให้น้ำนั้นไม่น่ามอง
- สีส่วนใหญ่เกิดจากสารอินทรีย์ประเภท Dissolved และ Colloidal ซึ่งจะใช้ออกซิเจนในน้ำ

สีของน้ำมี 2 ประเภท คือ (เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต,2539)

1) สีที่แท้จริง (True color) เกิดจากการละลายของสารประกอบที่มีในน้ำ

2) สีที่ปรากฏ (Apparent color) เกิดจากการสะท้อนของสิ่งที่แขวนลอยอยู่ในน้ำ หรือไม่ก็อาจเกิดจากการสะท้อนของท้องฟ้า การทราบสีที่แท้จริงของน้ำ อาจทำได้โดยการเก็บตัวอย่างน้ำขึ้นมาทำการกรองสิ่งที่แขวนลอยออกไป ใช้ Millipore filter หรือ ทำการเหวี่ยงแยก แล้วนำส่วนที่เป็นน้ำที่แท้จริงมาทำการเปรียบเทียบกับสีมาตรฐาน สีมาตรฐานจะได้จากการเจือจางในหลายๆ

ขั้นตอนของสารละลาย Potassium chloroplatinate (K_2PtCl) และ Cobaltous chloride ($CoCl_2.H_2O$) หน่วยที่ใช้วัดคือ Platinum cobalt unit (1 unit = 1 mg Pt / L) เช่น 1 unit คือ ใสมาก , 300 units คือ สีคล้ำมาก

2.4 เชื้อรา *Phanerochaete chrysosporium*

P. chrysosporium เป็นเชื้อราในกลุ่ม White rot fungi (ราที่มีสายใยสีขาว) ที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดที่ใช้ในการศึกษาการย่อยสลายสารลิกนินและสารอินทรีย์ที่มีพิษอื่นๆ เช่น ดีดีที, พอลิคลอริเนตเทตไบฟีนิลและคลอริเนตเทตอัลเคน (Eaton,1985 ; Bumpus และ Aust, 1987) โดยที่เชื้อรานี้สามารถผลิตเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายสารพิษต่างๆเหล่านี้ได้ *P.chrysosporium* จะหลั่งเอนไซม์เอกซ์ทราเซลลูลาร์ออกซิเดทีฟเอนไซม์ (Extracellular Oxydative Enzyme) ภายใต้ภาวะไนโตรเจน-คาร์บอนที่จำกัด โดยจะประกอบด้วยเอนไซม์ 2 ชนิด คือ ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (LiP) และมังกานีสเปอร์ออกซิเดส (MnP) ซึ่งเอนไซม์ 2 ชนิดนี้ เป็นสารทุติยภูมิในกระบวนการสร้างและสลาย (Secondary Metabolite) คือ เป็นเอนไซม์ที่สร้างขึ้นและขับออกนอกเซลล์เมื่อเชื้อราอยู่ในภาวะเจริญเติบโตเต็มที่ เอนไซม์ดังกล่าวสามารถออกซิไดซ์โมเลกุลของลิกนินทำให้ขนาดโมเลกุลของลิกนินเล็กลง เอนไซม์ที่มีบทบาทในการย่อยสลายลิกนินมากที่สุดคือ ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (LiP) ซึ่งมีสมบัติในการ Oxidize phenolic unit มีผลทำให้พันธะ C-C และ C-O แตกหักออกจากกัน (Datta และคณะ, 1991) ปัจจัยภายนอกที่สำคัญที่มีผลต่อแอคทิวิทีของเชื้อราในการเจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์คือ อุณหภูมิ, pH, ระดับความเข้มข้นของออกซิเจนละลาย และปริมาณการให้สารไนโตรเจนที่จำกัด (Kirk และคณะ, 1978 ; Leisola และคณะ,1984 ; Fenn และคณะ, 1981 ; Fenn และ Kirk, 1981 ; Reid, 1983a,b) ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโต คือที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส และที่พีเอช 4.0 - 4.5 (Kirk และคณะ,1978 ; Leisola และคณะ, 1984)

2.5 การตรึงเซลล์ (Cell immobilization)

2.5.1 ความหมายของการตรึงเซลล์

การตรึงเซลล์ ได้ดัดแปลงมาจากการตรึงเอนไซม์ โดยเป็นการจำกัดขอบเขตหรือสถานที่ทางกายภาพของเซลล์ให้อยู่ในบริเวณที่ที่กำหนด แต่เซลล์ยังคงรักษาสมบัติในการเป็นแหล่งผลิตเอนไซม์ให้มีความสามารถในการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาและสามารถใช้เซลล์ตรึงนี้ซ้ำและใช้

อย่างต่อเนื่องได้ โดยเซลล์ที่ถูกตรึงนี้อาจอยู่ในสถานะเซลล์ที่กำลังเจริญ เซลล์ระยะพักหรือเซลล์ที่ตายแล้ว (Chibata และ Wingard, 1983) นอกจากนี้การตรึงเซลล์ยังเป็นการลดขั้นตอนการสกัดเอนไซม์ การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยไม่ทำให้เสียความสามารถในการเร่งปฏิกิริยา

2.5.2 **กระบวนการตรึงเซลล์** (Cell immobilization process)

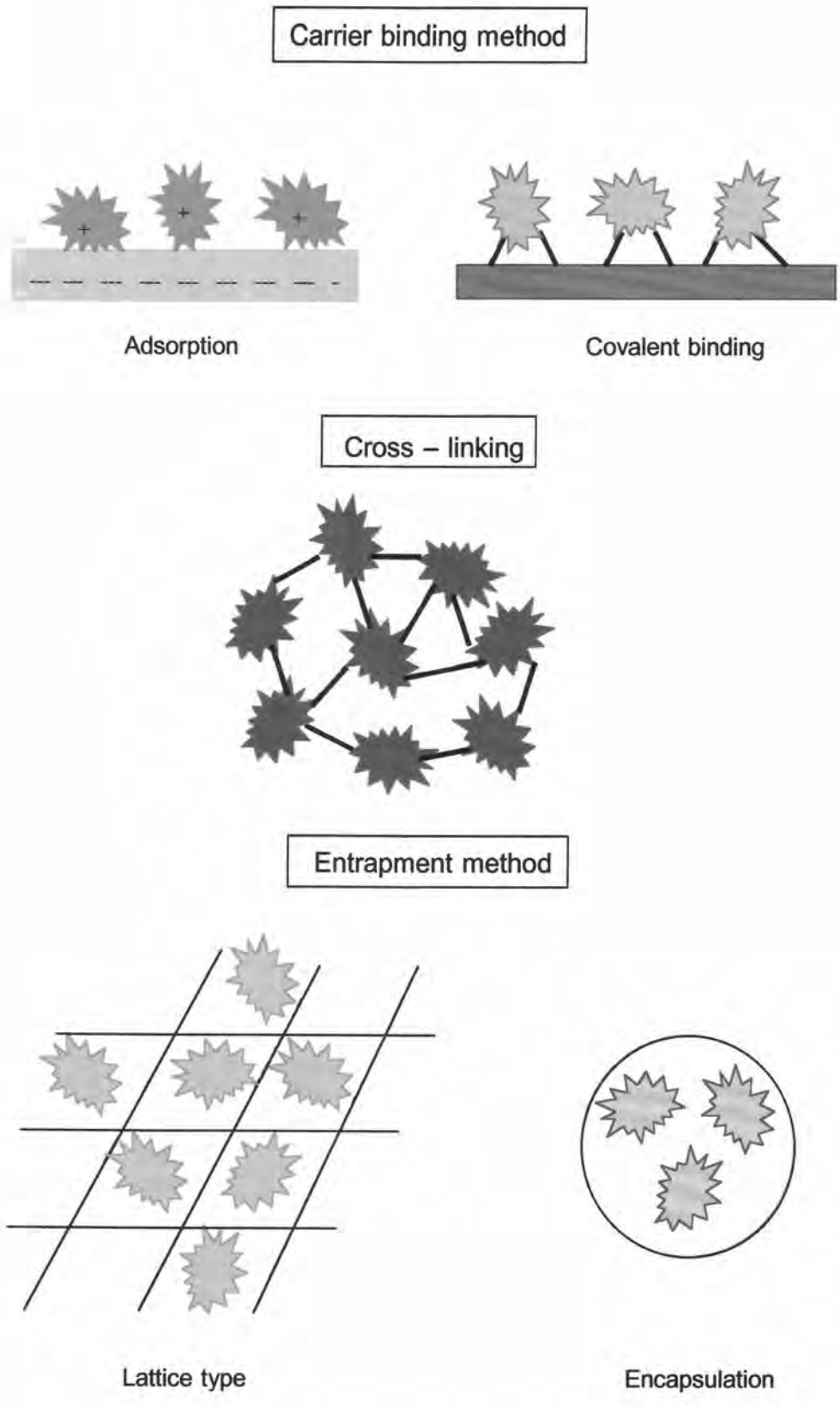
เทคนิคในการตรึงเซลล์มี 3 วิธีคือ การยึดด้วยตัวนำ (Carrier-binding method) การเชื่อมขวาง (Cross-linking method) และการกักขัง (Entrapment method) (Chibata และคณะ,1978) แสดงดังรูป 2.4

1. **การยึดด้วยตัวนำ** (Carrier-binding method) หมายถึงการเชื่อมเซลล์จุลินทรีย์กับสารพาหะโดยตรง แบ่งได้ 2 วิธี คือ

1.1 **การใช้พันธะโควาเลนต์** (Covalent binding method) เป็นวิธีการเชื่อมเซลล์โดยตรงกับสารพาหะ โดยสารที่ใช้เชื่อมนั้นสามารถต่อกับส่วนประกอบที่ยึดเซลล์ได้แก่กลุ่มอะมิโน, กลุ่มคาร์บอกซิล, กลุ่มซัลฟีดริล, กลุ่มไฮดรอกซิล, กลุ่มอิมิดาโซล หรือกลุ่มฟีนอลของโปรตีน วิธีนี้มีข้อดี คือ เซลล์เชื่อมอยู่กับผิวหน้าของตัวนำอย่างสม่ำเสมอ มีความคงตัวดี และการรั่วไหลของเซลล์น้อย (Cheetham,1980) แต่ก็มีข้อเสีย เนื่องจากการตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้ค่อนข้างรุนแรง และความเป็นพิษของสารที่ใช้อาจทำให้เซลล์สูญเสียความสามารถได้ ตัว Support materials ที่นิยมใช้คือ Polysaccharide polymers เช่น เซลลูโลส , เด็กซ์ทราน (Dextran) , แป้ง และกลูโคส porous silica และ Porous glass เป็นต้น

1.2 **การเกาะหรือดูดซับ** (Adsorption method) เป็นวิธีการตรึงเซลล์โดยให้เซลล์ดูดซับกับสารที่เป็นตัวนำด้วยพันธะไอออนิก หรือพันธะไฮโดรเจน (Cheetham, 1980) โดยอาศัยหลักทางธรรมชาติเคมี เนื่องจากผนังของเซลล์ประกอบด้วย diaminopimelic acid และ hexosamines ซึ่งสามารถเกิดพันธะไอออนิกกับตัวนำได้ (Koshcheenko, 1981) การตรึงวิธีนี้เป็นวิธีที่ง่าย แต่แรงดูดซับค่อนข้างอ่อนและมีการสูญเสียเซลล์ได้ง่าย เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-เบส การไหลของน้ำ การเกิดฟองอากาศ และเมื่อมีการแบ่งเซลล์

2. **การเชื่อมขวาง** (Cross-linking method) หมายถึงการเชื่อมเซลล์เข้าด้วยกัน โดยใช้สารพวกไบ-(bi-) หรือ มัลติฟังก์ชันนอลรีเอเจนต์ (multifunctional reagent) เช่น กลูทาอัลดีไฮด์



รูป 2.4 **กระบวนการตรึงเซลล์** (Gordon F. Bickerstaff, 1997)

(glutaraldehyde) และ โทลูอีน ไดไอโซไซยาเนต (toluene diisocyanate) (Chibata และคณะ,1978) เป็นต้น วิธีนี้จะใช้สารเคมีภายใต้ภาวะที่ค่อนข้างจะรุนแรง ทำให้เซลล์สูญเสียความสามารถในการดำรงชีวิตได้

3. **การกักขัง** (Entrapment method)

การตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้ จะต่างจากการตรึงเซลล์ด้วยวิธีทางเคมีโดยที่ไม่ได้มีการเชื่อมติดหรือไม่มีพันธะเกิดขึ้นระหว่างเซลล์กับสารพาหะ ดังนั้นจึงสามารถใช้ได้กับเซลล์ทุกชนิด การตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้แบ่งได้เป็น 2 วิธี คือ

3.1 **การตรึงแบบไมโครแคปซูล** (Microencapsulation) หมายถึง การกักขังเซลล์ไว้ในเยื่อกึ่งผ่านได้ (semipermeable membrane) เช่น collodian หรือ silicone ซึ่งป้องกันการซึมผ่านของเซลล์ได้ แต่ยอมให้ substrate และผลผลิตซึมผ่านได้อย่างอิสระ การตรึงด้วยวิธีนี้เป็นวิธีที่ง่ายแต่ไม่แข็งแรงพอที่จะใช้ในอุตสาหกรรม และอาจมีปัญหาการตกตะกอนของเซลล์เกิดขึ้นด้วย (Cheetham, 1980)

3.2 **การตรึงเซลล์แบบแลตทิซ** (Lattice type) หมายถึงการตรึงเซลล์โดยการกักขังไว้ภายในช่องว่าง 3 มิติ ในเจลของสารพอลิเมอร์ การตรึงเซลล์โดยวิธีกักขังทั่วไปจะหมายถึงแบบแลตทิซ ซึ่งเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมและประสบความสำเร็จมากที่สุด เนื่องจากใช้ได้กับเซลล์ทุกชนิด ในขณะที่วิธีการอื่นมีข้อจำเพาะและข้อเสียเปรียบมากกว่า (Cheetham, 1980) การตรึงเซลล์ด้วยวิธีการกักขังนี้นิยมใช้สารพวก biochemically inert hydrogel เป็นตัวกักขัง โดยใช้หลักการเกิดเจลซึ่งทำให้เกิดโครงสร้าง 3 มิติ ที่มีลักษณะเป็นรูพรุน โดยกลไกในการเกิดเจลขึ้นกับสารพาหะที่ใช้ ดังแสดงในตารางที่ 2.3 (ภาวินี, 2531)

เนื่องจากการเตรียมเซลล์ที่ถูกตรึงมีหลายวิธี ดังนั้นสมบัติของสารพาหะที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์แต่ละวิธีอาจมีข้อปลีกย่อยที่แตกต่างกันไป แต่โดยทั่วไปแล้วปัจจัยที่สำคัญในการพิจารณาจะคล้ายคลึงกันคือ สมบัติเชิงกล (mechanical properties), สมบัติทางกายภาพ (physical properties), ความแข็งแรง, ความชอบน้ำ (hydrophilicity), สภาพให้ซึมได้ (permeability), ทนต่อสภาพแวดล้อมทางกายภาพ สารเคมีและการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ เนื่องจากการตรึงเซลล์ต้องทำในภาวะปลอดเชื้อ ต้องเลือกสารพาหะที่ทนต่อความร้อนและความดันได้สูง สารพาหะไม่ควรเป็นอันตรายต่อเซลล์และสิ่งแวดล้อม และไม่ควรกระทบกระเทือนต่อระบบ

เมตาบอลิซึม นอกจากนี้อาจพิจารณาในด้านราคา การยอมรับและความสามารถในการนำกลับมาใช้ได้อีก (วิเชียร, 2524 และ ภาวิณี, 2537)

ตาราง 2.3 วิธีกักขังเซลล์ด้วยการทำให้เกิดเจลโดยพอลิเมอร์ของสารอินทรีย์ (ภาวิณี, 2537)

กลไกการเกิดเจล	สารพาหะ
พอลิเมอไรเซชัน (Polymerization)	พอลิอะคริลาไมด์, พอลิเมทาคริเลต
การเชื่อมขวาง (Cross linking)	พรีพอลิเมอร์, โปรตีน
พอลิคอนเดนเซชัน (Polycondensation)	พอริยูเรเทน, เอพอกซีเรซิน
การเกิดเจลเนื่องจากความร้อน (Thermal gelation)	คอลลาเจน, เจลลาติน, เอการ์/เอกาโรส, แคปปา-คาร์ราจิแนน
การเกิดเจลแบบไอโอโนโทรปิก (Ionotropic gelation)	อัลจิเนต, ชิโทซาน
การตกตะกอน (Precipitation)	เซลลูโลส, เซลลูโลสไตรอะซิเตต

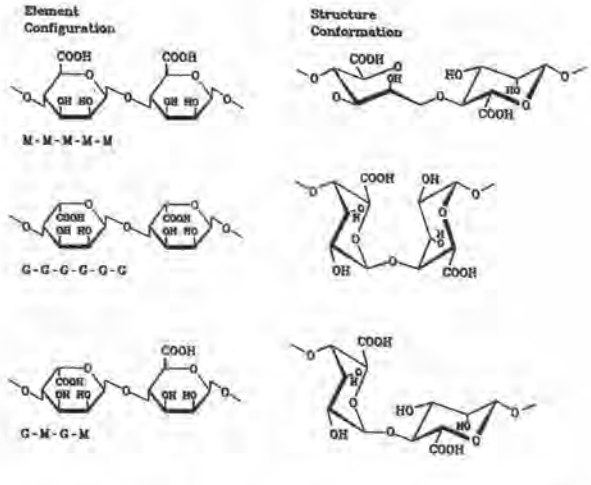
2.5.3 วิธีการกักขังเซลล์ในแคลเซียมอัลจิเนต (Cell Entrapment in Calcium Alginate)

การกักขังเซลล์จุลินทรีย์โดยใช้อัลจิเนตเป็นวิธีการที่เรียบง่ายวิธีการหนึ่งของการตรึงเซลล์ สารอัลจิเนตที่นิยมใช้มากสำหรับการตรึงเซลล์คือ โซเดียมอัลจิเนต (sodium alginate) ซึ่งเป็นพอลิแอนไอออน (polyanion) ทั้งนี้เนื่องจากสามารถทำการทดลองได้ที่อุณหภูมิห้องและสามารถละลายน้ำได้ อัลจิเนตเป็นสารที่ไม่เป็นพิษ มีเสถียรภาพต่อสารเคมีสูง ที่ พีเอช 5-10 ยอมรับให้ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและยามานานกว่า 65 ปี โดยใช้เป็นวัตถุเจือปนในอาหาร เช่น thickening agents, emulsifying agents, film forming agents และ gelling agents (Jane E. Fraser และ Gordon F. Bickerstaff,1997) แต่การใช้อัลจิเนตเป็นสารพาหะก็มีข้อเสียเช่นกัน ประการแรกคือ สารประกอบนี้สามารถเสื่อมสลายได้เมื่อสัมผัสโดยตรงกับสารออกซิไดซ์ เช่น หมู่ธาตุแฮโลเจน หรือ พีรีออเดต และโดยระบบรีดอกซ์ เช่น พอลิฟีนอล หรือ ไทออล (thiols) ประการที่สองคือ อัลจิเนตเจลจะสูญเสียเสถียรภาพเชิงกล เมื่อสัมผัสกับโปแทสเซียมไอออน (K^+), แมกนีเซียมไอออน (Mg^+), สารฟอสเฟต หรือ Chelating agent ที่มีความเข้มข้นสูง อย่างไรก็

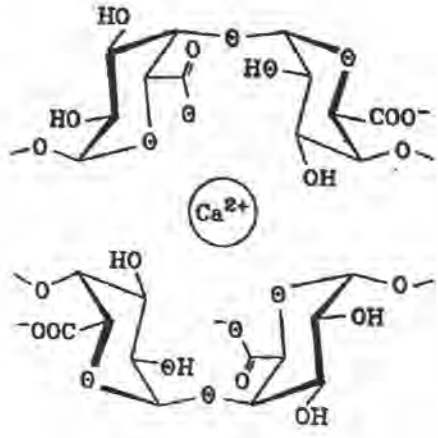
ตามวิธีการตรึงเซลล์ด้วยอัลจิเนต ก็เป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว ปลอดภัย และมีราคาไม่แพงมากนัก ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็น biocatalysts ได้อย่างกว้างขวาง

อัลจิเนต (Alginate) เป็นสารที่สกัดจากสาหร่ายทะเลสีน้ำตาล (Kelp) เช่น *Macrocystis pyrifera* เป็นต้น มีลักษณะโครงสร้างทางเคมีเป็นพอลิเมอร์ร่วม ของ β-D- manuronate (M) และ α-L- guluronate (G) โดยต่อแบบ 1-4 linked ดังรูปที่ 2.5 อัลจิเนตสามารถเกิดเจลได้ เมื่ออยู่ในสารละลายที่มีไอออนของโลหะ เช่น อะลูมิเนียมไอออน (Al^{3+}), แคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) , แบเรียมไอออน (Ba^{2+}) หรือ คอปเปอร์ไอออน (Cu^{2+}) โดยมีการแทนที่ของไอออนของสารโลหะเหล่านี้ ทำให้เกิดเป็นเจล มีโครงสร้าง 3 มิติ เรียกการเกิดเจลชนิดนี้ว่า "ไอโอโนโทรปิค"(Ionotropic gelation) ดังรูปที่ 2.6 โดยที่โครงสร้างแบบ 3 มิตินี้ค่อนข้างเฉื่อยทางด้านชีวเคมี และมีเสถียรภาพทางเชิงกล ซึ่งเหมาะสำหรับที่จะใช้ในการตรึงเซลล์ เพราะเซลล์สามารถถูกกักขังไว้ในเจลได้ภายใต้ภาวะที่ไม่รุนแรงโดยไม่ส่งผลกระทบกระเทือนต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ (Jane E. Fraser และคณะ,1997)

การตรึงเซลล์ด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ทำได้โดยการผสมเซลล์ลงในสารละลายโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 2 - 4 % (w / v) แล้วหยดลงบนสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.05-0.2 M จะเกิดเป็นเจลของแคลเซียมอัลจิเนตขึ้นทันที หลังจากนั้นควรแช่เจลที่ได้ไว้ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์อย่างน้อย 20 นาที เพื่อให้การเกิดเจล เกิดอย่างสมบูรณ์ (Bucke, 1987) สมบัติของเจลที่ได้ จะขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณของอัลจิเนตที่ใช้ นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับชนิดความเข้มข้นของไอออนโลหะ และปริมาณเซลล์ที่ใช้ด้วย (Cheethem และคณะ, 1979)



รูป 2.5 โครงสร้างทางเคมีของอัลจิเนต (ภาวิณี, 2537)



รูป 2.6 **การรวมตัวของสายโซ่โดยการเกิด** Complex Formation **กับ แคลเซียมไอออน** (Ca^{2+}) (**ภาวิณี**, 2537)

การใช้แคลเซียมอัลจิเนตในการตรึงเซลล์ มีข้อดีหลายประการ คือ สามารถทำได้ง่ายในภาวะปกติ สะดวก และรวดเร็ว ดังนั้นจึงนิยมใช้ในการตรึงเซลล์ที่มีชีวิต และการตรึงเซลล์ด้วยแคลเซียมอัลจิเนตยังเป็นวิธีที่ปลอดภัย เนื่องจากเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนตสามารถแบ่งเซลล์ได้ภายในเจล ทำให้ความสามารถในการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยามีอยู่เป็นเวลานาน แต่เซลล์บางส่วนอาจหลุดออกนอกเจล คือ มีการรั่วไหลของเซลล์ ทำให้เกิดการปนเปื้อนในผลผลิตได้ สิ่งที่มีอิทธิพลต่อการรั่วไหลของเซลล์คือ ความเข้มข้นเริ่มต้นของอัลจิเนต Mechanical treatment ของเม็ดเจล เช่น การเขย่าจะทำให้เกิดการรั่วไหลของเซลล์ได้มากกว่าการบรรจุเม็ดเจลในคอลัมน์ การลดเสถียรภาพของเม็ดแคลเซียมอัลจิเนต ทำได้โดยการแทนที่ แคลเซียมไอออนด้วย chelating agent หรือ divalent cation เช่น แมกนีเซียมไอออน (Mg^{2+}), ฟอสเฟต, citrate และ EDTA

2.6 การประยุกต์ใช้เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบฟลูอิไดซ์เบด (Fluidized bed bioreactor) ในการบำบัดน้ำเสีย

ในปัจจุบัน เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบฟลูอิไดซ์เบด เป็นเครื่องปฏิกรณ์ที่สำคัญที่มีการนำไปใช้ในงานเกี่ยวกับกระบวนการต่างๆ ทางชีวภาพกันอย่างแพร่หลาย เช่น มีการนำไปใช้ใน

อุตสาหกรรมการผลิตเอทานอล, การผลิตเบียร์, กระบวนการทางอาหารและเครื่องดื่ม, การบำบัดน้ำเสีย และการประยุกต์ใช้ในงานด้านสิ่งแวดล้อมอื่นๆ

ในระบบปฏิกิริยาที่ต่อเนื่องแล้ว เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบฟลูอิไดซ์เบดจัดได้ว่าเป็นเครื่องปฏิกรณ์ที่เหมาะสมที่สุด ในระบบนี้ไม่ต้องระมัดระวังด้านการสูญเสียและสูญสลายของเม็ดของแข็งเท่าใดนัก ขนาดของเม็ดของแข็งจะเป็นปัจจัยสำคัญของการก่อให้เกิดฟลูอิไดซ์เบดที่เรียบ ทั้งนี้เพราะระบบฟลูอิไดซ์ คือ ระบบที่ทำให้ของแข็งที่มีลักษณะเป็นเม็ดหรืออนุภาคสัมผัสกับสารละลายหรือแก๊ส ซึ่งไหลผ่านเข้ามาทางด้านล่างของคอลัมน์ด้วยความเร็วพอเหมาะค่าหนึ่งจะทำให้อนุภาคหรือเม็ดของแข็งเกิดการขยับตัวและลอยขึ้นอย่างอิสระเรียบ ไม่เกาะติดกัน ของแข็งที่อยู่ในลักษณะเช่นนี้จะมีสมบัติคล้ายของไหล คือสารละลายหรือแก๊ส ซึ่งจะไหลหมุนวนอยู่ภายในคอลัมน์หรือในเบด เรียกของแข็งในสถานะนี้ว่า " ฟลูอิไดเซชัน "

2.6.1 ประเภทของฟลูอิไดเซชัน (สมศักดิ์ ดำรงค์เลิศ, 2528)

ระบบฟลูอิไดซ์ มี 2 ประเภท คือ

1) ฟลูอิไดเซชันสองสถานะ (Two - phase Fluidization) หมายถึง ระบบฟลูอิไดซ์ที่ประกอบด้วย 2 สถานะคือ ของแข็งกับของไหล ซึ่งเป็นแก๊สหรือของเหลวอย่างใดอย่างหนึ่ง ดังนั้นจึงแบ่งย่อยออกเป็น 2 ชนิดคือ

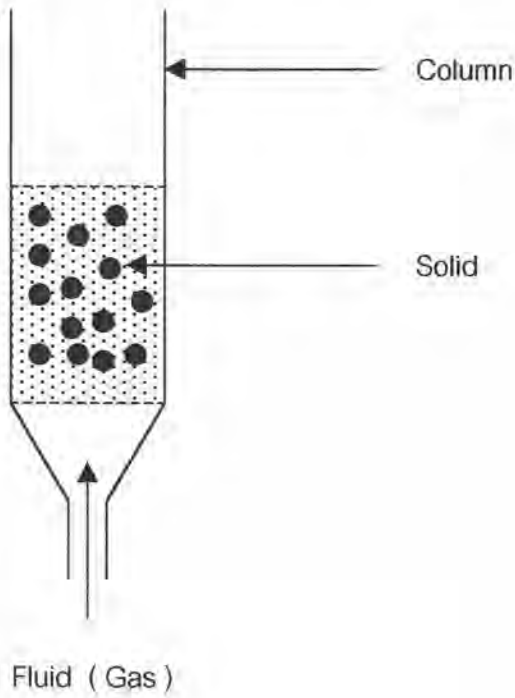
- แก๊สฟลูอิไดเซชัน (Gas Fluidization)
- ฟลูอิไดเซชันของเหลว (Liquid Fluidization)

2) ฟลูอิไดเซชันสามสถานะ (Three – phase Fluidization) หมายถึง ระบบฟลูอิไดซ์ที่ประกอบด้วย 3 สถานะ คือ ของแข็ง ของเหลว และแก๊ส ซึ่งเป็นระบบดัดแปลงมาจากระบบฟลูอิไดซ์แบบสองสถานะ

2.6.2 ลักษณะของฟลูอิไดซ์เบดสามสถานะ

เม็ดของแข็งที่อยู่ในเบดเคลื่อนที่ได้ด้วยการผ่านน้ำหรือสารละลายและอากาศไปพร้อมๆกัน อากาศเคลื่อนที่ในเบดในลักษณะเป็นฟอง ซึ่งเคลื่อนที่สู่ด้านบนของคอลัมน์ด้วยความเร็ว ขณะที่ลอยตัวนี้จะเหนี่ยวนำให้ทั้งน้ำและเม็ดของแข็งเคลื่อนที่ตามด้วย จึงเกิดการหมุน

เวียนของเม็ดของแข็งตลอดทั้งเบด ถ้าเพิ่มจำนวนฟองอากาศมาก การหมุนเวียนของเม็ดของแข็งยิ่งมีความรุนแรงเพิ่มขึ้น ระบบฟลูอิไดเซชัน 3 สถานะ แสดงดังรูป2.7



รูป 2.7 ลักษณะของฟลูอิไดเซชัน 3 สถานะ

2.6.3 ความเหมาะสมของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบฟลูอิไดซ์เบด

ข้อดีของการใช้เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบฟลูอิไดซ์เบด

1. สามารถทำงานแบบต่อเนื่องได้และการควบคุมทำได้ไม่ยาก ไม่ซับซ้อนนัก
2. มีการสูญเสียพลังงานน้อยเพราะลดแรงเสียดทานต่อการไหลและมีความดันน้อยกว่าระบบเบดบรรจุ (Packed bed)
3. เพิ่มพื้นที่สัมผัสระหว่างเม็ดของแข็งหรือกับของไหลมีมากกว่าเบดบรรจุ ที่ใช้จำนวนเม็ดของแข็งเท่ากัน จึงมีประโยชน์ในการขยายงานที่มีทั้งการถ่ายโอนความร้อนและการถ่ายโอนมวลสาร
4. เนื่องจากเม็ดของแข็งเคลื่อนที่อยู่ตลอดเวลา ทำให้เกิดการผสมกันได้อย่างรวดเร็วและสม่ำเสมอ อุณหภูมิภายในเบดจะคงที่ตลอดซึ่งต่างจากเบดอื่น

อย่างไรก็ตาม ระบบฟลูอิไดเซชันก็ยังมีข้อเสีย ทำให้เกิดข้อจำกัดของการใช้งานในระดับอุตสาหกรรมอยู่บ้าง กล่าวคือ ระยะเวลาที่ของไหลสัมผัสกับเม็ดของแข็งนั้นสั้นมาก จึงต้องใช้เบดสูงๆ หรือใช้หลายๆคอลัมน์ ซึ่งจะสิ้นเปลืองเงินลงทุนในส่วนนี้ อีกประการหนึ่งคือ ต้องมีการควบคุมที่แม่นยำ ถ้าให้ความเร็วของของไหลสูงเกินไป เม็ดของแข็งจะหลุดออกไปจากคอลัมน์พร้อมกับของไหลได้

2.6.4 การประยุกต์ใช้งานด้านการบำบัดน้ำเสีย

ตัวอย่างการนำเอาเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบฟลูอิไดซ์เบดไปใช้ในงานด้านการบำบัดน้ำเสีย แสดงดังตาราง 2.4

ตาราง 2.4 ตัวอย่างการใช้เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบฟลูอิไดซ์เบดในงานด้านการบำบัดน้ำเสีย

Treatment process	References
Treatment of pulp and paper industry wastewater in an anaerobic fluidized bed reactor	Hakulinen, R., and Mirja ,S.S., 1982
Biodegradation of dichlomethane in wastewater	R. Gälli, 1987
Three-phase biofilm fluidized sand bed reactor for aerobic wastewater treatment	Ryhiner, G.,Petrozzi, S., and Dunn, I.J., 1988
Decolorization and dechlorination of klaft bleach plant effluent using immobilized *Trametes versicolor* in urethane prepolymer	Sammaiah Pallerla and Robert P.Chambers, 1996
Biological Phenol degradation by calcium alginate gel beads entrapping microbes in three-phase fluidized bed bioreactor	Masahiro Shishido and Masayuki tocd, 1996

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Joyce และคณะ (1984) ศึกษาการลดสีของน้ำเสียจากโรงฟอกเยื่อกระดาษโดยใช้เชื้อรา *Phanerochaete chrysosporium* ในกระบวนการ Mycelial Color Removal (MyCoR) ซึ่งใช้เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบจานหมุน (Rotating Biological Contactor) พบว่าภาวะที่เหมาะสมคือที่อุณหภูมิ 40 °ซ และปรับพีเอชของน้ำเสียให้คงที่ ที่ 4.5 และมีการผ่านออกซิเจนบริสุทธิ์เข้าในเครื่องปฏิกรณ์ สามารถลดสีของน้ำเสียซึ่งสูงถึง 2,000 หน่วยสีต่อลิตรต่อวัน ได้ 70% และพบว่ายังสามารถลดค่าความต้องการออกซิเจนทางชีวเคมี (BOD) และค่าความต้องการออกซิเจนทางเคมี (COD) ได้ด้วย

Huynh และคณะ (1985) รายงานว่า เชื้อราในกลุ่ม white rot fungi คือ เชื้อรา *P. chrysosporium* สามารถย่อยสลายสารประกอบพวก Chlorinated phenol เช่น สาร2,4,6-trichlorophenol และ สาร polychlorinated guaiacols ซึ่งเป็นสารพิษที่เกิดขึ้นในกระบวนการฟอกเยื่อกระดาษด้วยสารคลอรีน กระบวนการต่างๆที่เกิดขึ้นในการย่อยสลายสารเหล่านี้ประกอบด้วย กระบวนการออกซิเดชัน (oxidation), ดีคลอริเนชัน (dechlorination) และ เมทิลเลชัน (methylation)

Mileski และคณะ (1988) ได้ทำการศึกษาทดลองการย่อยสลายทางชีวภาพของสารเพนตะคลอโรฟีนอลโดยใช้เชื้อรา *P. chrysosporium* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณสารไนโตรเจนจำกัด พบว่า เชื้อราสามารถเจริญเติบโตและย่อยสลายสารเพนตะคลอโรฟีนอล ที่มีความเข้มข้นสูงถึง 500 มิลลิกรัม / ลิตร (1.9 mM) ได้ และพบว่า ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของสารเพนตะคลอโรฟีนอลเท่ากับ 1.1 มิลลิกรัม / ลิตร (4.2 μM) สามารถย่อยสลายได้ 97 % ภายในเวลา 28 ชั่วโมง ของการบ่มเชื้อเปรียบเทียบกับที่ไม่ได้มีการเติมเชื้อ Mileski และคณะ(1988) ศึกษาภาวะการเจริญเติบโตของเชื้อที่มีผลต่อการย่อยสลายสารเพนตะคลอโรฟีนอล พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวให้เจริญเติบโตเต็มที่ก่อนจึงเติมสารเพนตะคลอโรฟีนอลลงไป อัตราการย่อยสลายสารนี้จะสูงกว่าเมื่อมีการเติมสารนี้ลงไปพร้อมกับอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อ

Valli และ Gold (1991) รายงานว่าเชื้อ *P. chrysosporium* สามารถย่อยสลายสาร Polynated phenol เช่น 2,4- dichlorophenol และ 2,4,5 – tricloropheo ได้ 50 - 60% หลังจากเลี้ยงเชื้อในอาหารแบบเหลวที่มีการจำกัดปริมาณสารไนโตรเจน เป็นเวลา 30 วัน

Lewandowski และคณะ (1990) ศึกษาและเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการย่อยสลายสาร 2-คลอโรฟีนอล ในเครื่องปฏิกรณ์แบบเบดนิ่ง (Packed-Bed Reactor) ที่มีการตรึงเซลล์ *P. chrysosporium* บน ซิลิกาเบส ซึ่งเป็นสารพาหะที่มีรูพรุนและในเครื่องปฏิกรณ์แบบผสม (Well-mixed Reactor) ที่ใช้อัลจิเนตเป็นตัวกลางในการตรึงเซลล์ เครื่องปฏิกรณ์ 2 ชนิดนี้ มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสาร 2 - คลอโรฟีนอล ที่มีความเข้มข้นสูงถึง 520 ppm. ผลของการศึกษาพบว่า การใช้เทคนิควิธีที่ 2 จะให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายดีกว่า เพราะการตรึงเซลล์จะเป็นแบบกักขัง ซึ่งมีข้อดีกว่าแบบเทคนิคที่ 1 ที่เป็นการตรึงเซลล์แบบดูดซับ การหาค่าคงที่ของอัตราการเกิดปฏิกิริยาการย่อยสลายสาร 2-คลอโรฟีนอล จะใช้สมการของ Michaelis-menten ในการอธิบายข้อมูลที่ได้จากการทดลอง Venkatadri และคณะ (1992) ศึกษาการผลิตเอนไซม์ ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (LiP) และการย่อยสลายสารเพนตะคลอโรฟีนอล ในSilicone membrane biofilm reactor เปรียบเทียบกับการทดลองในขวดทดลอง พบว่า ในเครื่องปฏิกรณ์นั้นสามารถย่อยสลายสารเพนตะคลอโรฟีนอลได้ในอัตรา 10.5 มิลลิกรัม / ลิตร / วัน และมีอัตราการย่อยสลายสารนี้สูงกว่าในขวดทดลอง ถึง 5 เท่า

Alan L. Prouty. (1990) ศึกษาจลนพลศาสตร์ของปฏิกิริยาการลดสีของน้ำทิ้งจากการฟอกเยื่อกระดาษด้วยเชื้อรา *P.chrysosporium* พบว่าอัตราการลดสีขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง ปัจจัยแรก คือ ความเข้มของสีเริ่มต้นของน้ำเสีย โดยทำการทดลองที่ความเข้มของสีเริ่มต้นตั้งแต่ 2000 – 8000 หน่วยสีต่อลิตร พบว่า อัตราการลดของสีจะสูงที่สุดที่ความเข้มของสีเริ่มต้นเท่ากับ 6000 หน่วยสีต่อลิตร, ปฏิกิริยาการลดของสีจะเป็นปฏิกิริยาอันดับหนึ่ง เมื่อความเข้มของสีเริ่มต้นมีค่าต่ำ และเป็นปฏิกิริยาอันดับศูนย์ เมื่อความเข้มเริ่มต้นของสีมีค่าสูง ซึ่งการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Campbell ในปี 1983 ส่วนปัจจัยที่สองคือ อัตราการเติมอากาศ ได้ทำการทดลองในปฏิกรณ์แบบมีการเติมอากาศ โดยมีอัตราการเติมอากาศตั้งแต่ 700 - 6000 ลบ.ซม. / นาที เพื่อหาอัตราการเติมอากาศที่เหมาะสมในการลดสี พบว่าอัตราการลดของสีจะสูงที่สุดเมื่อมีการเติมอากาศ 4500 ลบ.ซม. / นาที ซึ่งผลจากการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Reid และคณะ ในปี 1985 ที่แสดงให้เห็นว่าการย่อยสลายของลิกนินเกิดขึ้นเมื่อทำการทดลองในภาวะที่มีการกวน

Lin และคณะ (1991) ศึกษาประสิทธิภาพในการใช้เซลล์ตรึงของเชื้อรา *P.chrysosporium* ร่วมกับการใช้ถ่านกัมมันต์ (Activated carbon) ในการย่อยสลายสารเพนตะคลอโรฟีนอลเปรียบเทียบการใช้เซลล์เชื้อราที่ไม่ได้มีการตรึงเซลล์ พบว่า การใช้เซลล์ตรึงจะมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารนี้สูงกว่าการใช้เซลล์เชื้อราที่ไม่มีการตรึงเซลล์

Kling และ Neto (1991) รายงานว่า เชื้อรา *P. chrysosporium* มีความสามารถในการย่อยสลายสารประเภทสีย้อมได้ เช่น Methylene blue Gogna และคณะ (1991) ได้รายงานว่าเชื้อราชนิดนี้สามารถใช้ในการย่อยสลายทางชีวภาพแบบใช้ออกซิเจนของสีย้อม Rose Bengal (Tetrachlorotetraiodofluorescein) ได้

Sayadi และ Ellouz (1992) ศึกษาการลดสีของ Olive mill wastewater โดยใช้เชื้อรา *P. chrysosporium* พบว่าการลดลงของสีในน้ำเสียเกิดขึ้นได้ในระหว่างระยะแรกของการเจริญเติบโตของเชื้อเมื่อมีการเติมกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนให้เชื้อรา และระหว่าง Secondary metabolism ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการจำกัดปริมาณไนโตรเจน และพบว่าเมื่อมีการเติม Veratryl alcohol และเติมออกซิเจน ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูตาเมตเป็นแหล่งไนโตรเจนให้เชื้อ สามารถลดสีได้ 74 %และยังสามารถลดค่าซีโอดีได้ 80 %

Capalash และ Sharma (1992) ทำการทดลองใช้เชื้อรา *P.chrysosporium* ในการย่อยสลายทางชีวภาพของ Textile azo-dyes โดยสังเกตจากการลดลงของสี โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 5 วันแล้วเติมสีย้อมลงไป พบว่าสามารถย่อยสลายสีย้อมผ้าประเภท diazo และ Reactofix gold yellow ได้ 40 และ 73 % ตามลำดับ ในเวลา 72 ชั่วโมง

Presnell และคณะ (1992) ศึกษาการลดคลอรีนและการลดความเป็นพิษของน้ำเสียจากการฟอกเยื่อโดยใช้เชื้อ *P.chrysosporium* ภายใต้ภาวะที่มีการกวน โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อจากสปอร์ของเชื้อเป็นเวลา 4 วันในอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อที่มีการผสมน้ำทิ้งจากการฟอกเยื่อด้วย ปรับพีเอช เป็น 4.5 เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °ซ เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เมื่อครบ 4 วันแล้วเติมอาหารสำหรับเหนี่ยวนำให้เชื้อสร้างเอนไซม์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารพิษต่างๆลงไป ปรับพีเอช เป็น 4.5 ที่อุณหภูมิ 32 °ซ เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที โดยมีการเติมออกซิเจนด้วย พบว่าการลดสีสามารถเกิดขึ้นได้ภายใน 2วันหลังจากเติมอาหารสำหรับเหนี่ยวนำให้เชื้อหลั่งเอนไซม์ลงไป ซึ่งเวลาในการทำปฏิกิริยาการลดคลอรีนและการลดความเป็นพิษของน้ำทิ้งนี้คือ 2-3 วัน

Ruckenstein และ Wang (1994) ศึกษาการย่อยสลายสาร 2-คลอโรฟีนอลโดยใช้เทคนิคการตรึงเซลล์ *P. chrysosporium* บนสารพาหะพอลิสไตรีน-ไดไวนิลเบนซีนที่มีรูพรุน พบว่าการตรึงเซลล์โดยใช้สารแขวนลอยของสปอร์ของเชื้อจะให้ผลที่ดีกว่าการใช้เชื้อที่เลี้ยงไว้ 1 วันซึ่งจะอยู่ในรูปเพลเลต และมีการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการย่อยสลายสาร 2-คลอโรฟีนอล

โดยการใช้เซลล์ตรึงของเชื้อกับเซลล์อิสระที่แขวนลอยเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพในปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2 ลิตร จากการศึกษาพบว่าการใช้สารแขวนลอยของสปอร์ของเชื้อตรึงบนพอลิสไตรีน – ไดไวนิลเบนซีนที่มีรูพรุนจะมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสาร 2 – คลอโรฟีนอลได้ดีกว่าการใช้สารแขวนลอยของเซลล์อิสระเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ

Fahy และคณะ (1997) ศึกษาการลดสีของ Molasses spent wash (MSW) โดยใช้เชื้อรา *P. chrysosporium* ในระดับขวดเขย่าโดยใช้วิธีการตรึงเซลล์แบบกักขังในแคลเซียมอัลจิเนต ในอัตราส่วนเซลล์ 0.45 กรัม (น้ำหนักเซลล์แห้ง)ต่อลิตรของสารละลายโซเดียมอัลจิเนต ที่มีความเข้มข้น 2 % (w / v) พบว่า สามารถลดสีของ MSW 6.25% (v / v) ลงได้ 85% เมื่อทำการบ่มเชื้อใน MSW ที่มีกลูโคส 25 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนของเชื้อ ที่อุณหภูมิ 37°ซ เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 วัน และพบว่าการใช้เซลล์ตรึงในแคลเซียมอัลจิเนตสามารถลดสีของ MSW ได้เร็วกว่าการใช้เซลล์อิสระ