

การกำจัดซีไอที สี และความชุ่มของน้ำดำจากโรงงานเยื่อกระดาษ โดยกระบวนการ

โคแอล์กูเลชันร่วมกับราเนาขาวที่ตริงบนดินเบา



นายสุพรชัย รัตนะรัต

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR) are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม (สหสาขาวิชา)

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2559

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

COD, color and turbidity removal of Kraft pulp mill Black liquor by coagulation
combined with white rot fungi immobilized on diatomaceous earth

Mr. Supornchai Rattanarat



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Environmental Science
(Interdisciplinary Program)

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 2016

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การกำจัดซีโอดี สี และความขุ่นของน้ำดำจากโรงงานเยื่อกระดาษ โดยกระบวนการโคแอกกูเลชันร่วมกับราเนาขาวที่ตรึงบนดินเบา
โดย	นายสุพรชัย รัตนะรัต
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.สีหนาท ประสงค์สุข
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร.ณัฐยานัน พงศ์สถาปติ

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุนทร ชุตินทรานนท์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อภิชาติ อิ่มยิ้ม)
.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร.สีหนาท ประสงค์สุข)
.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร.ณัฐยานัน พงศ์สถาปติ)
.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.อรุณทัย ภิญญาคง)
.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ประไพพิศ ชัยรัตนมโนกร)

สุพรชัย รัตนะรัต : การกำจัดซีโอดี สี และความขุ่นของน้ำดำจากโรงงานเยื่อกระดาษ โดยกระบวนการโคแอกกูเลชันร่วมกับราเนาขาวที่ตรึงบนดินเบา (COD, color and turbidity removal of Kraft pulp mill Black liquor by coagulation combined with white rot fungi immobilized on diatomaceous earth) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. ดร.สีหนาท ประสงค์สุข, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ. ดร.ณัฐธยาน์ พงศ์สถาปติ, 143 หน้า.

ราเนาขาวหลายชนิดถูกสำรวจและเก็บตัวอย่างจากบริเวณต่าง ๆ ในประเทศไทย เพื่อหาสายพันธุ์ที่ให้กิจกรรมแลคแคสสูง และมีความสามารถในการทนร้อน จากตัวอย่างรา 42 ตัวอย่างที่เก็บได้จาก 12 จังหวัดในประเทศไทย สามารถแยกเส้นใยบริสุทธิ์ได้ 20 ไอโซเลต และพบว่า 19 ไอโซเลต ให้ผลบวกในการทดสอบการผลิตแลคแคสบนอาหารแข็ง ABTS เมื่อทดสอบความสามารถในการทนร้อนที่ 45 องศาเซลเซียส พบว่าราเนาขาวที่มีคุณสมบัติดังกล่าว ได้แก่ ไอโซเลต CU07 และ SM10 การทดสอบการผลิตแลคแคสในอาหารเหลวพบว่าไอโซเลต CU07 ให้กิจกรรมแลคแคสสูงสุดที่ 0.363 ± 0.12 ยูนิตต่อมิลลิลิตร หลังจากบ่ม 8 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมื่อระบุชนิดของไอโซเลต CU07 โดยอาศัยพื้นฐานของลักษณะทางสัณฐานวิทยา ร่วมกับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (ITS) สามารถจัดจำแนกชนิดได้เป็น *Trametes polyzona* ได้นำราสายพันธุ์ *T. polyzona* CU07 มาตรึงบนดินเบาและนำมาใช้ในการกำจัดซีโอดี สี และความขุ่นของน้ำดำร่วมกับกระบวนการโคแอกกูเลชันโดย ค่าซีโอดี สี และความขุ่นของน้ำดำเริ่มต้น เท่ากับ 292,216 มิลลิกรัมต่อลิตร 873,777 แพลตินัมโคบอลต์ยูนิต และ 1,330 เอ็นทียู ตามลำดับ จากการทดลองพบว่าร้อยละการกำจัดซีโอดี สี และความขุ่นมีค่าเท่ากับ 99.2 99.2 และ 70.0 ตามลำดับ เมื่อทำลายเสถียรภาพคอยลอยด์และรวมตะกอนด้วยโคโตซานและแคตไอออนพอลิอะคริลาไมด์ที่อัตราส่วนโดยน้ำหนักเท่ากับ 0.035 : 0.001 ปริมาตร 7 มิลลิลิตร ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 3.0 กวนที่ความเร็ว 140 รอบต่อนาที และใช้เวลาในการตกตะกอน 60 นาที น้ำดำที่ผ่านโคแอกกูเลชันแล้วจึงนำมาลดสีด้วยราเนาขาวที่ตรึงบนดินเบา โดยภาวะที่เหมาะสมในการตรึงราเนาขาวบนดินเบา มีสารอาหาร กลูโคสที่ ความเข้มข้นร้อยละ 3.00 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และ แอมโมเนียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.11 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่ค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นที่ 6.0 *T. polyzona* ที่ตรึงบนดินเบาสามารถใช้ซ้ำได้ 4 รอบ จากกระบวนการนี้พบว่าค่าซีโอดี สี และความขุ่นสุดท้ายมีค่า 1,467 มิลลิกรัมต่อลิตร (ร้อยละการกำจัด 99.5) 1,571 แพลตินัมโคบอลต์ยูนิต (ร้อยละการกำจัด 99.8) และ 266 เอ็นทียู (ร้อยละการกำจัด 80)

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม

ปีการศึกษา 2559

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5687216620 : MAJOR ENVIRONMENTAL SCIENCE

KEYWORDS: BLACK LIQUOR / WHITE ROT FUNGI / COAGULATION PROCESS

SUPORNCHAI RATTANARAT: COD, color and turbidity removal of Kraft pulp mill Black liquor by coagulation combined with white rot fungi immobilized on diatomaceous earth. ADVISOR: ASSOC. PROF. SEHANAT PRASONGSUK, Ph.D., CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. NATTAYA PONGSTABODEE, Ph.D., 143 pp.

A number of white rot fungi were surveyed and collected from different habitats in Thailand in order to screen for a high laccase activity with thermotolerant strain. Of 42 fungi collected from 12 provinces in Thailand, purified mycelia were successfully obtained from 20 fungal samples in which 19 of them showed positive results for laccase production using ABTS agar plate assay. Isolates CU07 and SM10 were found to be thermotolerant and CU07 showed the highest laccase activity (0.363 ± 0.12 U/mL) after incubation for 8 day, at 30°C. This isolate was identified as *Trametes polyzona* base on its morphological characteristics and Internal Transcribed Spacer (ITS) sequences. *T. polyzona* CU07 was immobilized on diatomaceous earth and applied for removal of Chemical Oxygen Demand (COD), color and turbidity of black liquor combined with coagulation process. The initial (COD), color and turbidity of black liquor were 292,216 mg/L, 873,777 Platinum-Cobalt unit, and 1330 NTU, respectively. Using coagulation, COD, color and turbidity were removed around 99.18%, 99.20% and 70% respectively, when using 7 mL mixture of chitosan and cation-polyacrylamide at weight ratio 1:1, pH was kept constant at 3 (stirred at 140 rpm for 12 min and precipitated for 60 min). The coagulated black liquor was then decolorized using immobilized *T. polyzona*. The optimal condition for its decolorization was obtained by supplementation of 3.00 w/v glucose and 0.11 w/v ammoniumchloride at pH 6.0. The immobilized *T. polyzona* could be reused up to 4 cycles. By using this process, the final COD color and turbidity were 1,467 mg/L (99.5% removal), 1,517 Pt-Co unit (99.8% removal) and 266 NTU (80%removal), respectively.

Field of Study: Environmental Science Student's Signature

Academic Year: 2016 Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี โดยการอนุเคราะห์จากหลายฝ่าย ผู้วิจัยขอกราบ
ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สีหนาท ประสงค์สุข อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ได้กรุณา
ให้คำแนะนำ คำปรึกษา และตรวจแก้ไขข้อบกพร่องด้วยความเอาใจใส่ สนับสนุนและเป็นกำลังใจ
ชี้แนะแนวทาง และช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์และถูกต้องยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ณัฐธยาน์ พงษ์สถาปติ อาจารย์ที่ปรึกษา
วิทยานิพนธ์ร่วมที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา และตรวจแก้ต้นฉบับวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องครบถ้วน

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อภิชาติ อิ่มยิ้ม ที่กรุณาเป็นประธาน
กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และตรวจแก้ไขต้นฉบับวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ รองศาสตราจารย์ ดร.
อรุณทัย ภิญญาคง ที่กรุณาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และตรวจแก้ไขต้นฉบับวิทยานิพนธ์ให้
สมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ประไพพิศ ชัยรัตน์มโนกร ที่กรุณาเป็น
กรรมการ (ผู้ทรงคุณวุฒิจากภายนอก) และตรวจแก้ไขต้นฉบับวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์

ขอขอบคุณบริษัท ดับเบิลเอจังก์ต จังหวัดปราจีนบุรี ที่ให้ความอนุเคราะห์น้ำดำ
ในงานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ หลักสูตรสหสาขาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม บัณฑิตวิทยาลัย
หน่วยปฏิบัติการใช้ประโยชน์จากชีวมวลพืช ภาควิชาพฤกษศาสตร์ ห้องปฏิบัติการการ NON
WASTE ภาควิชาเคมีเทคนิค คณะวิทยาศาสตร์ และ ห้องปฏิบัติการบัณฑิตศึกษา ภาควิชา
วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบคุณ สมาชิกในหน่วยปฏิบัติการใช้ประโยชน์จากชีวมวลพืช บุคลากรใน
หลักสูตรสหสาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม และภาควิชาพฤกษศาสตร์ ทุกท่าน

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบระลึกถึงพระคุณบิดามารดา ผู้วางรากฐานให้โอกาส
ทางการศึกษา และให้การสนับสนุน ช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจที่ดีเสมอมา จนกระทั่ง
วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญรูป	ฑ
สารบัญตาราง.....	ถ
บทที่ 1	21
บทนำ.....	21
1.1 ความเป็นมา และความสำคัญของปัญหา	21
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	22
1.3 สมมติฐานการวิจัย	22
1.4 ขอบเขตงานวิจัย.....	23
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	23
บทที่ 2	24
เอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	24
2.1 อุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษ.....	24
2.1.1 วัตถุดิบในการผลิตเยื่อกระดาษ	24
2.1.1.1 ไม้ล้มลุก (Nonwood).....	24
2.1.1.2 ไม้ยืนต้น (Wood).....	24
2.1.2 องค์ประกอบทางเคมีของเส้นใย.....	25
2.1.3 การผลิตเยื่อกระดาษ.....	26
2.1.3.1 การผลิตเยื่อเชิงกล.....	26

2.1.3.2 การผลิตเยื่อกึ่งเคมี.....	27
2.1.3.3 การผลิตเยื่อเคมี.....	27
2.1.4 การเตรียมน้ำเยื่อ.....	28
2.1.5 การผลิตกระดาษ (paper making).....	29
2.2 น้ำดำ (Black liquor)	29
2.3 ลิกนิน.....	33
2.3.1 กระบวนการสังเคราะห์ลิกนิน.....	34
2.4 ราเนาขาว.....	35
2.4.1 ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (lignin peroxidase: E.C 1.11.1.14).....	36
2.4.2 แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (Manganese peroxidase: E.C. 1.11.1.7).....	37
2.4.3 แลคแคส (laccase: E.C 1.10.3.2).....	38
2.4.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินของราเนาขาว.....	39
2.4.4.1 สารอาหาร.....	39
2.4.4.2 ไอออนของโลหะ.....	39
2.5 กระบวนการโคแอกกูเลชัน.....	40
2.5.1 อนุภาคคอลลอยด์.....	40
2.5.2.1 กลไกลดความหนาของชั้นกระจาย (Diffuse Layer).....	41
2.5.3 โคแอกกูแลนต์ (Coagulant).....	44
2.5.4 โคแอกกูแลนต์เฮด (Coagulant aid).....	44
2.6 ดินเบา.....	45
2.6.1 กำเนิดดินเบา.....	45
2.6.2 สมบัติทางฟิสิกส์ดินเบา.....	46
2.6.3 สมบัติทางเคมีของดินเบา.....	46

2.6.4 ประโยชน์ของดินเบา (ชฎาภรณ์ บุญแท้, 2545).....	46
2.6.5 แหล่งแร่.....	47
2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	48
บทที่ 3	51
วิธีการดำเนินงานวิจัย	51
3.1 สารเคมี เครื่องมือ และวัสดุอุปกรณ์.....	51
3.1.1 วัสดุดิบ	51
3.1.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	51
3.1.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย	52
3.2 วิธีดำเนินงานวิจัย	54
3.2.1 การเก็บตัวอย่างและ การแยกเส้นใยให้บริสุทธิ์ และการจัดจำแนกเห็ดกลุ่มราเนา ชาวจากจังหวัดต่างๆในประเทศไทย	54
3.2.1.1 การเก็บตัวอย่างเห็ด.....	54
3.2.1.2 การแยกเส้นใยเห็ดให้บริสุทธิ์	54
3.2.2 การตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์แลคแคสในอาหารแข็ง และอาหาร เหลว และความสามารถในการทนร้อน	54
3.2.2.1 การตรวจสอบความสามารถในการผลิตแลคแคสบนอาหารแข็ง	54
3.2.2.2 การตรวจสอบความสามารถในการทนอุณหภูมิสูง.....	55
3.2.2.3 การตรวจสอบความสามารถการผลิตแลคแคสในอาหารเหลว	55
3.2.3 การจัดจำแนกเห็ด	55
3.2.3.1 การจัดจำแนกเห็ดโดยวิธีการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา.....	55
3.2.3.2 การจัดจำแนกโดยอาศัยวิธีทางชีววิทยาระดับโมเลกุล	56
3.2.4 การตรวจวิเคราะห์คุณสมบัติน้ำดำ	58
3.2.5 การปรับสภาพน้ำดำโดยกระบวนการโคแอล์กูเลชัน	59

3.2.5.1 ค่าความเป็นกรด-ด่าง.....	59
3.2.5.2 ชนิดและความเข้มข้นของสารโคแอกูแลนต์	59
3.2.5.3 อัตราส่วนโดย น้ำหนักระหว่างโคโตะแซนกับแคตไอออนพอลิอะคริลาไมด์	59
3.2.5.4 ความเร็วในการกวนผสม.....	60
3.2.5.5 เวลาในการกวนผสม	60
3.2.5.6 เวลาในการตกตะกอน.....	60
3.2.6 การปรับสภาพน้ำดำที่ผ่านกระบวนการโคแอกูเลชันโดยราเนาขาวที่ตรึงบนดิน เบา.....	61
3.2.6.1 การตรึงราเนาขาว.....	61
3.2.6.2 ศึกษาภาวะเหมาะสมในการปรับสภาพน้ำดำที่ผ่านกระบวนการโคแอกู เลชันโดยราเนาขาวที่ตรึงบนดินเบา.....	61
บทที่ 4	64
ผลการวิจัย	64
4.1 การเก็บตัวอย่างราเนาขาวในประเทศไทย และการแยกเส้นใยให้บริสุทธิ์	64
4.2 การตรวจสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์แลคแคสบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง และใน อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวและการตรวจสอบความสามารถในการเจริญเติบโตที่อุณหภูมิสูง	65
4.2.1 การตรวจสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์แลคแคส บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง	65
4.2.2 การตรวจสอบความสามารถในการทนร้อนของราเนาขาว.....	67
4.2.3 การตรวจสอบการผลิตแลคแคสในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว.....	69
4.3 การจัดจำแนกราเนาขาว	69
4.3.1 การจัดจำแนกราเนาขาวโดยการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา.....	69
4.3.2 การจัดจำแนกราเนาขาวโดยวิธีทางชีววิทยาโมเลกุล	71
4.4 การตรวจสอบคุณสมบัติน้ำดำเริ่มต้น.....	71
4.5 กระบวนการปรับสภาพน้ำดำโดยกระบวนการตกตะกอน.....	72

4.6 การรวมตะกอนโดยกระบวนการโคแอกกูเลชัน	73
4.6.1 ปริมาตรโคแอกกูเลนท์ที่ใช้ในกระบวนการโคแอกกูเลชัน	73
4.6.2 อัตราส่วนที่เหมาะสมของโคแอกกูเลนท์ที่ใช้ในกระบวนการโคแอกกูเลชันน้ำดำ	76
4.6.3 ความเร็วรอบในการกวนผสม	77
4.6.4 เวลาในการกวนผสม	79
4.6.7 เวลาในการตกตะกอน	80
4.7 การกำจัดซีโอดี ซี และความขุ่นของน้ำดำที่ผ่านกระบวนการโคแอกกูเลชันร่วมกับราเนา ชาวบดินเบา	82
4.7.1 ลักษณะเซลล์ตรึงราเนาขาว	82
4.7.2 ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการกำจัดซีโอดี ซี และความขุ่นของน้ำดำที่ผ่าน กระบวนการโคแอกกูเลชันร่วมกับราเนาขาวที่ตรึงบนดินเบา	82
4.7.3 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งสารอาหาร	94
4.8. การใช้ราเนาขาวที่ตรึงบนดินเบาเพื่อกำจัดซีโอดี ซี และความขุ่นในรูปแบบการใช้เซลล์ซ้ำ ในระดับขวดเขย่า	98
4.9 สมบัติน้ำดำหลังผ่านกระบวนการ กำจัดซีโอดี ซี และความขุ่นด้วยกระบวนการโคแอกกูเล ชันร่วมกับราเนาขาวที่ตรึงบนดินเบา	100
บทที่ 5	102
การอภิปรายผลการวิจัย	102
5.1 การคัดแยก การคัดเลือกราเนาขาวและการระบุสายพันธุ์	102
5.1.1 การเก็บตัวอย่างราเนาขาว การแยกเส้นใยราเนาขาวให้บริสุทธิ์และการตรวจสอบ ความสามารถในการสร้างลิกนินไลติกเอนไซม์บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง	102
5.1.2 การศึกษาความสามารถในการเจริญเติบโตที่อุณหภูมิสูงของราเนาขาว และการวัด แอกติวิตีของเอนไซม์เชิงปริมาณ	103
5.1.3 การระบุสายพันธุ์ราเนาขาว	103

5.2 การตรวจวัดคุณสมบัติน้ำดำเบื้องต้น	104
5.3 การปรับสภาพน้ำดำโดยกระบวนการโคแอกกูเลชัน	104
5.3.1 กระบวนการปรับสภาพน้ำดำโดยการตกตะกอนด้วยกรดซัลฟิวริก	104
5.3.2 การรวมตะกอนโดยกระบวนการโคแอกกูเลชัน	105
5.3.2.1 ปริมาตรสารละลายโคโคซานและปริมาตรสารแคตไอออนพอลิอะคริลาไมด์ .	105
5.3.2.2 อัตราส่วนที่เหมาะสมของสารละลายโคโคซานต่อสารละลายแคตไอออนพอลิอะคริลาไมด์	106
5.3.2.3 ความเร็วในการกวนผสม	107
5.3.2.4 เวลาในการกวนผสม	108
5.3.2.5 เวลาในการตกตะกอน	108
5.4 ศึกษาการลดซีโอดี สี และความขุ่นโดยใช้ราเนาขาวที่ตรึงบนดินเบา	109
5.4.1 การเตรียมราเนาขาวบนดินเบา	109
5.4.2 การศึกษาระดับค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสม	109
5.4.3 การศึกษาแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม	110
5.4.4 ศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม	112
5.4.5 การศึกษาการลดซีโอดี สี และความขุ่น โดยใช้ราเนาขาวที่ตรึงบนดินเบาในรูปแบบการใช้เซลล์ซ้ำ	113
5.4.6 กลไกกระบวนการกำจัดซีโอดี สี และความขุ่นโดยใช้ราเนาขาวที่ตรึงบนดินเบา	114
บทที่ 6	117
สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ	117
ข้อเสนอแนะ	118
รายการอ้างอิง	120
ภาคผนวก ก	129
ภาคผนวก ข	131

ภาคผนวก ค.....	132
ภาคผนวก ง.....	134
ภาคผนวก จ.....	135
ภาคผนวก ฉ.....	138
ภาคผนวก ช.....	140
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	143



สารบัญรูป

รูปที่ 1	สารประกอบต่างๆ ในเนื้อไม้ (บุรพากรูป,2559).....	26
รูปที่ 2	โครงสร้างของลิกนิน (Mohan และคณะ, 2006).....	34
รูปที่ 3	โครงสร้างของ สารตั้งต้นของลิกนิน (Wong, 2009).....	35
รูปที่ 4	ราเนาขาวที่พบได้ทั่วไป (Bhosle และคณะ, 2010, Tian และคณะ, 2013)	36
รูปที่ 5	กลไกการทำงานของลิกนินเปอร์ออกซิเดส (Marco-Urrea และReddy, 2012).....	37
รูปที่ 6	กลไกการเกิดปฏิกิริยาของแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (Balan และMonteiro, 2001)	37
รูปที่ 7	กลไกการทำงานของเอนไซม์แลคแคส (a) ไม่ใช้สารตัวกลาง (b) ใช้สารตัวกลาง (Kunamneni และคณะ, 2008).....	38
รูปที่ 8	การจำแนกขนาดของสารต่างๆในน้ำ (Benefied, Judkinsand และ Weand,1982)	41
รูปที่ 9	กลไกของการทำลายของคอลลอยด์แบบต่อเชื่อมด้วยพอลิเมอร์ (Faust, S.D. and Aly 1983).....	43
รูปที่ 10	ลักษณะของดินเบา (Michen และคณะ, 2011).....	45
รูปที่ 11	วงสีเขียวของราเนาขาวที่คัดแยกเส้นใยบริสุทธิ์ได้.....	66
รูปที่ 12	แอกติวิตีของแลคแคส ของราเนาขาวไอโซเลต CU07 และไอโซเลต SM10 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร GYP medium เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที โดยเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน ที่อุณหภูมิ 27±3 องศาเซลเซียส	69
รูปที่ 13	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราเนาขาว Trametes polyzona CU07	70
รูปที่ 14	ลักษณะของน้ำดำที่มาจากกระบวนการต้มเยื่อแบบต่อเนื่อง	71
รูปที่ 15	ร้อยละการกำจัดซีโอที สี และความขุ่น ของน้ำดำโดยกระบวนการตกตะกอนโดยกรดซัลฟูริกเข้มข้นและปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที	73
รูปที่ 16	ร้อยละการกำจัดซีโอทีและสีของน้ำดำต่อผลของปริมาณสารละลายโคโคซาน ที่ความเร็วในการกวน 140 รอบต่อนาที ระยะเวลาในการกวน 2 นาที และทิ้งให้ตกตะกอนอย่างสมบูรณ์ ค่าเฉลี่ยเบี่ยงเบนมาตรฐานไม่เกิน 0.05	74

รูปที่ 17 ร้อยละการกำจัดความขุ่น ของน้ำดำต่อผลของปริมาณสารละลายโคโตซาน ที่ความเร็วในการกวน 140 รอบต่อนาที ระยะเวลาในการกวน 2 นาที และทิ้งให้ตกตะกอนอย่างสมบูรณ์....	74
รูปที่ 18 ร้อยละการกำจัดซีโอที สี ของน้ำดำต่อผลของสารช่วยสร้างตะกอนกลุ่ม แคตไอออนพอลิอะคริลาไมด์ ที่ความเร็วในการกวน 140 รอบต่อนาที ระยะเวลาในการกวน 2 นาที และทิ้งให้ตกตะกอนอย่างสมบูรณ์ ค่าเฉลี่ยเบี่ยงเบนมาตรฐานไม่เกิน 0.05	75
รูปที่ 19 ร้อยละการกำจัดความขุ่น ของน้ำดำต่อผลของสารช่วยสร้างตะกอนกลุ่มแคตไอออนพอลิอะคริลาไมด์ ที่ความเร็วในการกวน 140 รอบต่อนาที ระยะเวลาในการกวน 2 นาที และทิ้งให้ตกตะกอนอย่างสมบูรณ์	75
รูปที่ 20 ร้อยละการกำจัดซีโอทีและสี ของน้ำดำ ต่อผลของอัตราส่วนกรัมโคโตซานต่อกรัม แคตไอออน-พอลิอะคริลาไมด์ โดยใช้ความเร็วในการกวน 140 รอบต่อนาที ระยะเวลาในการกวน 2 นาที และทิ้งให้ตกตะกอนอย่างสมบูรณ์ ค่าเฉลี่ยเบี่ยงเบนมาตรฐานไม่เกิน 0.05.....	76
รูปที่ 21 ร้อยละการกำจัดความขุ่นของน้ำดำ ต่อผลของอัตราส่วนกรัมโคโตซาน ต่อ กรัมแคตไอออนพอลิอะคริลาไมด์ โดยใช้ความเร็วในการกวน 140 รอบต่อนาที ระยะเวลาในการกวน 2 นาที และทิ้ง ให้ตกตะกอนอย่างสมบูรณ์	77
รูปที่ 22 ร้อยละการกำจัดซีโอทีและสี ของน้ำดำต่อความเร็วรอบในการกวนผสม โดยใช้สารละลาย โคแอ็คกูแลนต์ ปริมาตร 7 มิลลิลิตร ระยะเวลาในการกวน 2 นาที และทิ้งให้ตกตะกอนอย่างสมบูรณ์ค่าเฉลี่ยเบี่ยงเบนมาตรฐานไม่เกิน 0.05.....	78
รูปที่ 23 ร้อยละการกำจัดความขุ่นของน้ำดำ ต่อความเร็วรอบในการกวนผสม โดยใช้สารละลาย โคแอ็คกูแลนต์ ปริมาตร 7 มิลลิลิตร ระยะเวลาในการกวน 2 นาที และทิ้งให้ตกตะกอนอย่างสมบูรณ์.....	78
รูปที่ 24 ร้อยละการกำจัดซีโอทีและสีของน้ำดำ ต่อระยะเวลาในการกวนผสม โดยใช้สารละลาย โคแอ็คกูแลนต์ปริมาตร 7 มิลลิลิตร ระยะเวลาในการกวน 2 นาที และทิ้งให้ตกตะกอนอย่างสมบูรณ์.....	79
รูปที่ 25 ร้อยละการกำจัดความขุ่นของน้ำดำ ต่อระยะเวลาในการกวนผสมในการกวน ผสม โดยใช้สารละลายโคแอ็คกูแลนต์ ปริมาตร 7 มิลลิลิตร ระยะเวลาในการกวน 2 นาที และทิ้งให้ตกตะกอนอย่างสมบูรณ์	80

รูปที่ 26 ร้อยละการกำจัดซีโอดีและสี ของน้ำดำต่อระยะเวลาในการตกตะกอน โดยใช้สารละลายโคแอล์คูแลนท์ปริมาตร 7 มิลลิลิตร ความเร็วรอบในการกวน 140 รอบต่อนาที ระยะเวลาในการกวน 2 นาที และทิ้งให้ตกตะกอนอย่างสมบูรณ์ ค่าเฉลี่ยเบี่ยงเบนมาตรฐานไม่เกิน 0.05..... 81

รูปที่ 27 ร้อยละการกำจัดความขุ่นของน้ำดำ ต่อระยะเวลาในการตกตะกอน โดยใช้สารละลายโคแอล์คูแลนท์ปริมาตร 7 มิลลิลิตร ความเร็วรอบในการกวน 140 รอบต่อนาที ระยะเวลาในการกวน 2 นาที และทิ้งให้ตกตะกอนอย่างสมบูรณ์..... 81

รูปที่ 28 (ก-ข) ลักษณะเส้นใยของราเนา..... 82

รูปที่ 29 กราฟแสดงผลของร้อยละการกำจัดสีของ *T. polyzona* CU07 ที่ตรึงบนดินเบาเมื่อเติมอาหาร กลูโคส 1% (น้ำหนักต่อปริมาตร) และ แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.12% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ต่อสภาวะค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นต่างๆ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานไม่เกิน 0.005 ตัวอักษรที่ต่างกันในการแสดงถึงให้เห็นค่าความแตกต่างของนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$)..... 83

รูปที่ 30 กราฟแสดงผลของร้อยละการกำจัดซีโอดีของ *T. polyzona* CU07 ที่ตรึงบนดินเบาเมื่อเติมอาหาร กลูโคส 1% (น้ำหนักต่อปริมาตร) และแอมโมเนียมคลอไรด์ 0.12% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ต่อสภาวะค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นต่างๆตัวอักษรที่ต่างกันในการแสดงถึงให้เห็นค่าความแตกต่างของนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$)..... 84

รูปที่ 31 กราฟแสดงผลของร้อยละการกำจัดความขุ่นของ *T. polyzona* CU07 ที่ตรึงบนดินเบาเมื่อเติมอาหาร กลูโคส 1% (น้ำหนักต่อปริมาตร) และแอมโมเนียมคลอไรด์ 0.12% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ต่อสภาวะค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นต่างๆ ตัวอักษรที่ต่างกันในการแสดงถึงให้เห็นค่าความแตกต่างของนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$)..... 84

รูปที่ 32 ผลของร้อยละการกำจัดสีต่อแหล่งสารอาหารไนโตรเจนประเภทต่างๆ โดยใช้ราเนาขาว *T. polyzona* CU07 โดยใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสที่ความเข้มข้น 1% (น้ำหนักต่อปริมาตร) และแหล่งไนโตรเจนต่างๆ ที่ความเข้มข้น 0.12 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) ตัวอักษรที่ต่างกันในการแสดงถึงให้เห็นค่าความแตกต่างของนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$)..... 88

รูปที่ 33 ผลของร้อยละการกำจัดซีโอดีแหล่งสารอาหารไนโตรเจนประเภทต่างๆ โดยใช้ราเน่าขาว <i>T. polyzona</i> CU07 โดยใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสที่ความเข้มข้น 1% (น้ำหนักต่อปริมาตร) และแหล่งไนโตรเจนต่างๆ ที่ความเข้มข้น 0.12 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) ตัวอักษรที่ต่างกันในกราฟแสดงถึงให้เห็นค่าความแตกต่างของนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$).....	88
รูปที่ 34 ผลของร้อยละการกำจัดความขุ่นแหล่งสารอาหารไนโตรเจนประเภทต่างๆ โดยใช้ราเน่าขาว <i>T. polyzona</i> CU07 โดยใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสที่ความเข้มข้น 1% (น้ำหนักต่อปริมาตร) และแหล่งไนโตรเจนต่างๆ ที่ความเข้มข้น 0.12 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) ตัวอักษรที่ต่างกันในกราฟแสดงถึงให้เห็นค่าความแตกต่างของนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$).....	89
รูปที่ 35 ผลของร้อยละการกำจัดสีต่อแหล่งสารอาหารไนโตรเจนประเภทต่างๆ โดยใช้ราเน่าขาว <i>T. polyzona</i> CU07 โดยใช้แหล่งคาร์บอนเป็นซูโครสที่ความเข้มข้น 1% น้ำหนักต่อปริมาตร ตัวอักษรที่ต่างกันในกราฟแสดงถึงให้เห็นค่าความแตกต่างของนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$).....	90
รูปที่ 36 ผลของร้อยละการกำจัดซีโอดีต่อแหล่งสารอาหารไนโตรเจนประเภทต่างๆ โดยใช้ ราเน่าขาว <i>T. polyzona</i> CU07 โดยใช้แหล่งคาร์บอนเป็นซูโครสที่ความเข้มข้น 1% น้ำหนักต่อปริมาตรตัวอักษรที่ต่างกันในกราฟแสดงถึงให้เห็นค่าความแตกต่างของนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$)	90
รูปที่ 37 ผลของร้อยละการกำจัดความขุ่นต่อแหล่งสารอาหารไนโตรเจนประเภทต่างๆ โดยใช้ ราเน่าขาว <i>T. polyzona</i> CU07 โดยใช้แหล่งคาร์บอนเป็นซูโครสที่ความเข้มข้น 1% น้ำหนักต่อปริมาตร ตัวอักษรที่ต่างกันในกราฟแสดงถึงให้เห็นค่าความแตกต่างของนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$).....	91
รูปที่ 38 พื้นผิวตอบสนองสามมิติแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นแหล่งคาร์บอน (กลูโคส) และความเข้มข้นแหล่งไนโตรเจน (แอมโมเนียมคลอไรด์) ต่อร้อยละการกำจัดสีที่เกิดขึ้น... 95	
รูปที่ 39 พื้นผิวตอบสนองสามมิติแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นแหล่งคาร์บอน (กลูโคส) และความเข้มข้นแหล่งไนโตรเจน (แอมโมเนียมคลอไรด์) ต่อร้อยละการกำจัดซีโอดีที่เกิดขึ้น.....	97
รูปที่ 40 ผลการใช้ราเน่าขาว <i>T. polyzona</i> CU07 ที่ตรึงบนดินเบาเพื่อกำจัดสีในน้ำดำในรูปแบบการใช้เซลล์ซ้ำ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานไม่เกิน 0.05	98

รูปที่ 41 ผลการใช้ราเน่าขาว <i>T. polyzona</i> CU07 ที่ตรึงบนดินเบาเพื่อกำจัดซีโอทีในน้ำดำใน รูปแบบการใช้เซลล์ซ้ำ	99
รูปที่ 42 ผลการใช้ราเน่าขาว <i>T. polyzona</i> CU07 ที่ตรึงบนดินเบาเพื่อกำจัดความขุ่นในน้ำดำ ในรูปแบบการใช้เซลล์ซ้ำ	99
รูปที่ 43 รูปแสดงลักษณะของน้ำดำก่อนและหลังกระบวนการบำบัด	101



สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 องค์ประกอบโดยเฉลี่ยของน้ำดำ (Naqvi และคณะ, 2010, Sjöström และ Westermark, 1999).....	30
ตารางที่ 2 ปริมาณที่แตกต่างของสารพิษจากกระบวนการในการผลิตเยื่อ และกระดาษ	32
ตารางที่ 3 แสดงผลการวิเคราะห์ทางเคมีของดินเบาจากแหล่งแร่ต่างๆ.....	46
ตารางที่ 4 ปริมาณของสารแต่ละชนิดที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR.....	57
ตารางที่ 5 ปฏิกิริยาที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยการทำปฏิกิริยาด้วยเทคนิค PCR	57
ตารางที่ 6 จังหวัดที่เก็บตัวอย่างราเนาขาวในประเทศไทย	64
ตารางที่ 7 ความสามารถของราเนาขาวทั้งสิ้น 20 ไอโซเลตในการสร้างแลคแคส เมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร LMB ที่มีการเติม ABTS ความเข้มข้น 0.001 มิลลิกรัม ที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เป็นเวลา 7 วัน.....	65
ตารางที่ 8 ความสามารถในการเจริญของราเนาขาวที่อุณหภูมิต่างๆ	68
ตารางที่ 9 สมบัติทางกายภาพของน้ำดำที่ได้จากกระบวนการต้มเยื่อแบบคราฟต์.....	72
ตารางที่ 10 เปรียบเทียบการย่อยสลายการกำจัดซีโอดี สี และความชุ่มชื้น วันที่ 4 ของการศึกษา.....	85
ตารางที่ 11 แอคติวิตีของเอนไซม์แลคแคสภายในน้ำดำที่ผ่านกระบวนการกำจัดซีโอดี สี และความชุ่มชื้นในการสภาวะค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสม	86
ตารางที่ 12 เปรียบเทียบร้อยละการกำจัดซีโอดี สีและความชุ่มชื้นของแหล่งไนโตรเจนความเข้มข้นร้อยละ 0.12 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ประเภทเปปโตเนและแอมโมเนียมคลอไรด์ เมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร).....	92
ตารางที่ 13 แอคติวิตีแลคแคสในน้ำดำภายหลังกระบวนการลดสีในขั้นตอนการหาแหล่งสารอาหารที่เหมาะสม	93
ตารางที่ 14 แผนการทดลองแบบ Central composite design (CCD) และผลการตอบสนองต่อ ร้อยละการกำจัดสีต่อปัจจัยที่ศึกษา คือ ความเข้มข้นของกลูโคส และ ความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์	95

ตารางที่ 15 แผนการทดลองแบบ Central composite design (CCD) และผลการตอบสนอง
ต่อร้อยละการกำจัดซีโอดีต่อปัจจัยที่ศึกษา คือ ความเข้มข้นของกลูโคส และ ความเข้มข้น
ของแอมโมเนียมคลอไรด์ 97

ตารางที่ 16 แอคติวิตีแลคแคสของราเนาขาวในแต่ละรอบการใช้เซลล์ซ้ำ 99

ตารางที่ 17 ร้อยละการกำจัดซีโอดี สี และความขุ่นเมื่อกำจัดด้วยขั้นตอนต่าง ๆ 100



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมา และความสำคัญของปัญหา

อุตสาหกรรมเยื่อและอุตสาหกรรมกระดาษเป็นอุตสาหกรรมที่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องเนื่องจากกระดาษเป็นวัตถุดิบหลักที่ถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอื่นๆ ได้แก่ อุตสาหกรรมการผลิตเยื่อกระดาษรีไซเคิล อุตสาหกรรมการผลิตกระดาษ อุตสาหกรรมการผลิตสิ่งพิมพ์ และอุตสาหกรรมบรรจุภัณฑ์ เป็นต้น ปัจจุบันประเทศไทยมีการผลิตเชื่อมโยงอย่างครบวงจรตั้งแต่ อุตสาหกรรมต้นน้ำ อุตสาหกรรมกลางน้ำและอุตสาหกรรมปลายน้ำ ดังนั้นอุตสาหกรรมการผลิตเยื่อจึงมีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมหลายชนิด ในปี พ.ศ. 2554 พบว่า อุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษมีอัตราการขยายตัวเพิ่มขึ้นร้อยละ 5 ถึง 7 และในปี พ.ศ. 2558 มีแนวโน้มการผลิตเยื่อและกระดาษมีเพิ่มขึ้นร้อยละ 9.77 (กระทรวงอุตสาหกรรม., 2558.)

สำหรับการผลิตเยื่อเพื่อการผลิตกระดาษ 1,000 กิโลกรัม ต้องผ่านกระบวนการทางเคมีและทางกายภาพ โดยใช้น้ำประมาณ 40–60 ลูกบาศก์เมตรในกระบวนการผลิต ซึ่งจะเห็นว่าอุตสาหกรรมเยื่อจะมีการปล่อยน้ำทิ้งออกมาเป็นปริมาณมาก สำหรับกระบวนการผลิตเยื่อมีการผลิตอยู่หลายกระบวนการ เช่น กระบวนการผลิตเยื่อแบบโซดา กระบวนการผลิตเยื่อแบบคราฟต์ กระบวนการผลิตเยื่อแบบซัลไฟต์โดยกระบวนการผลิตเยื่อกระดาษแบบคราฟต์ เป็นกรรมวิธีที่นิยมใช้อย่างแพร่หลายเนื่องจากสารเคมีที่ใช้ในกระบวนการต้มเยื่อเป็นสารกลุ่ม สารละลายอัลลาไคน์ และสารประกอบซัลไฟต์ ซึ่งเป็นสารที่มีราคาถูก (Sixta และSchild, 2009) และมีประสิทธิภาพในการทำลายโครงสร้างเยื่อไม้ เพื่อแยกลิกนินออกจากเซลลูโลส โดยน้ำในกระบวนการผลิตน้ำเมื่อสิ้นสุดก่อให้เกิด น้ำดำ (Black liquor) ซึ่งมีส่วนประกอบที่สำคัญคือ ลิกนิน โซเดียมไฮดรอกไซด์ โซเดียมซัลไฟต์ (Stigsson และBernard, 1998) โดยทั่วไปน้ำดำจะถูกเข้าสู่ระบบกู้คืนสารเคมีซึ่งเป็นระบบที่มีความซับซ้อน ทำให้ผู้ประกอบขนาดเล็กและขนาดกลางไม่สามารถติดตั้งระบบดังกล่าวจึงทำให้น้ำดำถูกปล่อยร่วมกับน้ำทิ้งจากส่วนอื่นๆของโรงงานก่อนเข้าสู่ระบบบำบัดน้ำเสีย โดยระบบบำบัดน้ำเสียจะไม่สามารถกำจัดลิกนินได้ ทำให้น้ำที่ปล่อยออกมามีค่าซีไอดีและสีที่สูงซึ่งจะส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมทางน้ำได้

องค์ประกอบหลักของน้ำดำคือลิกนิน โดยลิกนินเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของชีวมวลพืช มีโครงสร้างที่ซับซ้อน โมลโมเลกุลสูง มีโครงสร้างหลักประกอบด้วย phenylpropane และวง aromatic ทั้งนี้ราเนาขาวเป็นกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่สามารถย่อยสลายองค์ประกอบของชีวมวลพืชได้

โดยเฉพาะลิกนิน โดยพบว่าราเนาขาวหลายชนิดที่สามารถย่อยสลายลิกนินในน้ำดำได้ โดยอาศัยปฏิกิริยาของเอนไซม์กลุ่ม Extracellular oxidative (Lara และคณะ, 2003) และในประเทศไทยจัดเป็นประเทศที่อยู่ในเขตร้อน ซึ่งมีอุณหภูมิตั้งแต่ 27–40 องศาเซลเซียส เหมาะแก่การเจริญเติบโตของราเนาขาว ราเนาขาวหลายชนิดในประเทศไทยยังไม่มีการศึกษาถึงการนำไปใช้ประโยชน์ทางเทคโนโลยีชีวภาพและการศึกษาอนุกรมวิธาน โดยการนำคุณสมบัติของราเนาขาว มาประยุกต์ใช้กับงานวิจัยทางสิ่งแวดล้อม อาทิเช่นระบบบำบัดน้ำเสียจากโรงงานเยื่อกระดาษที่มีน้ำดำปนเปื้อน

กระบวนการบำบัดน้ำเสียในอุตสาหกรรมประกอบด้วย 3 กระบวนการหลัก ได้แก่ กระบวนการทางกายภาพ (การกรอง การดูดซับ การทำกำจัดตะกอนหนัก การกำจัดน้ำมัน และไขมัน) กระบวนการทางเคมี (กระบวนการโคแอกกูเลชัน ฟลอคกูเลชัน) ซึ่งเป็นกระบวนการที่เหมาะสมในการบำบัดน้ำเสียที่ออกจากอุตสาหกรรมกระดาษ (Irfan และคณะ, 2013) และกระบวนการทางชีวภาพ (ระบบบำบัดแบบตะกอนเร่งซึ่งเป็นระบบบำบัดแบบใช้อากาศ โดยมุ่งเน้นให้จุลินทรีย์ย่อยสลายสารอินทรีย์)

โดยในแต่ละกระบวนการบำบัดล้วนมีข้อจำกัด และข้อดีที่แตกต่างกัน ดังนั้นระบบการกำจัดซีโอดี สี และความขุ่นของน้ำดำ ที่นำกระบวนการทางเคมีและกระบวนการทางชีวภาพมาประยุกต์ใช้ร่วมกันเพื่อทำให้ระบบมีประสิทธิภาพที่สูงขึ้น ดังนั้นงานวิจัยในครั้งนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาถึงวิธีการกำจัด ซีโอดี สี และความขุ่นในน้ำดำโดยกระบวนการโคแอกกูเลชันร่วมกับกระบวนการทางชีวภาพในการลดสี โดยใช้ราเนาขาวที่ตรึงอยู่บนดินเบา (diatomaceous earth)

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อคัดแยกและคัดเลือกราเนาขาวที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ย่อยลิกนินจากธรรมชาติในประเทศไทย
2. เพื่อกำจัด ซีโอดี สี และความขุ่น ของน้ำดำโดยวิธีโคแอกกูเลชันร่วมกับราเนาขาวที่ตรึงบนดินเบา

1.3 สมมติฐานการวิจัย

กระบวนการโคแอกกูเลชันร่วมกับราเนาขาวที่ตรึงบนดินเบาสามารถกำจัดค่าซีโอดี สี และความขุ่นของน้ำดำจากโรงงานเยื่อกระดาษ

1.4 ขอบเขตงานวิจัย

1.4.1 ทำลายเสถียรภาพคอลลอยด์ด้วยกระบวนการโคแอกกูเลชัน โดยจะศึกษาภายใต้อิทธิพลของตัวแปรเหล่านี้

1.4.1.1 การปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยกรดซัลฟิวริก

1.4.1.2 ชนิดของสารโคแอกกูแลนต์ (coagulant) ในงานวิจัยนี้เลือกใช้ 2 ชนิดคือ ไคโตซาน (chitosan) และแคตไอออนพอลิอะคริลาไมด์ (Cation-Polyacrylamide, PAM) โดยศึกษาปริมาณสารโคแอกกูแลนต์ในกระบวนการโคแอกกูเลชันซึ่งทดลองด้วย Jar test แล้วเลือกประสิทธิภาพของสารโคแอกกูแลนต์ที่สามารถกำจัดค่าซีโอดี สี และความขุ่นได้ดีที่สุด เพื่อบำบัดร่วมกับกระบวนการทางชีวภาพ

1.4.1.3 อัตราส่วนปริมาณระหว่างไคโตแซนและแคตไอออนพอลิอะคริลาไมด์ อยู่ในช่วง 100:1 20:1 10:1 5:1 3:1 และ 2:1 ตามลำดับ

1.4.1.4 ความเร็วในการกวน จะอยู่ในช่วง 30-160 รอบต่อนาที

1.4.1.5 ระยะเวลาในการกวน จะอยู่ในช่วง 2-20 นาที

1.4.1.6 ระยะเวลาในการตกตะกอน 20-120 นาที

1.4.2 การคัดแยกกราน่าขาว โดยใช้ราน่าขาวที่คัดแยกได้ โดยวิธีการแยกเชื้อเส้นใยบริสุทธิ์ในอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) ในจำนวนที่ไม่ต่ำกว่า 20 ไอโซเลต ทดสอบเอนไซม์แลคแคสโดยวิธี Plate screening enzyme โดยให้เกิดผลบวกจำนวนที่ไม่ต่ำกว่า 15 ไอโซเลต และทดสอบความสามารถในการเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิมากกว่า 40 องศาเซลเซียส และการผลิตเอนไซม์แลคแคสในอาหารเหลว เพื่อคัดเลือกกราน่าขาวที่ให้กิจกรรมเอนไซม์แลคแคส และสามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่ร้อน

1.4.2.1 ศึกษาค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อน้ำดำในช่วง 3-7

1.4.2.2 ศึกษาแหล่งคาร์บอนเช่น กลูโคส ซูโครส และแหล่งไนโตรเจน เช่น แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมซัลเฟต เปปโตน ยูเรีย โดยออกแบบการทดลองเป็นแบบ Factorial design (FD)

1.4.2.3 ศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนโดยวิธีการศึกษาพื้นผิวตอบสนอง Response Surface Methodology (RSM) แบบ central composite design (CCD) โดยทำการศึกษาแหล่งคาร์บอน 3 ระดับ และแหล่งไนโตรเจน 3 ระดับ

1.4.2.4 ศึกษา cell cycle ของราน่าขาวที่ตรึงบนไดอะตอมไมค์เอิร์ธ

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เพื่อทราบถึงสภาวะที่เหมาะสมในการกำจัด ค่า ซีโอดี สี และความขุ่นของน้ำดำจากโรงงานเยื่อกระดาษโดยกระบวนการโคแอกกูเลชันร่วมกับราน่าขาวที่ตรึงบนดินเบา

บทที่ 2

เอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 อุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษ

กระบวนการผลิตเยื่อกระดาษเป็นกระบวนการผลิตที่ใช้น้ำในปริมาณที่มาก ในการผลิตกระดาษ 1 ตันจะก่อให้เกิดน้ำดำประมาณ 7,000 ลิตร (Biermann, 1996) จะถูกปล่อยจากขั้นตอนการผลิตทางเคมี โดยลักษณะของน้ำดำจะขึ้นอยู่กับลักษณะกระบวนการผลิต และสารเคมีที่ใช้ในกระบวนการผลิต กระบวนการผลิตกระดาษประกอบไปด้วย 2 กระบวนการหลักคือ กระบวนการผลิตเยื่อและกระบวนการผลิตกระดาษ

2.1.1 วัตถุดิบในการผลิตเยื่อกระดาษ

พืชทุกชนิดประกอบด้วยเซลลูโลส ซึ่งเซลลูโลสที่ได้มาจากพืชในแต่ละประเภท มีความแข็งแรงแตกต่างกัน โดยเซลลูโลสที่มีความแข็งแรงมีเหมาะสมกับการนำไปผลิตกระดาษ นอกจากจะคำนึงถึงคุณสมบัติของเส้นใยแล้ว ยังต้องมีความเป็นไปได้ทางธุรกิจ คือ หาง่าย ราคาไม่แพง การเก็บ การขนส่งไม่ยุ่งยากพืชที่สามารถใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเยื่อกระดาษแบ่งออกเป็น 2 ประเภท ได้แก่

2.1.1.1 ไม้ล้มลุก (Nonwood) ได้แก่ พืชอื่นๆ นอกเหนือจากไม้ยืนต้น ที่เส้นใยมีคุณสมบัติเหมาะสม สามารถนำมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตกระดาษได้ ได้แก่ ปอ ใผ่ ฝ้าย หรือเป็นส่วนที่เหลือจากเกษตรและอุตสาหกรรม เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย เป็นต้น สมบัติของเส้นใยจากพืชกลุ่ม Nonwood มีสมบัติไม่แน่นอน อาจมีความยาวตั้งแต่สั้นกว่า 1 มิลลิเมตร ไปจนถึงหลายเซนติเมตร (Holik, 2006)

2.1.1.2. ไม้ยืนต้น (Wood) หมายถึงพืชที่เป็นต้นไม้มีลำต้นแข็งแรง อายุยืน แบ่งเป็น 2 ชนิด

ไม้เนื้อแข็ง (hard wood) เป็นไม้ที่พบทั่วไปในบริเวณป่าไม้ของไทย โดยไม้เนื้อแข็งที่ลักษณะใบกว้าง (broad leaved trees) ไม้ในกลุ่มนี้ได้แก่ ยูคาลิปตัส (Eucalyptus) กระถินเทพา (Acacia) เบิร์ช (Birch) และแอสเพน (Aspen) โครงสร้างของไม้มีความซับซ้อนเมื่อเปรียบเทียบกับไม้เนื้ออ่อน โดยเส้นใยของไม้เนื้อแข็งสามารถผลิตเป็นเยื่อใยสั้น (short fiber) โดยมีขนาดประมาณ 0.5-1.5 มิลลิเมตร โดยใช้เป็นวัตถุดิบหลักในการผลิตเยื่อกระดาษ

ไม้เนื้ออ่อน (softwood) เป็นไม้ที่ได้จากต้นไม้จำพวกสน อาทิเช่น สนสองใบ สองสามใบ โดยมีลักษณะใบที่เรียวเล็ก (needle leaves) โดยเส้นใยของไม้เนื้ออ่อนมักนำมาผลิตเป็นเยื่อ

ใยยาว (long fiber) โดยมีขนาด 2-4 มิลลิเมตร โดยเยื่อใยยาวนี้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์กระดาษมีความเหนียวมากยิ่งขึ้น (Intachang และคณะ, 2012)

ในประเทศไทยไม่มีแหล่งวัตถุดิบประเภทไม้เนื้ออ่อน เนื่องจากภูมิประเทศไม่อำนวยต่อการเจริญเติบโต แต่สำหรับไม้เนื้อแข็งมีการปลูกสวนป่ายูคาลิปตัสกันมาก ในบริเวณภาคตะวันออกเฉียงเหนือและทางตอนใต้ของภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเยื่อกระดาษ เส้นใยที่ได้จากไม้เนื้อแข็ง และไม้เนื้ออ่อนมีคุณสมบัติแตกต่างกันมาก โดยเยื่อใยยาวมีคุณสมบัติเหมาะสมกับการนำไปผลิตกระดาษที่ต้องรับแรงขณะใช้งาน เช่น กระดาษบรรจุภัณฑ์ ถุง กระดาษห่อต่างๆ กล่องลูกฟูก และเยื่อใยสั้น มีคุณสมบัติเหมาะสมกับการนำไปผลิตกระดาษที่ใช้ในการพิมพ์ เนื่องจากเส้นใยมีความละเอียด จึงสามารถผลิตกระดาษที่มีความเรียบสูง มีเนื้อละเอียดได้ ส่วนการผลิตเยื่อจากพืชไม้ล้มลุกนั้นมีไม่มากเมื่อเทียบกับเยื่อจากไม้ยืนต้น เพราะมีปัญหาค่อนข้างมาก เช่น ต้องใช้พื้นที่ในการจัดเก็บมาก เนื่องจากวัตถุดิบมีความหนาแน่นต่ำ พืชบางอย่างมีเป็นฤดูกาล เช่น ฟางข้าว มีเฉพาะช่วงเก็บเกี่ยว ในปัจจุบันจึงไม่นิยมผลิตเยื่อกระดาษจากวัตถุดิบเหล่านี้

2.1.2 องค์ประกอบทางเคมีของเส้นใย ประกอบด้วยสารเคมีหลายชนิด สารเหล่านี้เป็นสารอินทรีย์ที่เกิดจากการสังเคราะห์ด้วยแสงของพืช ได้แก่

2.1.2.1 เซลลูโลส (cellulose)

เป็นสารที่มีปริมาณมากที่สุด และมีความแข็งแรงมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารตัวอื่นๆ จึงทำให้ต้นไม้มีความแข็งแรง โดยเซลลูโลสมีสีขาว ดังปรากฏเช่น เส้นใยของฝ้ายมีสีขาว เนื่องจากมีเซลลูโลสเป็นส่วนประกอบมากกว่า 90 % โมเลกุลของเซลลูโลสเป็นเส้นตรงยาว ประกอบด้วยหน่วยย่อย คือ กลูโคส (Glucose) เช่นเดียวกับแป้ง แต่มีสูตรโครงสร้างต่างกัน แป้งจึงอมน้ำ และพองตัวเมื่อโดนน้ำ โดยในกระบวนการผลิตเยื่อต้องรักษาเซลลูโลสให้ถูกทำลายน้อยที่สุด

2.1.2.2 เฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose)

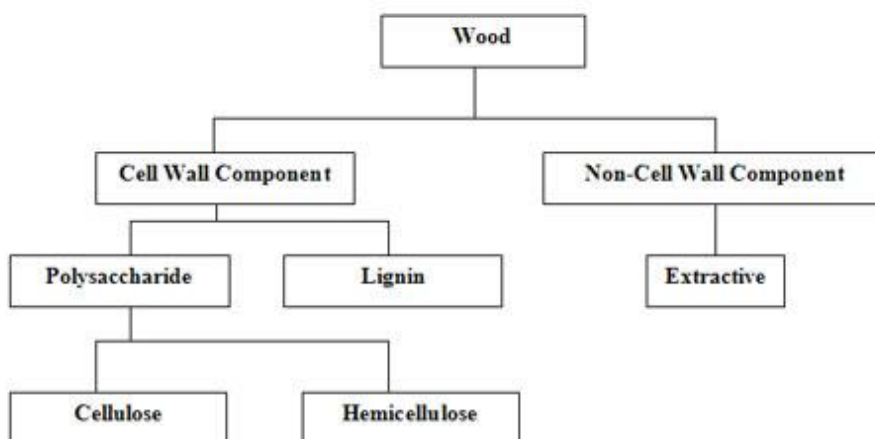
เฮมิเซลลูโลสเป็นสารที่ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเช่นเดียวกับเซลลูโลส แต่โครงสร้างของโมเลกุลมีลักษณะเป็นกิ่งก้านสาขา ไม่ได้เป็นเส้นตรงยาวเหมือนเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสจึงมีความแข็งแรงต่ำ สามารถอมน้ำ และพองตัวได้คล้ายแป้ง

2.1.2.3. ลิกนิน (Lignin)

ลิกนินมีอยู่ประมาณ 20-40% เป็นพอลิเมอร์เชิงซ้อน (Complex Polymer) เป็นสารประกอบประเภทอะโรมาติกทำหน้าที่เป็นสารยึดเส้นใยในเนื้อไม้ให้เกาะติดกัน โดยลิกนินทำให้เกิดสีน้ำตาล ลิกนินจะละลายออกมาจากเส้นใยในขณะถูกย่อยสลาย เช่น ละลายในสารละลายกรด ในกระบวนการผลิตเยื่อแบบซัลไฟต์ (Sulfite process) หรือละลายในด่างร้อนในกระบวนการผลิตเยื่อกระดาษแบบคราฟต์ (Kraft) หรือกระบวนการแบบซัลเฟต (Sulfate process) เยื่อที่มีลิกนินมากจะมีสีคล้ำ เปลี่ยนสีง่าย เป็นสารที่ต้องกำจัดออกในการผลิตเยื่อ

2.1.2.4. อื่นๆ (Extraneous component)

ส่วนนี้จะมีประมาณ 2-10% เป็นสารประกอบที่สามารถละลายได้ในตัวทำละลาย มีปริมาณน้อย ได้แก่ เทอร์พีน (Terpene) ไขมัน (lipid) เป็นต้น



รูปที่ 1 สารประกอบต่างๆ ในเนื้อไม้ (บุรพากรูป,2559)

2.1.3 การผลิตเยื่อกระดาษ (Gullichsen และFogelholm, 1999, Smook, 1990)

วัตถุประสงค์ของกระบวนการผลิตเยื่อเพื่อละลาย และกำจัดลิกนินที่ประกอบอยู่ในเยื่อไม้เพื่อให้เหลือแต่เซลลูโลส เพื่อนำไปสู่กระบวนการทำกระดาษต่อไป ในกระบวนการผลิตเยื่อประกอบไปด้วย 2 กระบวนการคือ กระบวนการผลิตเยื่อเชิงกล (mechanical pulping) การผลิตเยื่อกึ่งเคมี (semichemical pulping) และกระบวนการผลิตเยื่อเชิงเคมี (chemical pulping)

2.1.3.1 การผลิตเยื่อเชิงกล (Mechanical Pulping Process) เป็นกระบวนการที่ใช้พลังงานกลควบคุมไปกับพลังงานความร้อนในการแยกเส้นใยออกมา โดยชิ้นไม้จะถูกส่งเข้าท่อนจะได้รับการตัดออกเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วบดด้วย ลูกหิน (ground wood; GW) หรือบดด้วยจานจนละเอียดเป็นเยื่อไม้ เยื่อไม้ที่ได้จากกระบวนการนี้มักมีลักษณะหยาบ กระด้าง แต่ให้ผลผลิตสูง โดยให้มากกว่าร้อยละ 85 เนื่องจาก ลิกนินถูกสกัดออกไปน้อยมาก ลักษณะของเส้นใยคือมีการฉีกขาด มีลักษณะเป็นท่อนๆโดยเรียกว่า เยื่อไม้บดนอกจากนี้ยังมีกลุ่มของเส้นใยปนอยู่ด้วย ในเยื่อไม้บดจึงประกอบด้วยเส้นใยฝอย (fines) ซึ่งเกิดจากการฉีกขาดของเส้นใย เส้นใยเดี่ยว (individual fiber) ไม่ค่อยสมบูรณ์มัดขอเส้นใย (bundle of fiber) ซึ่งประกอบด้วยเส้นใยหลายๆ เส้นเกาะติดกันเป็นมัด เยื่อชนิดนี้เมื่อนำมาเป็นวัตถุดิบในการทำกระดาษ จะให้คุณสมบัติตามส่วนประกอบทั้ง 3 คือ เส้นใยฝอยจะเพิ่มคุณสมบัติด้านทึบแสง เส้นใยซึ่งไม่ค่อยสมบูรณ์ และยังคงมี ลิกนินตกค้างอยู่ทำให้พันธะระหว่างเส้นใยต่ำ ทำให้กระดาษเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเมื่อได้รับแสง กระดาษที่ได้จากกรรมวิธีนี้มีความทึบสูงดูความชื้นได้ดี เยื่อชนิดนี้จึงไม่เหมาะที่จะนำไปทำกระดาษที่ต้องรับแรงสูงหรือเก็บนานๆ มีราคาถูกเหมาะสมสำหรับทำสิ่งพิมพ์ราคาถูก เช่น หนังสือพิมพ์ กระดาษห่อของหรือใช้เป็นเยื่อชั้นในกระดาษแข็ง

2.1.3.2 การผลิตเยื่อกึ่งเคมี (Semi-chemical pulping) เป็นการผลิตเยื่อโดยใช้กระบวนการทางกลร่วมกับกระบวนการทางเคมี คือการนำโดยที่กระบวนการเคมีจะใช้สารเคมีน้อยกว่าวิธีทางเคมี และกระบวนการทางกลจะใช้การบดที่แยกเส้นใยออกเท่านั้น เยื่อที่ได้จากการเตรียมวิธีนี้มีคุณสมบัติอยู่ระหว่างเยื่อไม้บด และเยื่อเคมีวิธีการแยกเส้นใยโดยวิธีกระบวนการกึ่งเคมี การผลิตเยื่อกระดาษ เป็นการนำชิ้นไม้สับมาต้มกับน้ำยาต้มเยื่อในหม้อต้มเยื่อภายใต้เวลาอุณหภูมิ และปริมาณน้ำยาเคมีต่อปริมาณไม้ที่กำหนด เมื่อต้มได้สภาวะหนึ่งแล้วก็นำไป ผ่านกระบวนการบีบเพื่อแยกเส้นใยออกมา เรียกว่า เยื่อที่ได้ว่าเยื่อกึ่งเคมี เยื่อที่ได้มักจะมีลิกนินเหลืออยู่ครึ่งหนึ่งของปริมาณที่มีอยู่ในวัตถุดิบ การผลิตเยื่อโดยวิธีนี้จะเรียกว่า chemi-mechanical pulping หรือ chemi-thermomechanical pulping

2.1.3.3 การผลิตเยื่อเคมี (chemical pulping) การผลิตเยื่อตามกรรมวิธีนี้จะใช้พลังงานเคมี และพลังงานความร้อนในการทำให้เส้นใยแยกจากกัน โดยชิ้นไม้จะถูกส่งเข้าหม้อต้มเยื่อ (digester) สารเคมี และความร้อนจะละลายลิกนินออกไป เหลือส่วนที่ไม่ละลายคือเยื่อ เยื่อเคมีมีหลายชนิดเรียกชื่อตามสารเคมีที่ใช้ในการผลิตเช่น เยื่อซัลเฟต เยื่อซัลไฟต์ และเยื่อโซดา เยื่อเคมีให้ผลผลิตเยื่อประมาณร้อยละ 40-50 มีลักษณะนุ่ม สีค่อนข้างคล้ำ เส้นใยที่ได้จะสมบูรณ์ เยื่อชนิดนี้มีปริมาณการใช้สูงมาก เพราะสามารถพัฒนาศักยภาพของเส้นใยให้สามารถใช้งานได้อย่างกว้างขวางเหมาะทั้งใช้ในงานรับแรง และเพื่อการสื่อสาร ถ้าใช้ในงานรับแรง เช่น นำไปทำกระดาษบรรจุภัณฑ์ไม่จำเป็นต้องฟอก แต่ถ้าใช้เพื่อการสื่อสารจะต้องนำไปฟอกให้ขาวก่อน โดยการผลิตเยื่อเคมี สามารถแบ่งออกได้หลายลักษณะตามประเภทสารเคมีที่ใช้

ก. กระบวนการผลิตแบบอัลคาไลน์ (alkaline process) โดยสามารถแบ่งได้ 2 ลักษณะการผลิตคือ

กระบวนการโซดา (soda process) เป็นกระบวนการผลิตที่ใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เป็นตัวทำละลายลิกนิน โดยกระบวนการนี้เป็นวิธีแบบดั้งเดิม โดยปกติเยื่อฟอกขาวนี้ส่วนใหญ่ใช้ทำกระดาษพิมพ์เขียน นอกจากนั้นการผลิตกระดาษชนิดพิเศษ เช่น กระดาษสา

กระบวนการผลิตแบบคราฟต์ (kraft process) ชิ้นไม้ถูกต้มในหม้อต้มเยื่อกับสารเคมีซึ่งเรียกว่า “White liquor” ซึ่งประกอบด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) และโซเดียมซัลไฟด์ (Na₂S) ของเหลวดำเจือจาง (Weak Black Liquor) อุณหภูมิและระยะเวลาของการต้มเยื่อจะขึ้นกับชนิดของไม้ และ Degree of Delignification ที่ต้องการเยื่อที่ผลิตจากวิธีคราฟต์มีความแข็งแรงเหนียว สีคล้ำและมีสีน้ำตาล โดยการผลิตเยื่อแบบนี้สามารถใช้ผลิตเยื่อได้จากพืชหลายชนิด เยื่อที่ได้จากการผลิตนี้มีความแข็งแรง กว่าเยื่อแบบโซดา เหมาะเป็นเยื่อสำหรับทำถุง และบรรจุภัณฑ์ต่างๆโดยการผลิตแบบเยื่อกระดาษแบบคราฟต์ มีการดำเนินการระบบ 2 ลักษณะ คือ หม้อต้มเยื่อแบบกะ (batch pulp digester) และหม้อต้มเยื่อ (continuous pulp digester) โดยมีลักษณะดังนี้

ต้มเยื่อแบบกะ

หม้อต้มเยื่อแบบกะ ใช้วิธีการต้มแบบครั้งต่อครั้ง โดยทำการใส่สารเคมีที่ใช้ในย่อยสลาย ลิกนินจากเยื่อไม้ โดยทำการต้มที่อุณหภูมิ 170 องศาเซลเซียส ใช้เวลาต้ม 2-3 ชั่วโมง ในการต้มเยื่อ ลักษณะจะเกิดน้ำดำปริมาณมาก และใช้สารเคมีในการย่อยสลาย ลิกนินออกจากเยื่อไม้ในปริมาณ มาก โดยหม้อต้มเยื่อในลักษณะนี้จะถูกเชื่อมต่อกับ ถังปรับความดัน (blow tank) โดยทำหน้าที่ แบ่งปันเยื่อไม้จากหม้อต้มเยื่อ โดยระบายความดันจากหม้อต้มเยื่อ เพื่อป้องกันการระเบิด อันเนื่องมาจากความดัน และความร้อน

ต้มเยื่อแบบต่อเนื่อง

หม้อต้มเยื่อแบบต่อเนื่องมีขนาดสูงถึง 200 ฟุต กว้าง 12-18 ฟุต เยื่อไม้ถูกส่งมาจาก ด้านบนของหม้อต้มเยื่อ ในกระบวนการต้มเยื่อแบบต่อเนื่องใช้เวลานานถึง 7 ชั่วโมงในการรันระบบ โดยน้ำสารเคมีจะถูกส่งโดยใช้ระบบท่อภายในหม้อต้มเยื่อและแผ่กระจายออกจากด้านในซึ่ง กระบวนการดังกล่าวเป็นกระบวนการที่มีประสิทธิภาพสูงในการต้มเยื่อและใช้สารเคมีในการย่อย สลายลิกนินออกจากน้ำดำในปริมาณที่เหมาะสม เนื่องจากไม่ต้องส่งเข้าระบบกู้คืนสารเคมีแต่สามารถ นำกลับมาใช้ใหม่ได้ทันที

ข. กระบวนการผลิตแบบซัลไฟต์ (sulfite process) การผลิตเยื่อโดย กระบวนการนี้จะใช้กรดซัลฟูรัส (Sulfurous acid: H_2SO_3) และไบซัลไฟต์ไอออน (Bisulfite ion: HSO_3^-) ในภาวะที่เป็นกรด ในการละลายลิกนินที่จับระหว่างเยื่อไม้ไหลออกมา เยื่อที่ได้จาก กระบวนการซัลไฟต์จะมีสีอ่อนกว่าเยื่อที่ได้จากกระบวนการซัลเฟตและสามารถฟอกสีได้ง่ายกว่า

2.1.4 การเตรียมน้ำเยื่อ

ในขั้นการเตรียมน้ำเยื่อนี้มีวัตถุประสงค์หลัก 2 ประการ คือ เพื่อพัฒนาศักยภาพของ เส้นใย โดยการนำเยื่อไปบด และปรับปรุงสมบัติกระดาษให้ได้ตามวัตถุประสงค์การใช้งาน โดยการ ผสมหรือใส่สารเติมแต่งชนิดต่างๆ ตามอัตราส่วนที่กำหนดส่วนผสมที่ได้นี้เรียกว่า “น้ำเยื่อ” หรือ “สต็อก” (stock) เยื่อที่นำมาทำกระดาษทุกชนิดจะต้องผ่านการบด มากหรือน้อยขึ้นอยู่กับระดับ คุณภาพของเยื่อ เยื่อบางชนิดไม่จำเป็นต้องบด เช่น เยื่อไม้บด และเยื่อเวียนทำใหม่

ในขั้นการเตรียมน้ำเยื่อประกอบด้วยส่วนต่างๆ ที่ทำหน้าที่ในการบด และผสมโดยมี ขั้นตอนการปฏิบัติการเรียงลำดับดังนี้

2.1.4.1 การกระจายเส้นใย (defibering)

2.1.4.2 การบดเยื่อ (refining)

2.1.4.3 การผสมน้ำเยื่อ (blending)

2.1.4.4 การแยกสิ่งสกปรกออกจากน้ำเยื่อ (screening and cleaning)

2.1.4.5 การควบคุมความชื้นของน้ำเยื่อ (consistency regulator) เพื่อควบคุมให้น้ำ

เยื่อชั้นคงที่

2.1.5 การผลิตกระดาษ (paper making)

น้ำเยื่อจะถูกส่งเข้าสู่เครื่องจักรผลิตกระดาษเพื่อทำเป็นแผ่นกระดาษที่ยาวต่อเนื่องกันซึ่งเรียกว่า เว็บบเปเปอร์ (web paper) เครื่องจักรที่ใช้ผลิตกระดาษมีหลายแบบ ส่วนใหญ่เป็นแบบโฟร์ดริเนียร์ (fourdrinier) และแบบไซลินเดอร์ (cylinder) เครื่องจักรผลิตกระดาษทุกแบบจะมีส่วนประกอบต่างๆ เพื่อทำหน้าที่หลัก 3 ประการคือ

การแยกน้ำออก (draining) ทำหน้าที่เป็นตะแกรงรองรับน้ำเยื่อ น้ำจะลอดผ่านตะแกรงทำให้เยื่อก่อตัวเป็นแผ่นเปียก (wet sheet forming)

การกดน้ำออก (pressing) ทำหน้าที่กดหรือบีบน้ำออกจากแผ่นเปียก ทำให้เกิดการยึดติดแน่นระหว่างเส้นใยภายในกระดาษ (consolidation of wet)

การอบกระดาษ (drying) แผ่นกระดาษจะถูกอบให้แห้งเพื่อไล่น้ำออกจนกระดาษแห้งเหลือความชื้นประมาณร้อยละ 4-6

ภายหลังจากการผสมเยื่อเป็นอันเสร็จแล้ว น้ำเยื่อจะถูกส่งไปยังเครื่องจักรผลิตกระดาษ เพื่อทำเป็นแผ่นกระดาษ โดยทำเป็นแผ่นกระดาษที่ยาวต่อเนื่องกันซึ่งเรียกว่า เว็บบเปเปอร์ (web paper) เครื่องจักรที่ใช้ผลิตกระดาษมีหลายแบบ ส่วนใหญ่เป็นแบบโฟร์ดริเนียร์ (fourdrinier) และแบบไซลินเดอร์ (cylinder)

2.2 น้ำดำ (Black liquor)

น้ำดำเป็นของเสียที่เกิดจากการผลิตจากการต้มเยื่อแบบคราฟต์ ซึ่งประกอบด้วยสารอินทรีย์ต่างๆจากไม้และสารอนินทรีย์จากสารเคมีที่ใช้ในการกำจัดลิกนิน น้ำดำมีสีดำเข้ม องค์ประกอบของน้ำดำจะขึ้นอยู่กับวัตถุดิบที่เข้าสู่ระบบการผลิตเยื่อ โดยประกอบไปด้วยลิกนินในปริมาณที่สูง (Ksibi และคณะ, 2003) โดยน้ำดำประกอบด้วยปริมาณน้ำ สารประกอบอินทรีย์จากเยื่อไม้และสารประกอบอินทรีย์จากขบวนการต้มเยื่อโดยสารอินทรีย์มักประกอบไปด้วย ลิกนิน พอลิแซ็กคาไรด์ คาร์บอซิลิกแอซิด และสารแทรกอื่นๆในเนื้อไม้ โดยแสดงรายละเอียดดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 องค์ประกอบโดยเฉลี่ยของน้ำดำ (Naqvi และคณะ, 2010, Sjöström และWestermarck, 1999)

องค์ประกอบ	ส่วนประกอบ (% โดยน้ำหนักของแข็ง)
สารประกอบอินทรีย์	78 %
ลิกนิน	37.5 %
กรดไอโซแซคคาณิก	22.6 %
คาร์บอกซิลิก แอซิด	14.4 %
เรซิน กรดไขมัน	0.5 %
พอลิแซ็กคาไรด์	3.0 %
สารประกอบอนินทรีย์	22%
โซเดียมไฮดรอกไซด์	9.2 %
โซเดียมคาร์บอเนต	3.6 %
โซเดียมซัลเฟต	2.4 %
โซเดียมไฮโอซัลเฟต	0.5 %
โซเดียมคลอไรด์	0.5 %
สารประกอบอื่นๆ	0.2 %
ซัลเฟอร์	4.8 %

ในการผลิตเยื่อกระดาษน้ำดำที่ได้จากกระบวนการผลิตเยื่อมักมีปริมาณที่มาก โดยน้ำดำจะถูกแบ่งออกเป็น 2 ส่วนคือ ส่วนที่ 1 น้ำดำจะถูกส่งไปผสมกับน้ำยาที่ใช้ในการต้มเยื่อเพื่อให้ น้ำยาต้มเยื่อ มีปริมาณมากพอสำหรับการต้มเยื่อ น้ำดำส่วนที่เหลือ จะถูกนำเข้าสู่กระบวนการนำสารเคมีกลับคืน ซึ่งเริ่มต้นจากหน่วยทำระเหยเพื่อให้ น้ำดำมีความเข้มข้นมากขึ้น จากนั้นจึงป้อนน้ำดำเข้มข้นเข้าสู่หม้อ นำนำสารกลับคืน สารอินทรีย์ในน้ำดำเข้มข้นจะติดไฟและให้พลังงานความร้อนออกมา สารเคมีหรือ สารอนินทรีย์ที่เหลือจะละลายเป็นของเหลวไหลลงสู่ด้านล่างของหม้อ นำนำสารกลับคืน ผสมกับ ของเหลวเจือจางในสารละลายกลายเป็นของเหลวสีเขียว ซึ่งจะถูกส่งไปยังถังตกตะกอนเพื่อแยก สิ่งเจือปนที่เป็นของแข็งออก แล้วส่งต่อไปยังหน่วยทำต่างเพื่อทำปฏิกิริยากับปูนขาว กลายเป็นน้ำยา กลับเข้าสู่การผลิตเยื่อต่อไป พลังงานความร้อนที่เกิดขึ้นจากการเผา น้ำดำเข้มข้นในหม้อ นำนำสารเคมี กลับคืน ถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของไอน้ำและนำไปใช้ในหน่วยทำระเหย ต่อไป หากไม่มีการนำสารเคมี กลับมาใช้ก็ทำให้เยื่อกระดาษมีราคาแพงขึ้น เนื่องจากสารเคมีมีราคาแพง อีกทั้งยังทำให้มลพิษ ต่อสิ่งแวดล้อมด้วยน้ำดำเนื่องจากปริมาณสารเคมีที่อยู่ในน้ำดำมีปริมาณมาก

น้ำดำจากโรงงานผลิตเยื่อและกระดาษ สามารถนำเข้าสู่กระบวนการเผาไหม้เพื่อผลิตเป็นกระแสไฟฟ้า (Marshman และคณะ, 2010) และนำมาตกตะกอนในภาวะกรด ในปฏิกิริยาลิกโนซัลโฟเนตทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ลิกโนซัลโฟเนต ซึ่งคงคุณสมบัติส่วนใหญ่ของลิกนินไว้จึงถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรม (Yang และคณะ, 2007) ลิกโนซัลโฟเนตมีลักษณะเป็นผงสีน้ำตาล โดยส่วนมากผลิตจากกระบวนการผลิตเยื่อ กระดาษแบบซัลไฟต์ ปัจจุบันนำเข้ามาจากต่างประเทศ สามารถสังเคราะห์ได้โดยมีลิกนินเป็นสารตั้งต้นซึ่งประโยชน์ของลิกโนซัลโฟเนตมีดังนี้ (El Mansouri และ Salvadó, 2006)

- เป็นตัวอิมัลซิไฟเออร์ ในยางมะตอย
- เป็นสารช่วยกระจายอนุภาค เช่น เป็นสารลดน้ำในซีเมนต์ และคอนกรีต หรือผสมสีย้อมหรือเม็ดสีต่างๆ รวมถึงผสมในยาฆ่าแมลง
- เป็นตัวประสานหรือตัวยึดเกาะ เช่นผสมในอาหารสัตว์อัดเม็ด หรือผสมกับหินเพื่อลดที่ฟุ้งกระจาย โดยเฉพาะการซ่อมแซมผิวหน้าของถนน

โดยทั่วไปในกระบวนการผลิตเยื่อและการฟอกเยื่อเป็นแหล่งที่ก่อให้เกิดน้ำเสียในอุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษ โดยถ้าน้ำดำถูกปล่อยออกจากระบบกู้คืนสารเคมี อันเนื่องมาจาก ระบบโรงงานที่มีขนาดเล็ก หรือ ขนาดกลางที่ไม่สามารถสร้างระบบกู้คืนสารเคมีได้ทำให้จึงจำเป็นต้องปล่อยน้ำดำออกสู่สภาวะแวดล้อม หรือในกรณี โรงงานลักลอบปล่อยลงสู่น้ำเสีย เนื่องจากน้ำดำเป็นหนึ่งในข้อจำกัดของโรงงานผลิตเยื่อกระดาษในปัจจุบันตามหลักเกณฑ์การจัดตั้งโรงงานต้มเยื่อกระดาษได้กำหนดไว้ว่า จะต้องสร้างระบบกู้คืนสารเคมี เพื่อป้องกันการปล่อยน้ำดำออกสู่สิ่งแวดล้อม โดยถ้าโรงงานต้องการเพิ่มกำลังการผลิตเยื่อจึงมีความจำเป็นต้องสร้างระบบกู้คืนสารเคมีเพิ่มกำลัง ซึ่งนั่นเองเป็นการเพิ่มภาระต้นทุนในการดำเนินการระบบใหม่ จึงทำให้เกิดการลักลอบปล่อยน้ำดำออกสู่สภาวะแวดล้อม โดยน้ำดำจะมีผลต่อสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศอย่างสำคัญ เนื่องจากมีสารเคมีในปริมาณมาก และมีสีดำคล้ำอันเนื่องมาจากลิกนิน (Kortekaas และคณะ, 1998) โดยอุตสาหกรรมกระดาษเป็นอุตสาหกรรมที่ปล่อยน้ำทิ้งออกมาเป็นปริมาณมากโดยปริมาณน้ำนั้นจะขึ้นอยู่กับกระบวนการ และมาตรฐานในการผลิตดังแสดงในตารางที่ 2 ทุกขั้นตอนของการผลิตเยื่อ และกระดาษจะมีสารอินทรีย์ซึ่งเกิดจากวัตถุดิบที่นำมาใช้ผลิตเยื่อ โดยสารอินทรีย์จะมีผลต่อความต้องการออกซิเจน ในการย่อยสลายของแหล่งน้ำ ทำให้ค่าออกซิเจนในน้ำลดลง ส่งผลให้น้ำเน่าเสีย

ตารางที่ 2 ปริมาณที่แตกต่างของสารพิษจากกระบวนการในการผลิตเยื่อ และกระดาษ
(Rintala และPuhakka, 1994)

กระบวนการ	ปริมาณน้ำที่ใช้ (ลบ.ม.ต่อตันกระดาษ)	สารแขวนลอย (ก.ก.ต่อตันกระดาษ)	ซีไอดี (ก.ก. ต่อตันกระดาษ)
- การลอกเปลือกไม้ แบบเปียก	5-25	Nr	5-20
- การผลิตเยื่อเชิงกล	10-15	Nr	15-32
- การผลิตเยื่อเชิงกล โดยใช้ความร้อน(ไม่ พอก)	10-32	10-40	40-60
- การผลิตเยื่อเชิงกล โดยใช้ความร้อน(พอก)	10-30	10-40	50-120
- การผลิตเยื่อเชิงกล โดยใช้ความร้อนกึ่งเคมี (ไม่พอก)	10-15	20-50	70-120
- การผลิตเยื่อเชิงกล โดยใช้ความร้อนกึ่งเคมี (พอก)	10-15	20-50	100-180
- กระบวนการซัลไฟต์	80-100	20-50	nr
- แคลเซียม ซัลไฟต์ (ไม่พอก)	150-180	20-60	120-180
- แคลเซียม ซัลไฟต์ (พอก)	40-60	10-40	60-120
- คราฟต์(ไม่พอก)	40-60	10-20	40-60
- คราฟต์ (พอก)	60-90	10-40	100-140
- การผลิตกระดาษ	10-50	Nr	nr

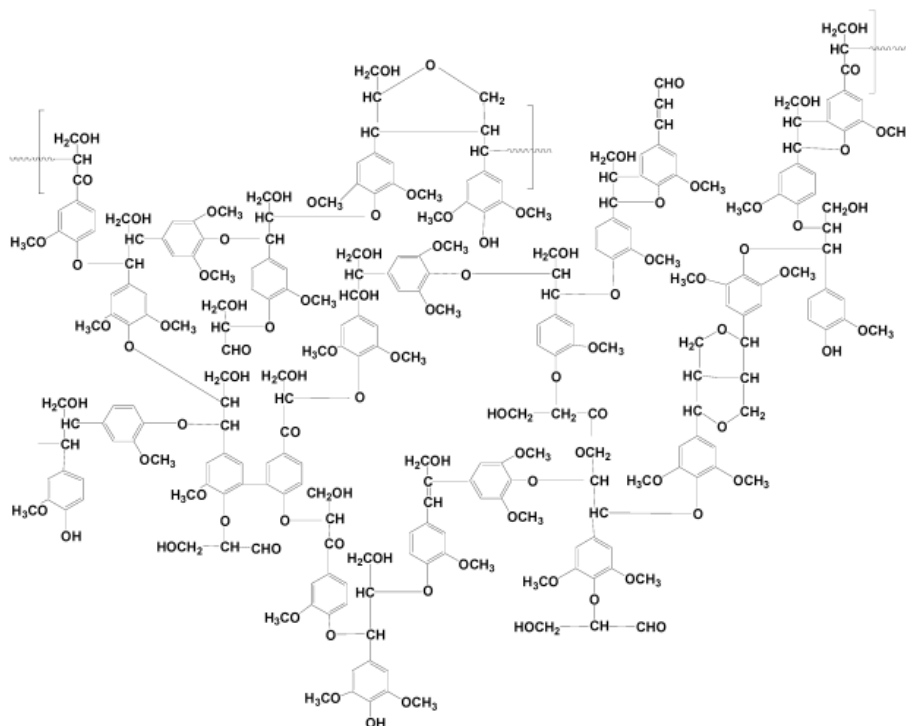
Nr- ไม่มีการรายงาน

2.3 ลิกนิน

ลิกนินเป็นสารประกอบพีนอล โมเลกุลของลิกนินจะแทรกและเชื่อมอยู่ระหว่างโมเลกุลเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส โดยพบว่าเป็นลิกนินที่มีความซับซ้อนมากกว่าเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส ทำให้ลิกนินมีหน้าที่ช่วยเพิ่มความแข็งแรงให้แก่ผนังเซลล์พืช โดยทำหน้าที่เป็นตัวยึดระหว่างผนังเซลล์พืช (Reid, 1995) เนื่องจากโครงสร้างภายในจะเชื่อมกันด้วยพันธะแอริล-อีเทอร์ และคาร์บอน-คาร์บอน ที่เชื่อมต่อกับอะโรมาติกนิวคลีไอ (aromatic nuclei) ซึ่งพันธะเหล่านี้ไม่สามารถย่อยสลายด้วยกระบวนการไฮโดรไลซิสได้ ทำให้ลิกนินทนทานต่อการย่อยสลายด้วยสารเคมีหรือเอนไซม์มากกว่าพอลิเมอร์ชนิดอื่นๆ และยังป้องกันไม่ให้เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลสถูกทำลายด้วยจุลินทรีย์

ลิกนิน มีหน่วยพอลิเมอร์เป็นกลุ่ม ฟีนิลโพรเพน (Lewis และ Yamamoto, 1990) โดยทั่วไปลิกนินในเนื้อไม้ และเนื้อเยื่อของพืชจะมีอยู่ประมาณร้อยละ 20-30 (Tuomela และคณะ, 2000) ลิกนินมีโมเลกุลขนาดใหญ่ 8000-11,000 กิโลดาลตัน (Lara และคณะ, 2003) ยังเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์พืชที่มีมากเป็นอันดับ 3 ในไม้ใบแคบหรือไม้ตระกูลสน (softwood) จะมีลิกนินประมาณ 23-33 % ส่วนในไม้ใบกว้าง (hardwood) มีลิกนินประมาณ 16-25 % มีโครงสร้างเป็นรูปแบบอสัณฐาน โดยโครงสร้างของลิกนิน แสดงได้ดังรูปที่ 2 ลิกนินไม่สามารถละลายน้ำได้ ไม่มีคุณสมบัติในการยืดหยุ่น นอกจากนี้ยังพบว่าพืชแต่ละชนิดหรือแม้แต่มะดุนิดเดียวกัน แต่อายุการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันก็ส่งผลให้ปริมาณของลิกนินแตกต่างกันด้วย

แม้ว่าลิกนินเป็นสิ่งที่จำเป็นกับพืชแต่สำหรับกระบวนการผลิตกระดาษนั้นต้องมีการกำจัดลิกนินออก โมเลกุลของลิกนินใหญ่กว่าหน่วยของโมเลกุลมาก ลักษณะของภาพเป็น 3 มิติ ลิกนินไม่มีคุณสมบัติในการยืดหยุ่น นอกจากนี้พบว่าพืชแต่ละชนิดหรือชนิดเดียวกัน อายุในการเจริญต่างกัน สภาพแวดล้อมต่างก็ส่งผลต่อปริมาณลิกนินในเนื้อไม้



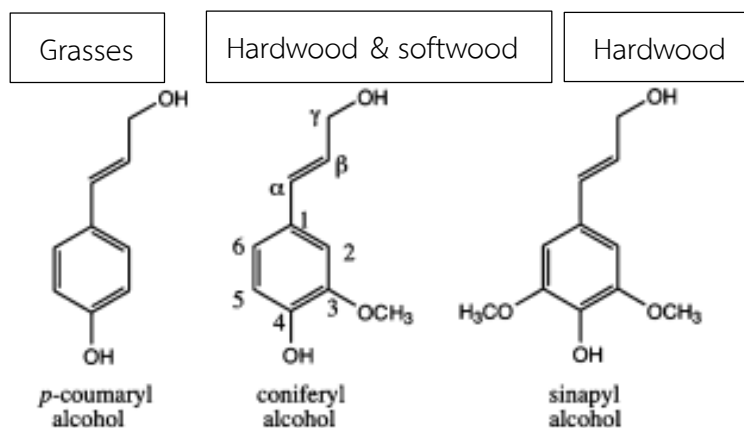
รูปที่ 2 โครงสร้างของลิกนิน (Mohan และคณะ, 2006)

2.3.1 กระบวนการสังเคราะห์ลิกนิน

ในการสังเคราะห์ลิกนิน พืชจะตรึงคาร์บอนไดออกไซด์จากบรรยากาศด้วยกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงสำหรับสร้างคาร์โบไฮเดรต แล้วเข้ากระบวนการสังเคราะห์กรดอะมิโนอะโรมาติกในกลุ่มกรดฟีนิลโพรเพนอะมิโน เช่น แอล-ฟีนิลอะลานีน ซึ่งมีกรดชิกิมิก (shikimic acid) เป็นสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์ (Brebu และVasile, 2010) โดยเกิดจากสารตั้งต้น (precursor) 3 ชนิด ได้แก่ พารา-คูมาริล แอลกอฮอล์ (coumaryl alcohol) โคนิฟอร์ล แอลกอฮอล์ (coniferyl alcohol) และซินาปิล แอลกอฮอล์ (sinapyl alcohol) (Glasser และSarkanen, 1989)

1. ลิกนินจากไม้เนื้ออ่อน (Soft wood lignin) ได้แก่ลิกนินที่มาจากไม้ที่ลักษณะใบแคบ ซึ่งได้แก่พืชตระกูลสน มักมีสารตั้งต้นเป็น coniferyl alcohol เพียงอย่างเดียว
2. ลิกนินจากไม้เนื้อแข็ง (Hard wood lignin) ได้แก่ลิกนินจากไม้ใบกว้าง ซึ่งได้แก่ไม้กลุ่มเบญจพรรณ มักมีสารตั้งต้นเป็น coniferyl และ sinapyl alcohol
3. ลิกนินจากหญ้าหรือไม้ล้มลุก (Grass lignin) ได้แก่ลิกนินจากพืชตระกูลหญ้า ไม้มีเนื้อไม้ *p*-coumaryl alcohol sinapyl alcohol และconiferyl alcohol ซึ่ง coumaryl alcohol เป็นกลุ่มพาราไฮดรอกซีฟีนิล (*p*-hydroxy phenyl)

โดยแอลกอฮอล์ทั้ง 3 ชนิดนี้ในการสังเคราะห์ลิกนินมีความแตกต่างกันในหมู่เมทอกซี บนตำแหน่งในวงแหวนอะโรมาติกที่แตกต่างกัน (Reid, 1995) โดยประเภทของลิกนิน สามารถแบ่งได้ตามชนิดที่พบในพืชที่นำมาเป็นสารตั้งต้นโดยสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม ดังแสดงในรูปที่ 3 (Chakar และRagauskas, 2004)



รูปที่ 3 โครงสร้างของ สารตั้งต้นของลิกนิน (Wong, 2009)

ดังที่ได้กล่าวมาแล้วว่าลิกนินเป็นสารที่ไม่ละลายน้ำ จึงทำให้กระบวนการย่อยสลายลิกนินเกิดขึ้นได้ช้า จึงมีการคิดค้นกระบวนการย่อยสลายลิกนินเพื่อให้ได้เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลสออกมาจนสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ ซึ่งกระบวนการย่อยสลายลิกนินนั้นอาจทำได้หลายวิธีเช่น การให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงหรือการใช้สารเคมีประเภทกรด หรือ ด่าง แต่กระบวนการดังกล่าวจะสิ้นเปลืองพลังงานเป็นอย่างมาก ในการย่อยสลายเออลิกนินออก ดังนั้นจึงได้นำวิธีการทางชีวภาพมาศึกษา ซึ่งมีชีวิตที่สามารถย่อยสลายลิกนินได้คือเชื้อราที่อยู่ในกลุ่ม Basidiomycetes และบางส่วนในเชื้อราในกลุ่ม Ascomycetes โดยเชื้อราที่สามารถย่อยสลายลิกนินได้ดี เรียกว่า ราเน่าขาว (white rot fungi)

2.4 ราเน่าขาว

ราเน่าขาวเป็นสิ่งมีชีวิตในกลุ่มของผู้ย่อยสลายขั้นต้น (primary decomposer) ในการย่อยสลายชีวมวลพืชโดยเฉพาะกลุ่มลิกนิน เฮมิเซลลูโลส และ เซลลูโลส ตามลำดับ (Dix และ Webster, 1995) ดังนั้นหลังจากการย่อยสลายลิกนินจนออกจนหมดแล้ว จึงเหลือแต่เซลลูโลส ทำให้เนื้อไม้เป็นสีขาว จึงเรียกรว่าราเน่าขาว (white rot fungi) (ten Have และ Teunissen, 2001)

ราเน่าขาวเป็นราที่พบได้ในไม้เนื้อแข็ง (hardwood) โดยมักขึ้นทั้งบริเวณผิวหน้า และในเนื้อไม้ ราคานี้มีผนังเซลล์ที่บางมาก เข้าแทรกเนื้อไม้ได้จนถึงผนังเซลล์ชั้นกลาง (middle lamella) และสามารถสร้างเอนไซม์ออกมานอกเซลล์ได้ โมเลกุลของลิกนินเป็นแบบไม่สมมาตร และมีมอนอเมอร์ภายในโมเลกุลหลายชนิดดังนั้นเอนไซม์กลุ่มออกซิโดรีดักเทส (Oxidoreductases) โดยส่วนใหญ่ ราฟอกขาวพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ โดยเฉพาะที่พบบริเวณเปลือกไม้ ท่อนไม้ หรือเศษไม้ ซึ่งเป็นแหล่งสำคัญของลิกนิน ตัวอย่างของราฟอกขาวที่พบได้แก่ *Ganoderma lucidum*, *Phellinus igniarius*, *Pycnoporus cinnabarinus* ดังแสดงในรูปที่ 4



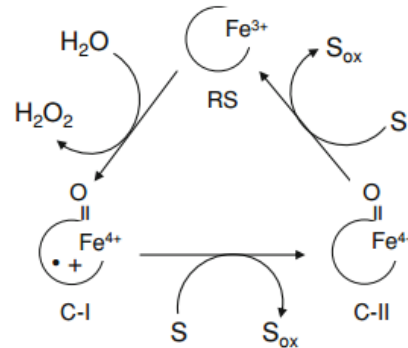
photo: Y.- C. Dai

รูปที่ 4 ราเน่าขาวที่พบได้ทั่วไป (Bhosle และคณะ, 2010, Tian และคณะ, 2013)

ราเน่าขาวมีกลไกในการย่อยสลายลิกนิน โดยใช้เอนไซม์กลุ่ม ลิกนินโนไลติกเอนไซม์ โดยประกอบไปด้วยเอนไซม์หลัก 3 ชนิดคือ ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (lignin peroxidase: E.C 1.11.1.14) แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (Manganese peroxidase: E.C.1.11.1.7) และเอนไซม์แลคเคส (laccase :E.C 1.10.3.2) (ten Have และTeunissen, 2001) แต่ในบางสายพันธุ์สามารถผลิตได้เพียงหนึ่งหรือสองชนิดเท่านั้น (Hatakka, 1994) การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ลิกนินโนไลติกเอนไซม์จะเกิดขึ้นโดยการสร้างโมเลกุลอนุมูลอิสระ เพื่อใช้ในการออกซิไดส์โมเลกุลสารอินทรีย์หลายชนิด ราฟอกขาวจะผลิตเอนไซม์กลุ่มนี้ออกมาในช่วงเมแทบอลิซึมแบบทุติยภูมิ (secondary metabolism) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับ ชนิด สัดส่วนของคาร์บอน และไนโตรเจนในอาหาร

2.4.1 ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (lignin peroxidase: E.C 1.11.1.14)

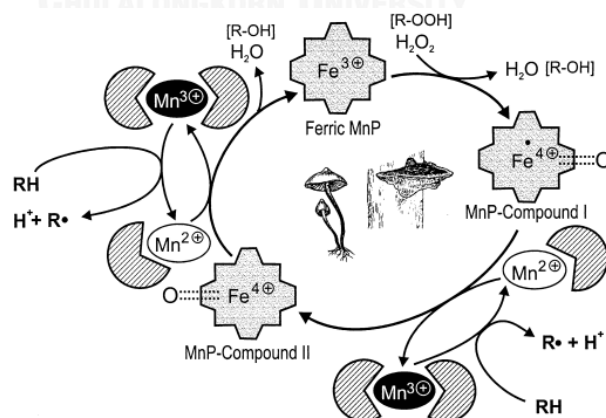
เป็นเอนไซม์ตัวแรกที่มีการค้นพบว่าสามารถย่อยสลายลิกนินได้โดยอาศัยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นตัวทำให้เกิดการตัดพันธะกลุ่ม $C\alpha-C\beta$ ของสารประกอบลิกนินได้ ลิกนินเปอร์ออกซิเดสเป็นเอนไซม์ที่มีศักยภาพในการย่อยสลายโดยสามารถตัดลิกนินที่มีลักษณะเป็น non phenolic propyl ของสารประกอบอะโรมาติกซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของโมเลกุลลิกนินได้ ลิกนินเปอร์ออกซิเดสจะเกิดปฏิกิริยาในภาวะที่มีไฮโดรเจนออกไซด์ สามารถออกซิไดซ์ veratyl alcohol, 3,4-dimethoxybenzyl alcohol ซึ่งเป็นสารประกอบอินทรีย์โมเลกุลเล็กๆ จากนั้นเอนไซม์จะสามารถออกซิไดส์ ได้จนเป็น veratryl aldehyde โดยราเน่าขาวนั้นสามารถ และขับลิกนินเปอร์ออกซิเดสออกมานอกเซลล์ (Linko, 1992) โดยกลไกของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสในธรรมชาติมีองค์ประกอบเป็น heme iron atom (Fe III) โดยปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นเมื่อมีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นตัวให้อิเล็กตรอน 2 อนุภาคแก่ oxo-iron cation radical (Fe IV-O) กลายเป็นสารประกอบ I (C-I) ซึ่งสามารถย่อยสลายลิกนินได้ จากนั้นจะเกิดการออกซิไดส์อีกครั้ง กลายเป็นสารประกอบ (C-II) และกลับเข้าสู่สภาวะเดิม (Tien และKirk, 1984) โดยแสดงดังรูปที่ 5



รูปที่ 5 กลไกการทำงานของลิกนินเปอร์ออกซิเดส (Marco-Urrea และReddy, 2012)

2.4.2 แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (Manganese peroxidase: E.C. 1.11.1.7)

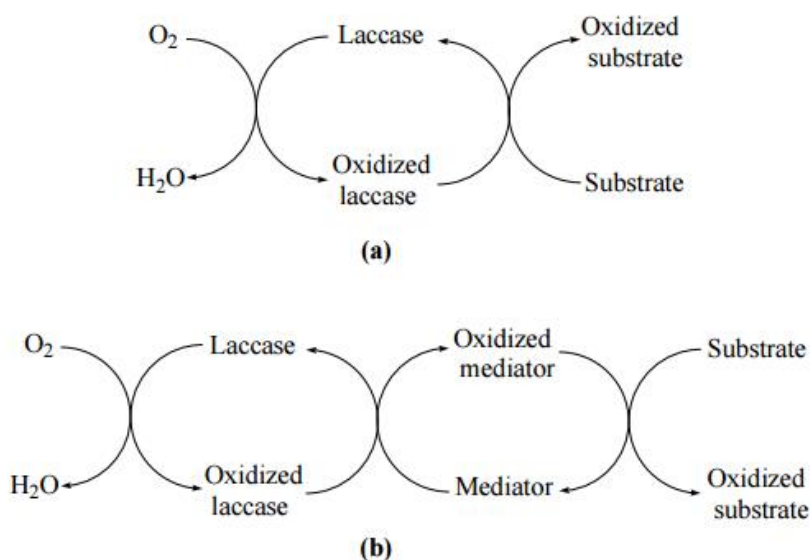
เป็นเอนไซม์กลุ่มเปอร์ออกซิเดสภายในโมเลกุลของเอนไซม์มีเหล็กไอออนเป็นองค์ประกอบ เช่นเดียวกับกับเอนไซม์กลุ่มลิกนินเปอร์ออกซิเดส การทำงานของเอนไซม์นี้มีกลไกคล้ายกับลิกนินเปอร์ออกซิเดส แต่มีข้อแตกต่างกันคือ ในปฏิกิริยาจะต้องมีไอออนของแมงกานีส (Mn^{2+}) ร่วมอยู่ด้วย มีงานวิจัยพบว่าปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรตบางชนิด เช่น ไคเมททอกซีฟินอล (Archibald และคณะ, 1990) และถูกกระตุ้นด้วยแลคเตท พบในอาหารเหลวที่ใช้เลี้ยง *Phanerochete chrysosporium* (Kuwahara และคณะ, 1984) กลไกการทำงานของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส เหมือนกับเอนไซม์กลุ่มเปอร์ออกซิเดสโดยทั่วไป โดยมีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยา และเปลี่ยนรูปไปเป็นสาร compound I (two electron oxidized form) หลังจากนั้นเปลี่ยนรูปไปเป็น compound II (one electron oxidized form) และ compound II กลับสู่ในภาวะปกติ (Forrester และคณะ, 1988) ดังแสดงในรูปที่ 6



รูปที่ 6 กลไกการเกิดปฏิกิริยาของแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (Balan และMonteiro, 2001)

2.4.3 แลคแคส (laccase: E.C 1.10.3.2)

เป็นเอนไซม์กลุ่มมัลติคอปเปอร์ออกซิเดส และถูกจัดอยู่ในกลุ่ม N - glycosylated extracellular blue oxidase และมีน้ำหนักโมเลกุลที่ 60 - 390 กิโลดาลตัน ถูกมักพบในกลุ่ม basidiomycetes (Reinhammar, 1984) โดยโมเลกุลของเอนไซม์แลคแคสประกอบด้วยโมเลกุลของ ไอออนคอปเปอร์ 4 อะตอม เพื่อใช้ในการออกซิเดชันสารอินทรีย์อาทิเช่น ฟีนอล พอลิฟีนอล และ สารประกอบอนินทรีย์ ใช้โมเลกุลออกซิโดซ์ 1 อะตอมในการออกซิโดซ์ โดยแลคแคสถูกค้นพบในพืช ชั้นสูง และเชื้อรา โดยแลคแคส ถูกค้นพบใน ต้นรักนา (*Rhus vernifera*) ในปี 1883 (Desai และ Nityanand, 2011) และถูกนำมาประยุกต์ใช้ในหลายอุตสาหกรรมในหลายประเภท อาทิเช่น การปรับสภาพเนื้อไม้เพื่อการผลิตเยื่อ และกระดาษ เพื่อการกำจัดลิกนิน โดยใช้ เอนไซม์ แลคแคส หรือ การฟอกสีกระดาษในโรงงานอุตสาหกรรมกระดาษ มักจะต้องใช้เอนไซม์แลคแคส และไซแลนเนส สำหรับการกำจัดลิกนิน และไซแลนออกจากกระดาษเพื่อความสว่าง เอนไซม์แลคแคสจะเกิดปฏิกิริยาใน ภาวะที่มีออกซิเจน ซึ่งเอนไซม์จะทำการออกซิโดซ์กับสับสเตรต (aromatic compound) โดย สารประกอบฟีนอลของลิกนินหรือผ่านสารตัวกลาง (mediator compound) ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารตั้ง ต้นร่วมดังรูปที่ 7 สารตัวกลางที่ใช้คือ 2,2-azinobis -[3-ethylbenzenzthiazoline-6-sulfonate] (ABTS) (Kunamneni และคณะ, 2008)



รูปที่ 7 กลไกการทำงานของเอนไซม์แลคแคส (a) ไม่ใช้สารตัวกลาง (b) ใช้สารตัวกลาง (Kunamneni และคณะ, 2008)

2.4.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินของราเนาขาว

การศึกษาการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนิน ได้ถูกศึกษากันอย่างกว้างขวาง โดยพบว่า เอนไซม์ย่อยสลายลิกนิน จะถูกผลิตออกมาเมื่อเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน โมเลกุลของลิกนินในช่วงการเจริญเติบโตแบบ ทูติยภูมิ ซึ่งจะไม่ให้พลังงานแก่ราเนาขาว (Gold และ Alic, 1993, Wesenberg และคณะ, 2003) โดยราเนาขาวยังคงขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ในการผลิตเอนไซม์ขึ้นอยู่กับ ชนิด และ ปริมาณขององค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ และ ไอออนของโลหะ เป็นต้น

2.4.4.1 สารอาหาร

โดยทั่วไปในการเหนี่ยวนำให้ราเนาขาวสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนิน มักจะใช้สภาวะการกระตุ้นในภาวะอาหารที่มีจำกัด เช่น จากการศึกษา การผลิตเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส และเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส จะมีแนวโน้มการผลิตที่สูงขึ้น เมื่อทำการเลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งของไนโตรเจนจำกัด (Kapich และคณะ, 2004) ซึ่งสอดคล้องกับ (Eggert และคณะ, 1996) รายงานว่าในอาหารที่มีไนโตรเจนต่ำ สามารถกระตุ้นการผลิตเอนไซม์ใน *Pycnoporus cinnabarinus* ได้ดี ในขณะที่ ราเนาขาวบางสายพันธุ์สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินในสภาวะที่มีความเข้มข้นที่สูง เช่น *Cyathus stecoreus*, *Gendoderma lucidum* โดยมีรายงานของ Sethuraman และคณะ (1999) และ D'souza และคณะ (1999) ให้กิจกรรมเอนไซม์แลคแคสสูง ขึ้น เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นสูงดังนั้น จะเห็นได้ว่า หากพิจารณาความสัมพันธ์ของการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนิน กับความเข้มข้นของสารอาหาร เช่นแหล่งไนโตรเจน พบว่า ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของราเนาขาวเป็นสำคัญ นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่ศึกษาถึงแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินของราเนาขาวมีดังนี้ Revankar และ Lele (2006) ศึกษาแหล่งคาร์บอนจำนวน 7 ชนิด ได้แก่ กลูโคส แลคโตส กลีเซอรอล ฟรุคโตส ซูโครส และสตาร์ช โดยจากการศึกษาพบว่า แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมคือ กลูโคสผสมกับ สตาร์ช ในอัตราส่วน 1:1 โดยให้กิจกรรม *Coriolus versicolor* MTCC 138 มากที่สุด โดยให้แอกติวิตีเอนไซม์แลคแคสสูงถึง 235 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และเมื่อศึกษาถึงแหล่งไนโตรเจน จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ ยีสต์สกัด แอล-แอสพาราจีน เปปโตน และ แอมโมเนียมซัลเฟต ภายใต้สภาวะการทดลองเดียวกัน โดยพบว่า ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อ *Coriolus versicolor* MTCC 138 โดยให้กิจกรรมเอนไซม์แลคแคส สูงถึง 185 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

2.4.4.2 ไอออนของโลหะ

โลหะหนักบางชนิดมีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของราเนาขาว เช่น คอปเปอร์ (Cu) แมงกานีส (Mn) และสังกะสี (Zn) เป็นต้น โดยราเนาขาวต้องการโลหะหนักเหล่านี้ปริมาณเล็กน้อย สำหรับกระบวนการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนิน แต่ในบางครั้งหากมีปริมาณที่สูงเกินไปอาจเป็นพิษ

ต่อราเนาขาวได้ จากการศึกษาของ Baldrain และ Gabriel (2002) พบว่า การเติมสังกะสีที่ความเข้มข้น 0.006 -1.8 มิลลิโมลาร์ และ คอปเปอร์ที่ความเข้มข้น 0.00004-1.2 มิลลิโมลาร์ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากโลหะจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส และ เอนไซม์ แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสจาก *Phanerochaete chrysosporium* จะเห็นได้ว่า โลหะทั้งสองชนิดมีความเกี่ยวข้องกันโดยตรงต่อปฏิกิริยาของเอนไซม์ย่อยสลายลิกนิน ในกรณีของเอนไซม์แลคเคสที่มีคอปเปอร์เป็นองค์ประกอบอยู่ภายในโครงสร้างของเอนไซม์นั้นๆ

2.5 กระบวนการโคแอกกูเลชัน

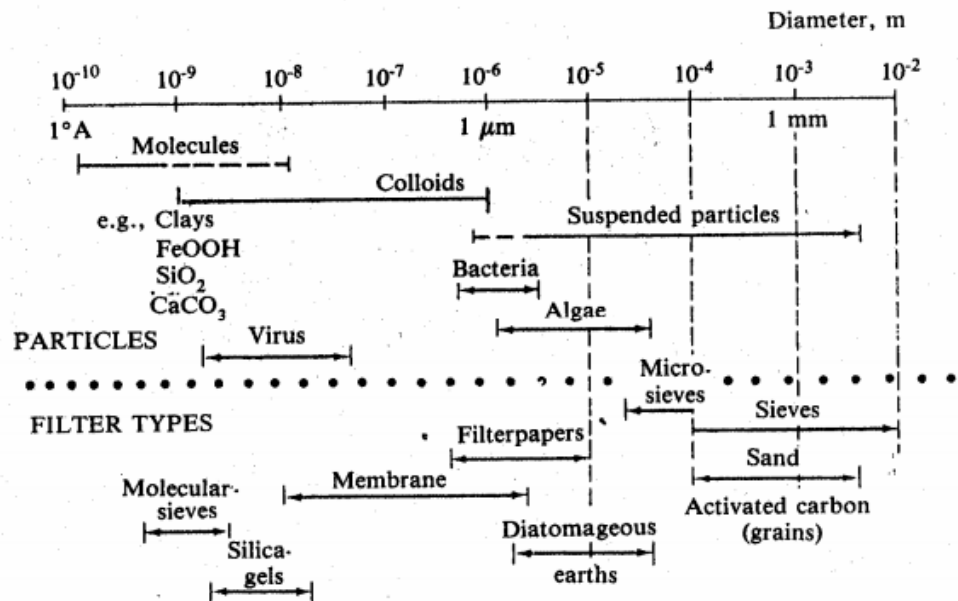
กระบวนการตกตะกอนที่เรียกว่ากระบวนการโคแอกกูเลชันเป็นกระบวนการที่เติมสารบางชนิดลงไปเพื่อให้อนุภาคขนาดเล็กรวมตัวกันเป็นตะกอนที่มีขนาดใหญ่ขึ้น (Sundstrom และ Klei,1979) โดย โคแอกกูเลชันเป็นกระบวนการการใช้สารเคมีเข้าทำปฏิกิริยากับสารแขวนลอยซึ่งส่วนมากจะเป็นประเภทคอลลอยด์ เพื่อทำลายเสถียรภาพ (destabilization) ระหว่างน้ำ และสารแขวนลอย ให้เกิดตะกอนปรากฏขึ้นอย่างเด่นชัด จนสามารถแยกตัวออกมาจากน้ำได้ง่าย หรือ สารแขวนลอยที่มีขนาดเล็กมาก ไล่ลงไปในน้ำเสียมีสภาพวะที่มีสารแขวนลอยอยู่เพื่อทำให้อนุภาคของสารแขวนลอย ไปรวมตัวกันกับอนุภาคแขวนลอยในน้ำเสียเพื่อให้มีขนาดที่ใหญ่ขึ้น และทำการกำจัดตะกอนดังกล่าว โดย วิธีการตกตะกอน (sedimentation) การรวมตัวกันของตะกอน (flocculation) กระบวนการกรอง (filtration) หรือกระบวนการปั่นเหวี่ยง (centrifuge) หรือกรรมวิธีอื่นใดเพื่อกำจัดตะกอนออกไป ในกระบวนการโคแอกกูเลชันต้องใส่สารเคมีเพื่อใช้ในการตกตะกอน (coagulant) ลงไปในน้ำเสียเพื่อทำลายเสถียรภาพคอลลอยด์ (มันสิน ตันตุลเสถียร,2552)

การสร้างแกนตะกอนจะกระทำโดยการใส่สารเคมีซึ่งเมื่ออยู่ในรูปสารละลายแล้วจะให้ประจุบวกเรียกว่า Couperin เมื่อเข้าทำปฏิกิริยากับสารคอลลอยด์ซึ่งเป็นสารคอลลอยด์ซึ่งเป็นประจุลบอยู่แล้วจะทำให้พลังงานไฟฟ้าเรียกว่า Zeta potential ที่มีอยู่รอบประจุลบลงมาจากทำให้แรงผลัก (repulsive force) มีน้อยลง ดังนั้นแรงดึงดูด (attractive force หรือเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า Van der Waal's force) ที่กระทำต่อประจุอยู่ข้างเคียงจะเพิ่มขึ้น และเมื่อประจุเหล่านี้เคลื่อนที่เข้าใกล้กันในระยะที่มีผลจะช่วยให้เกิดการดึงดูดเข้าหากัน

2.5.1 อนุภาคคอลลอยด์

ลักษณะที่เห็นได้ชัดที่น้ำเป็นที่น่ารังเกียจ คือ สารแขวนลอยหรือความขุ่น ประสิทธิภาพในการกำจัดความขุ่นโดยใช้กระบวนการโคแอกกูเลชันจะง่ายหรือยากนั้นขึ้นอยู่กับขนาดของมัน เช่น ความขุ่นที่เกิดจากอนุภาคขนาดใหญ่ย่อมสามารถกำจัดออกจากน้ำได้ง่ายกว่าอนุภาคขนาดเล็ก อนุภาคที่มีขนาดอยู่ในช่วง 1×10^{-6} มิลลิเมตร (1 นาโนเมตร) จนถึง 1×10^{-3} มิลลิเมตร (ไมครอน) เป็นอนุภาคคอลลอยด์ ดังแสดงในรูปที่ 8 โดยอนุภาคคอลลอยด์แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือพวกที่ชอบน้ำ

(hydrophilic) จะมีแรงยึดเหนี่ยวกับสารตัวกลาง ในที่นี้คือน้ำที่มีกำลังแรง จึงแยกออกจากน้ำได้ยาก ต้องใช้แรงมากในการทำให้อนุภาคต่าง ๆ นั้นจับเป็นกลุ่มเป็นก้อน เพราะมีโมเลกุลของน้ำห่อหุ้มอยู่ ส่วนอีกชนิดหนึ่งคือพวกที่ไม่ชอบ (hydrophobic) พวกนี้จะมีแรงยึดเหนี่ยวกับน้ำที่มีกำลังอ่อน เป็นอนุภาคที่สามารถออกจากน้ำโดยง่าย เพราะไม่มีโมเลกุลของน้ำเป็นสิ่งกีดขวาง (Eckenfelder, 1989) ลักษณะของอนุภาคของสารแขวนลอยในน้ำสามารถแสดงได้ดังนี้



รูปที่ 8 การจำแนกขนาดของสารต่างๆในน้ำ (Benefield, Judkins และ Weand, 1982)

2.5.2 การสร้างตะกอน (Benefield et al., 1982)

เป็นการทำลายเสถียรภาพคอลลอยด์ขึ้นอยู่กับแรงผลักรวมและแรงดูดระหว่างอนุภาค คอลลอยด์ แรงผลักรวมเกิดขึ้นจากศักย์ไฟฟ้าซึ่งเป็นแรงที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติของอนุภาคขนาดเล็ก และโมเลกุล แรงผลักรวมมากกว่าแรงดูดทำให้อนุภาคคอลลอยด์มีเสถียรภาพ และแขวนลอยอยู่ในน้ำได้ โดยกลไกการทำลายเสถียรภาพคอลลอยด์ประกอบไปด้วยกลไก 4 แบบดังนี้

2.5.2.1 กลไกลดความหนาของชั้นกระจาย (Diffuse Layer) เป็นการทำลายเสถียรภาพของอนุภาคคอลลอยด์ โดยลดค่าศักย์ไฟฟ้าโพเทนเชียล (Zeta potential) โดยการเพิ่มจำนวนไอออนที่มีประจุตรงกันข้ามกับประจุของอนุภาค ผลคือชั้นกระจายที่มีความหนาลดลง ทำให้ค่าศักย์ไฟฟ้าโพเทนเชียลลดลงด้วย ด้วยวิธีลดความหนาของชั้นกระจายไม่ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของคอลลอยด์โดยไม่ว่าจะเติมไอออนบวกมากเพียงใด จะไม่สามารถทำให้คอลลอยด์เปลี่ยนประจุไฟฟ้าจากลบเป็นบวก (Charge Reversal)

2.5.2.2 กลไกดูดติดผิวและทำลายประจุของอนุภาคคอลลอยด์ (Adsorption and Charge Neutralization) โดยการเติมสารเคมีที่ประจุไฟฟ้าตรงกันข้ามกับอนุภาคคอลลอยด์และสามารถดูดติดผิวบนอนุภาคคอลลอยด์ได้

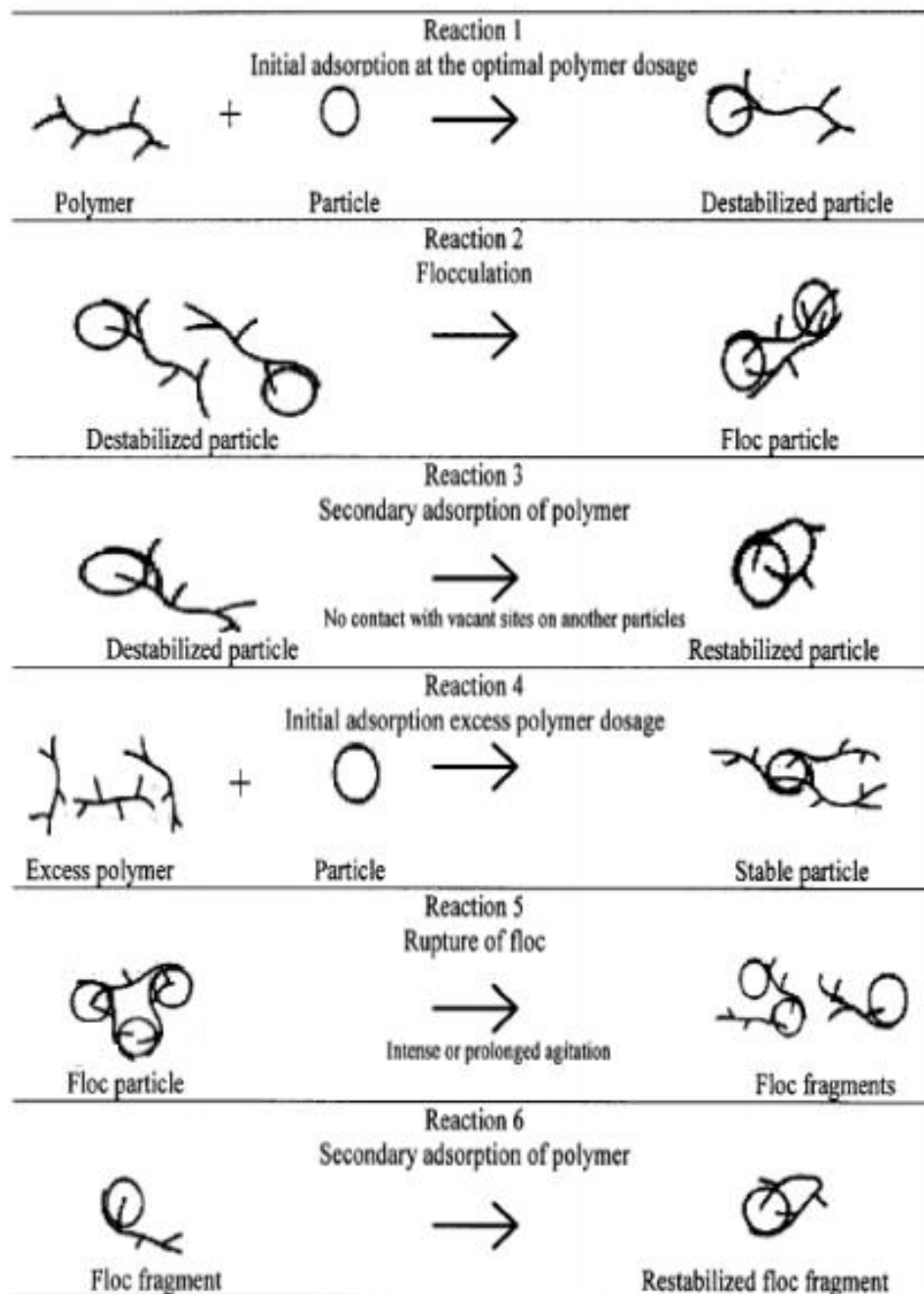
2.5.2.3 กลไกการสร้างผลึกขึ้นมาเพื่อให้อนุภาคคอลลอยด์มาเกาะจับ (Sweep Coagulation) เกิดโดยการเติมสารเคมีบางชนิดลงไป ทำให้เกิดผลึกของสารประกอบ ที่มีลักษณะเหนียว สามารถห่อหุ้มอนุภาคคอลลอยด์ ทำให้มีผลึกขนาดใหญ่ และมีน้ำหนักมาก เช่น การใส่สารส้ม ให้เกิดผลึก $Al(OH)_3$ เพื่อให้อนุภาคมาเกาะแลรวมกันเป็นตะกอน ฟล็อกได้เป็นการเติมสารประกอบเกลือของโลหะบางชนิดลงไป ในน้ำในปริมาณที่มากพอที่สารประกอบเกลือจะตกผลึกในน้ำขึ้น โดยมีอนุภาคคอลลอยด์เป็นแกนในของผลึก ถือว่าเป็นการเพิ่มขนาดหรือน้ำหนักให้คอลลอยด์สามารถตกตะกอนได้ สารประกอบเกลือของโลหะที่ใช้สร้างผลึกในที่นี้ ได้แก่ สารส้ม ($Al_2(SO_4)_3$) เมื่อละลายน้ำแล้วสามารถตกผลึกเป็น $Al(OH)_3$ ความสามารถในการละลายน้ำของของแข็ง ในที่นี้คือ สารส้มจะแตกตัวให้ Al^{3+} ซึ่งสามารถรวมตัวกับไฮดรอกไซด์ในน้ำ (OH^-) และตกผลึกทางเคมีเป็นอลูมิเนียมไฮดรอกไซด์ ($Al(OH)_3$) ได้ กรณีจะเกิดขึ้นได้ถ้าผลคูณของความเข้มข้นไอออนทั้งสอง (Al^{3+} และ OH^-) มากกว่าค่าความสามารถในการละลายน้ำ (K_{sp}) ดังสมการ

$$[Al^{3+}][OH^-] > K_{sp} \text{ โดยไฮดรอกไซด์มาจากความเป็นต่างในน้ำ}$$

(กลไกแบบห่อหุ้มนี้จะใช้ปริมาณสารส้มมากกว่ากลไกแบบดูดติดผิว/ทำลายประจุ ซึ่งจะเกิดขึ้นได้ก็ต่อเมื่อ $[Al^{3+}][OH^-] < K_{sp}$ มิฉะนั้นจะเกิดเป็นกลไกแบบห่อหุ้มแทน) ปริมาณสารส้มที่ต้องใช้จะแปรผกผันกับความเข้มข้นของคอลลอยด์ในน้ำ เช่น น้ำที่มีความขุ่นน้อยต้องใช้สารส้มมากเพื่อสร้างผลึกจำนวนมากมาเป็นเป่าส้มฝักกับคอลลอยด์

2.5.2.4 กลไกสร้างสะพานเชื่อมต่อนอนุภาคคอลลอยด์ (Polymer Bridging)

อธิบายโดยโมเดลที่ว่า Polymer bridging ในขั้นตอนแรก โมเลกุลของสารช่วยสารตะกอนและคอลลอยด์ จะเกาะติดบนอนุภาคคอลลอยด์ อาจเนื่องมาจากประจุที่ต่างกันระหว่างสารช่วยสารตะกอนและคอลลอยด์ สำหรับอนุภาคที่มีสารช่วยสร้างตะกอนเกาะติดอยู่จะมีปลายอิสระสำหรับเกาะติดอนุภาคอื่น ถือว่าเป็นอนุภาคที่สูญเสียเสถียรภาพแล้ว (destabilization) ขั้นตอนต่อมาอนุภาคดังกล่าวจะไปรวมกับอนุภาคอื่นโดยมีสารช่วยสร้างตะกอนเป็นสะพานเชื่อม ทำให้เกิดฟล็อกขนาดใหญ่และสามารถแยกตัวจากน้ำได้ง่าย ดังแสดงในรูปที่ 9 ถ้าใช้สารช่วยสารตะกอนมากเกินไป จะทำให้เกิดผลเสียเนื่องจากสารช่วยสร้างตะกอนหลายโมเลกุลจะไปเกาะอนุภาคคอลลอยด์ จนไม่มีที่ว่างบนอนุภาคสำหรับเป็นที่จับของปลายอิสระของสารช่วยสร้างตะกอน ซึ่งอยู่บนอนุภาคอื่น ซึ่งเรียกว่าอนุภาคที่มีเสถียรภาพกลับคืนมาใหม่ (restabilized) นอกจากนี้การกวนน้ำแรงเกินไปก็จะทำให้เสถียรภาพของคอลลอยด์กลับคืนมาเช่นกัน



รูปที่ 9 กลไกของการทำลายของคอลลอยด์แบบต่อเชื่อมด้วยพอลิเมอร์ (Faust, S.D. and Aly 1983)

2.5.3 โคแอกูแลนต์ (Coagulant) คือ สารเคมีที่ใช้ในกระบวนการโคแอกูเลชันโดย เมื่อเติมสารโคแอกูแลนต์ลงไปลงในน้ำ มันจะแตกสลายไอออนบวก และลบที่มีวาเลนซ์ (valance) ไอออนบวกสามารถทำปฏิกิริยากับ OH^- ทำให้เกิดคอลลอยด์ และสารประกอบโลหะ ไฮดรอกไซด์ซึ่งมีประจุบวก สารไฮดรอกไซด์สามารถจับตัวกันอนุภาคคอลลอยด์ ทำให้มีแรงผลักระหว่างอนุภาคคอลลอยด์ ซึ่งเป็นการทำลายเสถียรภาพคอลลอยด์ โดยสารโคแอกูแลนต์ ที่ใช้โดยทั่วไปมีหลายชนิด ได้แก่

2.5.3.1 สารส้ม ($\text{Al}_2 (\text{SO}_3)_4$)

โดยปกติ สารส้มให้ผลดีในการกำจัดความขุ่นเมื่อน้ำมีพีเอชอยู่ในช่วง 6 -7 เหมาะกับน้ำดิบที่มีความขุ่น และความเป็นต่างในระดับสูง ซึ่งเป็นน้ำที่สร้างโคแอกูแลนต์ได้ง่าย

2.5.3.2. เฟอร์ริกคลอไรด์ (FeCl_3)

สามารถใช้เป็นโคแอกูแลนต์แทนสารส้มได้ เหมาะกับน้ำที่มีพีเอชในช่วง 5 -7 เหมาะกับน้ำดิบที่มีความขุ่น และความเป็นต่างในระดับสูง ปฏิกิริยาระหว่างเฟอร์ริกคลอไรด์กับน้ำจะได้ผลึกเฟอร์ริกไฮดรอกไซด์ ($\text{Fe}(\text{OH})_3$) (ตรงข้ามกับสารส้ม จะให้ผลึกอลูมิเนียมไฮดรอกไซด์)นอกจากนี้เฟอร์ริกคลอไรด์ยังเหมาะที่จะใช้กับน้ำอ่อนที่มีสีเข้ม ซึ่งการใช้สารส้มจะไม่ได้ผลดี

2.5.3.3. สารส้ม ($\text{Al}_2 (\text{SO}_3)_4$) ร่วมกับปูนขาว ($\text{Ca} (\text{OH})_2$)

สำหรับกรณีที่น้ำดิบมีความเป็นต่างต่ำเกินไป จึงจำเป็นต้องเติมปูนขาวเพื่อเพิ่มความเป็นต่างให้กับน้ำ เพื่อสะเทินความเป็นกรดที่จะเพิ่มขึ้นเมื่อใส่สารส้มลงไป หากไม่ใช้ปูนขาว จะใช้โซดาแอช (Na_2CO_3) แทนก็ได้

2.5.3.4. เฟอร์รัสซัลเฟต (FeSO_4) ร่วมกับปูนขาว ($\text{Ca}(\text{OH})_2$)

เฟอร์รัสซัลเฟตสามารถใช้แทนสารส้มได้ ปฏิกิริยาระหว่างเฟอร์รัสซัลเฟต และปูนขาวจะได้ผลึกเฟอร์ริกไฮดรอกไซด์ ($\text{Fe}(\text{OH})_3$) มีเนื้อแน่น และตกตะกอนดี

2.5.3.5. แมกนีเซียมคาร์บอเนต (MgCO_3) และปูนขาว ($\text{Ca}(\text{OH})_2$)

ปฏิกิริยาระหว่างแมกนีเซียมคาร์บอเนต และปูนขาวจะได้ผลึก $\text{Mg}(\text{OH})_2$ ลักษณะคล้ายปุ๋ย $\text{Al}(\text{OH})_3$ แต่มีน้ำหนักมากกว่า ลดปัญหาการกำจัดกากตะกอนเลน

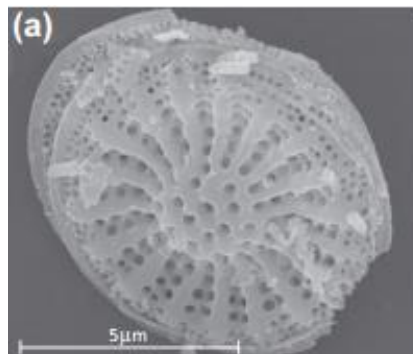
2.5.4 โคแอกูแลนต์เฮด (Coagulant aid)

เป็นสารเคมีที่เติมร่วมกับโคแอกูแลนต์เพื่อช่วยให้เกิดโคแอกูเลชันได้ดียิ่งขึ้น ได้แก่

2.5.4.1. พอลิเมอร์ เป็นสารโคแอกูแลนต์เฮดที่นิยมใช้มากที่สุดในปัจจุบัน แบ่งเป็นโพลีเมอร์แบบประจุบวก แบบประจุลบ และแบบไม่มีประจุ โดยโพลีเมอร์แบบประจุลบ และแบบไม่มีประจุนิยมใช้ร่วมกับสารส้มเพื่อให้เกิดการเกาะกันระหว่างฟล็อกได้ดียิ่งขึ้น โดยเติมหลังการเติมสารส้ม โพลีเมอร์ยังช่วยลดการใช้สารส้มลงได้มาก ตะกอนสลัดจ์ที่เกิดขึ้นมีปริมาณลดลง และกำจัดน้ำออกได้ง่าย

2.5.4.2. แอคติเวตเต็ดซิลิกา (Activated silica) นิยมใช้กับน้ำดิบที่มีความขุ่นน้อย เพื่อให้เกิดโคแอกูเลชันได้ดี แอคติเวตเต็ดซิลิกาจะเป็นเป่าสัมผัสเพิ่มเติมให้กับน้ำ และช่วยลดปริมาณสารส้ม ฟล็อกที่เกิดขึ้นมีขนาดใหญ่ ตกตะกอนได้ง่าย

2.6 ดินเบา



รูปที่ 10 ลักษณะของดินเบา (Michen และคณะ, 2011)

ดินเบา (diatomaceous Earth) คือ หินตะกอนชนิดโดยมีลักษณะเป็นสสารกลุ่ม ซิลิกาอนออกไซด์โดยเกิดมาจากการทับถมของสาหร่ายเซลล์เดี่ยวเรียกว่า ไดอะตอม (Diatom) โครงสร้างผนังเซลล์ไดอะตอม มีโครงสร้างที่มีรูพรุน ทำให้มีความสามารถในการดูดซับสารพิษ หรือสี และผนังเซลล์ส่วนใหญ่ประกอบด้วยซิลิกา 80-90% ซึ่งเป็นซิลิกาเนื้อออปอล์ทำให้ดินเบามีความเฉื่อยในการเกิดปฏิกิริยาเคมีจึงมีการนำไปเป็นตัวเติมในอุตสาหกรรมสี ยาง และพลาสติก โดยดินเบามีส่วนประกอบทางเคมีดังนี้ ซิลิกาออกไซด์ ร้อยละ 62.05-69.06 อะลูมินาออกไซด์ ร้อยละ 11.88-15.68 เพอริคออกไซด์ ร้อยละ 3.56-9.15 และ แคลเซียมออกไซด์ร้อยละ 0.20-0.89

2.6.1 กำเนิดดินเบา

ดินเบาเกิดจากการทับถมของสาหร่ายน้ำจืดในบริเวณทะเลสาบน้ำจืดซึ่งโดยทั่วไปจะอาศัยอยู่ในช่วงระดับผิวน้ำถึงความลึกไม่เกิน 35 เมตร โดยสภาวะทางเคมีของทะเลสาบซึ่งเหมาะสมสำหรับการเจริญของไดอะตอมควรมีสารละลายซิลิกาอยู่ในน้ำ 5-25 มิลลิกรัม/ลิตร สภาพความเป็นด่าง 1-10 มิลลิกรัมสมมูล/ลิตร มีแก๊สซัลเฟอร์ไดออกไซด์พอเหมาะ มีสารอาหารต่างๆอุดมสมบูรณ์ เช่น ฟอสเฟต ไนเตรต และอื่นๆ และปราศจากสารที่เป็นพิษ สำหรับไดอะตอมที่พบเป็นชนิด *Melosira granulata* (HER.) RALFS. , *Navicula* spp. และ *Fragilaria* spp. โดยส่วนใหญ่เป็นชนิด *Melosira granulata* ซึ่งอายุของไดอะตอมชนิดนี้อยู่ในช่วงไมโอซีนถึงปัจจุบันเมื่อไดอะตอมตายก็จะตกลงสู่ท้องน้ำทับถมกันเช่นกันตะกอนทั้งหลายส่วนที่เป็นอินทรีย์วัตถุจะสลายตัวไปหมดที่คงเหลืออยู่บ้างภายใต้ความร้อน และความกดดันโดยมักมี ดิน ทราย สารคาร์บอนเนต และแก้วภูเขาไฟแทรกเจืออยู่ด้วย ซากเหล่านี้ก็จะสะสมจนมีความหนา และค่อยๆจับตัวกันแน่นเข้าจนกลายเป็นแหล่งดินเบาเมื่อแหล่งสะสมนี้ถูกยกตัวขึ้นพ้นระดับน้ำมีการชำระล้างทำลายเป็นตะกอนเกิดการทับถมสะสมตัวขึ้นใหม่กลายเป็นแหล่งแร่ที่น่าสนใจในปัจจุบัน

2.6.2 สมบัติทางฟิสิกส์ดินเบา

ดินเบา มีลักษณะเป็นฝุ่น ผงขนาดเล็ก มีหลายสีขึ้นอยู่กับองค์ประกอบ ตั้งแต่สีขาว จนถึงสีเทาและสีเหลือง จนถึงสีแดง ดินเบาเกิดมาจากเศษซากของไดอะตอมที่ตายแล้ว ทำให้มีโครงสร้างที่แตกต่างกันออกไป โดยส่วนมากมีโครงสร้างเป็น ซิลิกอน ออกไซด์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้าเกิดมาจากไต้ทะเล ปริมาณของซิลิกาแบบผลึกจะมีความเข้มข้นมากกว่าไดอะตอมไมค์ที่พบบริเวณน้ำจืดประมาณ 2-7% โดยในไดอะตอมไมค์ที่พบในบริเวณน้ำจืดมีซิลิกอนน้อยกว่า 1% ค่าความถ่วงจำเพาะของไดอะตอมไมค์ โดยมาจากการคิดคำนวณจากควาหนาแน่นพบว่า มีค่าอยู่ระหว่าง 220 – 230 กรัมต่อลิตร ถึง 670 กรัมต่อลิตร ค่า pH โดยเฉลี่ยของไดอะตอมไมค์มีค่าตั้งแต่ 4.4 -9.2 ไม่มีกลิ่น ความชื้นมีค่าตั้งแต่ 2-6% ไม่สามารถละลายในน้ำ จุดไม่ติดไฟ ในกรณีที่ดินเบาที่มีโครงสร้างเป็นอสัณฐานมักมีแร่ธาตุอื่น อยู่ อาทิเช่น อะลูมิเนียม แมกนีเซียม โซเดียม เหล็ก ฟอสฟอรัส ซัลเฟต นิกเกิล สังกะสี และแมกกาเนส (Michen และคณะ, 2011, Quarles และ Winn, 1996)

2.6.3 สมบัติทางเคมีของดินเบา

ดินเบาบริสุทธิ์ประกอบด้วย แร่โอปาลีน (opaline) หรือ ไฮโดรซิลิกา (hydro silica) กับสารอนินทรีย์อื่นๆ เล็กน้อยเช่น แร่อะลูมิเนียม , โลหะอัลคาไลน์ เปนตน ดินเบาดีบอาจมีอินทรีย์สาร หิน ทรายดิน หรือคาร์บอนเนตในปริมาณต่างๆ โดยในตารางที่ 3 พบว่าว่องคประกอบส่วใหญ่ของดินเบาคือ ซิลิกา จึงทำให้พื้นที่ผิวส่วนใหญ่ของดินเบาเปนหุม silanol (ซิลานอล) ทำให้สามารถดูดซับโมเลกุลที่มีขั้วได้ (ชัยศรี สุขสาโรจน์, 2555)

ตารางที่ 3 แสดงผลการวิเคราะห์ทางเคมีของดินเบาจากแหล่งแร่ต่างๆ

1. Hollywood, California
2. Dragowistiza near Sofia, Bulgaria
3. The Gurmen deposit, Blagoevgrad, Bulgaria
4. อำเภอมะทะ จังหวัดลำปาง

ส่วนประกอบ	(Pettijohn, 1957)	(Zadrozny และคณะ, 2013)	(Atanasov, 1974)	(ชฎาภรณ์ บุญแท้, 2554)
SiO ₂	73.71	68.8	83.5	68.14
Al ₂ O ₃	7.25	13.7	10.56	13.75
Fe ₂ O ₃	2.63	5.3	2.04	5
MgO	1.47	0.9	0.67	0.87
CaO	1.72	1.1	1.18	0.42
Na ₂ O	1.19	1.8	2.05	1
K ₂ O	1	1.8	2.05	-

2.6.4 ประโยชน์ของดินเบา (ชฎาภรณ์ บุญแท้, 2545)

ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมของดินเบา อาจแบ่งออกได้ดังนี้

1. ใช้เป็นตัวกรอง (Filtering agent) ดินเบาถูกประยุกต์เพื่อกรองสิ่งสกปรกออกจากของเหลวจำพวกสารเคมีเนื่องจากดินเบาค่อนข้างเฉื่อยต่อการทำปฏิกิริยา โดยถูกใช้อย่างแพร่หลาย เช่น ถลุงแร่โลหะ ยา เครื่องดื่ม ปีโตรเลียม น้ำยาซักแห้ง
2. ในอดีตใช้เป็นสารเคลือบผลไม้ เพื่อป้องกันแมลง เนื่องจาก ซิลิกาเป็นพิษต่อระบบทางช่องท้องของแมลง ในกรณีแมลงขนาดเล็ก
3. ใช้เป็นตัวเติม (Mineral fillers) ในอุตสาหกรรมต่างๆเรียงตามลำดับความสำคัญคือผสมทำสีทาภายในอาคาร กระจก ยางล้อแมลง พลาสติก แอสฟัลต์ ปูน ท่อต่อ หมึกพิมพ์วัสดุระเบิด ไม้ขีดไฟ ทันตกรรม
4. ใช้เป็นตัวดูดซับ (Absorbent) ใช้สำหรับเป็นสารเคมีทำลายเชื้อโรค ทำดินระเบิดเชื้อเพลิงแข็ง ประโยชน์ที่สำคัญอันหนึ่งก็คือ ใช้ในอุตสาหกรรมเกี่ยวกับสารทำความสะอาดพื้น
5. ใช้เป็นวัสดุขัดสีอย่างอ่อน (Mild abrasive) ส่วนใหญ่กับเครื่องเงิน โลหะ และรถยนต์ที่ดีที่สุดของโลกขัดด้วยสารที่มีส่วนผสมของดินเบา

2.6.5 แหล่งแร่

แหล่งดินเบาที่สำคัญๆของโลกมีทั้งชนิดที่เกิดในน้ำทะเล และน้ำจืดอายุต่างๆกันตั้งแต่ยุคน้ำแข็งตอนกลางของยุค ควอเทอนารี (Quaternary) ถึง เทอร์เชียรี (Tertiary) แหล่งสะสมในบริเวณที่พื้นโลกตื่นตัวอยู่เสมอมักมีขนาดเล็ก พบแหล่งดินเบาที่เกิดในยุค พาเลโอจีน (Paleocene) และ ครีเตเชียส (Cretaceous) บ้าง แต่แหล่งดินเบาเหล่านี้มักจะมีคุณภาพค่อนข้างต่ำ และไม่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจแหล่งดินเบาในประเทศไทยพบที่จังหวัดลำปางกระจัดกระจายอยู่ 5 แหล่งภายในแอ่งลำปางคือ

1. บ้านม่อนหินแก้ว ตำบลวังพร้าว อำเภอเกาะคา จังหวัดลำปาง
2. วัดม่อนศรีวัน ตำบลพิชัย อำเภอเมือง จังหวัดลำปาง
3. บ้านห้วยน้ำเค็ม ตำบลบ้านแลง อำเภอเมือง จังหวัดลำปาง
4. บ้านหนองถ้อย ตำบลนาคร้ว อำเภอแม่ทะ จังหวัดลำปาง
5. ตำบลกล้วยแพะ อำเภอเมือง จังหวัดลำปาง

แหล่งแร่เกิดแผ่อำณาเขตเป็นบริเวณกว้างขวาง ชั้นดินเบามีความหนาประมาณ 1-10 เมตร ดินผิวหน้าประกอบด้วย กรวดทราย และดินลูกรัง หนาประมาณ 4 เมตร (ธัญรัตน์ เลิศโฆษิตพงศ์, 2553 อ้างถึงใน ดร.ณิ สายสุทธิชัย, 2542)

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

พิชัมพร ระย้า (2552) ศึกษาการฟอกสีน้ำเสียจากอุตสาหกรรมเยื่อ และกระดาษ โดยคัดแยกราเนาขาวในเขตร้อน โดยเก็บตัวอย่างราเนาขาว 35 สายพันธุ์ โดยทำการทดสอบกิจกรรมแลคแคสของสายพันธุ์ที่ดีที่สุดคือ *Pycnoporus sanguineus* CM1 จึงนำสายพันธุ์นี้มาหาภาวะเหมาะสมในการผลิตแลคแคสโดยคัดเลือกแหล่งคาร์บอนโดยใช้ น้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นร้อยละ 2 และแหล่งไนโตรเจนโดยใช้ เปปโตน 0.25 ให้ค่ากิจกรรมแลคแคสสูง 0.67 ± 0.125 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ ให้ค่ากิจกรรมแลคแคสสูง 0.85 ± 0.04 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และคอปเปอร์ซัลเฟตที่มีความเข้มข้น 0.06 มิลลิโมลาร์ ให้ค่ากิจกรรมแลคแคสสูงสุดเท่ากับ 1.60 ± 0.06 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และได้ทำการให้เอนไซม์บริสุทธิ์โดยใช้กิจกรรมแลคแคสสูงถึง 3.45 เท่าโดยราเนาขาวดังกล่าว น้ำเสียจากอุตสาหกรรมเยื่อ และกระดาษมีค่าบีโอดีเริ่มต้นที่ 7,915 มิลลิกรัมต่อลิตร และค่าซีโอดีเริ่มต้น 13,260 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถลดค่าบีโอดี และซีโอดีร้อยละ 13 และ 16 ตามลำดับ และเมื่อนำ *Pycnoporus sanguineus* ตรึงรูปสามารถใช้เซลล์ตรึงรูปซ้ำ 2 รอบ โดยสามารถลดค่า บีโอดี และซีโอดีครั้งที่ 1 ร้อยละ 74 44.2 และ 5 ตามลำดับ และครั้งที่ 2 สามารถลดค่า บีโอดีได้ร้อยละ 73 และ 33 ตามลำดับ และได้นำแลคแคสมาตรึงรูป สามารถใช้ซ้ำ ได้ 6 รอบ โดยครั้งแรกสามารถลดค่า บีโอดีได้ร้อยละ 74 และ ครั้งสุดท้ายได้ร้อยละ 13.28

ชามา เยี่ยงมานิต (2555) ศึกษาการบำบัดน้ำดำจากโรงงานเยื่อกระดาษโดยโคแอกกูเลชัน/ฟล็อกกูเลชันร่วมกับราเนาขาวค่าซีโอดีน้ำดำเริ่มต้นมีค่า 140,000 มิลลิกรัมต่อลิตร สีมี่ค่า 554,000 แพลทตินัมโคลอไรด์ และความขุ่น 1,230 เอ็นทียู และค่าพีเอช เท่ากับ 14 โดยพบว่าค่าความเป็นกรด ต่างที่เหมาะสมในการบำบัดน้ำดำจากโรงงานเยื่อกระดาษคราฟต์เพื่อแยกตะกอนลิกนินออกคือ ค่าความเป็นกรด - ต่าง เท่ากับ 3 โดยสามารถกำจัดค่าซีโอดี และสีเท่ากับ 95.7 และ 96.6 ตามลำดับ และได้บำบัดน้ำดำผ่านกระบวนการโคแอกกูเลชัน โดยสารโคแอกกูแลนต์ที่เหมาะสมคือ พอลิอะลูมิเนียมคลอไรด์ ระยะเวลาในการกวนผสมที่เหมาะสมคือ 4 นาที และเวลาในการตกตะกอนที่ 60 นาที โดยในทุกสภาวะให้ร้อยละ 98 จากสภาวะเริ่มต้น หลังจากนั้นนำน้ำดำที่ผ่านกระบวนการโคแอกกูเลชันมาบำบัดด้วยกระบวนการฟล็อกกูแลชัน ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมคือ สารละลายโคโคเดแซนที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร กวนด้วยความเร็วรอบ 40 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที และตั้งทิ้งไว้ 60 นาที จากนั้นนำน้ำดำที่ผ่านกระบวนการบำบัดทางชีวภาพโดยใช้ราเนาขาวคือ *Phanerochaete sordida* แสดงร้อยละการกำจัดสูงสุดของซีโอดี และสีร้อยละ 57.9 54.3 และ 6.9ตามลำดับ และผ่านกระบวนการบำบัดโดยใช้กระบวนการดูดซับบนถ่านกัมมันต์ให้ผลร้อยละการกำจัดซีโอดีและสีที่ร้อยละ 99.7 99.8 ตามลำดับ

Prasongsuk และคณะ (2009) ศึกษาการลดสีน้ำดำจากโรงงานเยื่อกระดาษคราฟต์โดยใช้ราเนาขาวที่มีคุณสมบัติทนร้อน ได้ทำการคัดแยกราเนาขาวทั้ง 20 ตัวอย่าง พบว่ามี 8 ตัวอย่างที่สามารถทนร้อน และสามารถผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโอไลติกโดยใช้ *Phanerochaete chrysosporium* เป็นตัวเปรียบเทียบจาก 8 ตัวอย่างมี 3 สายพันธุ์ที่สามารถเจริญเติบโตได้ที่ 40 องศาเซลเซียส *Daedaleopsis* sp. , *Schizophyllum commune* PT และ *S. commune* SL.

และนำราทั้ง 3 สายพันธุ์มาทดสอบกับอาหารที่ทดสอบเอนไซม์กลุ่มแมงกานีสออกซิเดสพบว่า มีเพียง *Daedaleopsis* sp. ที่สามารถเจริญเติบโตได้ และพบว่า *Daedaleopsis* sp. สามารถลดสีได้ดีกว่า สายพันธุ์มาตรฐานถึง 34 %

พิมพ์ชนก เต็งเจริญ (2546) ศึกษาความเป็นไปได้ในการลดสี และลักษณะของน้ำทิ้งในการผลิตลิกนินด้วยราที่แยกได้จากเห็ด และกิ่งไม้ผุ โดยเก็บตัวอย่างเห็ดเป็นจำนวน 20 ตัวอย่าง และ กิ่งไม้ผุ 22 ตัวอย่าง โดยนำมาทดสอบโดย ใช้หลักการ Poly-R clearance และ Tannic agar โดยพบว่า Isolate A19 ที่แยก และรา Isolate B7 สามารถเปลี่ยนสีของ Poly-R agar clearance โดยเมื่อตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่าราดังกล่าวอยู่ในกลุ่ม Basidiomycota โดยนำศึกษาหาสภาวะเหมาะสมการเลี้ยงเชื้อราโดยใช้ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Czapek's Dox Medium โดยใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน และโซเดียมไนเตรตเป็นแหล่งอาหารไนโตรเจน ที่ความเป็นกรดต่าง 5 โดยใช้ซูโครสเป็นแหล่งอาหารคาร์บอนความเข้มข้นร้อยละ 0.5 และโซเดียมไนเตรตเป็นแหล่งอาหารไนโตรเจนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 หลังจากบ่มราเป็นเวลา 8 วัน มีประสิทธิภาพสูงสุดในการลดสี และลิกนินร้อยละ 94.55 และร้อยละ 75.81 ตามลำดับ

Irfan และคณะ (2013) ศึกษาการกำจัดค่าซีโอดี (COD) ปริมาณของแข็งทั้งหมด (TSS) และ สี (color) ในน้ำดำโดยกระบวนการโคแอกกูแลชัน ฟล็อกกูแลชัน โดยหาการค่า pH และระยะเวลาการตะกอน และความเข้มข้นของสารโคแอกกูแลนต์ และฟล็อกกูแลนต์ โดยผลการศึกษาพบว่าค่า COD ของน้ำดำเริ่มต้นจากโรงงานมีค่า 28,270 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณของแข็งทั้งหมด 11,455 mg/l และสี Dark brown/1640 pt-co/hazen โดยสารโคแอกกูแลนต์ที่ความเข้มข้น 0.8 กรัมต่อลิตร อะลูมิเนียมซัลเฟต (Al_2SO_4) และ เฟอร์ริกคลอไรด์ ($FeCl_3$) สามารถลดค่า COD ได้ 13% และ 16% ตามลำดับที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 3 และ PAC สามารถกำจัด COD ได้ที่ 14% ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4 และการกำจัด ปริมาณสารแขวนลอย และสีให้ค่าการกำจัดสูงสุดที่สาร โคแอกกูแลนต์คือ PAC ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 3 โดยเมื่อนำสารโคแอกกูแลนต์แต่ละชนิดมาผสมกันเพื่อหากลุ่มของสารโคแอกกูแลนต์ที่มีประสิทธิภาพในการกำจัด COD TSS colour โดย พบว่าลักษณะของการร่วมกันมีแนวโน้มที่แตกต่างไม่ชัดเจนนัก และกระบวนการ flocculation ใช้สาร PAM (Polyacrylamide) โดยทำการเปรียบเทียบ PAM ประจุบวก และ PAM ประจุลบ ต่อค่าความเป็นกรด-ด่างพบว่าที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 3 มีค่าร้อยละการกำจัด COD TSS และ สี เท่ากับ 74 93 และ 77 ตามลำดับ และการร่วมกับของ สารฟล็อกกูแลชัน ประจุบวก และประจุลบ พบว่า แอมโมเนียมคลอไรด์ และ PAC ให้ประสิทธิภาพการกำจัด COD , TSS และ สีที่มีประสิทธิภาพสูงกว่า และ PAC and พอลิเมอร์ประจุบวกให้ค่าการลด COD ลงถึง 81% และของแข็งแขวนลอยถึง 95 % ในขณะที่ การผสมกันของ อะลูมิเนียมคลอไรด์ , PAC and PAM ประจุบวก สามารถลดสีได้ดีถึง 88%

Wu และ Yu (2005) ศึกษาการย่อยสลายลิกนินในน้ำเสียจากกระบวนการอุตสาหกรรมกระดาษโดยราเนาขาวบนฟิล์มชีวภาพโดยได้ทำการศึกษารเนาขาวทั้งสิ้น 4 สายพันธุ์ *Pleurotus ostreatus* , *Lentinus edodes*, *Trametes versicolor* และ S22 โดยใช้ *P. chyrosporium* เป็น

สายพันธุ์เปรียบเทียบ โดยศึกษาการเปรียบเทียบการกำจัดลิกนินในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรน้ำเสียโดยราเน่าขาวสายพันธุ์ *P. ostretus* เป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการกำจัด COD และการย่อยสลายลิกนินที่สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ชนิดอื่น โดยได้นำมาศึกษาสภาวะอาหารที่เหมาะสม โดยแหล่งคาร์บอนคือกลูโคสที่ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร และแหล่งไนโตรเจน ใช้แอมโมเนียมทราเทรตที่ความเข้มข้น 0.2 กรัมต่อลิตรต่อลิตรให้ประสิทธิภาพการกำจัด COD ที่สูงที่สุด และ ราเน่าขาวสายพันธุ์ *P. chyrosporium* *P. ostreatus* และ S22 ที่ค่าความเป็นกรด – ต่างในช่วง 8-11

Ahmad และคณะ (2007) ศึกษาประสิทธิภาพกระบวนการโคแอกกูเลชัน/ฟลอคกูเลชัน ของสารส้ม และแคตไอออนพอลิอะคริลาไมด์ (Polyaluminium chloride, PAC) เมื่อใช้เพียงอย่างเดียว และเมื่อใช้ร่วมกับพอลิอะคริลาไมด์ประจุบวก (cation polyacrylamide , C-PAM) และพอลิอะคริลาไมด์ประจุลบ (anionic polyacrylamide, A-PAM) ในการบำบัดน้ำดำจากโรงงานเยื่อกระดาษโดยสภาวะที่เหมาะสมของสารส้มที่ความเข้มข้นความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ค่าความเป็นกรดต่างที่ 6 สามารถลดความขุ่นได้ร้อยละ 99.4 และลดซีโอดีได้ร้อยละ 91 และ PAC ที่ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัม ที่ค่าความเป็นกรดต่างที่ 6 สามารถลดความขุ่นได้ร้อยละ 99.9 ลดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ร้อยละ 99.5 และลดค่า ซีโอดีได้ร้อยละ 91.3 เมื่อเปรียบเทียบกับสารส้มกับ PAC พบว่า สารส้มให้ประสิทธิภาพดีกว่า PAC ซึ่งภาวะความเป็นกรด ต่างต่ำ และปริมาณสารโคแอกกูแลนต์ต่ำนั้นจะเป็นการทำลายเสถียรภาพ ของอนุภาคโดยเป็นแบบกลไกการทำลายประจุเพื่อให้เกิดสภาพเป็นกลางเพราะมีอนุภาคขนาดเล็ก เมื่อนำสารส้ม และ PAC มาใช้คู่กับ C-PAM และ A-PAM พบว่า สารส้มใช้ร่วมกับ C-PAM ให้ประสิทธิภาพที่ดีที่สุดซึ่งสามารถลดความขุ่นได้ร้อยละ 99.7 ลดปริมาณของแข็งที่ละลายได้ร้อยละ 99.5 และลดค่าซีโอดีได้ร้อยละ 95.6

จากการศึกษางานวิจัยที่เกี่ยวข้องพบว่า โดยงานวิจัยของ ทิฆัมพร ระย้า (2552) และ Prasongsuk และคณะ (2009) พบว่าราเน่าขาวเป็นกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดสีน้ำทิ้งจากโรงงานเยื่อกระดาษ โดยกระบวนการใช้แลคแคส อีกทั้งในประเทศไทยเป็นพื้นที่ในเขตร้อนซึ่งเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยของราเน่าขาวจำนวนมาก โดยยังไม่มีการศึกษาถึงความสามารถในศักยภาพทางการบำบัดมลพิษทางชีวภาพ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะคัดแยกทางราเน่าขาวเพื่อใช้ในการบำบัดทางชีวภาพ และ โดยจากการวิจัยของ ชามา เขียวมานิต (2555) พบว่า กระบวนการโคแอกกูเลชันเป็นหนึ่งในกระบวนการที่มีศักยภาพสูงในการกำจัดซีโอดี สี และความขุ่น โดยในงานวิจัยนี้ใช้โคแอกกูแลนต์ผสมโดยใช้สารประเภทพอลิเมอร์ ที่ยังไม่มีรายงานวิจัยใดรายงานมาก่อน และจากการวิจัยที่เกี่ยวข้องพบว่าข้อจำกัดการใช้ราเน่าขาวในการซีโอดี สี และความขุ่น อาจเกิดมาจากการหลุดรอดของเส้นใยราเน่าขาวออกสู่น้ำเสีย แต่อย่างไรก็ตาม ในงานวิจัยได้แก้ไขปัญหาดังกล่าวโดยการนำราเน่าขาวมาตรึงบนวัสดุค้ำจุนประเภทดินเบา โดยวัสดุค้ำจุนดังกล่าวก็ยังไม่เคยมีรายงานวิจัยใดรายงานมาก่อนเช่นกัน

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 สารเคมี เครื่องมือ และวัสดุอุปกรณ์

วัตถุดิบ วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี ที่ใช้ในงานวิจัย

บริษัท/ประเทศ

3.1.1 วัตถุดิบ

1. น้ำดำ (Black liquor)

โรงงานเยื่อกระดาษยูคาลิปตัส

บริษัท ดับเบิลเอจำกัด มหาชน

2. ดินเบา

อำเภอแม่ทะ จังหวัดลำปาง

3.1.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่งรุ่น BL610

Satorius/ Germany

2. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่งรุ่น TC-205

Denver Instrument
Company/ USA

3. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง

Satorius/ Germany

4. เครื่องเขย่า (shaker) รุ่น SP15

Labcon/ The Republic
Of South Africa

5. ตู้อบ (Hot air oven)

Binder/ USA

6. ตู้เขี่ยเชื้อแบบ Laminar flow รุ่น BV 123

ZISSOC

7. หม้อนึ่งความดันอบไอน้ำ

Ta Chang Medical

Instrument Factory/

Taiwan

8. เครื่องปั่นเหวี่ยงสาร

Hettich/ Germany

9. ตู้บ่มเชื้อแบบควบคุมอุณหภูมิได้

10. เตาความร้อน

C-MAG HS7 Model/
Germany

11. เครื่องวัดความขุ่น

2100P Portable

Turbidimeter/USA

12. เครื่องจาร์เทสต์

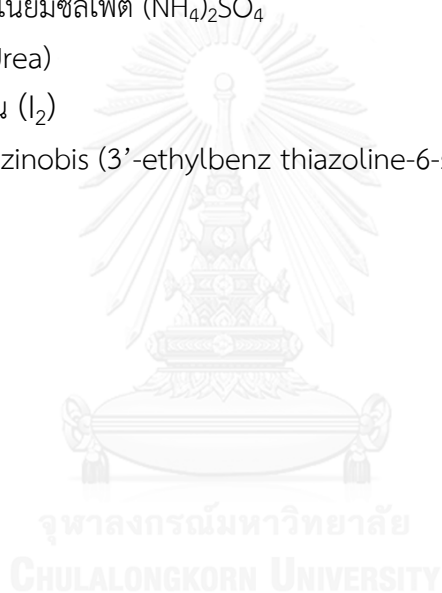
VELP/ Italy

- | | |
|--|------------------------------|
| 13. เครื่องปั่นผสม | Scientific
Industries/USA |
| 14. กล้องจุลทรรศน์แบบถ่ายภาพได้ | Olympus/ Japan |
| 15. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง | 2800 Unico/USA |
| 16. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR | |
| 17. ชุดอุปกรณ์แยกขนาดดีเอ็นเอ ด้วยวิธี Gel Electrophoresis | |

3.1.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

- | | |
|---|---------------------------------------|
| 1. กรดซัลฟิวริกเข้มข้น 98% (H_2SO_4) | J.T. Bake/USA |
| 2. กรดอะซิติก, เกรเซียล (CH_3COOH) | Merck/ Germany |
| 3. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) | Ajax/ Australia |
| 4. ไคโตแซน (chitosan, $(C_6H_{11}NO_4)_n$) MW. 500 kDa | Seafresh Industry
Public/ Thailand |
| 5. โคบอลต์คลอไรด์ ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$) | Ajax/ Australia |
| 6. ชาร์โครอล ไฮเดรต (Chloral hydrate) | Ajax/ Australia |
| 7. ซูโครส (sucrose) | Ajax/ Australia |
| 8. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) | Ajax/ Australia |
| 9. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) | Carlo Erba
Reagent/ Italy |
| 10. เฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต ($Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$) | Ajax/ Australia |
| 11. ทวิน (tween 80) | Fluka/ Switzerland |
| 12. น้ำตาลกลูโคส (glucose, $C_6H_{12}O_6$) | Sigma-Aldrich/
Australia |
| 13. เปปโตน (peptone) | Himedia/ India |
| 14. ผงมอลต์สกัด (Malt Extract) | Difgo/USA |
| 15. สารอาหาร potato dextrose broth | Himedia
Laboratories/ India |
| 16. เฟอรัสซัลเฟต เฮปตาไฮเดรต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) | carlo Erba
Reagent/ Italy |
| 17. โพแทสเซียมเฮกซะคลอโรแพลตตินेट (K_2PtCl_6) | Sigma-Aldrich/
USA |
| 18. 1,10 ฟิแนนโทรลีน ($C_{12}H_6N_2 \cdot H_2O$) | Fisher
Scientific/USA |

19. แคตไอออนพอลิอะคริลาไมด์(Polyacrlamide ,PAM)	Ajax/ Australia
20. โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	carlo Erba Reagent/ Italy
21. โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH)	Ajax/ Australia
22. โพแทสเซียมไอโอไดด์ (Potassium iodide)	Ajax/ Australia
23. ู๋น	Sigma/ USA
24. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	carlo Erba Reagent/ Italy
25. ยีสต์สกัด (yeast extract)	Himedia/ India
26. แอมโมเนียมซัลเฟต ($\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Sigma/ USA
27. ยูเรีย (Urea)	Sigma/ USA
28. ไอโอดีน (I_2)	Ajax/ Australia
29. (2,2'-azinobis (3'-ethylbenz thiazoline-6-sulfonate) (ABTS)	Sigma/Aldrich



3.2 วิธีดำเนินงานวิจัย

3.2.1 การเก็บตัวอย่างและ การแยกเส้นใยให้บริสุทธิ์ และการจัดจำแนกเห็ดกลุ่มราเนา
ขาวจากจังหวัดต่างๆในประเทศไทย

3.2.1.1 การเก็บตัวอย่างเห็ด

ทำการเก็บตัวอย่างราเนาขาวจากพื้นที่ต่างๆในประเทศไทย เก็บตัวอย่างในช่วงปี 2557 โดยเก็บตัวอย่างดอกเห็ดที่ขึ้นตามสภาพธรรมชาติโดยเลือกตัวอย่างเห็ดที่สมบูรณ์ คือ เนื้อดอกเห็ดมีความสด และไม่มีรอยกัดแทะของแมลง จุดบันทึกรายละเอียดแหล่งที่พบ ถ่ายรูปเพื่อบันทึกลักษณะของดอกเห็ด ตัวอย่างที่เก็บได้ใส่ถุงกระดาษ เพื่อรักษาความชื้นของดอกเห็ด เพื่อที่จะนำมาทำการคัดแยกเส้นใยต่อไป

3.2.1.2 การแยกเส้นใยเห็ดให้บริสุทธิ์

นำตัวอย่างราเนาขาวที่เก็บได้จากสภาพธรรมชาติมาทำการฆ่าเชื้อด้วยการแช่ดิวด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 ใช้ใบมีดตัดชิ้นเนื้อด้านในดอกเห็ดให้เป็นชิ้นเล็กๆ ขนาด 1-2 มิลลิเมตร นำมาวางบนจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารสูตร Potato dextrose agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิห้องประมาณ 2-3 วันจะสังเกตเห็นเส้นใยของราเนาขาวเจริญมาจากชิ้นเนื้อเยื่อ ตัดเส้นใยบริสุทธิ์ที่ได้มาทำการเลี้ยงบนอาหารสูตร PDA อีกครั้งเพื่อให้แน่ใจว่าเส้นใยเห็ดจริง และหลังจากนั้นจึงถ่ายลงอาหารแข็งเอียงเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง หรือที่ 4 องศาเซลเซียส ทำการเก็บเส้นใยเห็ดในน้ำกลั่นเพื่อนำไปใช้ในครั้งต่อไป

3.2.2 การตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์แลคแคสในอาหารแข็ง และอาหารเหลว และความสามารถในการทนร้อน

3.2.2.1 การตรวจสอบความสามารถในการผลิตแลคแคสบนอาหารแข็ง

นำเส้นใยเชื้อราที่แยกให้บริสุทธิ์แล้วมาเลี้ยงบนอาหารสูตร PDA เป็นเวลา 7 วัน และหลังจากนั้นจะทำการเจาะชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยเห็ดเจริญเติบโตอยู่บริเวณตรงปลายเส้นใยด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร นำชิ้นวุ้นที่เจาะมา 1 ชิ้นวางบนอาหารสูตร Lignin Modifying Basal agar ที่ผสมกับ 2,2'-azinobis(3'-ethylbenz thiazoline -6-sulfonate) (ABTS) ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตรนำไปทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์แลคแคส โดยทำการเลี้ยงเชื้อราที่อุณหภูมิห้องและติดตามผลได้โดยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงสี

เชียว และเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใย เพื่อนำไปคำนวณหาอัตราส่วนในการคัดเลือกกราเนาขาว ทำการติดตามผลโดยการวัดผลเป็นเวลา 8 วัน ถ้าเชื้อราที่มีความสามารถจะเกิดวงสีเชียวบนอาหารรอบเส้นใย

3.2.2.2 การตรวจสอบความสามารถในการทนอุณหภูมิสูง

นำเส้นใยเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์แลคแคสในอาหารแข็งจากข้อ

3.3.2.1 นำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิที่แตกต่างกัน ดังนี้ 30 35 40 และ 45 องศาเซลเซียส โดยวัดเส้นใยโคโลนี โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

3.2.2.3 การตรวจสอบความสามารถการผลิตแลคแคสในอาหารเหลว

นำเชื้อราที่สามารถเจริญเติบโตได้ในอุณหภูมิสูง ที่ได้จากข้อ 3.2.2.2 มาผลิตแลคแคสในอาหารเหลว โดยเลี้ยงเชื้อราบนอาหารสูตร PDA เป็นเวลา 7 วัน เมื่อเส้นใยเจริญแล้ว ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะบนชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยเกาะอยู่ตรงปลายเส้นใย 5 ชิ้น ถ่ายเส้นใยเชื้อราลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่มีอาหารสูตร production และทำการติดตามผลทุกๆ 2 วันเป็นเวลา 12 วันทำการเก็บตัวอย่างโดยอาหารสูตร production กรองโดยใช้กระดาษกรอง Whatman No.1 เพื่อแยกเส้นใยเปียก และอาหารเหลว แล้วนำส่วนใสมาวัดค่ากิจกรรมของแลคแคส ทำการวัดค่ากิจกรรมของแลคแคสตามวิธีการ Wolfenden, B.S., Wilson, R.L. (1982) ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นที่ 420 นาโนเมตร แล้วนำผลของอัตราการเกิดปฏิกิริยาที่ initial rate ไปคำนวณค่าหน่วยของเอนไซม์ (unit of enzyme)

3.2.3 การจัดจำแนกเห็ด

3.2.3.1 การจัดจำแนกเห็ดโดยวิธีการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ก. ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

จัดจำแนกสายพันธุ์เห็ดโดยทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยานอกจากดอกเห็ด คือ ดูจากลักษณะของดอกเห็ด ลักษณะของรูใต้ดอกเห็ด ขนาดของดอกรูใต้ดอกเห็ด ดูจากสัณฐานวิทยาภายในโดยดูจากลักษณะของสปอร์ การติดสีของดอกเห็ดเมื่อย้อมด้วย KOH's Regent ขนาดเบซิไดโอสปอร์ และการระบุสายพันธุ์ราเนาขาวโดยการจัดจำแนกโดยวิธี ทำสไลด์จากชิ้นส่วนต่างๆของดอกเห็ด เพื่อศึกษา การติดสีของ เบซิไดโอสปอร์ เมื่อย้อมด้วย Melzer's reagent เพื่อทดสอบลักษณะจำเพาะของสปอร์ ลักษณะของเส้นใย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยนำมาตรวจสอบเพื่อหาชื่อวิทยาศาสตร์จากหนังสือที่ใช้ประกอบในกาตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์ได้แก่ NORTH AMERICAN POLYPORE ของ Gilberston และ Ryvardeen ปี 1986 และ The Identification fungi ของ Frank M.Dugan ปี 2012

3.2.3.2 การจัดจำแนกโดยอาศัยวิธีทางชีววิทยาระดับโมเลกุล

ก. การสกัดดีเอ็นเอ

เลี้ยงเส้นใยเห็ดในอาหารสูตร PDA เป็นเวลา 7 วันหลังจากนั้นใช้ cork borer ขนาด 0.5 เซนติเมตร เจาะลงที่ชิ้นวุ้นจริงบริเวณปลายที่มีเส้นใยเกาะอยู่จำนวน 10 ชิ้น ถ่ายเส้นใยที่ตกลงสู่อาหารสูตร Potato dextrose broth (PDB) ปริมาตร 100 มิลลิลิตรในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นทำการกรองเส้นใยและส่วนใสออกจากกันด้วยกระดาษกรอง whatman NO.1 นำเส้นใยที่ได้มาสกัดดีเอ็นเอโดยวิธี Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) (Zhou, et al.,1999) เริ่มจากนำเส้นใยมาบดให้ละเอียดโดยใช้โกร่ง เติมสารละลาย washing buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตรถ่ายลงในหลอดไมโครเซ็นติฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 15,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 3 นาที เทของเหลวส่วนบนทิ้งให้เหลือแต่ตะกอน เติมสารละลาย washing buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปริมาตร 700 ไมโครลิตรบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เพื่อให้เซลล์แตกเติมสารละลายคลอโรฟอร์ม – ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ในอัตราส่วน 24:1 ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องเขย่าผสมสาร เพื่อกำจัดโปรตีน ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 8 นาที ถ่ายส่วนใสที่อยู่ชั้นบนใส่ลงในหลอดไมโครเซ็นติฟิวจ์ใหม่ แล้วเติมสารละลายไอโซโพรพานอล ปริมาตร 700 ไมโครลิตร แช่น้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อตกตะกอนของดีเอ็นเอ เทส่วนใสทิ้งตากตะกอนให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เติมน้ำกลั่นปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ RNase ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรปริมาตร 1 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้งให้เหลือตกตะกอน ดีเอ็นเอ เติมเอทานอลเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที เพื่อล้างตะกอนดีเอ็นเอดูดสารละลายออกทิ้งตะกอนให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เติมสารละลาย TE buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เพื่อละลายตะกอนดีเอ็นเอเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาศึกษาในครั้งต่อไป

ข. ตรวจสอบความสมบูรณ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ ก. ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสโดยเตรียมอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.8 % ที่ละลายในบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า เทลงในแม่พิมพ์ที่มีหัวเสียบ ทิ้งให้อะกาโรสเจลแข็งตัว จากนั้นวางชิ้นอะกาโรสที่ได้ลงในแชมเบอร์ เทบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่าลงในแชมเบอร์ให้ท่วมอะกาโรสเจล ผสมดีเอ็นเอที่สกัดได้แต่ละกลุ่มตัวอย่าง ปริมาตร 5 ไมโครลิตรกับสีย้อมติดตามปริมาณ 1 ไมโครลิตรหยอดลงในช่องวิ่ง จากนั้นทำอิเล็กโทรโฟเรซิส ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นย้อมอะกาโรสเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรเป็นเวลา 15 นาที นำอะกาโรสเจลไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตที่มีความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร

ค. การเพิ่มปริมาณของ ribosomal DNA (rDNA) บริเวณตำแหน่ง ITS (Internal Transcribed Spacer) ด้วยเทคนิค Polymerase chain Reaction (PCR) ทำการเพิ่มปริมาณ rDNA

ตรงตำแหน่งของ ITS โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCCG) และ ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATCG) โดยการเติมปริมาณสารสำหรับการทำ PCR ตามที่แสดงในตารางที่ 4 ตารางที่ 4 ปริมาณของสารแต่ละชนิดที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR

สาร	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร(ไมโครลิตร)
10XPCR buffer without MgCl ₂	1X	1.0
2 mM dNTP mixed	0.2 mM	1.0
Tag DNA polymerase	0.5 units/10 ul	0.1
25 mM MgCl ₂	2.5 mM	1.0
20 uM Primer I (ITS 1)	1.5 ul	0.5
20 uM Primer I (ITS 4)	1.5 ul	0.5
DNA template	-	1.0
Sterilized distilled water	-	4.9
Total volume		10

เมื่อได้ส่วนผสมทั้งหมดที่มีปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร นำไปทำปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นส่วน ดีเอ็นเอ ที่ตำแหน่ง ITS ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ (Authorized DNA thermal cycle) โดยใช้สภาวะที่กำหนดในตารางที่ 5 ตารางที่ 5 ปฏิกิริยาที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยการทำให้ปฏิกิริยาด้วยเทคนิค PCR

ปฏิกิริยา	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา(นาที)
Initial denaturation	95	5
Amplification		
Denaturation	95	1.5
Annealing	55	2
Extension	72	2
Final Extension	72	10
Hold	4	-

โดยได้กำหนด ภาวะดังตารางที่ 5 ในการทำปฏิกิริยา PCR จำนวนรวมทั้งหมด 35 รอบหลังจากนั้น ทำการตรวจสอบผลการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟเรซิส (Electrophoresis) โดยการแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอบน อะกาโรสที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 ใน 0.5 TBE buffer เติมเอธิเดียมโบรไมด์ 1 ไมโครลิตร ต่ออะกาโรสเจล 30 มิลลิลิตร ใช้กระแสความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที และใช้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ มาตรฐาน 100 bp + 1.5 kb DNA ladder ตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ที่เกิดขึ้นภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร และส่งชิ้นส่วนดีเอ็นเอไปวิเคราะห์ที่บริษัท Marcogen จำกัดที่ประเทศ ญี่ปุ่น

ง. การวิเคราะห์ลำดับเบส

นำชิ้นส่วนที่ประมวลรหัสของ ITS ของเส้นใยเห็ดส่งไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องตรวจสอบลำดับดีเอ็นเอ (DNA sequencing) จากนั้นนำลำดับเบสที่ได้เปรียบเทียบกับรายงานในฐานข้อมูล GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) เพื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนลำดับเบส ITS ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล โดยใช้โปรแกรม Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn)

จ. การจัดทำตัวอย่างแห้ง และ culture บริสุทธิ์เก็บในพิพิธภัณฑ์พืช

ทำการจัดเก็บตัวอย่างแห้ง โดยนำดอกเห็ดที่ได้จากการเก็บตัวอย่างและผ่านจัดจำแนกชนิดแล้ว มาอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน หรือจนกว่าดอกเห็ดแห้ง จัดเก็บตัวอย่างแห้งใส่ถุงหรือกล่องพลาสติก ที่มีลูกเหม็น 1-2 เม็ด เพื่อป้องกันการทำลายจากแมลงบันทึก specimen หลังจากนั้นทำการเก็บตัวอย่างในพิพิธภัณฑ์พืช

3.2.4 การตรวจวิเคราะห์คุณสมบัติน้ำดำ

น้ำดำที่นำมาศึกษาขอความอนุเคราะห์เมื่อเดือน พฤษภาคม 2558 ได้รับจากโรงงานเยื่อกระดาษยูคาลิปตัสโดยกระบวนการแบบคราฟต์ มาจากโรงต้มเยื่อที่ 2 ซึ่งเป็นการต้มเยื่อแบบ continuous คือเป็นการต้มโดยใช้หม้อต้มแบบต่อเนื่องจำนวน 1 ใบ น้ำดำจะถูกแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกจะถูกนำไปวิเคราะห์หาค่าความเป็นกรด – ด่างเริ่มต้น ค่าซีไอดีเริ่มต้น (COD) ด้วยวิธี close reflux ด้วยวิธีมาตรฐาน (AOAC Official Method 2000) และค่าสีเริ่มต้น (Platinum cobalt standard) (APHA AWWA and WEF, 1998) ที่ค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร และค่าความขุ่น (turbidity) โดยเครื่อง Turbidity meter ส่วนที่เหลือจะถูกเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณลักษณะต่างๆของน้ำดำเมื่อต้องการนำน้ำดำมาใช้ในงานวิจัย จึงนำน้ำดำมาปรับอุณหภูมิไว้ที่อุณหภูมิห้อง และทำการกวนผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน จึงจะนำไปใช้ในการทดลองซึ่งแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ การปรับสภาพน้ำดำโดยกระบวนการโคแอกกูเลชัน และการปรับสภาพน้ำดำ และการ

ปรับสภาพน้ำดำที่ผ่านกระบวนการโคแอกกูเลชันโดยราเนาขาวที่ตรึงบนดินเบา โดยมีรายละเอียด ดังนี้

3.2.5 การปรับสภาพน้ำดำโดยกระบวนการโคแอกกูเลชัน

ตัวแปรที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ประกอบด้วย ค่าความเป็นกรด-ด่าง ชนิดและความเข้มข้นของโคแอกูแลนท์ อัตราส่วนโดยน้ำหนักระหว่างโคโตนแซนกับแคตไอออนพอลิอะคริลาไมด์ ความเร็วในการกวนผสม เวลาในการกวนผสม และ เวลาในการตกตะกอน

3.2.5.1 ค่าความเป็นกรด-ด่าง

นำน้ำดำปริมาตร 400 มิลลิลิตร หยดกรดซัลฟิวริกเข้มข้นเพื่อปรับสภาพน้ำดำเป็น 3 4 5 6 7 8 9 และ 10 ตามลำดับ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จึงนำส่วนใสมาวิเคราะห์ร้อยละการวัด ซีไอดี สี และความขุ่น หลังจากนั้นจึงทำการเลือกค่าความเป็นกรด-ด่างที่ให้ร้อยละการกำจัดสูงสุดของ ซีไอดี สี และความขุ่นสูงสุด เพื่อศึกษาในขั้นต่อไป

3.2.5.2 ชนิดและความเข้มข้นของสารโคแอกูแลนท์

สารโคแอกูแลนท์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้จะเลือกใช้ 2 ชนิดคือ โคโตนแซนและแคตไอออนพอลิอะลูมิเนียมคลอไรด์ (Cation - polyacrylamide ; PAM) โดยน้ำดำที่ผ่านการปรับสภาพค่าความเป็นกรดต่างตามภาวะของขั้นตอนที่ 3.2.5.1 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร และทำการเติมสารละลายโคโตนแซนในกรดอะซิติกที่ระดับความเข้มข้น ร้อยละ 1 น้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาณ 0.01 0.02 0.03 0.04 0.05 0.06 0.07 0.08 และ 0.09 กรัม ตามลำดับ แล้วทำการกวนด้วยความเร็วรอบ 140 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที หลังจากนั้นตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 60 นาที เพื่อให้เกิดการแยกชั้นระหว่างน้ำดำและตะกอนอย่างสมบูรณ์ สุ่มตัวอย่างน้ำดำปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปวิเคราะห์ร้อยละการกำจัด ซีไอดี สี และความขุ่น กรณีเมื่อใช้สารแคตไอออนพอลิอะคริลาไมด์เป็นสารโคแอกูแลนท์จะทำตามขั้นตอนดังกล่าวข้างต้น หลังจากนั้นทำการเลือกสารโคแอกูแลนท์ให้ค่าร้อยละการกำจัดสูงจึงนำไปทำการศึกษาในขั้นต่อไป

3.2.5.3 อัตราส่วนโดย น้ำหนักระหว่างโคโตนแซนกับแคตไอออนพอลิอะคริลาไมด์

นำน้ำดำที่ผ่านการปรับสภาพค่าความเป็นกรด ต่างตามภาวะจากขั้นตอนที่ 3.2.5.1 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร และเติมสารโคแอกูแลนท์ที่ผสมระหว่างโคโตนแซนกับแคตไอออนพอลิอะคริลาไมด์ที่อัตราส่วนน้ำหนัก 100:1(0.035:0.00035), 20:1(0.035:0.00175), 1:0.1(0.035:0.0035), , 5:1(0.035:0.007), 3:1(0.035:0.0105), และ 2:1(0.035:0.00175) ตามลำดับ โดยกำหนดให้ปริมาตรของสารโคแอกูแลนท์ที่ให้ร้อยละการกำจัดสูงกว่ามีค่าคงที่ตามที่ได้จากขั้นตอน 3.2.5.2 แล้วทำการกวนด้วยความเร็วรอบ 140 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที หลังจากนั้นตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 60

นาที่ เพื่อให้เกิดการแยกชั้นระหว่างน้ำดำและตะกอนอย่างสมบูรณ์ สุ่มตัวอย่างน้ำดำปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปวิเคราะห์ร้อยละการกำจัด ซีโอดี สี และความขุ่น หลังจากนั้น โดยเลือกอัตราส่วน น้ำหนักต่อปริมาตร ระหว่างโคโคซานแคตไอออนพอลิอะคริลาไมด์ที่ให้ค่าการขจัดร้อยละซีโอดี สี และความขุ่นสูงสุดไปทำการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

3.2.5.4 ความเร็วในการกวนผสม

นำน้ำดำที่ผ่านการปรับสภาพจากขั้นตอนที่ 3.2.5.1 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ทำการเติมสารโคแอกูแลนต์ผสมที่สัดส่วนและปริมาตรตามที่พาได้จากขั้นตอนที่ 3.2.5.3 แล้วทำการกวนที่ความเร็วรอบระดับต่างๆ คือ 30 60 90 120 140 และ 160 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 2 นาที และตั้งทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 60 นาที เพื่อให้เกิดการแยกชั้นระหว่างน้ำดำและตะกอนอย่างสมบูรณ์ สุ่มตัวอย่างน้ำดำปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปวิเคราะห์ร้อยละการกำจัด ซีโอดี สี และความขุ่น นำน้ำดำที่แยกชั้นไปวิเคราะห์ซีโอดี สี และความขุ่น

3.2.5.5 เวลาในการกวนผสม

นำน้ำดำที่ผ่านการปรับสภาพค่าความเป็นกรด ต่างจากขั้นตอนที่ 3.2.5.1 ปริมาตร 200 มิลลิลิตรทำการเติมสารโคแอกูแลนต์ผสมที่ได้จากขั้นตอนที่ 3.2.5.3 แล้วกวนที่ความเร็วรอบซึ่งได้จากขั้นตอนที่ โดยใช้เวลาในการกวน 2 4 8 12 16 และ 20 นาที หลังจากนั้นตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 60 นาที เพื่อให้เกิดการแยกชั้นระหว่างน้ำดำและตะกอนอย่างสมบูรณ์ สุ่มตัวอย่างน้ำดำปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปวิเคราะห์ร้อยละการกำจัด ซีโอดี สี และความขุ่น นำน้ำดำที่แยกชั้นไปวิเคราะห์ซีโอดี สี และความขุ่น หลังจากนั้นทำการเลือกเวลาในการกวนผสมที่ให้ร้อยละการขจัด ซีโอดี สี และความขุ่น สูงสุดไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป

3.2.5.6 เวลาในการตกตะกอน

นำน้ำดำที่ผ่านการปรับสภาพค่าความเป็นกรด – ต่างจากขั้นตอนที่ 3.2.5.1 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ทำการเติมสารโคแอกูแลนต์ผสมที่ได้จากขั้นตอน 3.2.5.3 แล้วกวนที่ความเร็วรอบซึ่งหาได้จากขั้นตอน 3.2.5.4 โดยใช้เวลาในการผสมตามที่หาได้จากขั้นตอนที่ 3.2.5.5 หลังจากนั้นทิ้งไว้นาน 20 40 60 80 100 และ 120 นาที เพื่อให้เกิดการแยกชั้นระหว่างน้ำดำและตะกอนอย่างสมบูรณ์ สุ่มตัวอย่างน้ำดำปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปวิเคราะห์ร้อยละการกำจัด ซีโอดี สี และความขุ่น นำน้ำดำที่แยกชั้นไปวิเคราะห์ซีโอดี สี และความขุ่น หลังจากนั้นทำการเลือกเวลาในการกวนผสมที่ให้ร้อยละการขจัด ซีโอดี สี และความขุ่น หลังจากนั้นทำการเลือกเวลาในการตกตะกอนในการขจัดซีโอดี สี และความขุ่น สูงสุดเพื่อศึกษาในขั้นตอนต่อไป

3.2.6 การปรับสภาพน้ำค้ำที่ผ่านกระบวนการโคแอกกูเลชันโดยราเนาขาวที่ตรึงบนดินเบา

3.2.6.1 การตรึงราเนาขาว

ทำการเลี้ยงราที่คัดแยกในหัวข้อ 3.2.3 และถูกระบุสายพันธุ์แล้ว นำมาเลี้ยงในอาหารสูตร Potato dextrose agar (PDA) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2) เป็นเวลา 3 วัน หลังจากนั้นคอร์กเส้นใยบริเวณปลายโคโลนีจำนวน 5 คอร์ก ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose broth (PDB) เลี้ยงเป็นเวลา 2-3 วัน จึงนำเส้นใยในอาหารเหลวมาปั่นด้วยเครื่องปั่นผสม (Homogenizer) และดูดขึ้นมา 1,000 ไมโครลิตรใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ใหม่ และชั่งดินเบาปริมาณ 1 กรัม ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB เช่นเดียวกัน และเลี้ยงเป็นระยะ 2-3 วัน ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้เส้นใยราเนาขาวเจริญและใช้ดินเบาเป็นวัสดุค้ำจุนในการเจริญเติบโต และกรองเส้นใยราเนาขาวที่ตรึงบนดินเบาด้วยวิธีปลอดเชื้อ เพื่อนำเซลล์ตรึงราเนาขาวไปใช้ในกระบวนการกำจัดซีไอดี ซี และความชุ่มชื้นในการทดลองต่อไป

3.2.6.2 ศึกษาภาวะเหมาะสมในการปรับสภาพน้ำค้ำที่ผ่านกระบวนการโคแอกกูเลชันโดยราเนาขาวที่ตรึงบนดินเบา

ก. ศึกษาระดับ pH เริ่มต้นของน้ำค้ำที่ผ่านการบำบัดโดยกระบวนการโคแอกกูเลชันที่เหมาะสม

ทำการเลี้ยงราเนาขาวจากหัวข้อ 3.2.6.1 ชั่งเส้นใยเปียกชั่ง 5 กรัมเปียกถ่ายลงในน้ำเสียที่ผ่านกระบวนการปรับสภาพโดยกระบวนการโคแอกกูเลชัน โดยออกแบบชุดการทดลองเป็น 3 ชุดการทดลอง ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 เติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน และ แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.12 เลี้ยงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 50 มิลลิลิตรที่มีน้ำเสียสูตร wastewater medium บรรจุอยู่ 20 มิลลิลิตร ที่ระดับ pH เริ่มต้นของอาหารต่างๆ เช่น 3 4 5 6 และ 7 ทำการเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน และหลังจากนั้นนำน้ำค้ำที่เก็บมาทำการวิเคราะห์ค่าซีไอดี ซี ความชุ่มชื้น และตรวจวัดกิจกรรมเอนไซม์แลคแคส ในหน่วยยูนิตต่อมิลลิลิตร

ชุดการทดลองที่ 2 ไม่เติมแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน โดยเลี้ยงในฟอสฟอรัสขนาด 50 มิลลิลิตรที่มีน้ำค้ำที่ผ่านกระบวนการโคแอกกูเลชันบรรจุอยู่ 20 มิลลิลิตร ที่ระดับ pH เริ่มต้นของอาหารต่างๆ เช่น 3 4 5 6 และ 7 ทำการเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน และหลังจากนั้นนำน้ำค้ำที่เก็บมาทำการวิเคราะห์ค่าซีไอดี ซี ความชุ่มชื้น และตรวจวัดกิจกรรมเอนไซม์แลคแคส ในหน่วยยูนิตต่อมิลลิลิตร

ข. ศึกษาแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

ทำการเลี้ยงราเนาขาวจากหัวข้อ 3.2.6.1 ซึ่งเส้นใยเปียกชั่ง 5 กรัมเปียกถ่ายลงในน้ำเสียที่ผ่านกระบวนการปรับสภาพโดยกระบวนการโคแอกกูเลชัน โดย คัดเลือกแหล่งคาร์บอน 3 ชนิด เช่น กลูโคส ซูโครส ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1.0 (น้ำหนัก/ปริมาตร) และแหล่งไนโตรเจน 2 ชนิด เช่น แอมโมเนียซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ เปปโตเน และยูเรีย ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.12 (น้ำหนัก/ปริมาตร) โดยปรับค่าความเป็นกรด-ด่างจากข้อ ก. เก็บตัวอย่าง วัดค่าซีไอดี สี ความขุ่น และ ตรวจวัดกิจกรรมเอนไซม์แลคแคส ในหน่วยยูนิตต่อมิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 7 วัน โดยทำการวัดทุก 24 ชั่วโมง ออกแบบการทดลองแบบ Factorial Design (FD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS โดยวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance: ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

ค. ศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

คัดเลือกอาหารสูตรน้ำดำที่เติมแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน ที่สามารถกำจัดค่า ซีไอดี สี และความขุ่นได้มากที่สุด (นำข้อมูลเดิมจากข้อ ข.) มาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการลดซีไอดี สี และความขุ่น โดยวางแผนการทดลองด้วยวิธีพื้นผิวแบบตอบสนอง (response surface methodology) แบบ central composite design (CCD) ที่ศึกษา 2 ปัจจัยได้แก่ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน โดยศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน 3 ระดับ ที่ร้อยละ 1.0 3.0 5.0 (น้ำหนัก/ปริมาตร) และศึกษาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน 3 ระดับ ที่ร้อยละ 0.06 0.12 0.18 (น้ำหนัก/ปริมาตร) เก็บตัวอย่าง วัดค่าซีไอดี สี ความขุ่น และตรวจวัดกิจกรรมเอนไซม์แลคแคส ในหน่วยยูนิตต่อมิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 7 วัน โดยทำการวัดทุก 24 ชั่วโมง วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS โดยวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance: ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

ง. ศึกษาประสิทธิภาพการลดซีไอดี สี และความขุ่น ในรูปแบบ Cell Cycle

ทำการเลี้ยงราเนาขาวในขั้นตอนที่ 3.2.6.1 ถ่ายลงน้ำที่ผ่านการกำจัดซีไอดี สี ความขุ่น จากขั้นตอนที่ 3.3.5 ที่ให้ร้อยละการกำจัดได้สูงที่สุด เลี้ยงในภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน เก็บตัวอย่างน้ำดำมาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปวิเคราะห์ค่า ซีไอดี สี และความขุ่นกรองราเนาขาวออกจากน้ำดำด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 และล้างเพื่อนำกลับไปใช้ซ้ำโดยล้างเซลล์ตรึงรูปด้วยน้ำกลั่นในสภาวะปลอดเชื้อ เพื่อทำความสะอาดเซลล์เรียกขั้นตอนทั้งหมด 1 Cell Cycle โดยทำการทดลองจนมีประสิทธิภาพการกำจัดซีไอดี สี และความขุ่น ลดลงเหลือ ร้อยละ 50 ของประสิทธิภาพเริ่มต้น

3.2.7 การวิเคราะห์ข้อมูล การลดลงของซีโอดี สี และความขุ่นในน้ำดำจากอุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษ

การวัดค่าซีโอดีของน้ำดำในการทดลองนี้จะวิเคราะห์ด้วยวิธีการรีฟลักซ์แบบปิด (Close reflux) โดยคำนวณการลดลงของซีโอดีจากสูตรดังแสดงในสมการ 3.1

$$\text{ร้อยละการลดลงของซีโอดี} = \left(\frac{\text{ซีโอดีเริ่มต้น} - \text{ซีโอดีหลังบำบัด}}{\text{ซีโอดีเริ่มต้น}} \right) \times 100 \quad (3.1)$$

การวัดสีของน้ำดำในการทดลองจะใช้เครื่อง spectrophotometer ในการหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนกับค่าหน่วยสีของสารละลายสีมาตรฐานซึ่งจะใช้เป็น calibration curve ในการหาหน่วยสีของน้ำดำที่ต้องการวัด ซึ่งการเตรียมสารละลายมาตรฐานความเข้มข้นสี 0-500 หน่วย โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 475 นาโนเมตร และนำไปคำนวณการลดลงของสีจากสูตรดังแสดงในสมการ 3.2

$$\text{ร้อยละการลดลงของสี} = \left(\frac{\text{สีเริ่มต้น} - \text{สีหลังบำบัด}}{\text{สีเริ่มต้น}} \right) \times 100 \quad (3.2)$$

การวัดความขุ่นของน้ำดำในการทดลองนี้จะใช้เครื่อง turbidity meter วิธี nephelometric method เป็นการวัดความขุ่นของน้ำโดยเปรียบเทียบความเข้มของแสงที่กระจัดกระจายของตัวอย่างน้ำกับสารมาตรฐานภายใต้ภาวะต่างๆ ที่เหมือนกัน หน่วยของการวัดความขุ่นคือ nephelometric turbidity unit หรือ NTU คำนวณการลดลงของค่าความขุ่นจากสูตรดังแสดงในสมการ 3.3

$$\text{ร้อยละการลดลงของความขุ่น} = \left(\frac{\text{ความขุ่นเริ่มต้น} - \text{ความขุ่นหลังบำบัด}}{\text{ความขุ่นเริ่มต้น}} \right) \times 100 \quad (3.3)$$

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 การเก็บตัวอย่างราเน่าขาวในประเทศไทย และการแยกเส้นใยให้บริสุทธิ์

4.1.1 การเก็บตัวอย่างราเน่าขาวในประเทศไทยและการแยกเส้นใยให้บริสุทธิ์

จากการทดลองเก็บตัวอย่างเห็ดในกลุ่มราเน่าขาวตั้งแต่เดือน กุมภาพันธ์-ตุลาคม พ.ศ. 2556 โดยเก็บตัวอย่างทั้งสิ้น 12 จังหวัด พบว่าตัวอย่างที่เก็บทั้งหมด 42 ตัวอย่าง สามารถแยกตัวอย่างได้ทั้งหมด 19 ไอโซเลต เมื่อทำการแยกเส้นใยบริสุทธิ์จากตัวอย่างเห็ดแล้วนั้น จึงนำมาเก็บรักษาในอาหาร Potato dextrose agar (PDA) โดยสามารถเก็บรักษาได้นาน 2 ปี เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในการตรวจสอบเอนไซม์แลคเคสบนอาหารแข็งต่อไป โดยรายละเอียดพื้นที่ในการเก็บตัวอย่างดังแสดงรายละเอียด ในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 จังหวัดที่เก็บตัวอย่างราเน่าขาวในประเทศไทย

จังหวัดที่เก็บตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่างราเน่าขาวที่เก็บได้	ไอโซเลตที่คัดแยกได้	ไอโซเลต
กรุงเทพมหานคร	8	3 ไอโซเลต	SM10 CU07 KB4
สมุทรปราการ	9	5 ไอโซเลต	SM01 SM04 SM06 SM09 SM11
ชัยภูมิ	7	3 ไอโซเลต	CY01 YT03 YT04
ร้อยเอ็ด	2	2 ไอโซเลต	YT 01 Yt02
นครศรีธรรมราช	1	1 ไอโซเลต	PN01
สุราษฎร์ธานี	3	1 ไอโซเลต	JJ02
นนทบุรี	4	1 ไอโซเลต	JJ03
ชลบุรี	4	2 ไอโซเลต	CBR04 CBR05
ฉะเชิงเทรา	4	1 ไอโซเลต	CCH01

โดยในการศึกษานี้ใช้ราเน่าขาวสายพันธุ์อ้างอิง จากหน่วยปฏิบัติการวิจัยการใช้ประโยชน์จากชีวมวลพืช ภาควิชาพฤกษศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย *Phanerochaete sorida* SK7

4.2 การตรวจสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์แลคแคสบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง และในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวและการตรวจสอบความสามารถในการเจริญเติบโตที่อุณหภูมิสูง

4.2.1 การตรวจสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์แลคแคส บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง

นำเส้นใยบริสุทธิ์ของราเนาขาวทั้งหมด 20 ไอโซเลต มาตรวจสอบความสามารถในการสร้างแลคแคส โดยเลี้ยงในอาหารสูตร LMB ที่เติม ABTS เพื่อทดสอบความสามารถในการสร้าง ABTS-oxidizing enzyme พบว่าราเนาขาว 20 ไอโซเลต สามารถสร้างแลคแคสได้โดยสังเกตจากการเกิดวงสีเขียวจนถึงสีม่วงรอบโคโลนีรา ดังแสดงในรูปที่ 11 เมื่อเปรียบเทียบอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของวงสีกับเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี พบว่าราทั้งหมด 19 ไอโซเลต ให้ผลบวก มีไอโซเลตให้ผลอัตราส่วนมากกว่า 1 ทั้งสิ้น 12 ไอโซเลต และอัตราส่วนมากกว่า 2 ทั้งสิ้น 4 ไอโซเลต คือ CU07 CBR04 KB04 SM10 โดยไอโซเลต CU07 ให้ค่าอัตราส่วนดังกล่าวสูงที่สุด คือ 3.46 ในวันที่ 2 และ ไอโซเลต YT04 มีค่าอัตราส่วนดังกล่าวต่ำที่สุดในวันที่ 5 คือ 0.57 (ตารางที่ 7)

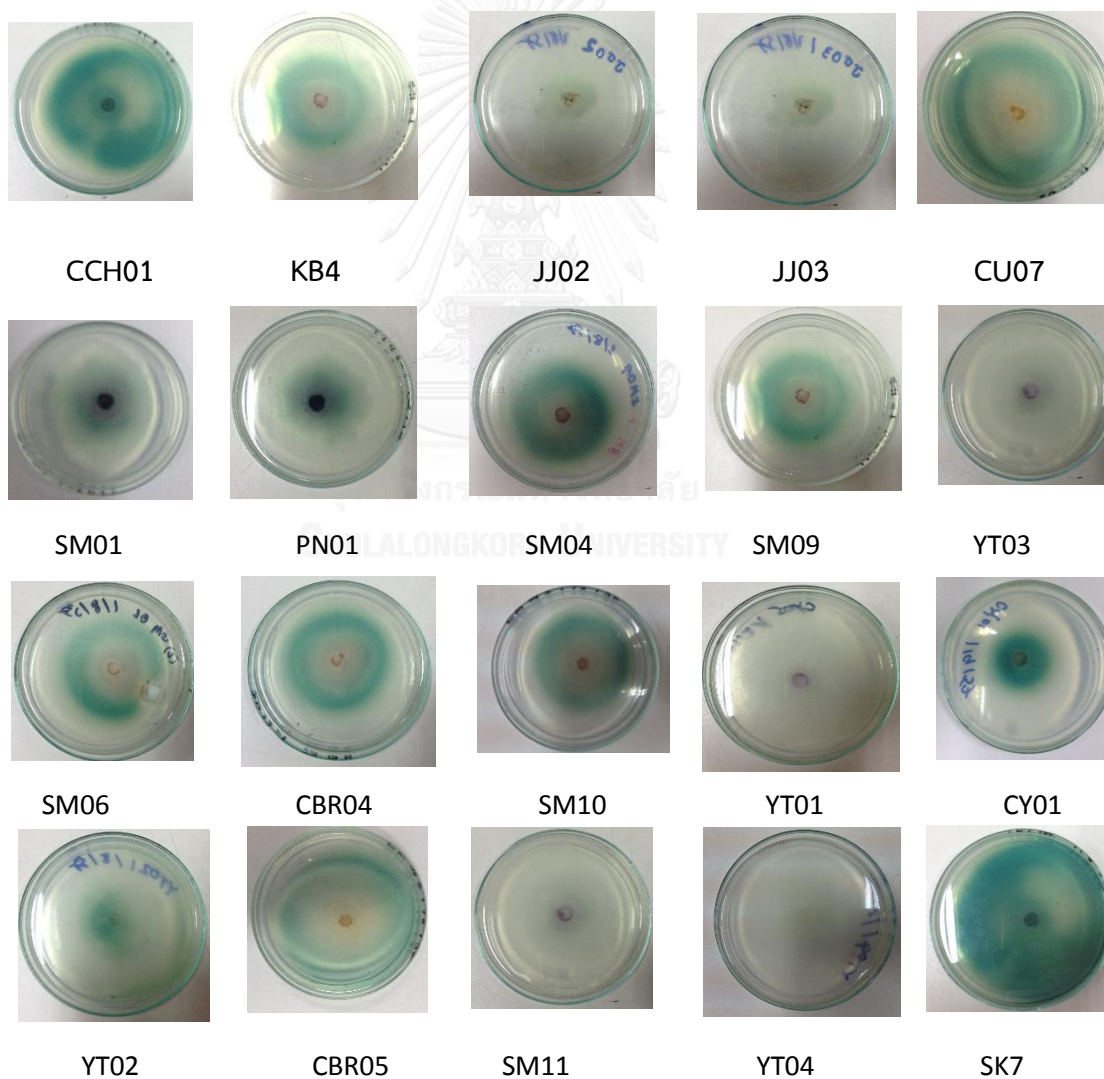
ตารางที่ 7 ความสามารถของราเนาขาวทั้งสิ้น 20 ไอโซเลตในการสร้างแลคแคส เมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร LMB ที่มีการเติม ABTS ความเข้มข้น 0.001 มิลลิกรัม ที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เป็นเวลา 7 วัน

ไอโซเลต	เส้นผ่านศูนย์กลางของวงสีเขียว/เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี	อัตราส่วน	วันที่แสดงอัตราส่วนสูงที่สุด
<i>Phanerocheate sorida</i> SK7*	3.50 ±0.02/3.00 ±0.02	1.16	2
CCH01	5.00±0.01/2.80±0.01	1.78	2
KB4	4.80±0.02/2.20±0.04	2.18	2
JJ02	2.20±0.03/2.30±0.05	0.95	2
JJ03	2.30±0.07/2.40±0.06	0.95	2
CU07	4.78±0.04/1.38±0.04	3.46	2
PN01	2.34±0.01/2.13±0.04	1.09	2
SM01	2.45±0.03/2.37±0.02	1.03	2
SM04	1.54±0.09/1.45±0.0	1.06	2
SM06	1.76±0.02/1.89±0.03	0.94	2
SM09	2.35±0.12/1.36±0.12	1.72	2
SM10	3.97±0.02/1.98±0.12	2.00	2
SM11	1.56±0.01/1.90±0.03	0.82	4
CY01	2.18±0.02/2.34±0.02	0.93	3
CBR04	3.56±0.02/1.34±0.05	2.65	2
CBR05	2.34±0.03/2.45±0.08	0.95	3

ตารางที่ 7 แสดงความสามารถของราเน่าขาวทั้งสิ้น 20 ไอโซเลตในการสร้างแลคแคส เมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร LMB ที่มีการเติม ABTS ความเข้มข้น 0.001 มิลลิกรัม ที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เป็นเวลา 7 วัน (ต่อ)

ไอโซเลต	เส้นผ่านศูนย์กลางของวงสีเขียว/ เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี	อัตราส่วน	วันที่แสดงอัตราส่วนสูงที่สุด
YT01	1.45±0.02/1.32±0.02	1.09	2
YT02	2.97±0.03/1.98±0.02	1.50	3
YT03	0.56±0.03/0.65±0.07	0.86	8
YT04	0.32±0.02/0.56±0.01	0.57	5

* ราเน่าขาวสายพันธุ์อ้างอิง



รูปที่ 11 วงสีเขียวของราเน่าขาวที่คัดแยกเส้นใยบริสุทธิ์ได้

4.2.2 การตรวจสอบความสามารถในการทนร้อนของราเนาขาว

นำไอโซเลตราเนาขาวที่ให้อัตราส่วนเส้นผ่านศูนย์กลางวงสี่เหลี่ยมต่อเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีที่มีค่ามากกว่า 2.0 และราเนาขาวสายพันธุ์อ้างอิงคือ *Phanarocheate sorida* สายพันธุ์ SK7 นำมาวัดการเจริญเติบโตที่อุณหภูมิต่างๆ ตั้งแต่ 30 35 40 และ 45 องศาเซลเซียส วัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเป็นเวลา 5 วัน พบว่าทุกไอโซเลตของราเนาขาวสามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พบว่ามี 3 ไอโซเลตสามารถเจริญเติบโตได้โดยเรียงตามลำดับการเจริญเติบโตได้ดังนี้คือ CU07 SM10 และSK7 ตามลำดับ และที่ 45 องศาเซลเซียส พบว่ามีเพียง 2 ไอโซเลตสามารถเจริญเติบโตได้คือ CU07 และ SM10 (ตารางที่ 8)



ตารางที่ 8 ความสามารถในการเจริญของราเน่าขาวที่อุณหภูมิต่างๆ

	วันที่ เพาะเลี้ยง	CU07	SK7	SM10	CBR04	KB4
ชุดการ ทดลอง ควบคุม อุณหภูมิห้อง	1	++	+	+	+	+
	2	++	+	+	++	++
	3	+++	++	++	+++	+++
	4	+++	+++	++	+++	+++
	5	+++	+++	+++	+++	+++
30 องศา เซลเซียส	1	++	+	+	+	+
	2	++	+	++	++	++
	3	+++	+++	++	++	+++
	4	+++	+++	+++	+++	+++
	5	+++	+++	+++	+++	+++
35 องศา เซลเซียส	1	+	+	+	+	+
	2	+	++	++	++	++
	3	++	+++	++	++	++
	4	+++	+++	+++	++	++
	5	+++	+++	+++	+++	+++
40 องศา เซลเซียส	1	+	+	+	-	-
	2	++	+	++	-	-
	3	+++	+	++	-	-
	4	+++	+	+++	-	-
	5	+++	+	+++	-	-
45 องศา เซลเซียส	1	+	-	+	-	-
	2	+	-	+	-	-
	3	+	-	+	-	-
	4	+	-	+	-	-
	5	++	-	+	-	-

หมายเหตุ + เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีที่ความยาว 1-3 เซนติเมตร

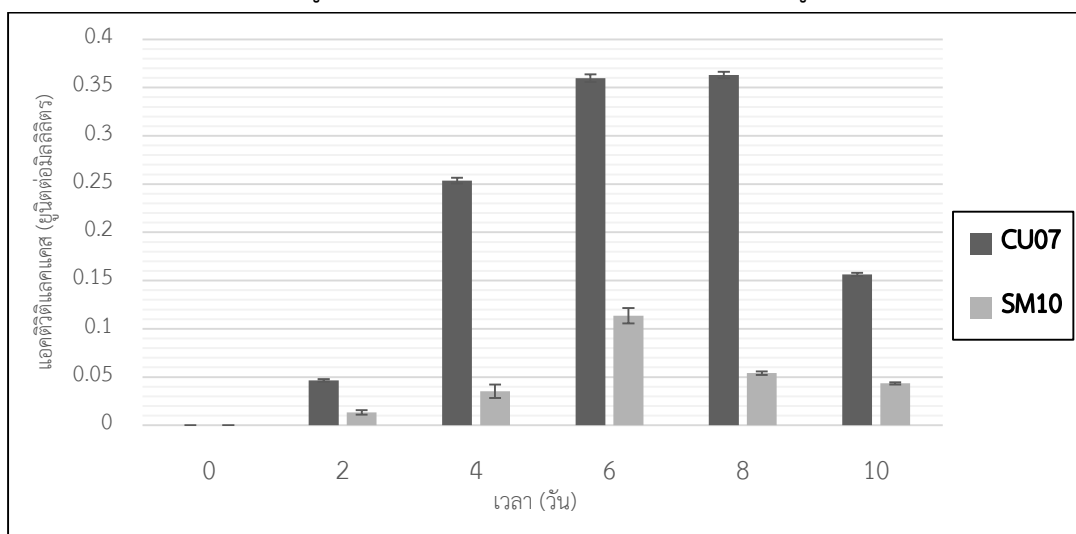
++ เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีที่ความยาว 4-6 เซนติเมตร

+++ เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีที่ความยาว 7-9 เซนติเมตร

- ไม่มีการเจริญเติบโต

4.2.3 การตรวจสอบการผลิตแลคแคสในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

นำไอโซเลตที่คัดเลือกได้จากหัวข้อ 4.2.2 คือ CU07 และ SM10 โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร production (GYP Medium) และเก็บตัวอย่างแลคแคส ทุก 2 วัน เป็นเวลา 10 วัน หลังจากนั้นนำมาวัดแอกติวิตีของแลคแคส พบว่าไอโซเลต CU07 มีแอกติวิตีแลคแคสสูงที่สุดเท่ากับ 0.363 ± 0.012 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 8 ของการทดลอง ซึ่งมากกว่า SM10 ซึ่งให้แอกติวิตีของแลคแคสเท่ากับ 0.113 ± 0.023 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 6 ของการทดลอง (รูปที่ 12)



รูปที่ 12 แอกติวิตีของแลคแคส ของราเน่าขาวไอโซเลต CU07 และไอโซเลต SM10 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร GYP medium เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที โดยเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน ที่อุณหภูมิ 27 ± 3 องศาเซลเซียส

4.3 การจัดจำแนกราเน่าขาว

4.3.1 การจัดจำแนกราเน่าขาวโดยการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ผลการทดลองพบว่า CU07 สามารถจัดจำแนกได้เป็นชนิด *Trametes polyzona* โดยมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาดังนี้ (รูปที่ 13)

แหล่งที่พบ ตอมะพร้าวผุ ภายในจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลักษณะที่มองเห็นด้วยตาเปล่า

หมวก รูปร่างลักษณะแผ่นครึ่งวงกลม ขนาด 7 เซนติเมตร X 10 เซนติเมตร ผิวสีขาว แข็ง เนื้อเยื่อมีลักษณะเป็น 2 ชั้นหนา 1-1.5 เซนติเมตร ด้านล่างของหมวกเห็นมีลักษณะเป็นรู มีลักษณะเอมิโนพอร์ (Hyphemnopore) มีสีขาวถึงเหลือง ขนาด 2-3 รูต่อเซนติเมตร ดอกเห็ดยึดเกาะกับขอนไม้โดยตรง (sessile) ไม่มีก้านดอก

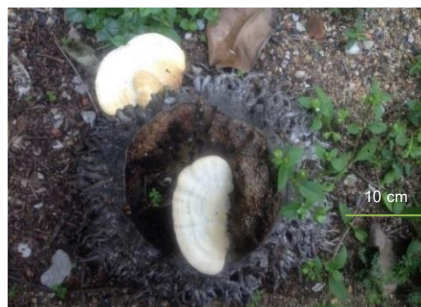
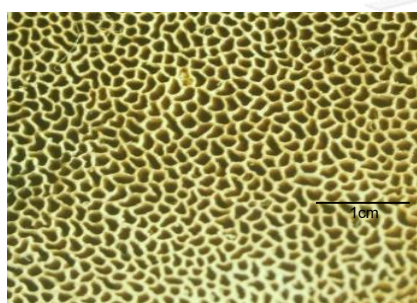
ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์

เบซิดิโอสปอร์ (basidiospore) รูปร่าง กลม รี ขนาด 2-3 ไมโครเมตร ผนังเรียบ บาง สีขาว ไม่ติดสี เมื่อทำปฏิกิริยากับ Melzer's reagent

ซิสซิเดียม (cystidium) มีขนาด 3X4 ไมโครเมตร

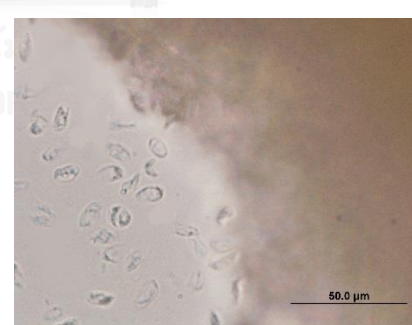
ลักษณะเส้นใย (hypha system) พันกันไม่เป็นระเบียบ ประกอบไปด้วยเส้นใย 3 ประเภท โดย generative hypha ผนังบาง สีใส ปรากฏเห็น clamp connection ขนาดกว้าง 3-5 ไมโครเมตร skeletal hyphae สีเหลืองอ่อน ผนังหนา และ binding hyphae ไม่มีสี ผนังหนา กว้าง 1.5-2.0 ไมโครเมตร

เบซิดียม (basidium) ประกอบด้วย 4 สเตอริกมา



ก. ลักษณะของรูภายใต้ดอกเห็ด

ข. แหล่งที่พบ



ค. ดอกเห็ด

ง. ลักษณะของเบซิดิโอสปอร์

รูปที่ 13 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราเนาขาว *Trametes polyzona* CU07

4.3.2 การจัดจำแนกราเนาขาวโดยวิธีทางชีววิทยาโมเลกุล

จากการเปรียบเทียบลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ (ความยาว 600 คู่เบส) ของ ไอโซเลต CU07 ในฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information (NCBI) โดยใช้วิธีการ BLAST พบว่าราเนาขาว 3 อันดับแรกที่มีความคล้ายคลึงกับลำดับเบสของไอโซเลต CU07 มีดังนี้ *Trametes polyzona* WR710-1, accession number JN848329 (ร้อยละ 99), *Trametes hirsuta* voucher CFMR accession number KJ1 4 0 6 3 2 (97%), *Trametes maxima* accession number HF947516.1 (96%), *Trametes socotrana* voucher accession number KC848313.1 (96%), *Trametes versicolor* strain YJ-9 accession number BJFC12724 (96%) ตามลำดับจากผลการวิเคราะห์ข้างต้น จึงสามารถสรุปได้ว่า CU07 คือ ราเนาขาวชนิด *Trametes polyzona* WR710-1, accession number JN848329

4.4 การตรวจสอบคุณสมบัติเริ่มต้น

น้ำดำที่ใช้ในการทดลองมาจากโรงงานเยื่อกระดาษยูคาลิปตัส โดยกระบวนการต้มเยื่อแบบคราฟต์จากหม้อต้มเยื่อที่ 2 โดยหม้อต้มเยื่อลักษณะคอลัมน์ขนาดใหญ่ปริมาตร 1000 ลิตร จำนวน 1 ใบ ซึ่งเป็นการต้มเยื่อแบบต่อเนื่อง โดยน้ำต้มเยื่อจะถูกส่งโดยใช้ระบบท่อภายในหม้อต้มเยื่อ และแผ่กระจายออกจากด้านบน ซึ่งกระบวนการดังกล่าวเป็นกระบวนการที่มีประสิทธิภาพสูงในการต้มเยื่อ และใช้สารเคมีในการย่อยสลายลิกนินออกจากน้ำดำในปริมาณที่มาก จากการวิเคราะห์น้ำดำเริ่มต้นแสดงในตารางที่ 9 และจากการสังเกตพบว่าน้ำมีความหนืด มีสีดำเข้ม (รูปที่ 14)



รูปที่ 14 ลักษณะของน้ำดำที่มาจากกระบวนการต้มเยื่อแบบต่อเนื่อง

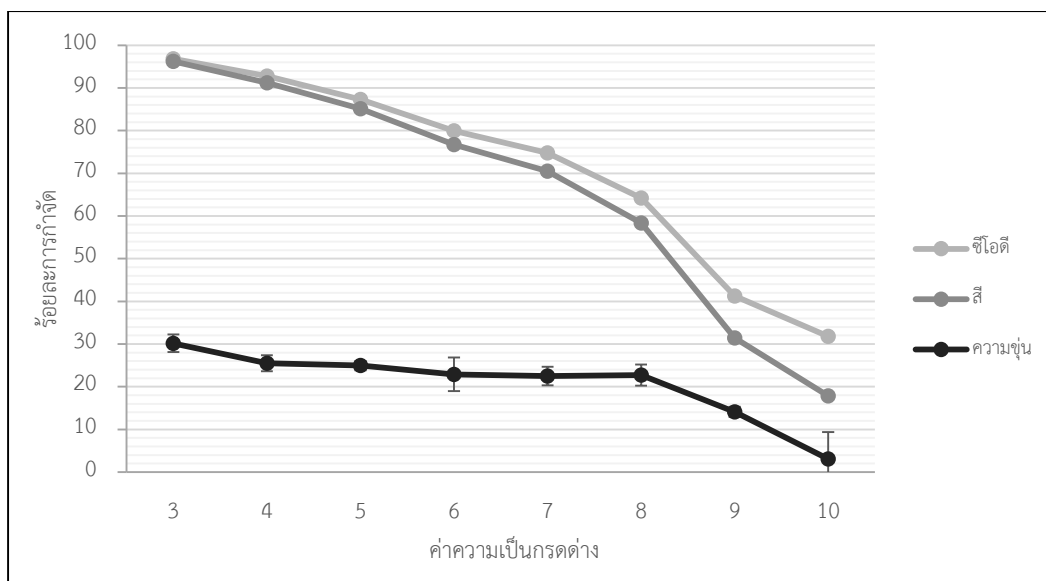
ตารางที่ 9 สมบัติทางกายภาพของน้ำดำที่ได้จากกระบวนการต้มเยื่อแบบคราฟต์

คุณสมบัติ	ค่าที่วัดได้
ซีโอดี	292,216 มิลลิกรัมต่อลิตร
สี	873,777 Pt-co unit
ความขุ่น	1,330 NTU
ค่าความเป็นกรดต่าง	13

นำน้ำดำที่ผ่านการตรวจสอบคุณสมบัติ น้ำดำเบื้องต้น เข้าสู่กระบวนการตกตะกอนโดยกรด กระบวนการทำลายเสถียรภาพคอลลอยด์ด้วยกระบวนการโคแอกกูเลชัน และกระบวนการปรับสภาพน้ำดำโดยราเนาขาวที่ตรึงบนดินเบา เพื่อกำจัดค่าซีโอดี สี และความขุ่น โดยผลการดำเนินการแสดงดังรายละเอียดดังนี้

4.5 กระบวนการปรับสภาพน้ำดำโดยกระบวนการตกตะกอน

ทำการตกตะกอนด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น ณ ที่ระดับความเป็นกรดต่างตั้งแต่ 3 ถึง 10 แล้วทำการแยกตะกอนโดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใสมาวัดซีโอดี สี และความขุ่น พบว่าค่าความเป็นกรดต่างที่ 3 ให้ค่าการกำจัดซีโอดีและสี สูงกว่าร้อยละ 96 และมีแนวโน้มลดลงเมื่อค่าความเป็นกรดต่างเพิ่มขึ้นจนถึงค่าความเป็นกรดต่างที่ 10 (ร้อยละ 21) และในกระบวนการตกตะกอนด้วยกรดพบว่าค่าความเป็นกรดต่างที่ 3 สามารถกำจัดความขุ่นได้ดีที่สุด (ร้อยละ 29.17) และมีแนวโน้มที่ลดลงเมื่อมีค่าความเป็นต่างเพิ่มขึ้นจนถึง 10 (ร้อยละ 3) (รูปที่ 15) ดังนั้นก่อนเริ่มทำการทดลองในตัวแปรอื่นๆต่อไป จึงกำหนดให้ปรับสภาพน้ำดำที่ค่าความเป็นกรดต่างที่ 3

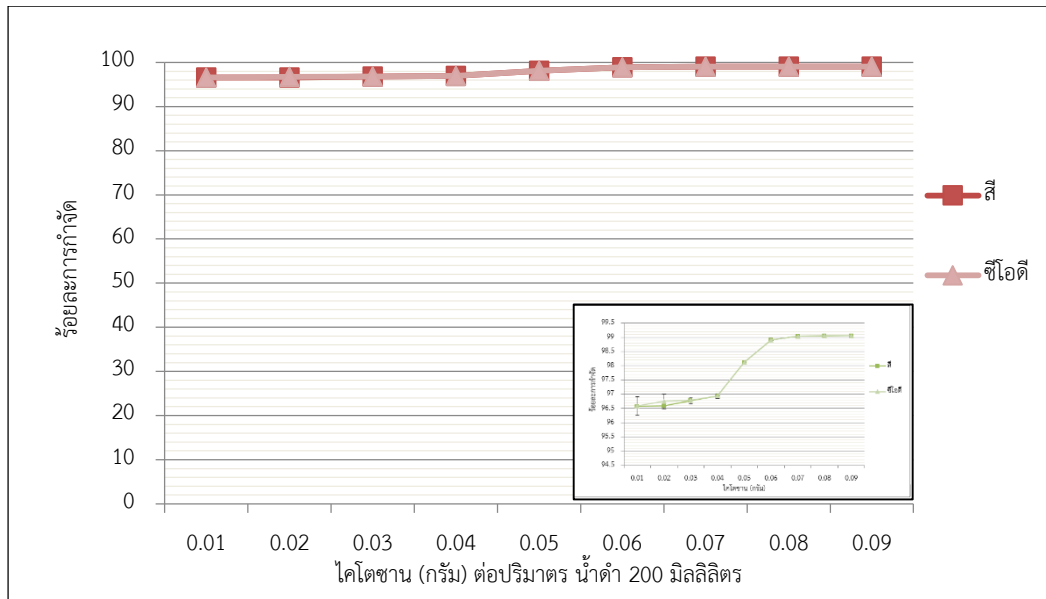


รูปที่ 15 ร้อยละการกำจัดซีโอติ ซี และความขุ่น ของน้ำดำโดยกระบวนการตกตะกอนโดยกรดซัลฟูริกเข้มข้นและปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที

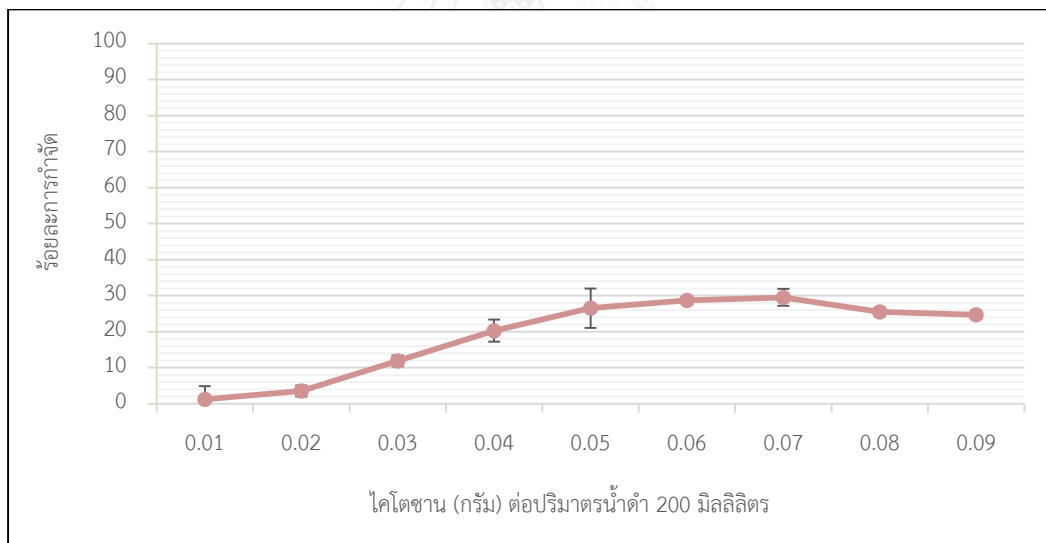
4.6 การรวมตะกอนโดยกระบวนการโคแอกกูเลชัน

4.6.1 ปริมาณโคแอกกูเลนต์ที่ใช้ในกระบวนการโคแอกกูเลชัน

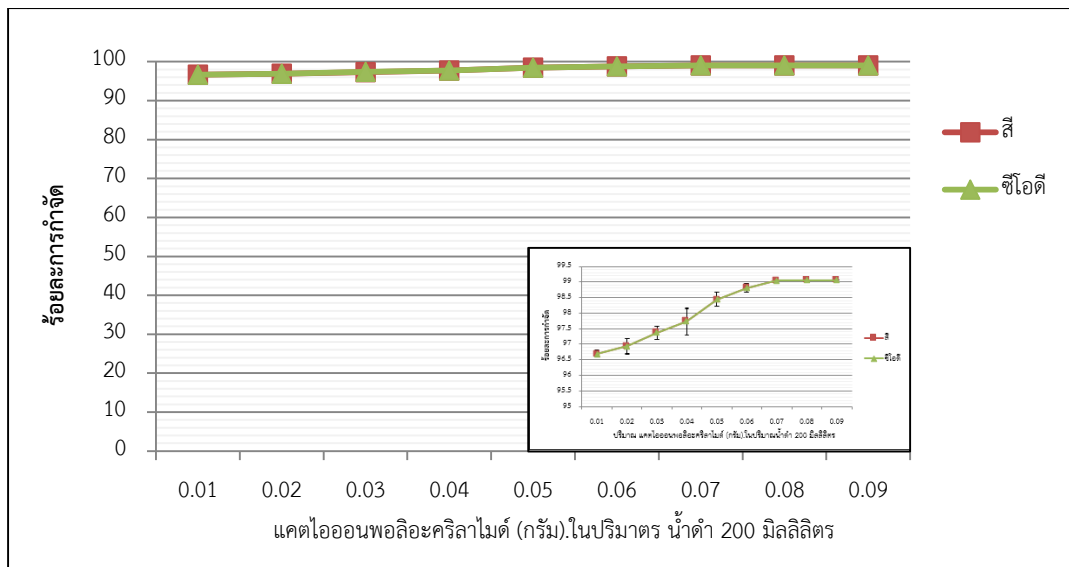
ในการศึกษาครั้งนี้ใช้สารโคแอกกูเลนต์คือ สารละลายโคโตะซานความเข้มข้นร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และสารละลายแคตไอออนพอลิอะคริลาไมด์ (C-PAM) ความเข้มข้นร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยสารละลายแคตไอออนพอลิอะคริลาไมด์ทำหน้าที่เป็นสารช่วยสารตะกอน โดยศึกษาปริมาณสารโคแอกกูเลนต์ทั้ง 2 ชนิด ที่ 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08 และ 0.09 กรัมต่อปริมาตรน้ำดำ 200 มิลลิลิตร ที่ความเร็วรอบ 140 รอบต่อนาที ระยะเวลาในการกวน 2 นาที โดยตกตะกอนจนกว่าตะกอนจะแยกชั้นสมบูรณ์ พบว่าปริมาณสารโคแอกกูเลนต์ที่ใช้ในกระบวนการโคแอกกูเลชันให้ร้อยละการกำจัดซีโอติและสี มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเมื่อใช้ปริมาณสารโคแอกกูเลนต์มากขึ้น โดยให้ร้อยละการกำจัดสูงสุดคือร้อยละ 99 (รูปที่ 16) และพบว่าสารละลายโคโตะซานสามารถกำจัดความขุ่นได้ที่ร้อยละ 29.5 (รูปที่ 17) เมื่อใช้สารโคแอกกูเลนต์ที่ 7 มิลลิลิตร และ สารละลายแคตไอออนพอลิอะคริลาไมด์สามารถกำจัดซีโอติ และสีได้ ร้อยละ 99 เช่นเดียวกัน (รูปที่ 18) แต่สารพอลิอะคริลาไมด์สามารถกำจัดความขุ่นได้ถึง ร้อยละ 50.4 เช่นเดียวกัน (รูปที่ 19) เมื่อใช้สารโคแอกกูเลนต์ที่ 7 มิลลิลิตร ดังนั้นก่อนทำการทดลองในตัวแปรอื่นๆต่อไปจึงให้กำหนดปรับค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 3 และใช้ปริมาณสารโคแอกกูเลนต์เท่ากับ 7 มิลลิลิตร



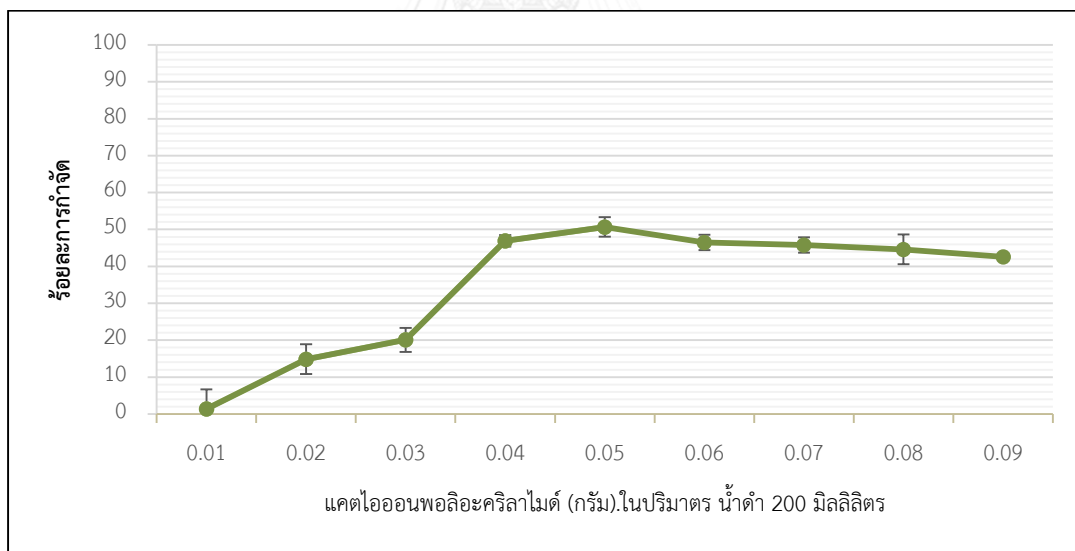
รูปที่ 16 ร้อยละการกำจัดซีไอดีและสีของน้ำดำต่อผลของปริมาณสารละลายโคโคซาน ที่ความเร็วในการกวน 140 รอบต่อนาที ระยะเวลาในการกวน 2 นาที และทิ้งให้ตกตะกอนอย่างสมบูรณ์ ค่าเฉลี่ยเบี่ยงเบนมาตรฐานไม่เกิน 0.05



รูปที่ 17 ร้อยละการกำจัดความขุ่น ของน้ำดำต่อผลของปริมาณสารละลายโคโคซาน ที่ความเร็วในการกวน 140 รอบต่อนาที ระยะเวลาในการกวน 2 นาที และทิ้งให้ตกตะกอนอย่างสมบูรณ์



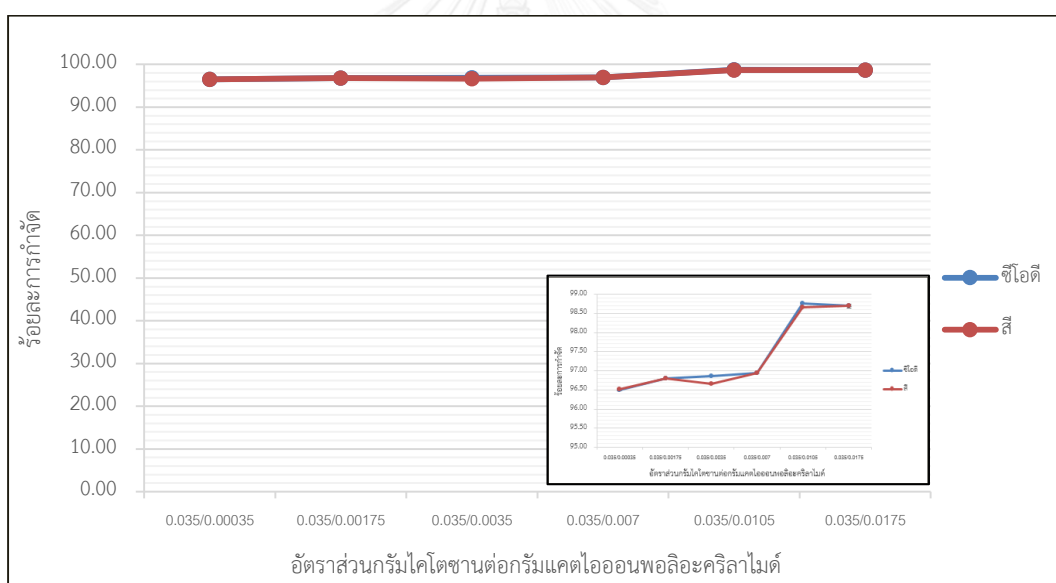
รูปที่ 18 ร้อยละการกำจัดซีโอที ซี ของน้ำดำต่อผลของสารช่วยสร้างตะกอนกลุ่ม แคลตไอออนพอลิอะคริลาไมด์ ที่ความเร็วในการกวน 140 รอบต่อนาที ระยะเวลาในการกวน 2 นาที และทิ้งให้ตกตะกอนอย่างสมบูรณ์ ค่าเฉลี่ยเบี่ยงเบนมาตรฐานไม่เกิน 0.05



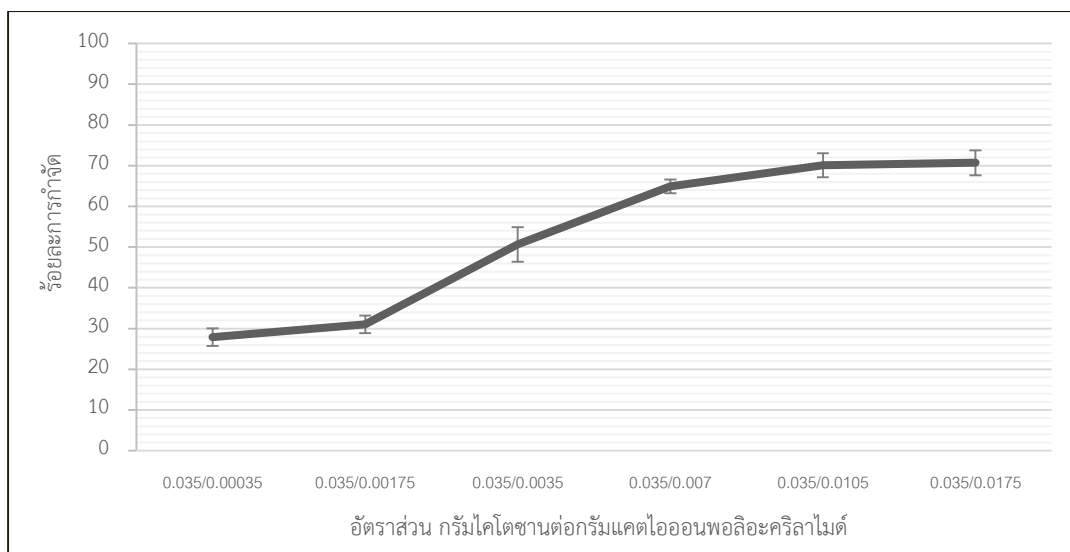
รูปที่ 19 ร้อยละการกำจัดความขุ่น ของน้ำดำต่อผลของสารช่วยสร้างตะกอนกลุ่มแคลตไอออนพอลิอะคริลาไมด์ ที่ความเร็วในการกวน 140 รอบต่อนาที ระยะเวลาในการกวน 2 นาที และทิ้งให้ตกตะกอนอย่างสมบูรณ์

4.6.2 อัตราส่วนที่เหมาะสมของโคแอ็คกูแลนท์ที่ใช้ในกระบวนการโคแอ็คกูแลชันน้ำค้ำ

นำน้ำค้ำที่ต้องการศึกษามาปรับค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 3 ด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น แล้วเติมสารโคแอ็คกูแลนท์ปริมาตร 7 มิลลิลิตร โดยศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมของสารโคแอ็คกูแลนท์ โดยใช้สารโคแอ็คกูแลนท์คือสารละลายโคโตซาน และสารช่วยสารตะกอนกลุ่มสารละลายแคตไอออน -พอลิอะคริลาไมด์ ได้ แก่ 100:1(0.035:0.00035), 20:1(0.035:0.00175), 1:0.1(0.035:0.0035) , 5:1(0.035:0.007), 3:1(0.035:0.0105), และ 2:1(0.035:0.00175) กรัมโคโตซาน : กรัมแคตไอออนพอลิอะคริลาไมด์ แล้วทำการกวนผสมเป็นเวลา 2 นาที ที่ความเร็วรอบ 140 รอบต่อนาที และทิ้งให้ตกตะกอนอย่างสมบูรณ์ ผลของอัตราส่วนผสมระหว่างสารละลายโคโตซานและแคตไอออน-พอลิอะคริลาไมด์ ต่อร้อยละการกำจัดซีโอดีและสี แสดงในรูปที่ 20 และร้อยละความขุ่นแสดงในรูปที่ 21 พบว่าที่อัตราส่วน 3:1 ปริมาตรสารละลายโคโตซานต่อปริมาตรสารละลายแคตไอออน-พอลิอะคริลาไมด์ ให้ร้อยละการกำจัดซีโอดีและสี เท่ากับ ร้อยละ 98.65 และที่อัตราส่วนดังกล่าวสามารถกำจัดความขุ่นได้ที่ร้อยละ 70



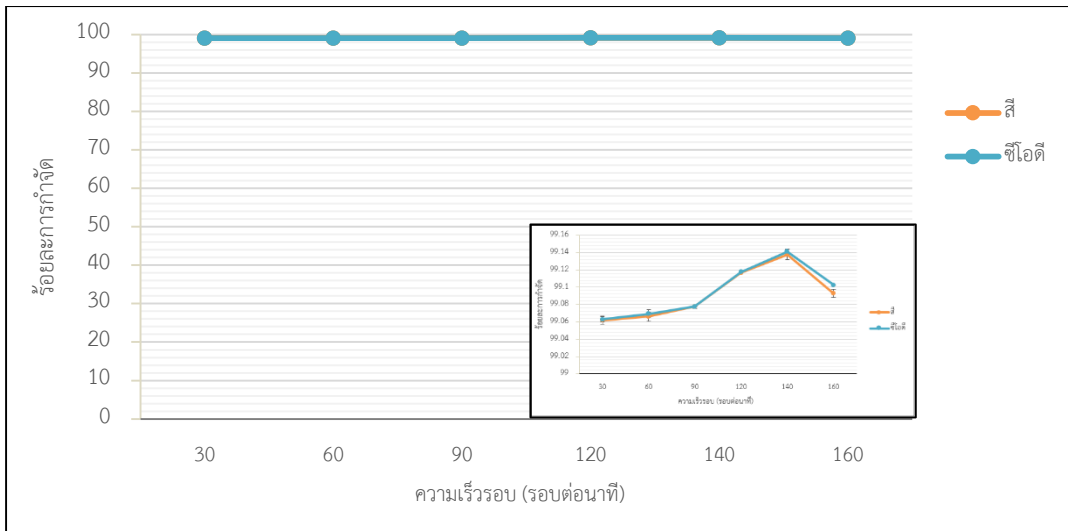
รูปที่ 20 ร้อยละการกำจัดซีโอดีและสี ของน้ำค้ำ ต่อผลของอัตราส่วนกรัมโคโตซานต่อกรัม แคตไอออน-พอลิอะคริลาไมด์ โดยใช้ความเร็วในการกวน 140 รอบต่อนาที ระยะเวลาในการกวน 2 นาที และทิ้งให้ตกตะกอนอย่างสมบูรณ์ ค่าเฉลี่ยเบี่ยงเบนมาตรฐานไม่เกิน 0.05



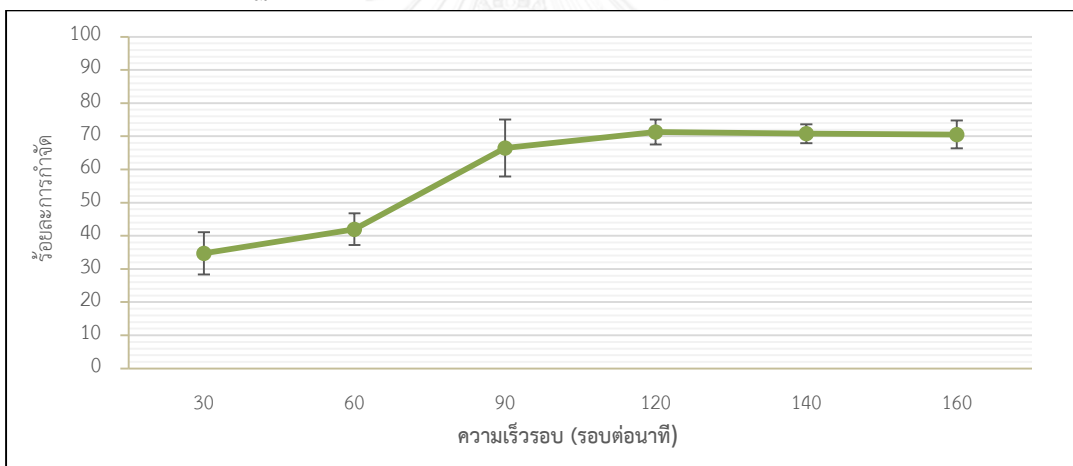
รูปที่ 21 ร้อยละการกำจัดความขุ่นของน้ำดำ ต่อผลของอัตราส่วนกรัมโคโตซาน ต่อ กรัมแคตไอออนพอลิอะคริลาไมด์ โดยใช้ความเร็วในการกวน 140 รอบต่อนาที ระยะเวลาในการกวน 2 นาที และทิ้งให้ตกตะกอนอย่างสมบูรณ์

4.6.3 ความเร็วรอบในการกวนผสม

ในการศึกษาผลของความเร็วรอบในการกวนผสม ต่อการทำลายเสถียรภาพคอลลอยด์ เริ่มต้นจากการนำน้ำดำที่ต้องการศึกษามาปรับค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 3 ด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น แล้วเติมสารโคแอสคูแลนท์ (สารละลายโคโตซานต่อสารละลายแคตไอออน-พอลิอะคริลาไมด์) ที่อัตราส่วน 0.035:0.0105 (กรัมต่อกรัม) ที่ปริมาตร 7 มิลลิลิตร แล้วทำการกวนผสมเป็นเวลา 2 นาที ที่ระดับความเร็วรอบ 30, 60, 90, 120, 140 และ 160 รอบต่อนาที หลังจากนั้นจึงตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอนนาน 60 นาที ผลของความเร็วรอบในการกวนผสมเพื่อรวมตะกอน ซึ่งรายงานผลในค่าร้อยละการกำจัดซีโอดีและร้อยละการกำจัดสี ได้แสดงดังในรูปที่ 22 และร้อยละการกำจัดความขุ่น พบว่าความเร็วรอบ 140 รอบต่อนาที สามารถกำจัดซีโอดีและสี ที่ร้อยละ 99.16 และเมื่อเพิ่มความเร็วรอบ 160 รอบต่อนาทีปรากฏว่าร้อยละการกำจัดลดลง และสามารถกำจัดความขุ่นที่ร้อยละ 40 ที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เมื่อเทียบกับความขุ่นเริ่มต้นดังแสดงในรูปที่ 23



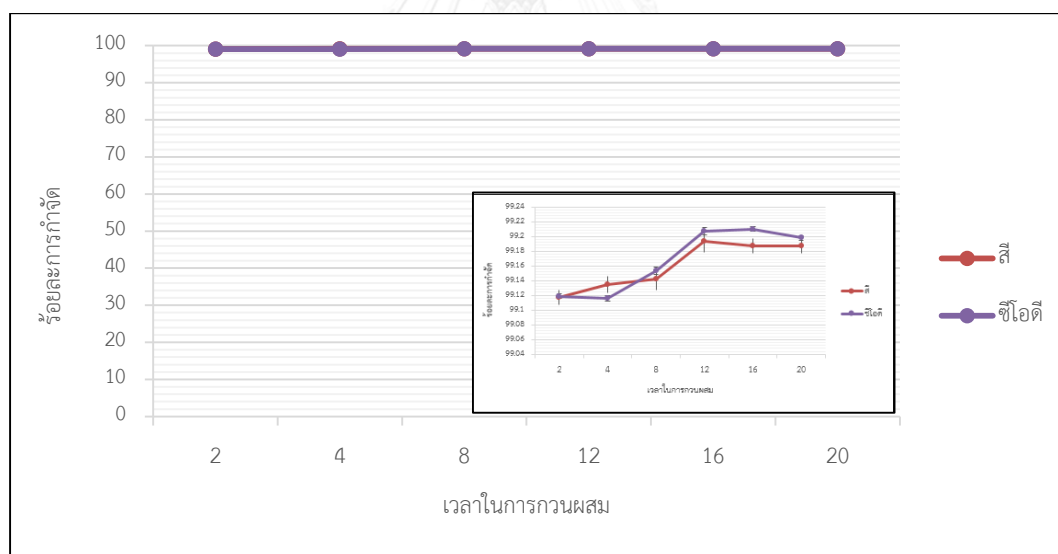
รูปที่ 22 ร้อยละการกำจัดซีโอดีและสี ของน้ำดำต่อความเร็วรอบในการกวนผสม โดยใช้สารละลายโคแอ็คกูแลนต์ ปริมาตร 7 มิลลิลิตร ระยะเวลาในการกวน 2 นาที และทิ้งให้ตกตะกอนอย่างสมบูรณ์ ค่าเฉลี่ยเบี่ยงเบนมาตรฐานไม่เกิน 0.05



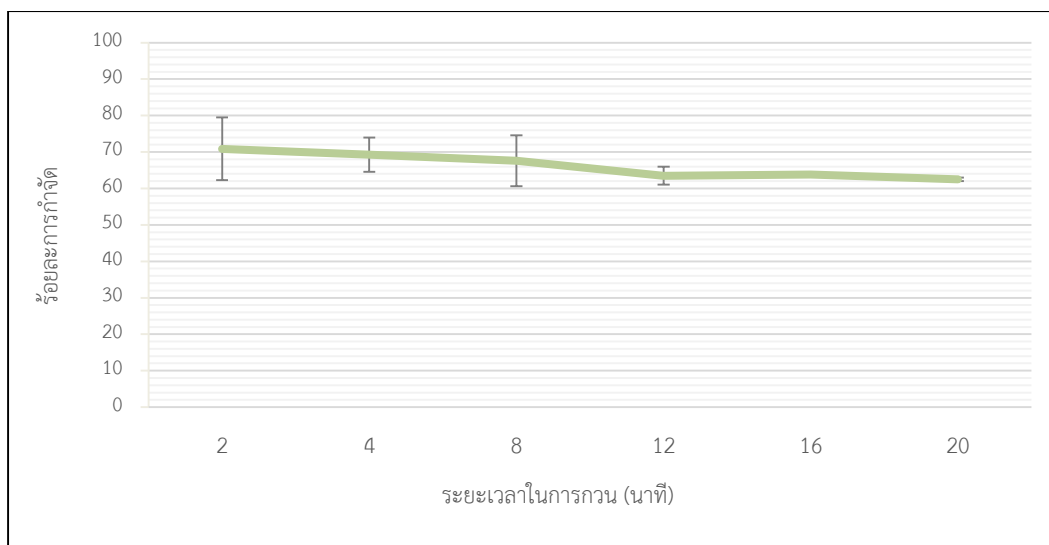
รูปที่ 23 ร้อยละการกำจัดความขุ่นของน้ำดำ ต่อความเร็วรอบในการกวนผสม โดยใช้สารละลายโคแอ็คกูแลนต์ ปริมาตร 7 มิลลิลิตร ระยะเวลาในการกวน 2 นาที และทิ้งให้ตกตะกอนอย่างสมบูรณ์

4.6.4 เวลาในการกวนผสม

ในการศึกษาผลของเวลาในการกวนผสม ต่อการทำลายเสถียรภาพคอลลอยด์ เริ่มต้นจากการนำน้ำดำที่ต้องการศึกษามาปรับค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 3 ด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น แล้วเติมสารโคแอล์กูแลนท์ (สารละลายโคโตะซานต่อสารละลายแคตไอออนพอลิอะคริลาไมด์) ที่อัตราส่วน 0.035:0.0105 (กรัมต่อกรัม) ที่ปริมาตร 7 มิลลิลิตร แล้วทำการกวนผสมที่ความเร็วคงที่ 140 รอบต่อนาที ด้วยเวลาที่ 2, 4, 8, 12, 16 และ 20 นาที ตามลำดับ จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้ชั้นตะกอนแยกออกจากชั้นน้ำอย่างสมบูรณ์ ผลของเวลาในการกวนผสมเพื่อรวมตะกอนได้รายงานผลในค่าของร้อยละการกำจัดซีโอติและร้อยละการกำจัดสี ดังแสดงในรูปที่ 24 และร้อยละความขุ่นดังแสดงในรูปที่ 25 พบว่าเมื่อเพิ่มระยะเวลาการกวนผสมจาก 2 นาที เป็น 12 นาที ปรากฏว่าร้อยละการกำจัดมีผลเพิ่มขึ้น โดยเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 99.11 เป็น 99.20 และเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการกวนเป็น 20 นาที ปรากฏว่าร้อยละการกำจัดซีโอติและสีคงที่ และพบว่าร้อยละการกำจัดค่าความขุ่นมีแนวโน้มคงที่ตลอดระยะเวลาในการกวนผสม



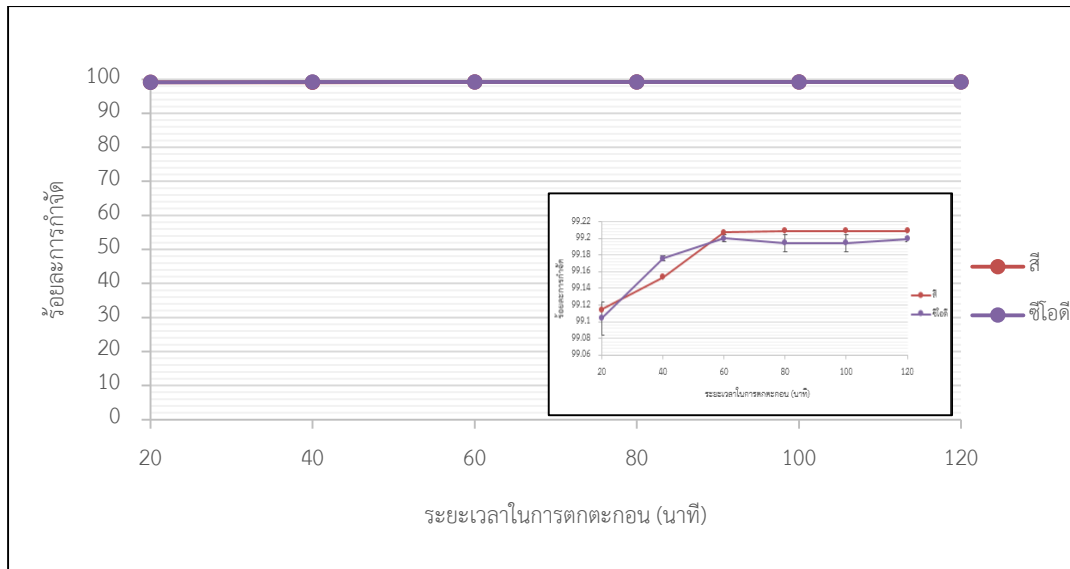
รูปที่ 24 ร้อยละการกำจัดซีโอติและสีของน้ำดำ ต่อระยะเวลาในการกวนผสม โดยใช้สารละลายโคแอล์กูแลนท์ปริมาตร 7 มิลลิลิตร ระยะเวลาในการกวน 2 นาที และทิ้งให้ตกตะกอนอย่างสมบูรณ์



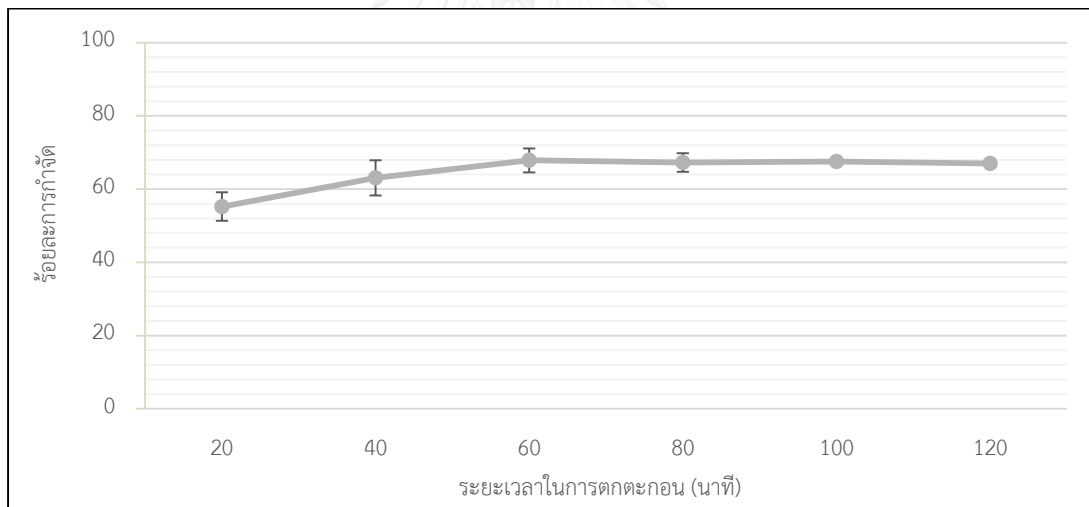
รูปที่ 25 ร้อยละการกำจัดความขุ่นของน้ำดำ ต่อระยะเวลาในการกวนผสมในการกวน ผสม โดยใช้ สารละลายโคแอกกูแลนท์ ปริมาตร 7 มิลลิลิตร ระยะเวลาในการกวน 2 นาที และทิ้งให้ตกตะกอน อย่างสมบูรณ์

4.6.7 เวลาในการตกตะกอน

ในการศึกษาเวลาในการตกตะกอนสำหรับกระบวนการทำลายเสถียรภาพคอลลอยด์เริ่มต้นจากการนำน้ำดำที่ต้องการศึกษามาปรับค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 3 ด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้นแล้วเติมสารโคแอกกูแลนท์ (สารละลายโคโคซานต่อสารละลายแคตไอออน-พอลิอะคริลาไมด์) ที่อัตราส่วน 0.035:0.0105 (กรัมต่อกรัม) ที่ปริมาตร 7 มิลลิลิตรแล้วทำการกวนผสมที่ความเร็วคงที่ 140 รอบต่อนาที ระยะเวลาในการกวน 2 นาที หลังจากนั้นทิ้งให้ชั้นตะกอนแยกจากชั้นน้ำเป็นระยะเวลา 20, 40, 60, 80, 100 และ 120 นาที ผลของเวลาในการตกตะกอนสำหรับกระบวนการทำลายเสถียรภาพคอลลอยด์ ซึ่งรายงานผลในค่าร้อยละของการกำจัดซีโอดี และสี ดังแสดงในรูปที่ 26 และ ร้อยละการกำจัดความขุ่นดังแสดงในรูปที่ 27 พบว่าที่ระยะเวลา 60 นาที สามารถกำจัดร้อยละซีโอดีและสี 99.12 โดยเมื่อพิจารณาแนวโน้มการกำจัดซีโอดีและสี จาก 20 นาที เป็น 60 นาที พบว่ามีแนวโน้มการเพิ่มขึ้นจาก 99.06 เป็น 99.12 และเมื่อทำการเพิ่มระยะเวลาในการกวนจาก 60 นาที เป็น 120 นาที พบว่าร้อยละการกำจัดซีโอดีและสี ไม่เปลี่ยนแปลง และผลของเวลาในการตกตะกอน ต่อร้อยละการกำจัดความขุ่นโดยปรากฏว่า ที่ร้อยละ 60 นาที ให้ร้อยละคงที่ และเมื่อเพิ่มระยะเวลาการตกตะกอนปรากฏว่าความขุ่นคงที่



รูปที่ 26 ร้อยละการกำจัดซีโอติและสี ของน้ำดำต่อระยะเวลาในการตกตะกอน โดยใช้สารละลายโคแอลลูเจนท์ปริมาตร 7 มิลลิลิตร ความเร็วรอบในการกวน 140 รอบต่อนาที ระยะเวลาในการกวน 2 นาที และทิ้งให้ตกตะกอนอย่างสมบูรณ์ ค่าเฉลี่ยเบี่ยงเบนมาตรฐานไม่เกิน 0.05

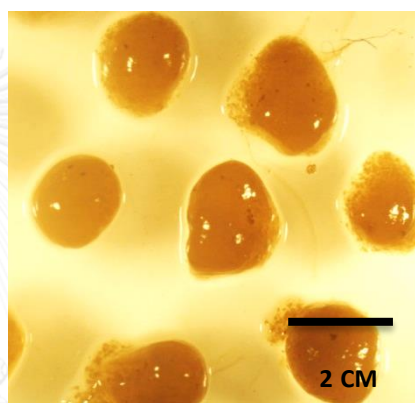


รูปที่ 27 ร้อยละการกำจัดความขุ่นของน้ำดำ ต่อระยะเวลาในการตกตะกอน โดยใช้สารละลายโคแอลลูเจนท์ปริมาตร 7 มิลลิลิตร ความเร็วรอบในการกวน 140 รอบต่อนาที ระยะเวลาในการกวน 2 นาที และทิ้งให้ตกตะกอนอย่างสมบูรณ์

ดังนั้นก่อนเริ่มทำการทดลองต่อไปจะเริ่มทำการปรับค่าความเป็นกรดต่างของน้ำดำให้มีค่าเท่ากับ 3 เติมสารโคเอ็คกุลแลนท์ (สารละลายโคโตซานและสารละลายแคตไอออน-พอลิอะคริลาไมด์) ที่อัตราส่วน 0.035:0.0105 (กรัมต่อกรัม) ปริมาตร 7 มิลลิลิตร พร้อมกวนผสมที่ความเร็วรอบ 140 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ 60 นาที เพื่อให้ตะกอนแยกตัวออกชั้นน้ำดำ หลังจากแยกตะกอนจากชั้นน้ำดำแล้วจึงนำเข้าสู่การปรับสภาพน้ำดำโดยราเนาขาวที่ตรึงบนดินเบาต่อไป

4.7 การกำจัดซีโอดี สี และความขุ่นของน้ำดำที่ผ่านกระบวนการโคเอ็คกุลแลนท์ร่วมกับราเนาขาวบนดินเบา

4.7.1 ลักษณะเซลล์ตรึงราเนาขาว



ก. ราเนาขาว *T. polyzona* CU07 บนอาหารแข็ง

ข. ลักษณะ pellet ราเนาขาวที่ถูกตรึงบนดินเบา

รูปที่ 28 (ก-ข) ลักษณะเส้นใยของราเนา

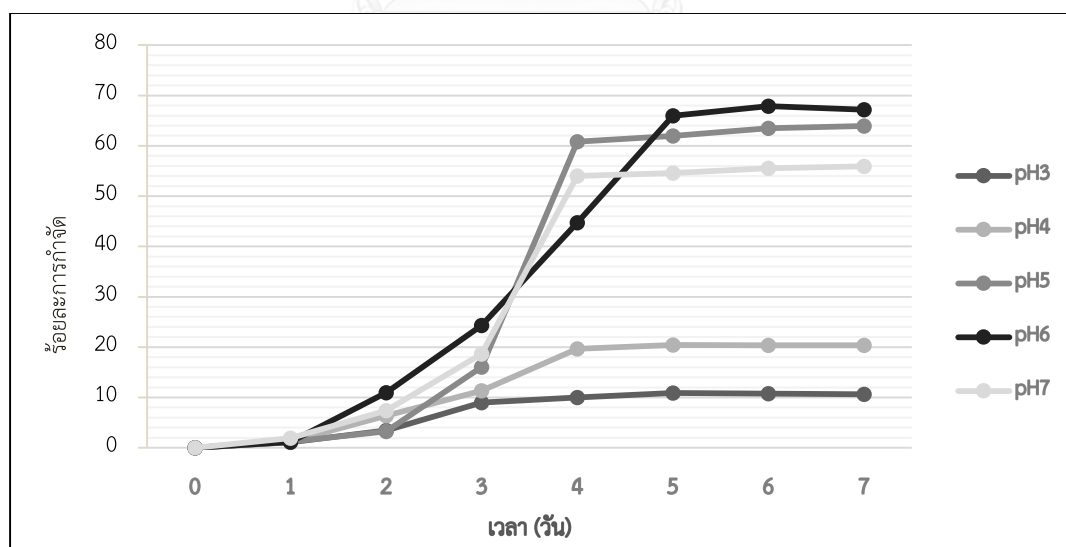
- ก. ลักษณะของเส้นใยราเนาขาวบนอาหารแข็ง Potato dextrose agar (PDA) ที่เลี้ยงเป็นระยะ 4 วัน
- ข. ลักษณะของเส้นใยราเนาขาวที่ตรึงบนดินเบาที่เลี้ยงเป็นระยะ 5 วันบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที โดยถ่ายกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ

4.7.2 ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการกำจัดซีโอดี สี และความขุ่นของน้ำดำที่ผ่านกระบวนการโคเอ็คกุลแลนท์ร่วมกับราเนาขาวที่ตรึงบนดินเบา

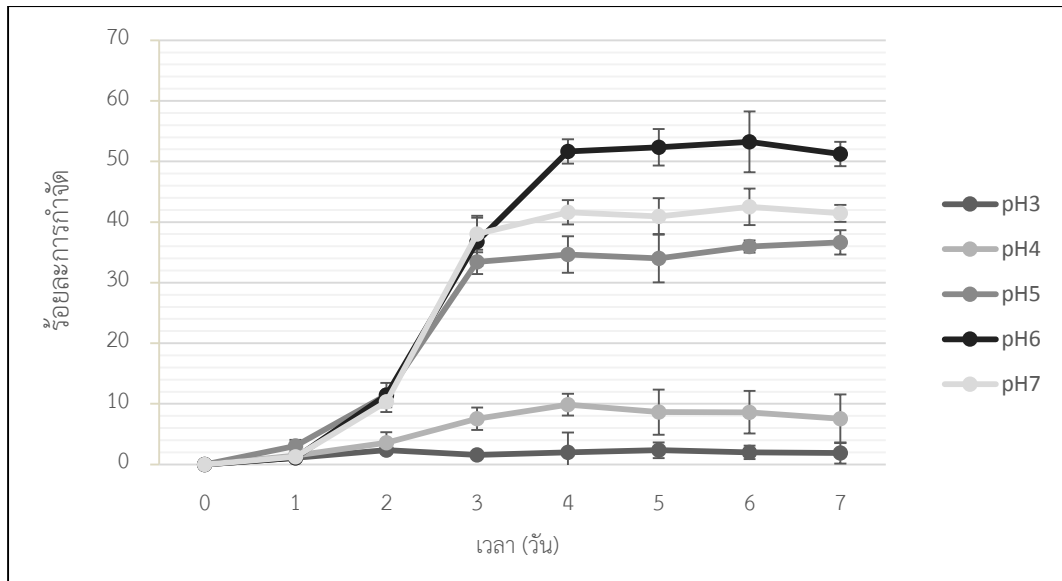
การทดลองการปรับสภาพน้ำดำโดยราเนาขาวบนดินเบา โดยทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสม คือ ค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้น แหล่งสารอาหารที่เหมาะสม โดยการออกแบบการทดลองแบบ Factorial Design (FD) เพื่อหาแหล่งที่เหมาะสม และความเข้มข้นของสารอาหารที่เหมาะสมโดยออกแบบการทดลองแบบ CCD โดยวิธีทางสถิติ response surface methodology (RSM) โดยมีรายละเอียดผลการทดลองดังนี้

4.7.2.1 ศึกษาระดับของค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นที่เหมาะสมในการกำจัดซีโอดี สี และความขุ่นของน้ำดำโดยใช้ราเน่าขาว *T. polyzona* CU07 ที่ตรึงบนดินเบา

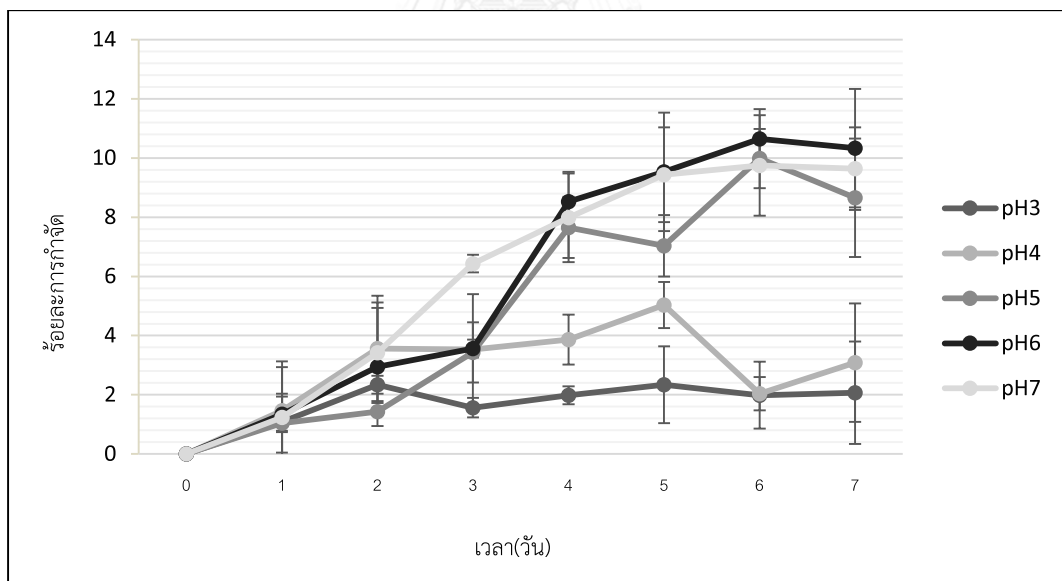
จากการทดลองใช้ราเน่าขาว *T. polyzona* CU07 ที่ตรึงบนดินเบา เพื่อศึกษา ร้อยละการกำจัดซีโอดี สี และร้อยละการกำจัดความขุ่น โดยเริ่มต้นจากการชั่งราเน่าขาวที่ตรึงบนดินเบาน้ำหนัก 5 กรัมเปียกลงในน้ำดำที่มีการเติมสารอาหารคือ กลูโคสที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 และแอมโมเนียมคลอไรด์ ร้อยละ 0.12 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เลี้ยงในอุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ที่ค่าความเป็นกรดต่างที่ต่างกันตั้งแต่ 3-7 พบว่าราเน่าขาวที่ตรึงบนดินเบาสามารถกำจัดซีโอดี สี และความขุ่นได้สูงที่สุด ได้ที่ ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5 และ 6 โดยสามารถลดสีได้ร้อยละการกำจัดที่ 60.81 และ 65.99 ตามลำดับ ในวันที่ 5 ของการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 29 สามารถกำจัดซีโอดีได้ร้อยละ 51.67 ในวันที่ 4 ของการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 30 สามารถกำจัดความขุ่นได้ร้อยละ 10.5 ในวันที่ 6 ของการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 31 ตามลำดับ โดยเมื่อวัดแอกติวิตีแลคแคสในน้ำดำหลังผ่านกระบวนการลดสีโดยราเน่าขาวพบว่า แอกติวิตีเอนไซม์สูงที่สุดที่ 0.332 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในค่าความเป็นกรดต่างที่ 6 ในวันที่ 5 ของการทดลอง และในวันที่ 6 และ 7 แอกติวิตีของเอนไซม์ยังคงอยู่ที่ 0.323 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 10 และได้นำมา ร้อยละการกำจัดซีโอดี สี และความขุ่น นำมาเปรียบเทียบการร้อยละการกำจัดซีโอดี สี และความขุ่น ที่ วันที่ 4 ของการศึกษาโดยวิธี DMRT ในตารางที่ 11.



รูปที่ 29 กราฟแสดงผลของร้อยละการกำจัดสีของ *T. polyzona* CU07 ที่ตรึงบนดินเบาเมื่อเติมอาหาร กลูโคส 1% (น้ำหนักต่อปริมาตร) และ แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.12% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ต่อสภาวะค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นต่างๆ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานไม่เกิน 0.005 ตัวอักษรที่ต่างกันในการกราฟแสดงถึงให้เห็นค่าความแตกต่างของนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$)



รูปที่ 30 กราฟแสดงผลของร้อยละการกำจัดสปอร์ของ *T. polyzona* CU07 ที่ตรึงบนดินเบาเมื่อเติมอาหาร กลูโคส 1% (น้ำหนักต่อปริมาตร) และแอมโมเนียมคลอไรด์ 0.12% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ต่อสภาวะค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นต่างๆตัวอักษรที่ต่างกันในกราฟแสดงถึงให้เห็นค่าความแตกต่างของนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$)

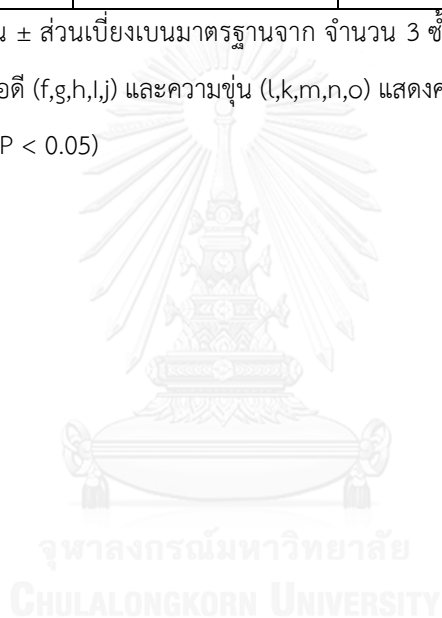


รูปที่ 31 กราฟแสดงผลของร้อยละการกำจัดความชุ่มชื้นของ *T. polyzona* CU07 ที่ตรึงบนดินเบาเมื่อเติมอาหาร กลูโคส 1% (น้ำหนักต่อปริมาตร) และแอมโมเนียมคลอไรด์ 0.12% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ต่อสภาวะค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นต่างๆ ตัวอักษรที่ต่างกันในกราฟแสดงถึงให้เห็นค่าความแตกต่างของนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$)

ตารางที่ 10 เปรียบเทียบการร่อยละการกำจัดซีโอดี สี และความชุ่มชื้นที่ วันที่ 4 ของการศึกษา

ค่าความเป็นกรดต่าง	ร่อยละการกำจัดที่วันที่ 4 ของการทดลอง		
	สี*	ซีโอดี*	ความชุ่มชื้น*
3	9.97±0.02 ^a	1.98±0.10 ^f	1.97±0.12 ^l
4	19.93 ±0.12 ^b	9.84±0.11 ^g	3.74±0.17 ^k
5	44.64±0.07 ^c	34.62±0.14 ^h	7.61±0.20 ^m
6	60.87±0.09 ^d	51.98±0.15 ⁱ	7.64±0.21 ⁿ
7	54.48±0.11 ^e	41.64±0.19 ^j	7.93±0.30 ^o

*ค่าเฉลี่ยเบี่ยงเบนมาตรฐาน ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจาก จำนวน 3 ซ้ำ และความแตกต่างของตัวยกกำลังในคอลัมน์ของสี (a,b,c,d,e) ซีโอดี (f,g,h,i,j) และความชุ่มชื้น (l,k,m,n,o) แสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ANOVA P < 0.05)



ตารางที่ 11 แอคติวิตีของเอนไซม์แลคแคสภายในน้ำดำที่ผ่านกระบวนการกำจัดซีโอดี สี และความ
 ชุ่นในการสภาวะค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสม

pH	แอคติวิตีของแลคแคส (ยูนิตต่อมิลลิเมตร)						
	ระยะเวลาในการเลี้ยง						
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6	วันที่ 7
Con trol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3	ND	ND	ND	ND	0.0129 ^{b,1} ±0.001	0.0123 ^{b,1} ±0.001	0.0234 ^{c,2} ±0.021
4	ND	ND	ND	0.0232 ^{c,1} ±0.011	0.1032 ^{f,2} ±0.04	0.1233 ^{g,2} ±0.021	0.0234 ^{h,2} ±0.023
5	ND	ND	0.0012 ^{a,1} ±0.001	0.0543 ^{d,2} ±0.012	0.0113 ^{g,3} ±0.023	0.214 ^{h,3} ±0.091	0.210 ^{h,3} ±0.014
6	ND	ND	ND	0.0915 ^{b,3} ±0.014	0.332 ^{i,5} ±0.023	0.311 ^{i,4} ±0.101	0.323 ^{i,4} ±0.016
7	ND	ND	ND	0.0875 ^{e,3} ±0.016	0.0865 ^{e,4} ±0.026	0.224 ^{h,3} ±0.010	0.0235 ^{c,1} ±0.013

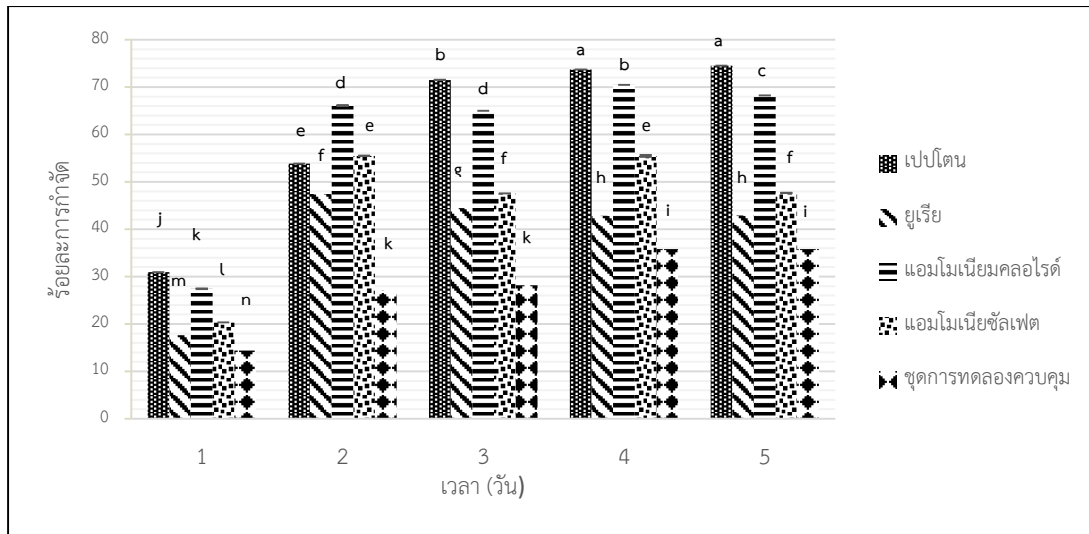
ND หมายถึง ไม่สามารถตรวจวัดได้ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ และความ
 ต่างของด้วยกำลังโดยตัวอักษร (a, b, c, d, e, f, g, h) แสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ โดยให้
 a คือกิจกรรมเอนไซม์แลคแคสที่ต่ำที่สุด และตัวเลข (1, 2, 3, 4, 5) แสดงถึงค่าความแตกต่างระหว่างคอลัมน์ ที่
 ความเชื่อมั่น 95% (ANOVA $P < 0.05$) โดยกำหนดให้ 1 คือกิจกรรมเอนไซม์แลคแคสที่ต่ำที่สุดในแต่ละวัน

4.7.2.2 ศึกษาแหล่งสารอาหารที่เหมาะสมในการกำจัดซีโอดี ซี และความชุ่มของน้ำดำโดยใช้ราเนาขาว *T. polyzona* CU07 ที่ตรึงบนดินเบา

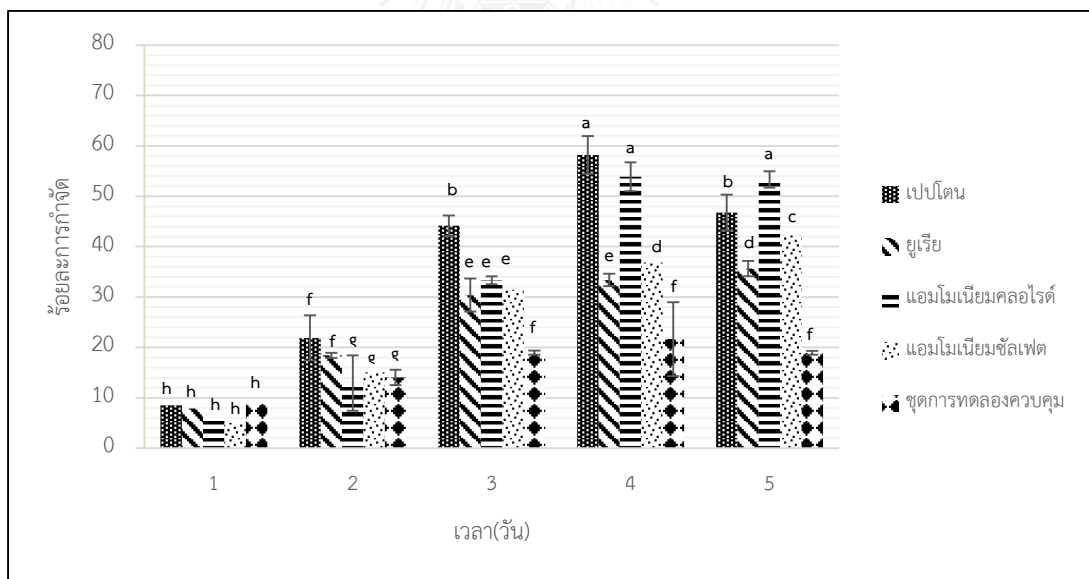
จากการทดลองพบว่า ราเนาขาว *T. polyzona* CU07 ที่ตรึงบนดินเบา เลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน โดยทำการศึกษาแหล่งคาร์บอน 2 ประเภทคือ กลูโคส และซูโครส และแหล่งไนโตรเจน 2 ประเภทคือ แหล่งไนโตรเจนสารอินทรีย์ คือ เปปโตน ยูเรีย และ แหล่งสารอนินทรีย์คือ แอมโมเนียมซัลเฟต และแอมโมเนียมคลอไรด์ โดยศึกษาที่ความเข้มข้นคาร์บอนที่ร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และความเข้มข้นของไนโตรเจนร้อยละ 0.12 (น้ำหนักต่อปริมาตร) พบว่าเมื่อเติมสารอาหารกลูโคสและเปปโตน สามารถกำจัดซีได้ร้อยละสูงที่สุดที่ 74.71 ในวันที่ 5 ของการทดลอง ซึ่งเป็นสารอาหารไนโตรเจนอินทรีย์ และเมื่อเปรียบเทียบกับสารอาหารไนโตรเจนประเภท อนินทรีย์ พบว่าแอมโมเนียมคลอไรด์สามารถให้ร้อยละการกำจัดซีที่สูงที่สุดในประเภทดังกล่าวร้อยละ 70.48 ในวันที่ 4 ของการทดลอง เมื่อเทียบกับชุดการทดลองควบคุมที่สามารถกำจัดได้ร้อยละ 35.67 ดังแสดงรูปที่ 32

เมื่อทำการศึกษาการกำจัดซีโอดีพบว่า ร้อยละการกำจัดซีโอดีสูงที่สุดเมื่อเติมสารอาหารประเภทกลูโคสและเปปโตนที่ร้อยละ 58.18 ในวันที่ 4 ของการทดลอง และแหล่งสารอาหารกลูโคสกับแหล่งสารอาหารประเภทสารอนินทรีย์ คือแอมโมเนียมคลอไรด์ ที่ร้อยละ 53.84 ในวันที่ 4 ของการทดลอง เมื่อเทียบกับชุดการทดลองควบคุมโดยสามารถกำจัดได้สูงที่สุดที่ 21.37 ของการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 33

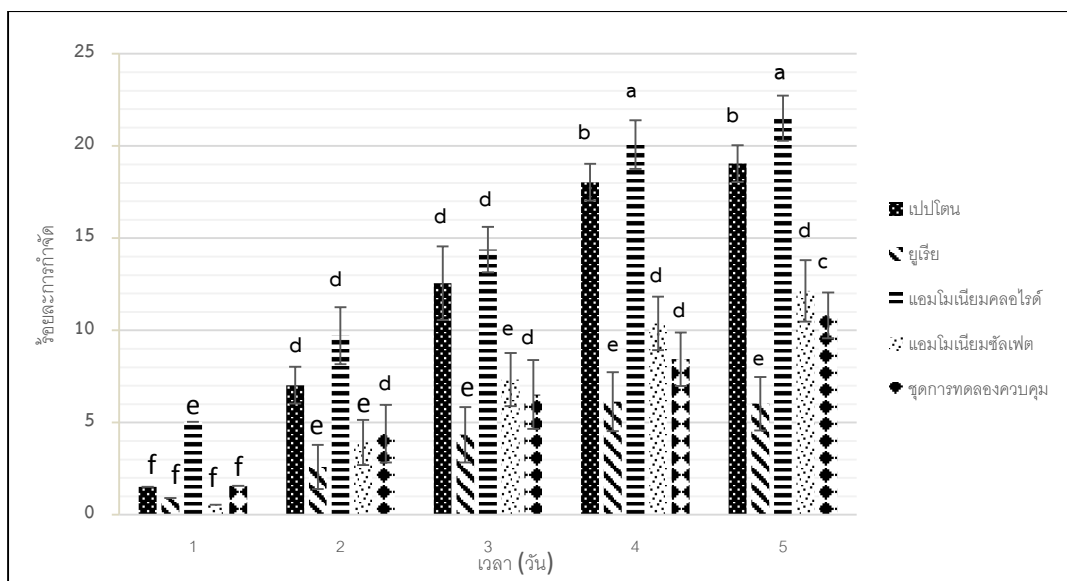
และสามารถกำจัดความชุ่มโดยร้อยละการกำจัดสูงที่สุดคือ แอมโมเนียมคลอไรด์ที่ร้อยละ 21.38 ในวันที่ 5 ของการทดลองและเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุมพบว่า เพียง 10.81 ดังแสดงในรูปที่ 4.24 โดยเมื่อวัดแอกติวิตีของเอนไซม์แลคเคสภายในน้ำดำหลังกระบวนการลดซีโอดี ซี และความชุ่ม พบว่าสามารถวัดแอกติวิตีแลคเคสจากแหล่งไนโตรเจนประเภท เปปโตน มีค่า 0.224 ± 0.15 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 5 ของการทดลอง และแอมโมเนียมคลอไรด์ที่ 0.198 ± 0.64 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 5 ของการทดลอง เช่นกัน โดยแหล่งไนโตรเจนประเภทยูเรียไม่สามารถวัดแอกติวิตีเอนไซม์ได้ เนื่องจากน้ำเสียสีเข้ม จึงไม่สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ และแหล่งไนโตรเจนแอมโมเนียมซัลเฟตสามารถวัดแอกติวิตีแลคเคสได้ 0.023 ± 0.01 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งแสดงในตารางที่ 13



รูปที่ 32 ผลของร้อยละการกำจัดสัตรูต่อแหล่งสารอาหารไนโตรเจนประเภทต่างๆ โดยใช้ราเฝ้าขาว *T. polyzona* CU07 โดยใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสที่ความเข้มข้น 1% (น้ำหนักต่อปริมาตร) และแหล่งไนโตรเจนต่างๆ ที่ความเข้มข้น 0.12 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) ตัวอักษรที่ต่างกันในกราฟแสดงถึงให้เห็นค่าความแตกต่างของนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$)



รูปที่ 33 ผลของร้อยละการกำจัดสัตรูโอดีต่อแหล่งสารอาหารไนโตรเจนประเภทต่างๆ โดยใช้ราเฝ้าขาว *T. polyzona* CU07 โดยใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสที่ความเข้มข้น 1% (น้ำหนักต่อปริมาตร) และแหล่งไนโตรเจนต่างๆ ที่ความเข้มข้น 0.12 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) ตัวอักษรที่ต่างกันในกราฟแสดงถึงให้เห็นค่าความแตกต่างของนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$)



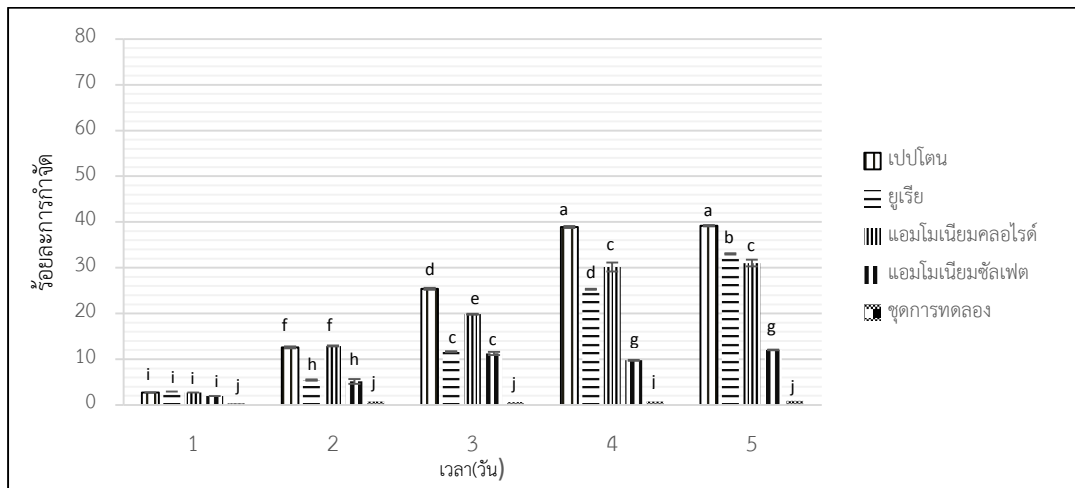
รูปที่ 34 ผลของร้อยละการกำจัดความชุ่นแหล่งสารอาหารไนโตรเจนประเภทต่างๆ โดยใช้ราเฝ้าขาว *T. polyzona* CU07 โดยใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสที่ความเข้มข้น 1% (น้ำหนักต่อปริมาตร) และแหล่งไนโตรเจนต่างๆที่ความเข้มข้น 0.12 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) ตัวอักษรที่ต่างกันในกราฟแสดงถึงให้เห็นค่าความแตกต่างของนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$)

พบว่าเมื่อเลี้ยงราเฝ้าขาว *T. polyzona* CU07 ที่ตริงบนดินเบา โดยใช้แหล่งซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และความเข้มข้นของไนโตรเจนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.12 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และศึกษาของแหล่งไนโตรเจน พบว่าเมื่อเติมสารอาหารประเภทซูโครสต่อแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ คือเปปโตน ให้ร้อยละการกำจัดสูงสุดที่ 38.93 ในวันที่ 4 ของการทดลอง และแหล่งซูโครสต่อแหล่งไนโตรเจนประเภทสารอนินทรีย์คือแอมโมเนียมคลอไรด์ที่ร้อยละ 31.15 ในวันที่ 5 ของการทดลอง โดยชุดการควบคุมสามารถกำจัดได้ 0.728 ของการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 35

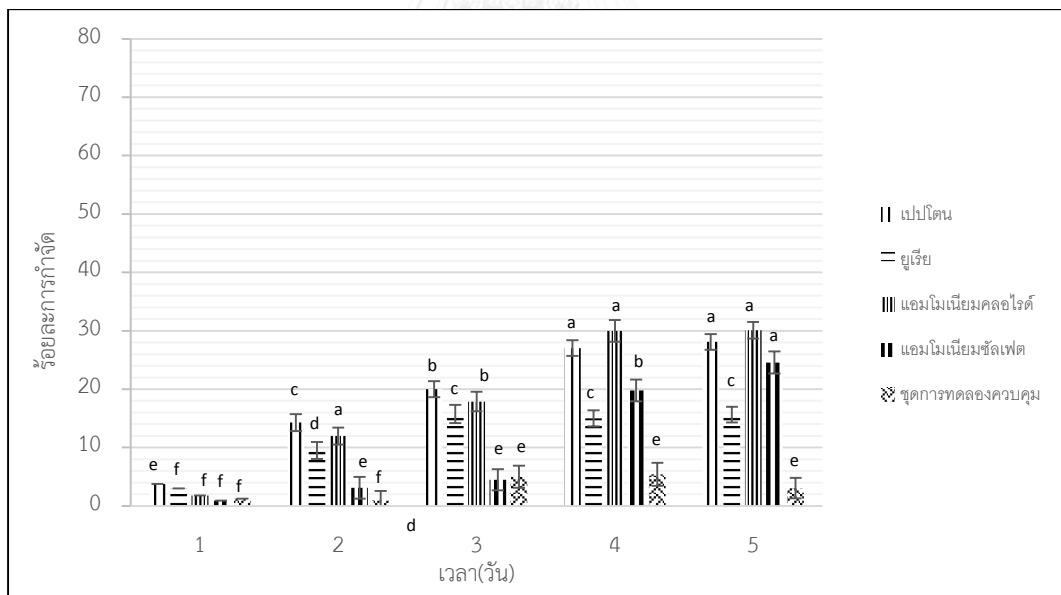
เมื่อทำการศึกษาร้อยละการกำจัดซีโอดีพบว่าร้อยละการกำจัดซีโอดีสูงสุดเมื่อเติมสารอาหารประเภทกลูโคสและเปปโตนที่ร้อยละ 58.18 ในวันที่ 4 ของการทดลอง และแหล่งสารอาหารกลูโคสกับแหล่งสารอาหารประเภทสารอนินทรีย์คือแอมโมเนียมคลอไรด์ ที่ร้อยละ 53.84 ในวันที่ 4 ของการทดลอง เมื่อเทียบกับชุดการทดลองควบคุมโดยสามารถกำจัดได้สูงสุดที่ 21.37 ของการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 36

และสามารถกำจัดความชุ่นโดยร้อยละการกำจัดสูงสุดคือแอมโมเนียมคลอไรด์ที่ร้อยละ 7.34 ในวันที่ 4 ของการทดลองและเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุมพบว่า เพียง 1.81 แสดงในรูปที่ 37 โดยเมื่อวัดแอกติวิตีของเอนไซม์แลคแคสภายในน้ำดำหลังกระบวนการลดซีโอดี สี

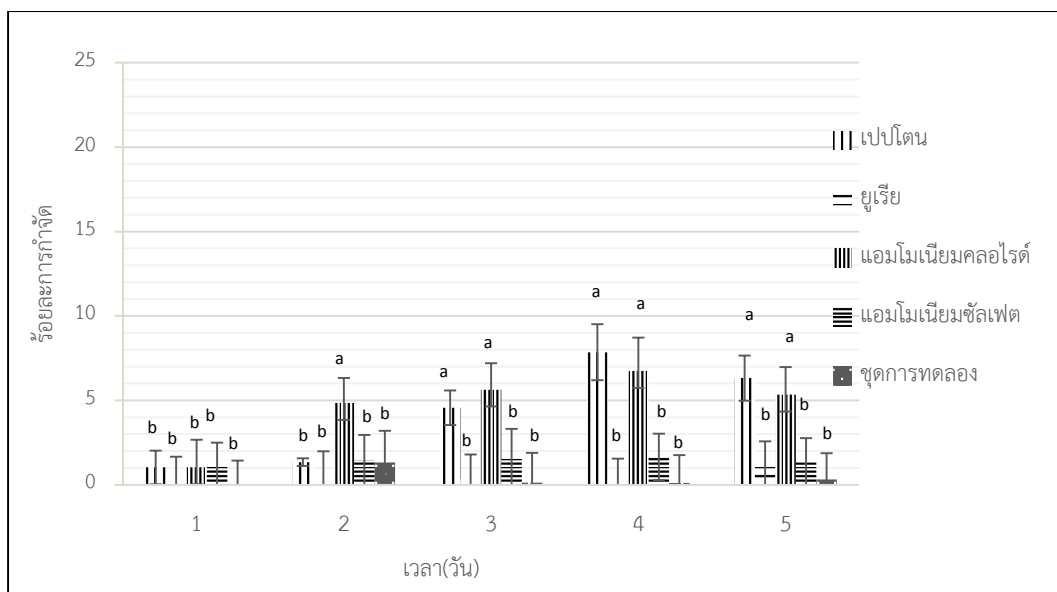
และ ความชุ่ม ผลปรากฏว่าไม่สามารถแยกดีเอ็นเอไมโครออร์แกนิซึมได้ในทุกแหล่งสารอาหารเนื่องจาก เนื่องจาก น้ำเสียสีเข้ม จึงไม่สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ ซึ่งแสดงในตารางที่ 13



รูปที่ 35 ผลของร้อยละการกำจัดไนโตรเจนต่อแหล่งสารอาหารไนโตรเจนประเภทต่างๆ โดยใช้ราเฝ้าขาว *T.polyzona* CU07 โดยใช้แหล่งคาร์บอนเป็นซูโครสที่ความเข้มข้น 1% น้ำหนักต่อปริมาตรตัวอักษร ที่ต่างกันในการแสดงถึงให้เห็นค่าความแตกต่างของนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$)



รูปที่ 36 ผลของร้อยละการกำจัดซีโอดีต่อแหล่งสารอาหารไนโตรเจนประเภทต่างๆ โดยใช้ ราเฝ้าขาว *T.polyzona* CU07 โดยใช้แหล่งคาร์บอนเป็นซูโครสที่ความเข้มข้น 1% น้ำหนักต่อปริมาตรตัวอักษร ที่ต่างกันในการแสดงถึงให้เห็นค่าความแตกต่างของนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$)



รูปที่ 37 ผลของร้อยละการกำจัดความชุ่นต่อแหล่งสารอาหารไนโตรเจนประเภทต่างๆ โดยใช้ ราเนาขาว *T. polyzona* CU07 โดยใช้แหล่งคาร์บอนเป็นซูโครสที่ความเข้มข้น 1% น้ำหนักต่อปริมาตร ตัวอักษรที่ต่างกันในกราฟแสดงถึงให้เห็นค่าความแตกต่างของนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$)

เมื่อประมวลผลการทดลองในขั้นตอนการหาสภาวะค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อผลการกำจัดซีโอดี สี และความชุ่น ปรากฏว่าที่ค่าความเป็นกรดต่างที่ 6 ราเนาขาวสามารถกำจัดซีโอดี สี และความชุ่นได้สูงที่สุด และเมื่อนำมาหาสภาวะที่เหมาะสมของแหล่งสารอาหาร ปรากฏว่าแหล่งสารคาร์บอนที่ให้ร้อยละการกำจัดซีโอดี สี และความชุ่นที่ดีที่สุดคือกลูโคส และแหล่งไนโตรเจนที่มีราเนาขาวสามารถกำจัดซีโอดี สี และความชุ่นได้ดีที่สุดคือ เปปโตน แต่อย่างไรก็ตามพิจารณาปัจจัยทางด้านเศรษฐศาสตร์ต่อกระบวนการบำบัดน้ำ ปรากฏว่าแอมโมเนียมให้ร้อยละการกำจัดที่ไม่แตกต่างกันมากนักและมีราคาที่ถูกกว่าเปปโตนเป็นอย่างมากดังแสดงในตารางที่ 12 จึงสรุปได้ว่าในงานวิจัยนี้ใช้แหล่งสารอาหารคือ กลูโคสและแอมโมเนียมคลอไรด์ในการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อไป

ตารางที่ 12 เปรียบเทียบร้อยละการกำจัดซีโอดี สีและความขุ่นของแหล่งไนโตรเจนความเข้มข้นร้อยละ 0.12 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ประเภทเปปโตินและแอมโมเนียมคลอไรด์ เมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร)

พารามิเตอร์ที่ศึกษา	เปปโติน*	แอมโมเนียมคลอไรด์*
ร้อยละการกำจัดซีโอดี	74.71±1.35 ^A ในวันที่ 5 ของการทดลอง	70.48±0.98 ^A ในวันที่ 4 ของการทดลอง
ร้อยละการกำจัดสี	58.18±0.75 ^A ในวันที่ 4 ของการทดลอง	53.84±0.13 ^B ในวันที่ 4 ของการทดลอง
ร้อยละการกำจัดความขุ่น	20.07±1.58 ^A ในวันที่ 5 ของการทดลอง	21.50±1.25 ^A ในวันที่ 5 ของการทดลอง

* ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจากจำนวน 3 ซ้ำ และความแตกต่างของตัวยกกำลัง (A, B) ในระหว่างคอลัมน์แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 13 แอคติวิตีแลคแคสในน้ำค้ำกายหลังกระบวนการลดสีในขั้นตอนการหาแหล่งสารอาหารที่เหมาะสม

แหล่งคาร์บอน	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5	
กลูโคส	เปปโติน	0.021U/ml ±0.01	0.124U/ml ±0.01	0.132U/ml ±0.23	0.224U/ml ±0.15	
	ยูเรีย	ND	ND	ND	ND	
	แอมโมเนียมคลอไรด์	ND	0.0124U/ml ±0.12	0.021U/ml ±0.01	0.087U/ml ±0.03	0.198U/ml ±0.64
	แอมโมเนียมซัลเฟต	ND	ND	ND	0.013 U/ml ±0.02	0.023U/ml ±0.01
	ชุดการทดลองควบคุม	ND	ND	ND	ND	ND
		วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5
ซูโครส	เปปโติน	ND	ND	ND	ND	ND
	ยูเรีย	ND	ND	ND	ND	ND
	แอมโมเนียมคลอไรด์	ND	ND	ND	ND	ND
	แอมโมเนียมซัลเฟต	ND	ND	ND	ND	ND
	ชุดการทดลองควบคุม	ND	ND	ND	ND	ND
		วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5

ND หมายถึง ไม่สามารถตรวจวัดปริมาณแลคแคส ได้เนื่องจากน้ำค้ำกายหลังกระบวนการลดสียังคงมีสีเข้มมาก

ชุดการทดลองควบคุม คือไม่เติมสารอาหารใดๆในน้ำค้ำ

4.7.3 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งสารอาหาร

จากผลการศึกษาแหล่งสารอาหารที่เหมาะสมของการกำจัดซีโอดี สี และความชุ่มชื้นจากการทดลองที่ 4.7.2.2 พบว่า แหล่งอาหารที่เหมาะสมคือ กลูโคส และแอมโมเนียมคลอไรด์ มาศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสม โดยปรับความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนด้วยแผนการทดลองแบบ CCD โดยค่ามีร้อยละการกำจัดซีโอดี และสี เป็นค่าตอบสนอง โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน

เมื่อนำผลการทดลองที่ได้มาสร้างสมการอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน กับร้อยละการกำจัดสีโดยใช้โปรแกรม Design Expert เวอร์ชัน 10 จะได้ความสัมพันธ์ดังสมการ

$$Y = +8.00 + 31.23X_1 + 575.5X_2 - 4.95X_1^2 - 2107 X_2^2 - 41.6X_1X_2$$

โดย Y	คือ ร้อยละการกำจัดสี
X ₁	คือ ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน
X ₂	คือ ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน

และที่ coefficient of determine หรือ R² เท่ากับ 0.81 แสดงว่าสมการดังกล่าวอธิบายความแปรปรวนของตัวแปรได้ X ได้ 81%

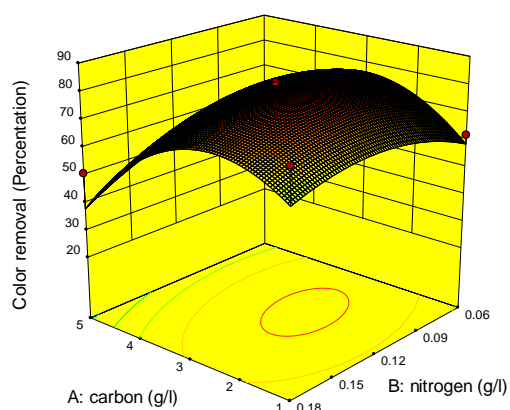
จากค่าตอบสนอง สามารถสร้างแผนภาพพื้นที่ผิวตอบสนอง (response surface plot) (รูปที่ 38) เพื่อหาค่าที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยเพื่อให้ได้ร้อยละการกำจัดสีที่สูงที่สุด สามารถทำนายได้ว่า เมื่อใช้ค่าความเข้มข้นแหล่งกลูโคสที่ร้อยละ 2.68 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และแหล่งความเข้มข้นของไนโตรเจนที่ร้อยละ 0.11 (น้ำหนักต่อปริมาตร) จะทำให้ได้ ร้อยละการกำจัดสีที่ 79.88 โดย เมื่อทำการทดลองซ้ำที่ภาวะดังกล่าว พบว่าร้อยละการกำจัดสีสูงสุดอยู่ที่ 80.12 ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P=0.95) แสดงว่าค่าที่ได้จากสมการสามารถนำมาทำนายร้อยละการกำจัดสีได้อย่างแม่นยำ

ตารางที่ 14 แผนการทดลองแบบ Central composite design (CCD) และผลการตอบสนองต่อ ร้อยละการกำจัดสีต่อปัจจัยที่ศึกษา คือ ความเข้มข้นของกลูโคส และ ความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์

ชุดการทดลอง	ปัจจัย		รหัสปัจจัย		ร้อยละการกำจัดสี
	ความเข้มข้นกลูโคส (เปอร์เซ็นต์ w/v)	ความเข้มข้นแอมโมเนียมคลอไรด์ (เปอร์เซ็นต์ w/v)	X ₁	X ₂	
1	3	0.12	0	0	78.00
2	0.171	0.12	-1.414	0	43
3	3	0.204	0	+1.414	46
4	3	0.12	0	0	81
5	5.828	0.12	+1.414	0	23
6	3	0.12	0	0	80
7	3	0.12	0	0	81
8	1	0.06	-1	-1	62
9	5	0.18	+1	+1	51
10	5	0.06	+1	-1	58
11	3	0.12	0	0	82
12	1	0.18	-1	+1	75
13	3	0.035	0	-1.414	69



X1 = A: carbon
X2 = B: nitrogen



รูปที่ 38 พื้นผิวตอบสนองสามมิติแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นแหล่งคาร์บอน (กลูโคส) และความเข้มข้นแหล่งไนโตรเจน (แอมโมเนียมคลอไรด์) ต่อร้อยละการกำจัดสีที่เกิดขึ้น

เมื่อนำผลการทดลองที่ได้มาสร้างสมการอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน กับร้อยละการกำจัดซีโอดีโดยใช้โปรแกรม Design Expert เวอร์ชัน 10 จะได้ความสัมพันธ์ดังสมการ

$$Y = -47.26 + 32.47X_1 + 1060.6X_2 - 4.41X_1^2 - 4170X_2^2 - 33.3X_1X_2$$

โดย Y	คือ ร้อยละการกำจัดซีโอดี
X_1	คือ ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน
X_2	คือ ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน

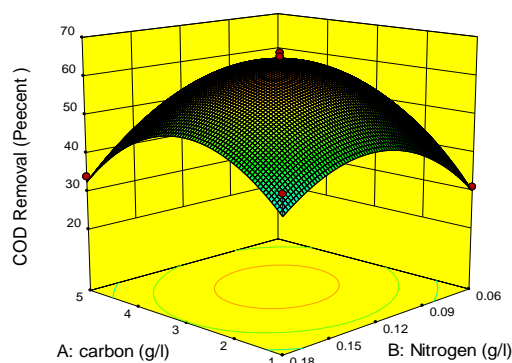
และที่ Coefficient of determine หรือ R^2 เท่ากับ 0.9895 แสดงว่าสมการดังกล่าวอธิบายความแปรปรวนของตัวแปรได้ X ได้ 98.9%

จากค่าตอบสนอง สามารถสร้างแผนภาพพื้นที่ผิวตอบสนอง (Response surface plot) (รูปที่ 39) เพื่อหาค่าที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยเพื่อให้ได้ร้อยละการกำจัดซีโอดีที่สูงที่สุด สามารถทำนายได้ว่าเมื่อใช้ค่าความเข้มข้นแหล่งกลูโคสที่ร้อยละ 3.18 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และแหล่งความเข้มข้นของไนโตรเจนที่ร้อยละ 0.11 (น้ำหนักต่อปริมาตร) จะทำให้ได้ร้อยละการกำจัดซีโอดีที่ 65.74 โดยเมื่อทำการทดลองซ้ำที่ภาวะดังกล่าว พบว่าร้อยละการกำจัดซีโอดีสูงสุดอยู่ที่ 64.0 ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.95$) แสดงว่าค่าที่ได้จากสมการสามารถนำมาทำนายร้อยละการกำจัดซีโอดีได้อย่างแม่นยำ

ตารางที่ 15 แผนการทดลองแบบ Central composite design (CCD) และผลการตอบสนองต่อ ร้อยละการกำจัดซีโอดีต่อปัจจัยที่ศึกษา คือ ความเข้มข้นของกลูโคส และ ความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์

ชุดการทดลอง	ปัจจัย		รหัสปัจจัย		ร้อยละการกำจัดซีโอดี
	ความเข้มข้นกลูโคส (เปอร์เซ็นต์ w/v)	ความเข้มข้นแอมโมเนียมคลอไรด์ (เปอร์เซ็นต์ w/v)	X ₁	X ₂	
1	3	0.12	0	0	66
2	0.171	0.12	-1.414	0	36
3	3	0.204	0	+1.414	32
4	3	0.12	0	0	62
5	5.828	0.12	+1.414	0	38
6	3	0.12	0	0	65
7	3	0.12	0	0	58
8	1	0.06	-1	-1	31
9	5	0.18	0	+1	34
10	5	0.06	1	-1	40
11	3	0.12	-1	0	61.7
12	1	0.18	0	+1	41.51
13	3	0.035	1	-1.414	41

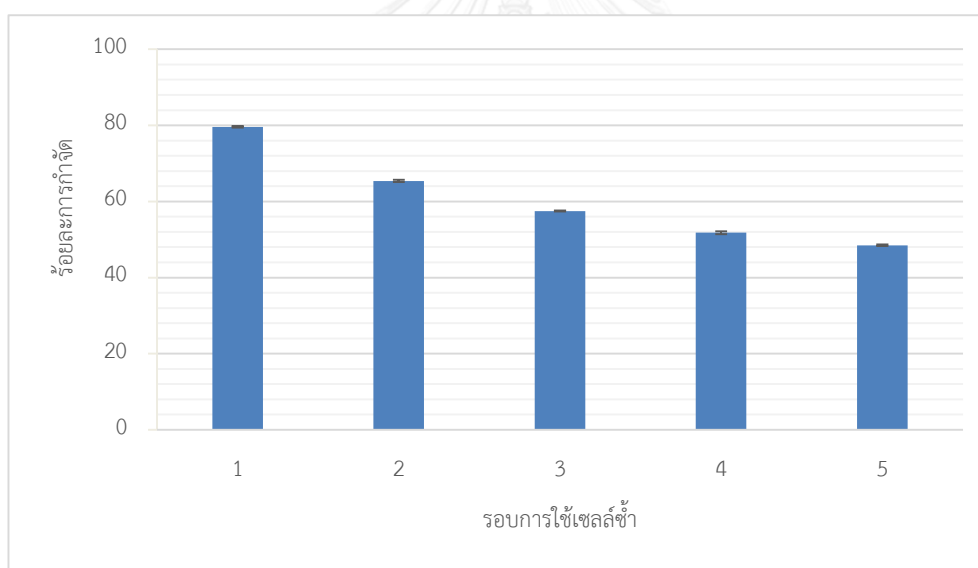
66
26
X1 = A: carbon
X2 = B: Nitrogen



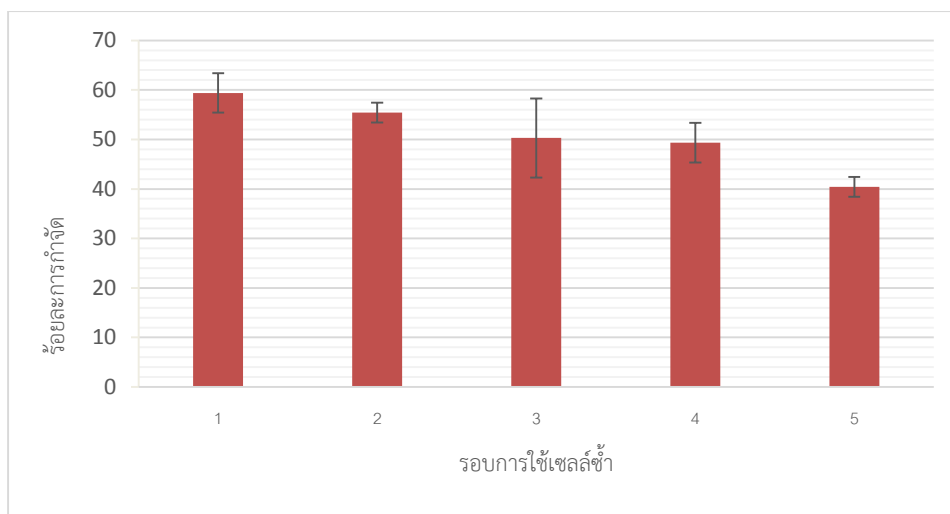
รูปที่ 39 พื้นผิวตอบสนองสามมิติแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นแหล่งคาร์บอน (กลูโคส) และความเข้มข้นแหล่งไนโตรเจน (แอมโมเนียมคลอไรด์) ต่อร้อยละการกำจัดซีโอดีที่เกิดขึ้น

4.8. การใช้ราเนาขาวที่ตรึงบนดินเบาเพื่อกำจัดซีโอดี สี และความขุ่นในรูปแบบการใช้เซลล์ซ้ำในระดับขวดเขย่า

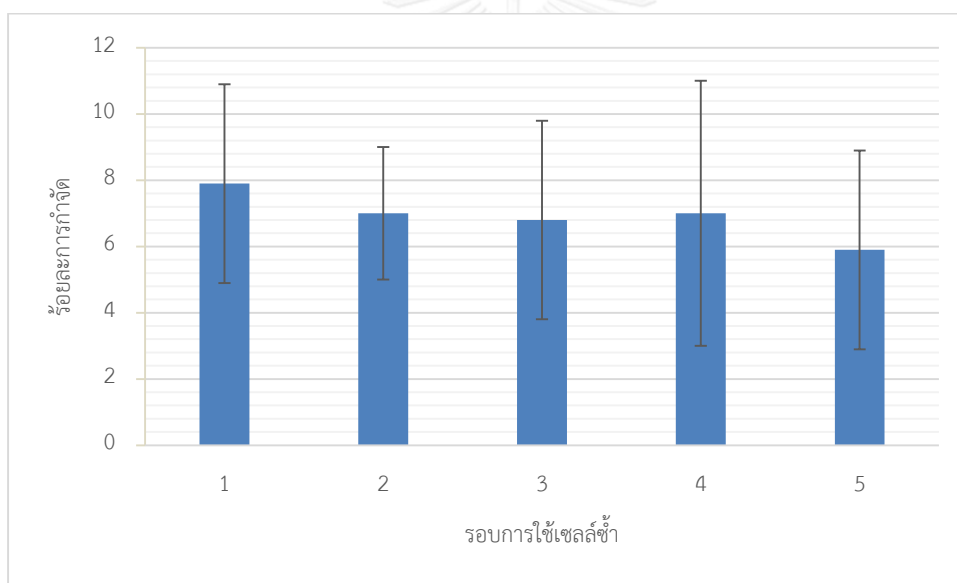
จากการทดลองใช้ราเนาขาวเพื่อทดสอบหาร้อยละการกำจัดซีโอดี สี และความขุ่น โดยทำการเลี้ยงราเนาขาวโดยเติมกลูโคสที่ความเข้มข้นร้อยละ 3.0 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และแอมโมเนียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.11 (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยเป็นค่าความเข้มข้นที่อยู่ในพื้นที่กราฟ contour plot แบบ overlaid contour plot จากการหาสภาวะที่เหมาะสมในการกำจัดซีโอดี และ สี โดยผลการทดลองพบว่า ราเนาขาวที่ตรึงบนดินเบา สามารถลดสี ได้ทั้งหมด 4 ซ้ำ โดยให้ร้อยละการกำจัดสีดังนี้ 79.6, 65.4, 57.5, 51.8 และ 48.5 ตามลำดับ (รูปที่ 40) ให้ร้อยละการกำจัดซีโอดีทั้งหมด 5 ซ้ำ 59.4, 55.4, 50.32, 49.34 และ 40.35 ตามลำดับ โดย 3 ซ้ำแรกได้ผลร้อยละการกำจัดซีโอดีมากกว่าร้อยละ 50 (รูปที่ 41) และให้ร้อยละการกำจัดความขุ่นที่ค่อนข้างคงที่ โดยสามารถกำจัดได้ร้อยละ 7.8, 7.5, 6.8, 5.9 และ 5.0 ตามลำดับ (รูปที่ 42) และแสดงค่าแอกติวิตีของเอนไซม์แลคเคสในแต่ละรอบการใช้เซลล์ซ้ำดังตารางที่ 16



รูปที่ 40 ผลการใช้ราเนาขาว *T. polyzona* CU07 ที่ตรึงบนดินเบาเพื่อกำจัดสีในน้ำดำในรูปแบบการใช้เซลล์ซ้ำ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานไม่เกิน 0.05



รูปที่ 41 ผลการใช้ราเน่าขาว *T. polyzona* CU07 ที่ตรึงบนดินเบาเพื่อกำจัดซีโอทีในน้ำดำในรูปแบบการใช้เซลล์ซ้ำ



รูปที่ 42 ผลการใช้ราเน่าขาว *T. polyzona* CU07 ที่ตรึงบนดินเบาเพื่อกำจัดความขุ่นในน้ำดำ ในรูปแบบการใช้เซลล์ซ้ำ

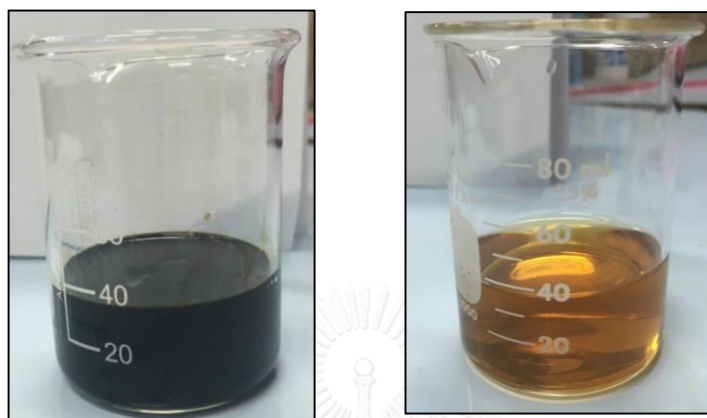
ตารางที่ 16 แอคติวิตีแลคแคสของราเน่าขาวในแต่ละรอบการใช้เซลล์ซ้ำ

แอกติวิตี	รอบการใช้เซลล์ซ้ำ				
	1	2	3	4	5
เอนไซม์แลคแคส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	0.233±0.123	0.202±0.145	0.173±0.012	0.154±0.01	0.109±0.023

4.9 สมบัติน้ำดำหลังผ่านกระบวนการ กำจัดซีโอที สี และความขุ่นด้วยกระบวนการโคแอกกูเลชัน ร่วมกับราเนาขาวที่ตรึงบนดินเบา

ตารางที่ 17 ร้อยละการกำจัดซีโอที สี และความขุ่นเมื่อกำจัดด้วยขั้นตอนต่าง ๆ

วิธีการบำบัด	ซีโอที			สี			ความขุ่น		
	ก่อนบำบัด	หลังบำบัด	ร้อยละที่บำบัดได้	ก่อนบำบัด	หลังบำบัด	ร้อยละที่บำบัดได้	ก่อนบำบัด	หลังบำบัด	ร้อยละที่บำบัดได้
กระบวนการตกตะกอน	292,216	11,688	96	873,777	34,951	96	1,330	942	29.1
กระบวนการโคแอกกูเลชัน	11,688	2,396	99.18	34,951	6,990	99.2	942	399	70
กระบวนการสภาพที่เหมาะสมโดยใช้ราเนาขาวตรึงบนดินเบา (ค่าความเป็นกรดต่างที่ 6)	8,145	3,420	98.8	7,536	2,743	99.68	293	265	80
กระบวนการสภาพที่เหมาะสมโดยใช้ราเนาขาวตรึงบนดินเบา (สารอาหาร : แอมโมเนียมคลอไรด์)	8,034	1,206	99.4	7,441	2,001	99.70	319	266	80
กระบวนการสภาพที่เหมาะสมโดยใช้ราเนาขาวตรึงบนดินเบา (ความเข้มข้นสารอาหาร)	8,726	1,496	99.5	7,621	1,571	99.80	319	266	80
ค่าซีโอที สี ความขุ่น สุดท้าย	-	1,496	99.5	-	1,571	99.80	-	266	80



ก

ข

รูปที่ 43 รูปแสดงลักษณะของน้ำดำก่อนและหลังกระบวนการบำบัด

ก. น้ำดำก่อนบำบัด

ข. น้ำดำหลังบำบัด

บทที่ 5

การอภิปรายผลการวิจัย

5.1 การคัดแยก การคัดเลือกราเน่าขาวและการระบุสายพันธุ์

5.1.1 การเก็บตัวอย่างราเน่าขาว การแยกเส้นใยราเน่าขาวให้บริสุทธิ์และการตรวจสอบความสามารถในการสร้างลิโคไนด์จากเอนไซม์บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง

จากการสำรวจและการเก็บตัวอย่างราเน่าขาวในพื้นที่ต่างๆ ของประเทศไทยพบว่าสามารถเก็บราเน่าขาวได้ทั้งสิ้น 42 ตัวอย่าง โดยสามารถเก็บราเน่าขาวได้จากไม้ผุ utoไม้ หรือต้นไม้ ในบริเวณที่มีความชื้นสูง เนื่องจากราเน่าขาวกลุ่มนี้สามารถผลิตเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายลิโคไนด์ที่เป็นองค์ประกอบของไม้ได้ (Cerniglia, 1997) เมื่อทำการคัดแยกราเน่าขาว จะได้เส้นใยบริสุทธิ์เพียง 20 ไอโซเลต เนื่องจากมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นบนดอกเห็ด รวมทั้งตัวอย่างราเน่าขาวที่เก็บได้บางตัวอย่าง มีลักษณะไม่สมบูรณ์ เช่น ดอกเห็ดมีความแห้งเกินไป มีการกั้ดทะของแมลง เป็นต้น จึงไม่ประสบความสำเร็จในการแยกเส้นใยบริสุทธิ์ เมื่อนำตัวอย่างที่คัดแยกได้มาทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์กลุ่ม ABTS oxidizing enzyme บนอาหารแข็ง พบว่ามีราเน่าขาวจำนวน 19 ไอโซเลตที่สามารถผลิตวงสีเขียวน และให้อัตราส่วนของเส้นผ่านศูนย์กลางวงสีเขียวนต่อเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเส้นใยราเน่าขาว มากกว่า 2.0 คือ CBR04 SM10 KB4 CU07 โดยสอดคล้องกับงานวิจัยของ ปวีณา ทองเกร็ด (2550) ซึ่งได้มีการคัดเลือกราเน่าขาวที่มีความสามารถสร้างลิโคไนด์จากเอนไซม์โดยใช้สาร ABTS ผสมในอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) โดยพบว่า มี 3 สายพันธุ์ที่ให้อัตราส่วนของเส้นผ่านศูนย์กลางของวงสีเขียวนต่อเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีมากกว่า 1.5 คือ *Ganoderma austral* PTN3, *G. lobatum* BK5, *G. lobatum* RED6 วงสีเขียวนที่เกิดขึ้นในอาหารแข็งดังกล่าวเกิดจากเอนไซม์แลคเคสสามารถออกซิไดซ์ ABTS ให้เป็นอนุมูลอิสระของ ABTS (ABTS radical) จึงทำให้เกิดวงสีเขียวนบริเวณรอบเส้นใยราเน่าขาว ดังนั้น คุณสมบัติในการผลิตวงสีเขียวนจึงบ่งชี้ถึงความสามารถของราเน่าขาวในการผลิตแลคเคสได้

5.1.2 การศึกษาความสามารถในการเจริญเติบโตที่อุณหภูมิสูงของราเนาขาว และการวัดแอกติวิตีของเอนไซม์เชิงปริมาณ

จากการคัดเลือกราเนาขาวที่สามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิสูง พบว่ามี 3 ไอโซเลตคือ SM10 CU07 และ SK7 ที่มีคุณสมบัติเป็นราเนาขาวทนร้อน เนื่องจากสามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส (Maheshwari และคณะ, 2000) ซึ่งคุณสมบัติการทนร้อนเป็นหนึ่งในคุณสมบัติของราเนาขาวที่ถูกนำมาใช้ในกระบวนการศึกษาทางเทคโนโลยีชีวภาพ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Prasongsuk และคณะ (2009) ได้แยกราเนาขาวทนร้อนในประเทศไทยเพื่อลดสีน้ำตาลจากกระบวนการผลิตเยื่อและกระดาษ โดยพบว่า *Daedaleopsis* sp., *Schizophyllum commune* PT และ *S. commune* SL สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยจากผลการทดลองในงานวิจัยนี้พบว่า CU07 และ SM10 สามารถเจริญเติบโตที่ 45 องศาเซลเซียสได้ โดยมีการรายงานถึงคุณสมบัติของราเนาขาวทนร้อนที่มีความสามารถในการผลิตโปรตีนทนร้อน (Heat shock protein : HSPs) โดยโปรตีนดังกล่าวมักมีความสัมพันธ์กับลักษณะความทนต่อลักษณะทางกายภาพของเชื้อราอื่น ๆ อาทิเช่น การทนอุณหภูมิเย็น การทนค่าความเป็นกรดต่างที่ผิดปกติ ซึ่งเป็นงานวิจัยที่น่าสนใจที่จะทำการศึกษาต่อไป (Tiwari และคณะ, 2015) และราเนาขาวที่สามารถเจริญที่อุณหภูมิสูงได้ดีมักจะสามารผลิตเอนไซม์ที่อุณหภูมิห้องได้สูงกว่าเมื่อเทียบกับราเนาขาวในชนิดเดียวกัน นอกจากนี้มีการรายงานถึงการทนร้อนของราเนาขาวกลุ่ม *Fomes* sp. ที่สามารถทนการเจริญได้ถึง 50 องศาเซลเซียส และด้วยคุณสมบัติการทนร้อนจึงเป็นคุณสมบัติที่น่าสนใจในการนำประยุกต์ใช้กับอุตสาหกรรมการย่อยสลายชีวมวลพืช (Ordaz และคณะ, 2012) และโดยเมื่อวัดกิจกรรมแลคเคสเชิงปริมาณ ปรากฏว่า ไอโซเลต CU07 ให้แอกติวิตีของเอนไซม์แลคเคสมากกว่าไอโซเลต SM10 และไอโซเลต SM10 เป็นราเนาขาวที่ผลิตเม็ดสี (pigment) ซึ่งไม่สอดคล้องกับวัตถุประสงค์งานวิจัยที่ต้องการลดสีน้ำตาลจากโรงเยื่อกระดาษ ดังนั้นจึงนำราเนาขาวไอโซเลต CU07 มาระบุสายพันธุ์โดยวิธีทางสัณฐานวิทยาและชีววิทยาวิทยาโมเลกุล

5.1.3 การระบุสายพันธุ์ราเนาขาว

จากการระบุสายพันธุ์ราเนาขาวไอโซเลต CU07 โดยวิธีการทางสัณฐานวิทยาและชีววิทยาโมเลกุลพบว่า มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาจัดจำแนกได้เป็น *Trametes polyzona* ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Chairin และคณะ (2014) โดยมีรายงานถึงการคัดแยกไอโซเลตของราเนาขาวสายพันธุ์ *Trametes polyzona* WR710-1 ได้จากพื้นที่ในประเทศไทยเช่นกัน และมีรายงาน

ของ de KOKER และคณะ (2000) ซึ่งได้ทำการทดสอบการผลิตเอนไซม์ กลุ่มลิกนินเนสของราเนาขาวสายพันธุ์ *Coriopsis polyzona*, *Ganoderma* sp., *Merrulius* sp., *Phanerochaete chrysosporium* และ *Trametes* sp. พบว่ามีการสร้างเอนไซม์กลุ่มเพอร์ออกซิเดสและแลคเคสในการทดสอบสายพันธุ์ *C. polyzona* ; (*Trametes polyzona*) ให้ผลสอดคล้องกับงานวิจัยนี้

5.2 การตรวจวัดคุณสมบัติน้ำดำเบื้องต้น

ลักษณะน้ำดำเบื้องต้นมีสีดำเข้ม มีความหนืด มีสารแขวนลอยกระจายทั่วเนื่องจากมีองค์ประกอบของลิกนินในปริมาณมาก ซึ่งลิกนินเป็นสารอินทรีย์ที่ทำให้น้ำมีค่าซีโอดีที่สูง และมีสีเข้ม โดย Fengal และ Wegener (1983) อธิบายไว้ว่า ในสภาวะที่เป็นต่างลิกนินสามารถละลายน้ำได้ดี ซึ่งน้ำดำที่มาจากกระบวนการต้มเยื่อโดยมีสารเคมีกลุ่มโซเดียมไฮดรอกไซด์ เช่น โซเดียมซัลไฟด์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ เพื่อแยกเส้นใยเซลลูโลสออกจากสารประกอบอื่นๆ ในเนื้อไม้ จึงทำให้น้ำจากกระบวนการต้มเยื่อมีภาวะที่เป็นต่างแก่ส่งผลให้ลิกนินเกิดการละลาย จึงทำให้มีลักษณะสีดำ

5.3 การปรับสภาพน้ำดำโดยกระบวนการโคแอ็คกูเลชัน

5.3.1 กระบวนการปรับสภาพน้ำดำโดยการตกตะกอนด้วยกรดซัลฟิวริก

จากผลการทดลองพบว่าเมื่อทำการปรับลดระดับความเป็นกรดต่างจาก 13 (ภาวะต่าง) เป็น 3 (ภาวะกรด) ร้อยละการกำจัดซีโอดีและสีมีค่าเพิ่มขึ้นจาก 0 เป็น 96.1 และ 96.2 ตามลำดับ เนื่องจากกรดซัลฟิวริกจะทำปฏิกิริยาซัลโฟเนชันกับอนุพันธ์ของฟีนิลโพรเพน (phenylpropane) ซึ่งเป็นโครงสร้างหลักของลิกนินที่อยู่ในน้ำดำทำให้ได้เป็นผลิตภัณฑ์เป็นลิกโนซัลโฟเนต ซึ่งมีคุณสมบัติการละลายต่ำเมื่ออยู่ในภาวะเป็นกรด โดยภาวะกรดนี้จะทำให้เกิดการตกตะกอนของลิกนิน (Sun และคณะ, 1999) ส่งผลให้ร้อยละการกำจัดค่าซีโอดี สี และความขุ่น ในน้ำดำมีค่าสูงขึ้น นอกจากนี้ ร้อยละการกำจัดสีก็มีแนวโน้มเหมือนกับร้อยละการกำจัดค่าซีโอดี เนื่องจากหลังจากที่ลิกนินทำปฏิกิริยากับกรดซัลฟิวริกเป็นลิกโนซัลโฟเนต ซึ่งจะแยกตัวออกจากน้ำ และมีลักษณะเป็นตะกอนสีน้ำตาลเข้มจมอยู่ด้านล่างของน้ำดำ เมื่อลิกนินแยกตัวออกจากน้ำดำแล้วจะทำให้น้ำดำมีการเปลี่ยนสีไปเป็นสีน้ำตาลเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า และเมื่อนำไปวัดค่าสีพบว่าค่าสีค่าลดลงจาก 873,777 แพลทตินัมโคบอลต์เป็น 29,684 แพลทตินัมโคบอลต์ ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Gilarranz และคณะ (2000) ที่ศึกษาการตกตะกอนของลิกนินด้วยกรดซัลฟิวริกออกจากน้ำดำที่ได้

จากกระบวนการต้มเยื่อฟางข้าว ที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 3.5 สามารถลดค่าซีโอดีและสีได้ถึงร้อยละ 71 และ 82 ตามลำดับ และสามารถกำจัดค่าความขุ่นได้ร้อยละ 30 ของน้ำดำเริ่มต้น

5.3.2 การรวมตะกอนโดยกระบวนการโคแอกกูเลชัน

5.3.2.1 ปริมาตรสารละลายโคโตซานและปริมาตรสารแคตไอออนพอลิอะคริลาไมด์

กระบวนการโคแอกกูเลชันเป็นกระบวนการปรับสภาพน้ำเสียโดยใช้กระบวนการทางเคมีกายภาพโดยระบบการกำจัด ซีโอดี สี และความขุ่นในงานวิจัยนี้ เป็นกระบวนการใช้กระบวนการโคแอกกูเลชันร่วมกับบราน่าขาว ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ SangHi และ Bhattacharya (2015) ที่ได้ใช้กระบวนการโคแอกกูเลชันเป็นการบำบัดขั้นต้น และจึงนำมาใช้กระบวนการทางชีวภาพ ซึ่งกระบวนการโคแอกกูเลชันในงานวิจัยนี้มุ่งเน้นให้ลดซีโอดี สี และความขุ่น ก่อนเข้าสู่กระบวนการบำบัดทางชีวภาพ เนื่องจากน้ำดำที่เข้าสู่ระบบไม่สามารถใช้กระบวนการทางชีวภาพโดยตรงได้ เนื่องจากน้ำดำดังกล่าวมีความเป็นพิษสูง มีสารอินทรีย์ และสารเคมีจากแหล่งกำเนิดในปริมาณที่มาก (Stigsson และ Bernard, 1998) กระบวนการโคแอกกูเลชันในงานวิจัยนี้ได้นำสารละลายโคโตซาน เนื่องจากโคโตซานเป็นพอลิเมอร์ขนาดใหญ่ที่มีประจุบวกซึ่งสามารถทำลายประจุลบของตะกอนน้ำเสียโดยวิธีการใช้แรงดึงดูดระหว่างประจุ (electrostatic force) และเกิดการสร้างแกนตะกอนคอลลอยด์เพื่อให้เกิดตะกอนขนาดใหญ่ (Bratby, 2006) และนอกจากความสามารถดังกล่าวแล้ว สลัดจ์ (sludge) ที่ออกจากระบบบำบัดดังกล่าวที่ไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมเมื่อเปรียบเทียบกับสารโคแอกกูแลนท์กลุ่มอื่นๆ เช่น เฟอร์ริกคลอไรด์ ($FeCl_3$) หรือพอลิเมอร์สังเคราะห์อื่นๆ เช่น พอลิอะลูมิเนียมคลอไรด์ (Polyaluminium; PAC) (Bolto และ Gregory, 2007) จากผลการศึกษการใช้ปริมาณของสารละลายโคโตซานต่อการกำจัดซีโอดี สี และความขุ่น พบว่าที่ปริมาณโคโตซาน 0.07 กรัมในน้ำดำ 200 มิลลิลิตร สามารถกำจัดซีโอดี และสี ได้ที่ร้อยละ 99 และสามารถกำจัดความขุ่นที่ร้อยละ 30 โดยเมื่อทำการทดลองพบว่าตะกอนที่เกิดการโคโตซานเป็นตะกอนที่มีลักษณะหนักและเป็นตะกอนขนาดเล็ก และใช้ระยะเวลาในการตกตะกอนนาน และเมื่อทำการทดลองพบว่าสารโพลีเมอร์กลุ่มแคตไอออนพอลิอะคริลาไมด์ พบว่าได้ตะกอนที่เป็นลักษณะเยื่อเมือกเหลว (slurry) โดยมีความสามารถในการลดค่าความขุ่นได้สูง โดยสามารถลดค่าความขุ่นได้ถึงร้อยละ 60 แต่โดยข้อจำกัดการใช้สารกลุ่มโพลีเมอร์ในระบบ มักพบว่าทำให้ค่าสารอินทรีย์ในระบบเพิ่มสูงขึ้น โดยไม่จำเป็นและลักษณะทางกายภาพของน้ำดำจะเปลี่ยนแปลงไป เมื่อใส่สารกลุ่มโพลีเมอร์ในระบบมากเกินไป

โดยน้ำดำจะมีลักษณะหนืดและเหนียวมากขึ้นซึ่งไม่เป็นผลดีในระบบบำบัดน้ำเสีย จึงได้นำสารกลุ่มโพลีเมอร์แคตไอออนพอลิอะคริลาไมด์มาใช้ร่วมกันกับโคโตซาน พบว่าตะกอนของโคโตซานร่วมกับสารช่วยตกตะกอนแคตไอออนพอลิอะคริลาไมด์ มีลักษณะเป็นตะกอนหนัก และ ตะกอนของโพลีเมอร์แคตไอออนพอลิอะคริลาไมด์มีส่วนช่วยจับตะกอนที่เกิดจากโคโตซานให้ตกลงมาโดยระยะอันสั้น โดยคุณสมบัติ bridge formation จึงทำให้มีประสิทธิภาพในการกำจัดซีโอดี สี และความขุ่น มากกว่าการแยกใช้เพียงอย่างเดียว และนอกจากนั้นโดยคุณสมบัติของพอลิอะคริลาไมด์ เช่น ความสามารถในการทำลายประจุไฟฟ้าของอนุภาคคอลลอยด์ ทำลายประจุอนุภาคที่เหลือในน้ำที่นอกเหนือการทำงานของโคโตซานได้อีกทางหนึ่งด้วย จากคุณสมบัติดังกล่าวจึงทำให้สารโคแอ็กกูแลนต์ผสมชนิดนี้มีความน่าสนใจ และจึงนำไปศึกษาถึงอัตราส่วนที่เหมาะสมต่อไป

5.3.2.2 อัตราส่วนที่เหมาะสมของสารละลายโคโตซานต่อสารละลายแคตไอออนพอลิอะคริลาไมด์

สารช่วยสร้างตะกอนเป็นสารที่ใช้ในกระบวนการโคแอ็กกูเลชันเพื่อช่วยให้ประสิทธิภาพของการกำจัดซีโอดี สี สูงขึ้น แต่อย่างไรก็ตามจากใช้สารเคมีดังกล่าวเป็นการเพิ่มมูลค่าให้แก่ระบบ และเมื่อเติมสารช่วยสร้างตะกอนเข้าสู่ระบบมากเกินไป อาจทำให้เกิดการเพิ่มของค่าสารอินทรีย์ในระบบมากเกินไปจนความจำเป็น ดังนั้นจึงทำการศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมของสารช่วยสารตะกอนดังกล่าว ซึ่งในงานวิจัยโดยใช้ สารแคตไอออนพอลิอะคริลาไมด์ โดยพบว่าที่อัตราส่วนกรัมต่อกรัมโคโตซาน และแคตไอออนพอลิอะคริลาไมด์ที่ 0.07 : 0.021 (3:1) สามารถกำจัดคาร์บอนซีโอดี สี ได้ที่ร้อยละ 98.85, 98.84 และความขุ่นที่ร้อยละ 70 ซึ่งไม่แตกต่างกันกับการใช้อัตราส่วนกรัมต่อกรัมโคโตซาน และแคตไอออนพอลิอะคริลาไมด์ที่ 0.7 : 0.035 (2:1) อย่างมีนัยสำคัญ และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Morrow และ Rausch (1974) รายงานว่าพอลิเมอร์ประจุบวก (cationic polymer) สามารถใช้เปป็นสารช่วยสร้างตะกอนที่เป็นสารอนินทรีย์ (inorganic coagulants) ในแกนน้ำดิบที่มีความขุ่นสูง ทำให้ได้ตะกอนที่มีปริมาตรต่ำ จึงง่ายต่อการนำไปกำจัด นอกจากนี้ตะกอนที่เกิดขึ้นจะหนัก และมีความหนาแน่นมากกว่าตะกอนที่เกิดขึ้นจากการใช้สารสร้างตะกอนที่เป็นสารอินทรีย์ จึงทำให้การตกตะกอนและการรวมตัวกันของตะกอนที่ดีกว่า

5.3.2.3 ความเร็วในการกวนผสม

ความเร็วในการกวนผสมเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญในกระบวนการโคแอกกูเลชัน เนื่องจากความเร็วในการกวนเป็นพารามิเตอร์ที่กำหนดลักษณะความปั่นป่วนของน้ำ โดยที่น้ำในถังกวนเร็วจะต้องมีความปั่นป่วนสูง ทั้งนี้เพื่อให้การผสมระหว่างสารเคมีกับน้ำ เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วและพร้อมกันในทุกจุด (มันสิน ตัณฑุลเวศม์, 2542) จากผลการทดลองพบว่า ที่ความเร็วรอบ 140 รอบต่อนาที สามารถกำจัดซีโอดี กับสี ที่ร้อยละ 99.12 และ 99.13 ตามลำดับ และเมื่อเพิ่มความเร็วรอบที่ 160 รอบต่อนาที ร้อยละการกำจัดซีโอดีกับสีมีค่าคงที่และลดลงเพียงเล็กน้อย ซึ่ง เมื่อเปรียบเทียบกับความเร็วรอบที่เหมาะสมสำหรับสารโคแอกกูแลนที่ประเภทโคโตซานพบว่าต้องใช้ความเร็วรอบประมาณ 100 รอบต่อนาที อันเนื่องมาจากลักษณะตะกอนเป็นตะกอนขนาดเล็กที่เกิดมาจากอนุภาคของโคโตซานจึงยึดเหนี่ยวกับอนุภาคของน้ำดำ เมื่อเพิ่มความเร็วรอบมากขึ้นปรากฏว่าตะกอนที่เกิดจากโคโตซาน แตก ซึ่งสังเกตเห็นได้จากการลอย และไม่ตกตะกอนเมื่อทิ้งไว้ในระยะเวลาานาน และเมื่อพิจารณาถึงความเร็วรอบที่เหมาะสมของสารกลุ่มโพลีเมอร์ พบว่าต้องใช้ความเร็วรอบถึง 160 รอบต่อนาที เพื่อให้ลักษณะโพลีเมอร์กระจายตัวได้ดี เนื่องจากถ้าใช้ความเร็วรอบต่ำจะพบว่า โพลีเมอร์จะไม่เกิดการกระจายตัว ซึ่งก็จะปรากฏว่าไม่จับกับอนุภาคในน้ำดำ แต่เมื่อนำสารทั้ง 2 ชนิดคือโคโตซานและโพลีเมอร์ กลุ่มแคตไอออนพอลิอะคริลาไมด์มาผสมกันในอัตราส่วนที่เหมาะสมพบว่าที่ 140 รอบต่อนาทีเป็น ความเร็วรอบที่เหมาะสม เนื่องจาก ในงานวิจัยนี้เป็นตะกอนขนาดใหญ่อันเนื่องมาจากมีการเติมสารช่วยในการตกตะกอนกลุ่มโพลีเมอร์โดยสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ali และคณะ (2014) ได้ศึกษาผลของความเร็วและระยะเวลาการกวนต่อการกำจัดสีของน้ำเสียจากโรงงานสี ย้อมผ้าด้วยอะลูมิเนียมซัลเฟตและสารกลุ่มโพลีเมอร์ประจวบกับปรากฏว่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาทีสามารถกำจัดสีได้ร้อยละ 70.3 และเมื่อเพิ่มความเร็วรอบเป็น 200 ก็ปรากฏว่าร้อยละการกำจัดสีเพิ่มเพียงเล็กน้อยเท่านั้น

5.3.2.4 เวลาในการกวนผสม

เวลาในการกวนผสมคือเวลาที่สารเคมีมีโอกาสสัมผัสกับอนุภาคคอลลอยด์ในน้ำซึ่งเป็นหนึ่งในปัจจัยสำคัญในการควบคุมกระบวนการโคแอกกูเลชันโดยวิธีการจาร์เทรสต์ (มันซิน ตันทูลเวศม์, 2537) ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า เวลาในการกวนที่เหมาะสมคือ 12 นาที โดยเมื่อเพิ่มเวลาในการผสมจาก 2 เป็น 12 นาที จะให้ค่าร้อยละการกำจัดซีโอดีและร้อยละการกำจัดสีเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 99.12 เป็น 99.2 ตามลำดับ และเมื่อเพิ่มเวลาในการกวนผสมจาก 12 นาทีเป็น 20 นาที พบว่าค่าร้อยละการกำจัดค่าซีโอดี และร้อยละการกำจัดสีมีค่าคงที่ ส่วนร้อยละการกำจัดความขุ่นมีแนวโน้มเช่นเดียวกันกับร้อยละการกำจัดซีโอดีและร้อยละการกำจัดสี เนื่องจากการเพิ่มเวลาในการกวนจาก 2 เป็น 12 นาที เป็นการเพิ่มเวลาสัมผัสระหว่างโคแอกกูแลนต์ผสมระหว่างโคโตแซนกับแคตไอออนพอลิอะคริลาไมด์กับตะกอน ดังนั้นจำนวนครั้งที่สารโคแอกกูแลนต์รวมกับก้อนตะกอนมีมากขึ้น จึงส่งผลให้ร้อยละการกำจัดความขุ่นมีค่าสูงขึ้น

5.3.2.5 เวลาในการตกตะกอน

เวลาในการตกตะกอนเป็นหนึ่งในปัจจัยสำคัญที่ระบบบำบัดน้ำเสียโดยกระบวนการโคแอกกูเลชันคำนึงถึง เนื่องจากในระบบโรงงานขนาดใหญ่มักต้องการให้ใช้เวลาในการตกตะกอนที่เร็ว ซึ่งระยะเวลาดังกล่าวเป็นผลมาจากขนาดและชนิดตะกอนที่เกิดขึ้นหลังกระบวนการกวนผสม โดยจากการศึกษาในพารามิเตอร์ที่ผ่านมาพบว่า ได้ทิ้งไว้ในตกตะกอนอย่างสมบูรณ์ ซึ่งใช้ระยะเวลาประมาณ 90 นาที แต่ด้วยสารโคแอกกูแลนต์ผสมประเภทโคโตซานและพอลิอะคริลาไมด์เป็นสารที่ผสมที่ยังไม่เคยมีรายงานวิจัยใดรายงานมาก่อน และต้องการหาเวลาในการตกตะกอนที่เหมาะสม ซึ่งพบว่าที่ระยะเวลา 60 นาที เป็นระยะเวลาที่เหมาะสม โดยสามารถกำจัดค่าซีโอดีและสีได้ถึง 99.19 และ 99.20 ตามลำดับ เมื่อทิ้งไว้ถึง 120 นาทีพบว่าร้อยละการกำจัดค่าซีโอดี สี ไม่เปลี่ยนแปลง ซึ่งหมายความว่า ตะกอนจากสารโคแอกกูแลนต์ผสมใช้เวลาในการตกตะกอนที่ 60 นาทีก็เพียงพอแล้ว และเมื่อทำการวัดที่ระยะเวลาในการตกตะกอนที่ 20 และ 40 พบว่า ตะกอนยังอยู่ในกระบวนการตกตะกอนโดยตะกอนดังกล่าวเป็นตะกอนที่เกิดขึ้นจากสารโพลีเมอร์ทั้ง 2 ประเภทคือ โพลีเมอร์โคโตซานโดยทำการจับกับอนุภาคในน้ำดำ และ โพลีเมอร์กลุ่มแคตไอออนพอลิอะคริลาไมด์ทำหน้าที่เพิ่มน้ำหนักให้แก่ขนาดตะกอน

5.4 ศึกษาการลดซีโอดี ซี และความชุ่มชื้นโดยใช้ราเน่าขาวที่ตรึงบนดินเบา

5.4.1 การเตรียมราเน่าขาวบนดินเบา

ราเน่าขาวสามารถเจริญเติบโตได้บนดินเบา โดยมีลักษณะกลม เส้นใยหนา สีขาว และลักษณะของเส้นใยราเน่าขาวไอโซเลต *T. polyzona* CU07 อีกทั้ง ดินเบาเป็นสารจำพวกที่มีธาตุหลักเป็นสารจำพวกซิลิกา (ธัญรัตน์ เลิศโฆษิตพงศ์, 2553 อ้างถึงใน ดร.ณิ สายสุทธิชัย, 2542) ซึ่งเป็นแร่ธาตุที่ยากต่อการทำปฏิกิริยากับสารต่างๆ และไม่เสียสภาพที่อุณหภูมิสูง และดินเบาที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นดินเบาที่มาจากจังหวัดลำปาง ซึ่งได้มีรายงานถึง แร่ธาตุหลักและแร่ธาตุรองของดินเบาในพื้นที่ดังกล่าว โดยพบว่า มีสารกลุ่มโลหะบางประเภท ที่ส่งผลต่อเอนไซม์กลุ่มลิกนินเนสของราเน่าขาว (Murugesan และคณะ, 2009) ซึ่งได้สอดคล้องกับผลการทดลอง ซึ่งได้ตรวจวัดเอนไซม์ราเน่าขาว ดังแสดงภาคผนวก และการตรึงราเน่าขาวบนดินเบาในงานวิจัยนี้เป็นการตรึงแบบ Carrier binding โดยเส้นใยราเน่าขาวเจริญเติบโตบนดินเบา โดยการเกี่ยวพันและหุ้มดินเบา เพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวในการเจริญเติบโต (Couto, 2009) และด้วยสภาวะที่ทำการลดสีน้ำเสียโดยใช้ราเน่าขาวที่ตรึงบนดินเบา ทำให้สภาวะกึ่งแข็ง (semi-soild) ทำให้ราเน่าขาวมีประสิทธิภาพในการลดสีมากขึ้น (Kahraman และYeşilada, 2003) และดินเบาเป็นวัสดุใหม่ที่ไม่เคยมีงานวิจัยได้นำมาตรึงราเน่าขาวมาก่อน

5.4.2 การศึกษาระดับค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสม

ค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นเป็นปัจจัยหนึ่งซึ่งสามารถส่งผลกระทบต่อ การเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์ของราเน่าขาว ซึ่งมีผลต่อการลดสี ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ทำการแปรผันค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นในสูตรอาหารโดยมีค่าความเป็นกรดต่างตั้งแต่ 3-7 โดยค่าความเป็นกรดต่างของน้ำดำสุดท้ายจากระบวนการโคแอกกูเลชันมีค่าที่ 3 ซึ่งจากการทดลองเบื้องต้นของงานวิจัยนี้ ปรากฏว่าราเน่าขาวไม่สามารถเจริญเติบโตได้ โดยจากการทดลองพบว่า ที่ค่าความเป็นกรดต่าง 6 ราเน่าขาวสามารถลดสีได้ดีที่สุดที่ร้อยละการกำจัดสีที่ 65.96 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Cerron และคณะ (2015) ที่ศึกษาการลดสีย้อมผ้าของราเน่าขาว *T. polyzona* ที่ตรึงบนฟิล์มชีวภาพ พบว่า สามารถลดได้มากกว่าร้อยละ 50 โดยค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมในการลดสีย้อมผ้าเท่ากับ 6 ภายในเวลา 24 ชั่วโมง และในทำนองเดียวกันได้มีรายงานว่าแลคเคสจากราเน่าขาว *T. polyzona* WR710-1 มีสภาวะเหมาะสมที่ช่วงความเป็นกรด (Chairin และคณะ, 2014)

โดยเมื่อวัดแอกติวิตีแลคแคสในน้ำเสียที่ค่าความเป็นกรดต่าง ปรากฏว่า แอกติวิตีแลคแคสในน้ำดำที่ปรับค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นที่ 6 มีค่าสูงที่สุดที่ 0.323 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตรเมื่อเปรียบเทียบค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นต่างๆ ซึ่งเมื่อทำการศึกษาผลของความเป็นกรดต่างเริ่มต้นที่มีการผลิตเอนไซม์แลคแคสของรา นั้น พบว่าราส่วนใหญ่จะสามารถเจริญเติบโตได้ดี และสามารถผลิตเอนไซม์แลคแคสในช่วงที่ความเป็นกรดต่าง 5-6 และเมื่อพบว่าค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นสูงขึ้นจะมีผลทำให้การเติบโตและการผลิตแลคแคสลดลง เช่นการ ศึกษาที่พบว่า *Trametes trogii* สามารถผลิตแลคแคสได้ดีในช่วงความเป็นกรดต่างที่ช่วง 5-6.5 แต่เมื่อค่าความเป็นกรดต่างของอาหารเริ่มต้นสูงขึ้นจะมีผลทำให้การเติบโตและการผลิตแลคแคสลดลง และเมื่อตรวจวัดค่าความเป็นกรดต่างหลังกระบวนการบำบัดพบว่าค่าความเป็นกรดต่างลดต่ำลงโดยมีค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 4 โดยมีรายงานวิจัยหลายงานในผลการทดลองที่สอดคล้องเช่นเดียวกัน (More และคณะ, 2010) โดยเป็นผลมาจากการเจริญเติบโตของราเน่าขาวและกระบวนการเมตาบอลิซึมของราเน่าขาวที่ให้สารอินทรีย์ที่เป็นกรดของรา และเป็นลักษณะในการปรับตัวเพื่อให้ราสามารถอยู่รอดได้ โดยเชื่อว่ามักจะผลิตการก

5.4.3 การศึกษาแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบหลักในอาหารเลี้ยงเชื้อและเป็นปัจจัยหลักในการเจริญเติบโต (Rajput และคณะ, 2014) โดยคาร์บอนมีความสำคัญในกระบวนการเมตาบอลิซึม ส่วนไนโตรเจนเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน (Leung และ Stephen, 2002) และเมื่อพิจารณาถึงลักษณะที่เป็นองค์ประกอบในน้ำดำไม่สามารถนำมาเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับเชื้อราได้เพราะว่าลักษณะมีโครงสร้างที่ขนาดใหญ่และซับซ้อน จึงทำให้ยากต่อการย่อยสลายของเชื้อรา (Krick และคณะ, 1976) ด้วยเหตุผลดังกล่าว การประยุกต์ใช้ราเน่าขาวในกระบวนการบำบัดทางชีวภาพ จึงจำเป็นต้องเติมสารอาหารเข้าไปในระบบบำบัดเพื่อให้ราเน่าขาวเจริญเติบโตและเกิดกระบวนการย่อยสลายสารมลพิษต่อไป โดยมีงานวิจัยรายงานถึงการใช้ สาร Asparagine–glucose medium และ Malt Extract agar เป็นแหล่งอาหารของราเน่าขาวกลุ่ม *Trametes* sp. ในการบำบัดน้ำดำจากกระบวนการต้มเยื่อและกระดาษ (Da Re และ Papinutti, 2011) ซึ่งสารดังกล่าวเป็นสารที่ค่อนข้างมีราคาสูง ไม่คุ้มทุนเมื่อดำเนินการในระบบบำบัดน้ำเสียขนาดใหญ่

เมื่อทำการแปรผันแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนในน้ำดำ เพื่อให้ราเน่าขาวสามารถเจริญเติบโตได้ในน้ำดำที่มีสารอาหารประเภทกลูโคสและเปปโตเนเป็นองค์ประกอบหลัก พบว่า ราเน่าขาว *T. polyzona* ที่ตรึงบนดินเบาสามารถกำจัดซีโอดี ซี และ ความขุ่นได้ที่ร้อยละ 58.17, 78.24 และ 18.03 ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำดำที่มีสารอาหารประเภทกลูโคสและแอมโมเนียมคลอไรด์เป็นองค์ประกอบหลัก พบว่า ราเน่าขาว *T. polyzona* ที่ตรึงบนดินเบาสามารถกำจัดค่าซีโอดี ซี และ ความขุ่นได้ที่ ร้อยละ 54.54, 77.18 และ 20.07 ตามลำดับ เมื่อนำมาพิจารณาแล้วปรากฏว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ จึงทำการเลือกแหล่งไนโตรเจน คือ แอมโมเนียมคลอไรด์ เนื่องจากราคาในท้องตลาดของแอมโมเนียมคลอไรด์ มีราคาถูกกว่าเปปโตเน โดยเปปโตเน 1 กิโลกรัมราคา 5,800 บาท และเมื่อเปรียบเทียบกับแอมโมเนียมคลอไรด์ 1 กิโลกรัมราคา 500 บาท (Sigma, 2014) และผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยของ Prasongsuk และคณะ (2009) ที่ใช้กลูโคสและแอมโมเนียมคลอไรด์เป็นสารอาหารให้การลดสีน้ำเสียจากโรงงานเยื่อกระดาษ เมื่อพิจารณาผลของกลูโคสต่อการเจริญเติบโตของราเน่าขาว พบว่า กลูโคสเป็นแหล่งสารอาหารที่สำคัญของราเน่าขาวในกระบวนการเจริญเติบโต โดยมีการรายงานว่าการใส่กลูโคสที่ความเข้มข้นต่ำสามารถสนับสนุนให้ราเน่าขาวหลังเอนไซม์กลุ่มลิกนินเนสออกมามากขึ้น (Wu และคณะ, 2005) เนื่องจากกลูโคสทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นเพื่อผลิตเอนไซม์กลุ่มเพอร์ออกซิเดสประเภทหลังออกนอกเซลล์ โดยเอนไซม์กลุ่มดังกล่าว สามารถออกซิไดส์สารกลุ่มโครมาโตฟอร์ (chromophores) และกำจัดสีน้ำเสียได้ (Raj และคณะ, 2014) และเมื่อพิจารณาแหล่งคาร์บอนประเภทซูโครส พบว่าราเน่าขาวให้ร้อยละการกำจัดซีโอดี ซี ที่ต่ำ และไม่สามารถวัดกิจกรรมเอนไซม์แลคเคสได้ อันเนื่องมาจากการใช้น้ำตาบโมเลกุลคูราเน่าขาวจะต้องเอนไซม์ในการย่อยน้ำตาลโมเลกุลคู่ให้ได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเพื่อนำมาใช้ในกระบวนการเมตาบอลิซึมได้ และเมื่อพิจารณางานวิจัยเกี่ยวกับเอนไซม์ซูเครสพบว่าไม่มีงานวิจัยใดรายงานถึงการพบเอนไซม์นี้ในราเน่าขาวมาก่อน และผลการวิจัยนี้มีความคล้ายคลึงกับงานวิจัย Seatang และ Babel S (2010) ได้ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการลดซีโอดี ซีของน้ำชะขยะ(leachate) โดยใช้ราเน่าขาว *Trametes vesicolor* BCC 8725 พบว่า กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดโดยสามารถลดซีโอดีได้ที่ร้อยละ 58 ในกระบวนการบำบัดน้ำเสียโดยใช้ราเน่าขาว และพบว่าการใช้ราเน่าขาวในการกำจัดสีน้ำเสียสามารถลดค่าความเป็นพิษได้ โดยแสดงถึงรายงานวิจัย เช่น รายงานของ Font และ คณะ (2003) รายงานไว้ว่าเอนไซม์แลคเคสราเน่าขาวมีความสามารถในการลดความเป็นพิษของน้ำดำ โดยในงานวิจัยนี้ น้ำดำหลังกระบวนการบำบัดสามารถวัด

แอกติวิตีแลคแคสที่วันที่ 0.324 ± 0.15 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร จึงอาจเป็นไปได้ค่าความเป็นพิษลดลงอันเนื่องจากเอนไซม์แลคแคสได้ทำแตกโครงสร้างของสารกลุ่มอะโรมาติกออก เป็นโครงสร้างอนุพันธ์ต่างๆของลิกนิน

5.4.4 ศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

อัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจน (C/N Ratio) เป็นปัจจัยหลักในการเจริญเติบโตของราเนาขาว ซึ่งมีผลต่อการกำจัดซีโอดี สี และความขุ่น (Karthikeyan และคณะ, 2010) ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่า กลูโคสและแอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม สำหรับการนำมาศึกษาการหาความเข้มข้น ด้วยวิธีพื้นที่ผิวตอบสนอง (response surface methodology ; RSM) โดยวางแผนการทดลองแบบ central composite design (CCD) ซึ่งวิธี RSM เป็นวิธีการทางคณิตศาสตร์และสถิติที่นำมาใช้ในการสร้างแบบจำลองและวิเคราะห์ปัญหาที่เกิดจากความสัมพันธ์ของตัวแปรหลายตัวแปรโดยวิธีวิเคราะห์การถดถอยแบบพหุคูณ (multiple regression) และวิธีการสหสัมพันธ์ (correlation) เพื่อหาค่าที่ดีที่สุดของความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปร (Montgomery, 2008) โดยสามารถอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรต้นกับค่าการตอบสนอง สามารถแสดงให้เห็นแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของผลตอบสนอง เมื่อระดับของปัจจัยเชิงปริมาณเปลี่ยนแปลง และหาระดับของปัจจัยเชิงปริมาณที่เหมาะสม (optimum value) ที่จะทำให้เกิดผลตอบสนองที่ดีที่สุด โดยมีชุดการทดลองที่น้อยกว่าการออกแบบธรรมดา ทำให้ประหยัดเวลาและทรัพยากรที่ใช้ในการทดลอง (Jeong และ Park, 2009) จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี RSM สามารถทำนายได้ว่า แหล่งสารอาหารในน้ำดำที่ประกอบไปด้วยกลูโคสที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.74 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และ แอมโมเนียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.11 (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดย ราเนาขาวสามารถกำจัดสีสูงสุดได้ที่ร้อยละ 79.88 และเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี RSM ต่อผลตอบสนองคือร้อยละการกำจัดซีโอดี สามารถทำนายได้ว่ากลูโคสที่ความเข้มข้นร้อยละ 3.11 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และ แอมโมเนียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.11 (น้ำหนักต่อปริมาตร) กำจัดซีโอดีสูงสุดได้ที่ร้อยละ 57.68 โดยเมื่อพิจารณาค่าสภาวะที่เหมาะสมของสารอาหารกลุ่มคาร์บอน (กลูโคส) และ ไนโตรเจน (แอมโมเนียมคลอไรด์) พบว่าอยู่ในช่วงความเข้มข้นที่ทำการกำหนดช่วงการศึกษาไว้ดังนี้ คือ ความเข้มข้นคาร์บอนอยู่ในช่วงร้อยละ 1.00 – 5.00 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และ ความเข้มข้นของไนโตรเจนอยู่ในช่วงร้อยละ 0.06 – 0.18 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และ เมื่อพิจารณาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนดังกล่าว พบว่าใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Karthikeyan

และคณะ (2010) โดยได้ทำการศึกษาผลของความเข้มข้นแหล่งคาร์บอนประเภทกลูโคสในการลดสี น้ำเสียโดยใช้รา *Aspergillus niger* HM11 ที่ความเข้มข้น 3 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของ แหล่งไนโตรเจนมีค่าใกล้เคียงกับ รายงานของ Esposito และคณะ (1991) กล่าวว่า ผลกำจัดสีจาก น้ำเสียโรงงานเยื่อกระดาษมีผลโดยตรงอย่างมีนัยสำคัญกับความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและแหล่ง ไนโตรเจน และแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นที่ให้อ้อยละการกำจัดซีโอดี และสี ที่สูงที่สุดร้อยละ 0.18 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และสอดคล้องกับงานวิจัยรายงานไว้ว่าผลของแหล่งไนโตรเจนในอาหาร เลี้ยงเชื้อมีผลต่อการย่อยสลายลิกนิน โดยที่ความเข้มข้นต่ำเพิ่มความสามารถในการย่อยสลายลิกนิน และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นปรากฏว่าการย่อยสลายลิกนินลดลงอย่างเห็นได้ชัด (Kirk และคณะ, 1978)

5.4.5 การศึกษาการลดซีโอดี สี และความขุ่น โดยราเน่าขาวที่ตรึงบนดินเบาในรูปแบบการใช้ เซลล์ซ้ำ

จากการศึกษาการกำจัดซีโอดี สี และความขุ่นโดยใช้ราเน่าขาวที่ตรึงบนดินเบา ในการ ทดลองครั้งนี้ พบว่าเมื่อนำราเน่าขาว *T. polyzona* CU07 ที่ตรึงบนดินเบากลับมาใช้ซ้ำใน กระบวนการลดซีโอดี สี และความขุ่นได้ทั้งหมด 5 ซ้ำ โดยพบว่าร้อยละการกำจัดซีโอดีและสี ทั้ง 4 ครั้ง มีร้อยละการกำจัดมากกว่า 50 ซึ่งร้อยละการกำจัดสีในรอบการใช้เซลล์ซ้ำที่ 1 สามารถกำจัดได้ ถึงร้อยละ 79.6 และลดลงตามลำดับ และร้อยละการกำจัดซีโอดีรอบการใช้เซลล์ซ้ำที่ 1 สามารถ กำจัดได้ถึงร้อยละ 59.4 โดยครั้งที่ 5 ของการใช้เซลล์ซ้ำ ปรากฏว่าร้อยละการกำจัดซีโอดี สี ต่ำกว่า ร้อยละ 40 ของค่าซีโอดี สี และเริ่มต้น และร้อยละการกำจัดความขุ่น พบว่า เซลล์ตรึงรูปราเน่าขาว *T. polyzona* CU07 ไม่สามารถกำจัดได้ โดยผลการทดลองเกือบมีค่าคงที่ โดยให้ร้อยละการกำจัดอยู่ ในช่วงร้อยละ 8 ตลอดการใช้เซลล์ซ้ำ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยหลายงานวิจัยเช่น ชามา เยี่ยงมานิต (2556) ได้ศึกษาการใช้ราเน่าขาว *Phanerochaete sorida* ในรูปแบบ cell cycle พบว่าสามารถ ลดสีน้ำดำได้ร้อยละ 52, 50 และ 48.4 ตามลำดับ และสามารถลดซีโอดีได้ร้อยละ 55.5, 53.9 และ 51.6 ตามลำดับ และงานวิจัยของ Park และคณะ มีการศึกษาการลดสี acid black 52 ด้วยราเน่า ขาว *Funalia trogii* ด้วยอัลจิเนต พบว่าสามารถใช้เซลล์ตรึงรูปได้ซ้ำ 2 ครั้ง โดยประสิทธิภาพการ ลดลงของสีเท่ากับ 93.8 และ 88 ตามลำดับ ในวันที่ 10 ของการทดลอง โดยการนำเส้นใยราดังกล่าว มาใช้ในการลดสี น้ำเสียจากกระบวนการต่างๆ นั้นสามารถนำราเน่าขาวมาใช้ซ้ำได้ ทำให้ อุตสาหกรรมสามารถประหยัดต้นทุนในการบำบัดสีของน้ำเสียได้ (Couto, 2009) เมื่อเปรียบเทียบผล การทดลองของงานวิจัยนี้กับรายงานการวิจัยที่ผ่านมาปรากฏว่า เซลล์ตรึงรูปราเน่าขาว *T.*

polyzona CU 07 สามารถกำจัดซีโอที และสี ได้มากกว่า *P. sorida* และมีระยะเวลาการเลี้ยงที่สั้นกว่า *F. trogii* และจากการทดลองการตรวจวัดเอนไซม์แลคแคสในน้ำเสียระหว่างการใช้เซลล์ซ้ำปรากฏว่าแนวโน้มที่ลดลงตามแนวโน้มของร้อยละการลดสีน้ำเสียโดยเป็นไปตามรายงานการวิจัยของ Sumathi และ Phatak (1999) ซึ่งได้ใช้เชื้อรากลุ่ม *Asperillus foetidus* ลดสีน้ำดำที่ความเข้มข้นพบว่าโดยพบว่าเอนไซม์แลคแคสมีแนวโน้มมีความสัมพันธ์กับการลดสีน้ำเสียเช่นกัน

5.4.6 กลไกกระบวนการกำจัดซีโอที สี และความชุ่มชื้นโดยใช้ราเน่าขาวที่ตรึงบนดินเบา

เมื่อพิจารณาความเป็นไปได้ของกลไกการกำจัดซีโอที สี และความชุ่มชื้นในงานวิจัยนี้ โดยใช้ราเน่าขาวที่ตรึงบนดินเบา โดยเป็นไปได้ว่าอาจเกิดกระบวนการดูดซับสีโดยเส้นใยราเน่าขาว (biosorption) กระบวนการย่อยสลายโดยเอนไซม์กลุ่มลิกนินโกลิติก (ligninolytic enzyme degradation) และกระบวนการจับอนุภาคคอลลอยด์ในระบบโดยเซลล์ตรึงราเน่าขาว โดยสามารถได้อธิบายจากงานวิจัยดังต่อไปนี้ต่าง ๆ ดังนี้ ผลงานวิจัยของ Balan และ Monteiro (2001) ที่ได้ศึกษาการลดสีน้ำเสียโดยใช้เชื้อรากลุ่มลิกนินโกลิติกเอนไซม์ และได้อธิบายกลไกดังนี้ ที่เวลา 24 ชั่วโมงแรก พบว่าค่าดูดกลืนแสงมีค่าลดลง ที่ความยาวคลื่น 580 และ 680 นาโนเมตร โดยกลไกการดูดซับสีน้ำเสียมีความสามารถในการลดสีอย่างสูงถึงประมาณร้อยละ 74 และงานวิจัยของ Daassi และคณะ (2013) ได้ศึกษาการใช้ราเน่าขาวสายพันธุ์ *Trametes versicolor* และ *Trametes trogii* ตรึงบนแคลเซียมอัลจิเนต พบว่าเมื่อใช้เซลล์ที่ตายแล้ว ในร้อยละการกำจัดสีเท่ากับ 40 และ 25 ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าปรากฏมีการดูดซับสีโดยเส้นใยราเน่าขาว โดยกระบวนการดูดซับโดยโครงสร้างของสารอินทรีย์ประเภทไคติน โดยโครงสร้างของประเภทไคตินเป็นสารองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์เชื้อรา โดยไคตินมีหมู่โครงสร้างประเภท เอมีน ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอน จึงสามารถทำปฏิกิริยากับโปรตีน สีย้อมผ้า และไอออน ของโลหะได้ และ กระบวนการที่สำคัญในกลไกการกำจัดค่าซีโอที สี และความชุ่มชื้น คือ การย่อยสลายโครงสร้างของสารประเภท อะโรมาติกโดยกระบวนการใช้เอนไซม์ (enzymatic degradation) กับเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยจึงมีความเป็นไปได้ว่าอาจจะเกิดกระบวนการคล้ายคลึงกับ งานวิจัยของ Permpornsakul และคณะ (2015) โดยได้ศึกษาการบำบัดทางชีวภาพของสีย้อมกลุ่ม RB5 โดยใช้ราเน่าขาวสายพันธุ์ *Phanerochaete sordida* PBU 0057 โดยผลการศึกษาปรากฏว่าราเน่าขาวสามารถย่อยสลายสีย้อมโดยใช้เวลา 72 ชั่วโมง โดยการย่อยสลายสีย้อมมีความสัมพันธ์กับกิจกรรมเอนไซม์ของเอนไซม์กลุ่มลิกนินโกลิติกเอนไซม์ และได้ยืนยันโครงสร้างโดย เครื่องโครมาโท กราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) เพื่อตรวจสอบ

โครงสร้างสาร พบว่าสารเมตาบอไลต์ของสีย้อมกลุ่ม RB5 ว่ามีย่อยสลายของธาตุไนโตรเจนที่ตำแหน่งพันธะคู่ (azo bond) และสารเมตาบอไลต์ในงานวิจัยนี้เมื่อทดสอบโดยวิธีความเป็นพิษในพืชโดยนำสารเมตาบอไลต์มาทดสอบการงอกโดย ถั่วแขก (*Phaseolus vulgaris* L.) ข้าวฟ่าง (*Sorghum bicolor* L.) และ ข้าวโพด (*Zea mays* L) พบว่าความเป็นพิษต่ำเมื่อพิจารณา ร้อยละการงอกของพืชดังกล่าวใกล้เคียงกับชุดการทดลองควบคุม (น้ำกลั่น) โดยถั่วแขก ในร้อยละการงอกเท่ากับ 100 (เมื่อใช้สีย้อมให้ร้อยละการงอกที่ 80) และ ข้าวฟ่าง ข้าวโพด ร้อยละการงอกเท่ากับร้อยละ 90 (เมื่อใช้สีย้อมให้ร้อยละการงอกที่ 40 และ 65 ตามลำดับ) และกระบวนการที่สำคัญในกระบวนการกำจัดความชุ่มชื้นอาจเกิดกระบวนการกำจัดค่าความชุ่มชื้นโดยเส้นใยราเนาขาวที่ตรึงบนดินเบา โดยเมื่อพิจารณาปรากฏว่าเซลล์ตรึงราเนาขาวโดยดินเบา ลักษณะของเซลล์ตรึงราเนาขาวบนดินเบา มีลักษณะการตรึงแบบ Carrier binding โดยเจริญเติบโตโดยเส้นใยของราเนาขาวที่ตรึงบนดินเบา มีการเจริญ และพอร์มเซลล์ตรึงให้มีขนาดใหญ่ขึ้นโดยเส้นใยทำหน้าที่ จับสารคอลลอยด์ในระบบเข้าสู่ก่อนเซลล์ตรึง ทำให้ส่งผลให้ร้อยละการกำจัดความชุ่มชื้นเพิ่มขึ้น

โดยกระบวนการดูดซับด้วยชีวมวล (biosorption) การย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์ (enzymatic degradation) และกระบวนการจับอนุภาคคอลลอยด์ในระบบโดยเซลล์ตรึงราเนาขาว เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นเพื่อกำจัดสี ซีไอดี และความชุ่ม โดยในงานวิจัยนี้เกิดได้ทั้ง 3 กระบวนการ โดยทั้ง 3 กระบวนการมีข้อดี และข้อจำกัดแตกต่างกันออกไป เช่น การดูดซับสีโดยเส้นใยราเนาขาว เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นได้เร็ว โดยใช้ระยะเวลาเพียงประมาณ 24 ชั่วโมงแต่อย่างไรก็ตามกระบวนการดูดซับด้วยชีวมวลเส้นใยรา มีข้อจำกัดคือ สีที่เส้นใยดูดซับไว้สามารถกลับออกสู่สภาวะแวดล้อมอีกครั้งได้เมื่อเส้นใยราเนาขาวเกิดการย่อยสลายตามธรรมชาติ (Ali, 2010 และ Gao และคณะ, 2010) กระบวนการย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์เป็นกระบวนการทางชีวเคมีโดยใช้เอนไซม์ โดยเอนไซม์มีความสามารถในการเปลี่ยนสารตั้งต้นเป็นสารเมตาบอไลต์ที่ถาวร ไม่กลับมาเป็นสารตั้งต้นเดิมอีก แต่อย่างไรก็ตาม ข้อจำกัดของการย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์ คือ ต้องใช้เวลานานเพื่อให้ราเนาปรับสภาพในระบบเพื่อที่ปล่อยเอนไซม์ออกมาสู่กระบวนการย่อยสลาย และราเนาขาวในบางสายพันธุ์อาจจะต้องใช้โคแฟกเตอร์เพื่อช่วยให้เอนไซม์ทำงานได้ยิ่งขึ้น และกระบวนการกำจัดความชุ่มชื้นโดยการจับสารประเภทคอลลอยด์โดยเส้นใยราเนาขาว โดยจากการศึกษาในงานวิจัยนี้ พบว่าให้ร้อยละการกำจัดความชุ่มชื้นที่โดยสูงสุดที่ร้อยละ 21.5 อันเนื่องมาจากการเจริญเติบโตของราเนาขาวใช้ทำให้เพิ่มพื้นที่ผิวของราเนาขาว และในข้อจำกัดในกระบวนการนี้คือ ระยะเวลาเนื่องจากราเนาขาวต้องใช้

ระยะเวลาในการปรับสภาพ ซึ่งสอดคล้องกับ ผลการทดลองที่ 4.7.2.1 ในขั้นตอนการกำจัดความชุ่ม
พบว่าเมื่อเลี้ยงราเนาขาวที่วัดที่ 6 ให้ร้อยละการกำจัดความชุ่มที่สูงที่สุด



บทที่ 6

สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้สามารถแยกเส้นใยราเน่าขาวบริสุทธิ์ได้ทั้งสิ้น 20 ไอโซเลต โดยทั้ง 20 ไอโซเลตสามารถเกิดวงสีเขียวนอนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งได้จำนวน 19 ไอโซเลต โดยไอโซเลต CU07 และ SM10 สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และไอโซเลตให้แอกติวิตีของเอนไซม์แลคเคสของไอโซเลต CU07 เท่ากับ 0.363 ± 0.012 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และเมื่อทำการระบุสายพันธุ์โดยวิธีการทางสัณฐานวิทยาพบว่าสามารถจัดจำแนกได้คือ *Trametes polyzona* เมื่อยืนยันการจัดจำแนกด้วยการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ (ITS1-5.8S-ITS4) มีความคล้ายคลึงกับ *Trametes polyzona* WR710-1 โดยมีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงเท่ากับ 99% โดยน้ำดำที่ใช้ในงานวิจัยนี้มีคุณสมบัติทางกายภาพมีค่าดังนี้คือ ซีโอดีค่าเท่ากับ 292,216 มิลลิกรัมต่อลิตร สีมี่ค่าเท่ากับ 873,777 แพลทตินัมโคบอลต์ยูนิต ความขุ่นมีค่า 1,330 เอ็นทียู และมีค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 13 จากนั้นจึงนำน้ำดำเข้าสู่การปรับสภาพน้ำดำโดยกรดซัลฟิวริก และการรวมตะกอนด้วยกระบวนการโคแอกกูเลชัน คือผลการทดลองพบว่าค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมคือ ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 3 โดยสามารถกำจัดซีโอดี สี ได้ที่ 96.1 และ 96.2 ตามลำดับ และความขุ่นสามารถกำจัดได้ร้อยละ 30 ของน้ำดำเริ่มต้น และเมื่อเติมสารโคแอกกูแลนต์ที่เหมาะสมคือ ไคโตซานที่ความเข้มข้น 0.07 กรัม (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 7 มิลลิลิตร ต่อ สารละลายแคตไอออนพอลิอะคริลาไมด์ที่ความเข้มข้น 0.021 กรัม (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 7 มิลลิลิตร โดยสามารถกวนที่ความเร็วรอบ 140 รอบต่อนาที เวลาในการกวน 12 นาที ซึ่งให้ตกตะกอนเป็นเวลา 60 นาที แสดงค่าร้อยละการกำจัดซีโอดี สี และความขุ่นที่ 99.18 99.20 และ 70 หลังจากนั้นจึงนำเข้าสู่กระบวนการปรับสภาพด้วยราเน่าขาวต่อไป หลังจากนั้นจึงนำน้ำดำเข้าสู่กระบวนการปรับสภาพด้วยราเน่าขาว โดยพบว่าราเน่าขาว *T. polyzona* CU07 ที่ตรึงบนดินเบาสามารถใช้ดินเบาเป็นตัวค้ำจุนได้ และเมื่อทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสม โดยเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และแอมโมเนียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้นที่ร้อยละ 0.12 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของราเน่าขาวคือค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 6 โดยสามารถแสดงร้อยละการกำจัดซีโอดี สี และความขุ่นเท่ากับ 51.68 65.96 และ 10.06 จากค่าสีเริ่มต้นที่ 8,145 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 7,536 แพลทตินัมโคบอลต์ยูนิต และ 293 เอ็นทียู ตามลำดับ ที่วันที่ 4 ของการเลี้ยงราเน่า

ขาว และเมื่อศึกษาแหล่งสารอาหารที่เหมาะสมพบว่า กลูโคส และแอมโมเนียมคลอไรด์เป็นสารอาหารที่เหมาะสมต่อการนำไปศึกษาต่อ โดยสามารถแสดงร้อยละการกำจัดซีโอดี สี และความขุ่นเท่ากับ 54.54, 77.18 และ 20.07 ที่วันที่ 4 จากค่าสีเริ่มต้นที่ 8,034 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 7,441 แพลทตินัมโคบอลต์ยูนิต และ 266 เอ็นทียู ตามลำดับ ของการเลี้ยงราเน่าขาว และเมื่อศึกษาความเข้มข้นของสารอาหารกลูโคสและแอมโมเนียมคลอไรด์พบว่าค่าตอบสนองร้อยละการกำจัดซีโอดี สี ที่สูงที่สุดพบว่ามีค่าเท่ากับ น้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นร้อยละ 3.00 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และแอมโมเนียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.11 (น้ำหนักต่อปริมาตร) สามารถกำจัดร้อยละซีโอดี สี เท่ากับ 57.65 , 80.12 จากค่าสีเริ่มต้นที่ 8,726 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 7,624 แพลทตินัมโคบอลต์ยูนิต ตามลำดับ และเมื่อศึกษาการใช้เซลล์ฆ่าพบว่า เซลล์ตรึงราเน่าขาว *T. polyzona* CU07 สามารถใช้เซลล์ฆ่าได้ถึง 4 รอบเซลล์ฆ่าโดยให้ร้อยละการกำจัดซีโอดี สี มากกว่าร้อยละ 50 ของค่าซีโอดี และสี เริ่มต้น

และเมื่อพิจารณาค่าซีโอดี สี และความขุ่นสุดท้ายหลังกระบวนการกำจัดในงานวิจัยนี้มีค่าซีโอดี 1,496 มิลลิกรัมต่อลิตร (ร้อยละการกำจัด 99.5) ค่าสีมีค่าเท่ากับ 1,571 แพลทตินัมโคบอลต์ (ร้อยละการกำจัด 99.8) ค่าความขุ่น 260 เอ็นทียู (ร้อยละการกำจัด 80)

ข้อเสนอแนะ

กระบวนการกำจัดค่าซีโอดี สี และความขุ่นในงานวิจัยนี้ เมื่อเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานน้ำทิ้งในโรงงานอุตสาหกรรมแล้วพบว่า

ค่าซีโอดีหลังจากการบำบัดมีค่าเท่ากับ 1,496 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานน้ำทิ้งในโรงงานอุตสาหกรรม ซึ่งอุตสาหกรรมการผลิตเยื่อกระดาษเป็นอุตสาหกรรมที่กำหนดค่ามาตรฐานน้ำทิ้ง ตามประกาศกำหนดมาตรฐานควบคุมการระบายน้ำทิ้งจากแหล่งกำเนิดประเภทโรงงานอุตสาหกรรมและนิคมอุตสาหกรรม โดยกำหนดเป็นโรงงานอุตสาหกรรม จำพวกที่ 3 กำหนดค่าซีโอดีผ่านเกณฑ์มาตรฐานไว้ที่ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งจะเห็นได้ว่าค่าซีโอดีสุดท้ายจากงานวิจัยนี้ยังไม่ผ่านมาตรฐานดังกล่าว

ค่าสีตามมาตรฐานน้ำทิ้ง จากประกาศกำหนดมาตรฐานควบคุมการระบายน้ำทิ้งจากแหล่งกำเนิดประเภทโรงงานอุตสาหกรรมและนิคมอุตสาหกรรมให้โรงงานอุตสาหกรรมจำพวกที่ 3

ไว้ว่า ไม่เป็นที่พึงรังเกียจ และเมื่อพิจารณาลักษณะของน้ำเสียสุดท้ายที่ได้จากการกำจัดมีสีเหลือง ใส หรือมีค่าแพลตินัม-โคบอลต์ยูนิตเท่ากับ 1,571 แพลตินัมโคบอลต์ยูนิต โดยทางผู้วิจัยเห็นว่าควรมีกระบวนการบำบัดสีของน้ำดำเพิ่มเติม

เมื่อพิจารณาค่าความขุ่น ในมาตรฐานน้ำทิ้งตามประกาศกำหนดมาตรฐานควบคุมการระบายน้ำทิ้งจากแหล่งกำเนิด ประเภทโรงงานอุตสาหกรรมและนิคมอุตสาหกรรมในโรงงานอุตสาหกรรม จำพวกที่ 2 และจำพวกที่ 3 ปรากฏว่าค่าความขุ่นไม่ได้ถูกกำหนดค่ามาตรฐานไว้ อย่างไรก็ตาม ความขุ่นเป็นตัวแปรที่บ่งบอกถึงลักษณะทางกายภาพ ที่แสดงถึงความสะอาดของน้ำ จึงสมควรได้รับการกำจัดความขุ่นของน้ำดำก่อนทิ้งลงสู่สิ่งแวดล้อม โดยเมื่อพิจารณาค่าความขุ่นสุดท้ายมีค่า 260 เอ็นทียู ซึ่งค่อนข้างมีความใส แต่ยังมีตะกอนขนาดเล็กหลงเหลืออยู่

ดังนั้นเพื่อให้ค่าซีไอดี สี และความขุ่น ผ่านเกณฑ์มาตรฐานและไม่เป็นที่พึงรังเกียจ จึงอาจจะเพิ่มกระบวนการดูดซับในกระบวนการกำจัดค่าซีไอดี สี และความขุ่น โดยงานวิจัยของ ชามา เยี่ยงมานิต (2555) พบว่า กระบวนการดูดซับโดยใช้ถ่านกัมมันต์ เป็นกระบวนการที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดค่าซีไอดี สี และความขุ่น

แต่อย่างไรก็ตามกระบวนการกำจัดค่าซีไอดี สี และความขุ่นในงานวิจัยนี้ เป็นระบบบำบัดที่มีประสิทธิภาพ โดยเหมาะสำหรับโรงงานอุตสาหกรรมผลิตเยื่อกระดาษขนาดกลางและขนาดเล็ก หรือในกรณีที่ระบบกู้คืนสารเคมี (recovery process) ไม่สามารถดำเนินการได้ และเป็นระบบบำบัดเพื่อลดภาระของระบบบำบัดน้ำเสียหลัก ในโรงงานอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษได้

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- กระทรวงอุตสาหกรรม. 2558. เอกสารความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับอุตสาหกรรม ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับอุตสาหกรรม
เยื่อกระดาษ กระดาษ และสิ่งพิมพ์. [ออนไลน์][2558 กรกฎาคม 1]. แหล่งที่มา:
[http://www.oie.go.th/sites/default/files/attachments/IndustBasicKnowledge/
Master_7.pdf](http://www.oie.go.th/sites/default/files/attachments/IndustBasicKnowledge/Master_7.pdf) .
- ชฎาภรณ์ บุญแท้. การดูดซับโลหะหนักบางชนิดจากน้ำเสียด้วยดินเบา. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สหสาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม บัณฑิตวิทยาลัย. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.2554
- ชัยศรี สุขสำราญ. การวิเคราะห์วัสดุจีโอพอลิเมอร์ที่เตรียมจากเถ้าเถ้าปาล์มและดินเบา. วิทยานิพนธ์ปริญญา
มหาบัณฑิต ภาควิชาวิศวกรรมโยธา. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.2555
- ชามา เยี่ยงมานิต. การบำบัดน้ำดำจากโรงงานผลิตเยื่อกระดาษโดยโคแอกูเลชัน/ฟล็อกคูเลชันร่วมกับบราเนาขาว.
วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีเยื่อและกระดาษสาขาวิชาเทคโนโลยีเยื่อและกระดาษ คณะ
วิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.2555.
- ทิฆัมพร รัชยา. การฟอกสีน้ำเสียจากอุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษโดยเชื้อราฟอกขาวสายพันธุ์ที่คัดแยกจากเขต
ร้อน. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์. จุฬาลงกรณ์
มหาวิทยาลัย.2552
- ธัญรัศม์ เลิศโพธิ์พงษ์. การสังเคราะห์วัสดุจีโอพอลิเมอร์จากไดอะตอมไมค์ลำปาง. ปริญญาวิทยาศาสตร
มหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีอุตสาหกรรม. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.2553
- พิมพ์ชนก เต็งเจริญ. การกำจัดสีของน้ำทิ้งในการผลิตลิกนินโดยราไตรโคเดอร์มา. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต หลักสูตรสห
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สภาวะแวดล้อม บัณฑิตวิทยาลัย. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.2546
- มันสิน ตันกุลเวศน์. วิศวกรรมประปาเล่ม(1,2). กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย,2542.

ภาษาอังกฤษ

- Ali, H. 2010. Biodegradation of Synthetic Dyes—A Review. *Water, Air, & Soil Pollution*
213: 251-273.
- Archibald, F., M. G. Paice and L. Jurasek. 1990. Decolorization of kraft bleachery
effluent chromophores by *Coriolus (Trametes) versicolor*. *Enzyme and
Microbial Technology* 12: 846-853.
- Balan, D. S. and R. T. Monteiro. 2001. Decolorization of textile indigo dye by
ligninolytic fungi. *Journal of Biotechnology* 89: 141-145.

- Baldrian, P. and J. Gabriel. 2002. Copper and cadmium increase laccase activity in *Pleurotus ostreatus*. *FEMS Microbiology letters* 206: 69-74.
- Bhosle, S., K. Ranadive, G. Bapat, S. Garad, G. Deshpande and J. Vaidya. 2010. Taxonomy and diversity of *Ganoderma* from the Western parts of Maharashtra (India). *Mycosphere* 1: 249-262.
- Biermann, C. J. Handbook of pulping and papermaking. Academic press, 1996.
- Bolto, B. and J. Gregory. 2007. Organic polyelectrolytes in water treatment. *Water research* 41: 2301-2324.
- Bratby, J. Coagulation and flocculation in water and wastewater treatment. IWA publishing, 2006.
- Brebu, M. and C. Vasile. 2010. Thermal degradation of lignin—a review. *Cellulose Chemistry & Technology* 44: 353.
- Cerniglia, C. E. 1997. Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 19: 324-333.
- Cerrón, L. M., D. Romero-Suárez, N. Vera, Y. Ludeña, G. K. Villena and M. Gutiérrez-Correa. 2015. Decolorization of Textile Reactive Dyes and Effluents by Biofilms of *Trametes polyzona* LMB-TM5 and *Ceriporia* sp. LMB-TM1 Isolated from the Peruvian Rainforest. *Water, Air, & Soil Pollution* 226: 1-13.
- Chairin, T., T. Nitharanont, A. Watanabe, Y. Asada, C. Khanongnuch and S. Lumyong. 2014. Purification and characterization of the extracellular laccase produced by *Trametes polyzona* WR710-1 under solid-state fermentation. *Journal of basic microbiology* 54: 35-43.
- Chakar, F. S. and A. J. Ragauskas. 2004. Review of current and future softwood kraft lignin process chemistry. *Industrial Crops and Products* 20: 131-141.
- Couto, S. R. 2009. Dye removal by immobilised fungi. *Biotechnology Advances* 27: 227-235.
- D'souza, T. M., C. S. Merritt and C. A. Reddy. 1999. Lignin-modifying enzymes of the white rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*. *Applied and environmental microbiology* 65: 5307-5313.

- Da Re, V. and L. Papinutti. 2011. Black liquor decolorization by selected white-rot fungi. *Applied biochemistry and biotechnology* 165: 406-415.
- de KOKER, T. H., Z. John, S. F. Allsop and B. J. Janse. 2000. Isolation and enzymic characterisation of South African white-rot fungi. *Mycological Research* 104: 820-824.
- Desai, S. and C. Nityanand. 2011. Microbial laccases and their applications: a review. *Asian J Biotechnol* 3: 98-124.
- Dugan, F. M. The identification of fungi: an illustrated introduction with keys, glossary, and guide to literature. 2006.
- Eggert, C., U. Temp and K.-E. L. Eriksson. 1996. Laccase-producing white-rot fungus lacking lignin peroxidase and manganese peroxidase: role of laccase in lignin biodegradation.
- El Mansouri, N.-E. and J. Salvadó. 2006. Structural characterization of technical lignins for the production of adhesives: Application to lignosulfonate, kraft, soda-anthraquinone, organosolv and ethanol process lignins. *Industrial Crops and Products* 24: 8-16.
- Esposito, E., V. P. Canhos and N. Durán. 1991. Screening of lignin-degrading fungi for removal of color from Kraft mill wastewater with no additional extra carbon-source. *Biotechnology Letters* 13: 571-576.
- Fengel, D., G. Wegener and J. Feckl. 1981. Beitrag zur Charakterisierung analytischer und technischer Lignine.-Teil 2. Physikalisch-chemische und elektronenmikroskopische Untersuchungen. *Holzforschung-International Journal of the Biology, Chemistry, Physics and Technology of Wood* 35: 111-118.
- Font, X., G. Caminal, X. Gabarrell, S. Romero and M. T. Vicent. 2003. Black liquor detoxification by laccase of *Trametes versicolor* pellets. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 78: 548-554.
- Forrester, I. T., A. C. Grabski, R. R. Burgess and G. F. Leatham. 1988. Manganese, Mn-dependent peroxidases, and the biodegradation of lignin. *Biochemical and biophysical research communications* 157: 992-999.

- Gao, D., L. Du, J. Yang, W. M. Wu and H. Liang. 2010. A critical review of the application of white rot fungus to environmental pollution control. *Crit Rev Biotechnol* 30: 70-7.
- Gilarranz, M. A., F. Rodríguez and M. Oliet. 2000. Lignin Behavior During the Autocatalyzed Methanol Pulping of *Eucalyptus globulus* Changes in Molecular Weight and Functionality. *Holzforschung* 54: 373-380.
- Gilbertson, R. L. and L. Ryvarden. 1986. North American polypores. Vol. I. Abortiporus-Lindtneria. *North American polypores. Vol. I. Abortiporus-Lindtneria*.
- Gold, M. H. and M. Alic. 1993. Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Microbiological reviews* 57: 605-622.
- Gullichsen, J. and C.-J. Fogelholm. Chemical pulping. Fapet Oy, 1999.
- Hatakka, A. 1994. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role from in lignin degradation. *FEMS microbiology reviews* 13: 125-135.
- Holik, H. Handbook of paper and board. John Wiley & Sons, 2006.
- Intachang, T., T. Rakisarakul and A. Siripithakul. 2012. The effects of pulp and fiber crops that affect the printing surface through for packaging.
- Irfan, M., T. Butt, N. Imtiaz, N. Abbas, R. A. Khan and A. Shafique. 2013. The removal of COD, TSS and colour of black liquor by coagulation–flocculation process at optimized pH, settling and dosing rate. *Arabian Journal of Chemistry*.
- Jeong, G.-T. and D.-H. Park. 2009. Optimization of biodiesel production from castor oil using response surface methodology. *Applied biochemistry and biotechnology* 156: 1-11.
- Kahraman, S. and O. Yeşilada. 2003. Decolorization and bioremediation of molasses wastewater by white-rot fungi in a semi-solid-state condition. *Folia microbiologica* 48: 525-528.

- Kapich, A., B. Prior, A. Botha, S. Galkin, T. Lundell and A. Hatakka. 2004. Effect of lignocellulose-containing substrates on production of ligninolytic peroxidases in submerged cultures of *Phanerochaete chrysosporium* ME-446. *Enzyme and Microbial technology* 34: 187-195.
- Karthikeyan, K., K. Nanthakumar, K. Shanthi and P. Lakshmanaperumalsamy. 2010. Response surface methodology for optimization of culture conditions for dye decolorization by a fungus, *Aspergillus niger* HM11 isolated from dye affected soil. *Iranian journal of microbiology* 2: 213-222.
- Kirk, T. K., E. Schultz, W. Connors, L. Lorenz and J. Zeikus. 1978. Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives of Microbiology* 117: 277-285.
- Kortekaas, S., G. Vidal, H. Yan-Ling, G. Lettinga and J. A. Field. 1998. Anaerobic-aerobic treatment of toxic pulping black liquor with upfront effluent recirculation. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 86: 97-110.
- Ksibi, M., S. B. Amor, S. Cherif, E. Elaloui, A. Houas and M. Elaloui. 2003. Photodegradation of lignin from black liquor using a UV/TiO₂ system. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 154: 211-218.
- Kunamneni, A., F. J. Plou, A. Ballesteros and M. Alcalde. 2008. Laccases and their applications: a patent review. *Recent patents on biotechnology* 2: 10-24.
- Kuwahara, M., J. K. Glenn, M. A. Morgan and M. H. Gold. 1984. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS letters* 169: 247-250.
- Lara, M. A., A. J. Rodríguez-Malaver, O. J. Rojas, O. Holmquist, A. M. González, J. Bullón, N. Peñaloza and E. Araujo. 2003. Black liquor lignin biodegradation by *Trametes elegans*. *International biodeterioration & biodegradation* 52: 167-173.
- Leung, P.-C. and B. Stephen. 2002. Effect of different carbon and nitrogen regimes on Poly R decolorization by white-rot fungi. *Mycological Research* 106: 86-92.

- Lewis, N. G. and E. Yamamoto. 1990. Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation. *Annual review of plant biology* 41: 455-496.
- Linko, S. 1992. Production of *Phanerochaete chrysosporium* lignin peroxidase. *Biotechnology advances* 10: 191-236.
- Maheshwari, R., G. Bharadwaj and M. K. Bhat. 2000. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. *Microbiology and molecular biology reviews* 64: 461-488.
- Marshman, D., T. Chmelyk, M. Sidhu, R. Gopaluni and G. Dumont. 2010. Energy optimization in a pulp and paper mill cogeneration facility. *Applied Energy* 87: 3514-3525.
- Michen, B., A. Diatta, J. Fritsch, C. Aneziris and T. Graule. 2011. Removal of colloidal particles in ceramic depth filters based on diatomaceous earth. *Separation and purification technology* 81: 77-87.
- Mohan, D., C. U. Pittman and P. H. Steele. 2006. Pyrolysis of wood/biomass for bio-oil: a critical review. *Energy & fuels* 20: 848-889.
- Montgomery, D. C. Design and analysis of experiments. John Wiley & Sons, 2008.
- More, T., S. Yan, R. Tyagi and R. Surampalli. 2010. Potential use of filamentous fungi for wastewater sludge treatment. *Bioresource Technology* 101: 7691-7700.
- Murugesan, K., Y.-M. Kim, J.-R. Jeon and Y.-S. Chang. 2009. Effect of metal ions on reactive dye decolorization by laccase from *Ganoderma lucidum*. *Journal of hazardous materials* 168: 523-529.
- Naqvi, M., J. Yan and E. Dahlquist. 2010. Black liquor gasification integrated in pulp and paper mills: A critical review. *Bioresource technology* 101: 8001-8015.
- Ordaz, A., E. Favela, M. Meneses, G. Mendoza and O. Loera. 2012. Hyphal morphology modification in thermal adaptation by the white-rot fungus *Fomes* sp. EUM1. *Journal of basic Microbiology* 52: 167-174.
- Pettijohn, F. J. 1957. Sedimentary rocks.
- Prasongsuk, S., P. Lotrakul, T. Imai and H. Punnapayak. 2009. Decolourization of pulp mill wastewater using thermotolerant white rot fungi. *Science Asia* 35: 37-41.

- Quarles, W. and P. Winn. 1996. Diatomaceous earth and stored product pests. *IPM practitioner* 18: 1-10.
- Raj, A., S. Kumar, I. Haq and S. K. Singh. 2014. Bioremediation and toxicity reduction in pulp and paper mill effluent by newly isolated ligninolytic *Paenibacillus* sp. *Ecological Engineering* 71: 355-362.
- Rajput, A. Q., M. A. Khanzada and S. Shahzad. 2014. Effect of Different Substrates and Carbon and Nitrogen Sources on Growth and Shelf Life of *Trichoderma pseudokoningii*. *International Journal of Agriculture and Biology* 16: 893-898.
- Reid, I. D. 1995. Biodegradation of lignin. *Canadian Journal of Botany* 73: 1011-1018.
- Reinhammar, B. 1984. Laccase. *Copper proteins and copper enzymes* 3: 1-35.
- Rintala, J. A. and J. A. Puhakka. 1994. Anaerobic treatment in pulp-and paper-mill waste management: a review. *Bioresource Technology* 47: 1-18.
- Sanghi, R. and B. Bhattacharya. 2005. Comparative evaluation of natural polyelectrolytes psyllium and chitosan as coagulant aids for decolourization of dye solutions. *Water quality research journal of Canada* 40: 97-101.
- Sethuraman, A., D. Akin and K.-E. Eriksson. 1999. Production of ligninolytic enzymes and synthetic lignin mineralization by the bird's nest fungus *Cyathus stercoreus*. *Applied microbiology and biotechnology* 52: 689-697.
- Sixta, H. and G. Schild. 2009. A new generation kraft process. *Lenzinger Berichte* 87: 26-37.
- Smook, G. A. 1990. Handbook of Pulp and Paper Terminology. *Cegep de Trois-Rivieres*.
- Sumathi, S. and V. Phatak. 1999. Fungal treatment of bagasse based pulp and paper mill wastes. *Environmental technology* 20: 93-98.
- Sun, R., J. Tomkinson and J. Bolton. 1999. Effects of precipitation pH on the physico-chemical properties of the lignins isolated from the black liquor of oil palm empty fruit bunch fibre pulping. *Polymer degradation and stability* 63: 195-200.
- ten Have, R. and P. J. Teunissen. 2001. Oxidative mechanisms involved in lignin degradation by white-rot fungi. *Chemical Reviews* 101: 3397-3414.

- Tian, X.-M., H.-Y. Yu, L.-W. Zhou, C. Decock, J. Vlasák and Y.-C. Dai. 2013. Phylogeny and taxonomy of the *Inonotus linteus* complex. *Fungal Diversity* 58: 159-169.
- Tien, M. and T. K. Kirk. 1984. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 81: 2280-2284.
- Tiwari, S., R. Thakur and J. Shankar. 2015. Role of heat-shock proteins in cellular function and in the biology of fungi. *Biotechnology research international* 2015.
- Tuomela, M., M. Vikman, A. Hatakka and M. Itävaara. 2000. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. *Bioresource Technology* 72: 169-183.
- Wesenberg, D., I. Kyriakides and S. N. Agathos. 2003. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnology advances* 22: 161-187.
- Wong, D. W. 2009. Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. *Applied biochemistry and biotechnology* 157: 174-209.
- Wu, J., Y.-Z. Xiao and H.-Q. Yu. 2005. Degradation of lignin in pulp mill wastewaters by white-rot fungi on biofilm. *Bioresource Technology* 96: 1357-1363.
- Yang, D., X. Qiu, M. Zhou and H. Lou. 2007. Properties of sodium lignosulfonate as dispersant of coal water slurry. *Energy Conversion and Management* 48: 2433-2438.
- Zadrozny, J. M., D. J. Xiao, M. Atanasov, G. J. Long, F. Grandjean, F. Neese and J. R. Long. 2013. Magnetic blocking in a linear iron (I) complex. *Nature chemistry* 5: 577-581.

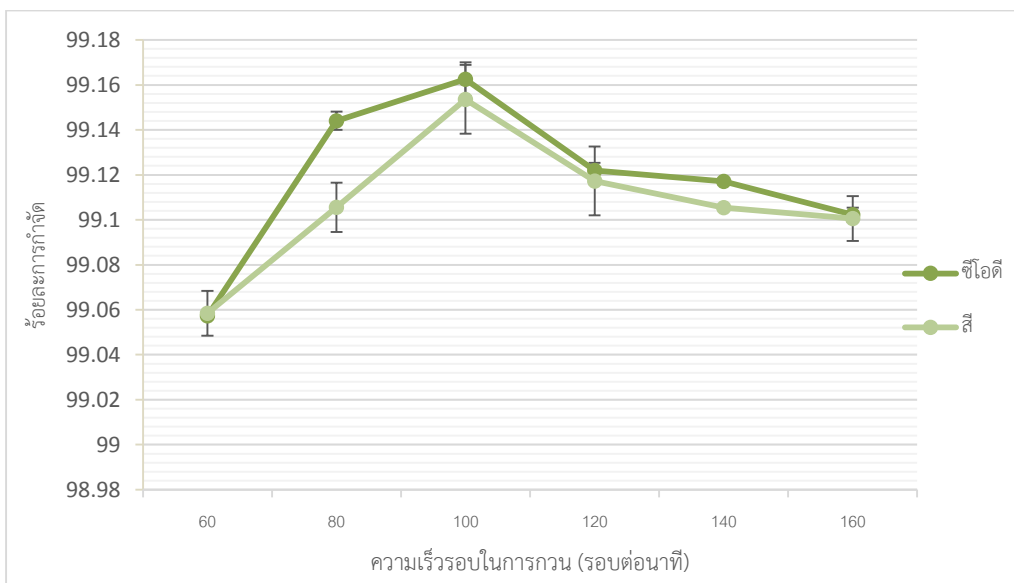


ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก

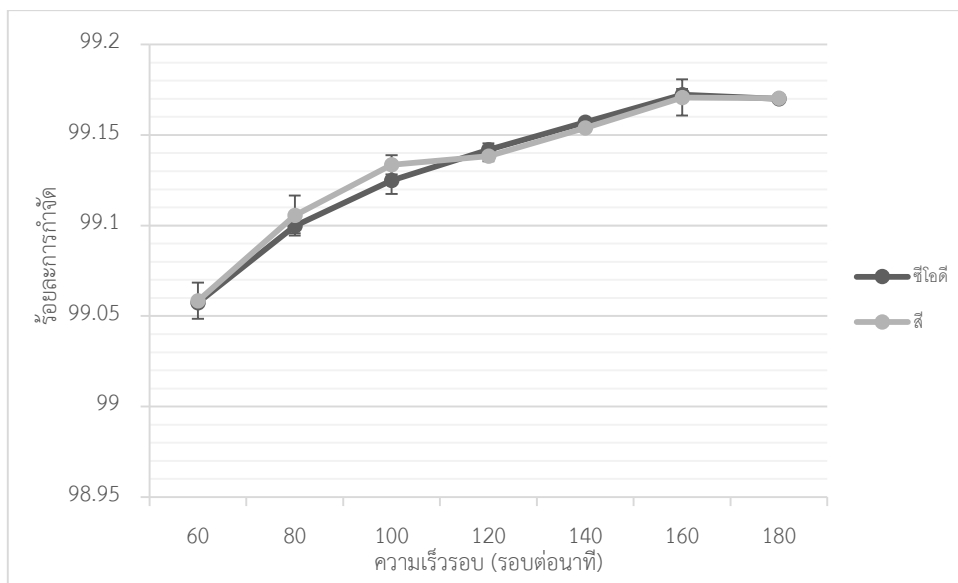
1. ศึกษาผลของความเร็วยรอบในการกวนที่เหมาะสมต่อสารละลายโคโคซานเพื่อกำจัดซีไอดี สี



รูปที่ ก.1 ร้อยละการกำจัดซีไอดี สี ที่ต่อความเร็วรอบในการกวนผสมที่เหมาะสมของสารโคแอกูแลนต์โคโคซาน โดยใช้สารโคแอกูแลนต์ปริมาตร 7 มิลลิลิตร ความเข้มข้นร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร)

จากรูปที่ ก.1 พบว่าเมื่อเพิ่มความเร็วรอบในการกวนผสมที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาทีให้ร้อยละการกำจัดซีไอดีและสีเท่ากับร้อยละ 99.16 และ 99.15 ตามลำดับ และเมื่อเพิ่มความเร็วรอบในการกวนผสมพบว่าร้อยละกำจัดซีไอดี สี มีแนวโน้มลดลง คาดว่าน่าจะเป็นผลมาจากความเร็วรอบในการกวนที่สูงขึ้นทำให้ตะกอนโคโคซานมีขนาดที่แตกออก และ ฟุ้งกระจายในระบบ จึงทำให้ผลการกำจัดลดลง

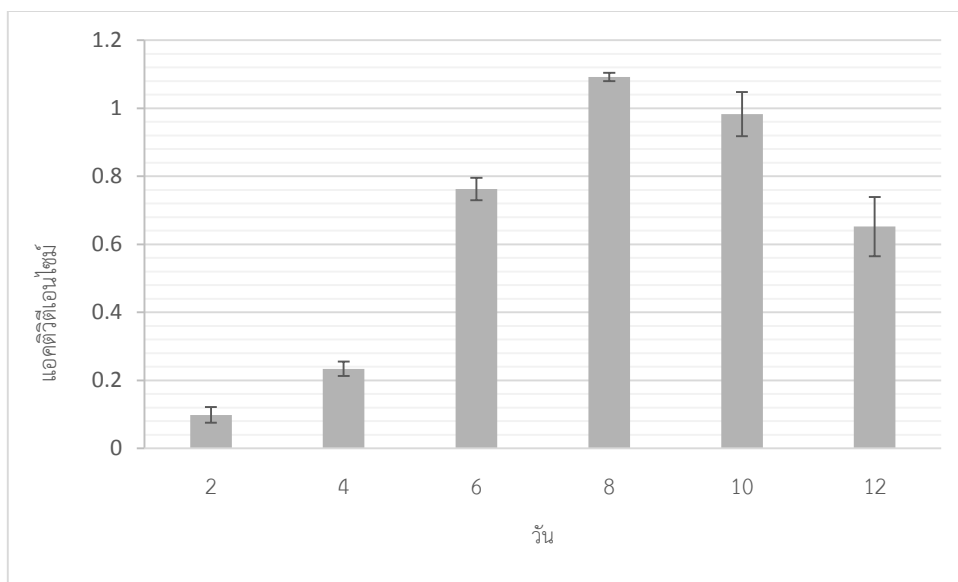
2. ศึกษาผลของความเร็วรอบในการกวนที่เหมาะสมผสมต่อสารแคตไอออนพอลิอะคริลาไมด์ เพื่อกำจัดซีโอดี สี



รูปที่ ก.2 ร้อยละการกำจัดซีโอดี สี ที่ต่อความเร็วรอบในการกวนผสมที่เหมาะสมของสารละลายพอลิอะคริลาไมด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยใช้สารโคแอกูแลนต์ปริมาณ 7 มิลลิลิตร ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)

จากรูปที่ ก.2 พบว่าเมื่อเพิ่มความเร็วรอบในการกวนผสมที่ความเร็วรอบ 160 รอบต่อนาทีให้ร้อยละการกำจัดซีโอดีและสีเท่ากับร้อยละ 99.17 ตามลำดับ และเมื่อเพิ่มความเร็วรอบในการกวนผสมพบว่าร้อยละกำจัดซีโอดี สี คงที่ที่ความเร็วรอบที่ 180 รอบต่อนาที

ภาคผนวก ข

กราฟแสดงแอกติวิตีเอนไซม์แลคเคสของราเน่าขาว *T.polyzona* CU07 ที่ตรึงบนดินเบา

รูปที่ ข.2 กราฟแสดงแอกติวิตีเอนไซม์แลคเคสที่ตรึงบนดินเบา

จากผลการทดลองข้างต้นจะเห็นค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับการวัดแอกติวิตีแลคเคสในสภาวะปกติ โดยค่าสูงสุดในค่าปกติอยู่ที่ 0.363 ± 0.12 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และเมื่อวัดกิจกรรมเอนไซม์แลคเคสโดยราเน่าขาวตรึงบนดินเบา ค่าสูงสุด 1.092 ± 0.12 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

ภาคผนวก ค

อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีเตรียม

1. อาหารสูตร Potato dextrose agar (PDA)

มันฝรั่ง	200	กรัม
น้ำตาลกลูโคส	20	กรัม
ผงวุ้น	18	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

1. ปอกเปลือกมันฝรั่งออกแล้วหั่นมันฝรั่งเป็นสี่เหลี่ยมลูกเต๋า
2. นำมันฝรั่งที่หั่นแล้วนำไปต้มกับน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ด้วยไฟปานกลางเป็นเวลา 20 นาทีหรือจนกว่ามันฝรั่งนิ่ม แล้วกรองเนื้อมันฝรั่งออกเอาแต่น้ำ
3. เติมน้ำตาลกลูโคสและผงวุ้นคนให้เข้ากันแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1000 มิลลิลิตร
4. เทใส่ขวดอาหารขวดละประมาณ 100 มิลลิลิตร
5. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งความดันไอน้ำสูง (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารสูตร Malt Extract Broth (MEB)

Malt Extract	20	กรัม
เปปโตน	10	กรัม
น้ำตาลกลูโคส	20	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

1. ละลาย malt extract ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร
2. เติมเปปโตนและน้ำตาลกลูโคสคนให้เข้ากัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร
3. เทใส่ขวดอาหารขวดละประมาณ 100 มิลลิลิตร ปิดฝาขวดให้สนิท
4. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งความดันไอน้ำสูง (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. อาหารสูตร Lignin Modified Basal medium (LMB)

Glucose	20	กรัม
KH ₂ PO ₄	1.0	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5	กรัม
CaCl ₂	0.01	กรัม
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01	กรัม
MnSO ₄ ·4H ₂ O	0.001	กรัม
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.001	กรัม
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.002	กรัม
H ₂ O	1000	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

1. ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตรจากนั้นปรับค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5
2. เติม ABTS ที่ความเข้มข้น 0.001 กรัมต่อลิตร เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งความดันไอน้ำ
3. อาหารสูตร Production (Glucose Yeast Peptone medium)

Glucose	40	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
เปปโติน	5	กรัม
KH ₂ PO ₄	0.46	กรัม
K ₂ HPO ₄	1	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5	กรัม
น้ำกลั่น	500	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

- . นำส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำกลั่นตามสัดส่วนข้างต้น ปรับค่าความเป็นกรดต่างให้ได้ 5.5. ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 N นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียสความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

ภาคผนวก ง
การวัดแอกติวิตีของเอนไซม์

1. การวัดกิจกรรมเอนไซม์แลคแคส (Madhavi and LeLe, 2006)

1.1 การเตรียม reaction mixture ปริมาตร 1.2 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย

0.1 M Sodium acetate (pH 5.5) 0.6 มิลลิลิตร

10 mM ABTS 0.2 มิลลิลิตร

Enzyme 0.4 มิลลิลิตร

1.2 นำ reaction mixture ในข้อ 1.1 มาผสมกันในคิวเวต โดยเติมเอนไซม์เป็นอันดับสุดท้าย

1.3 ทำการวัด reaction mixture ในข้อ 3.2 ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร เวลาทำปฏิกิริยา 1 นาที โดยมีชุดควบคุมเป็น reaction ที่ไม่มีการเติมเอนไซม์

1.4 การคำนวณหาแอกติวิตีของแลคแคส (Wolfenden and Wilson, 1982; Childs and Bardasley, 1975)

1 หน่วยแอกติวิตีของแลคแคส คือปริมาณของแลคแคสที่สามารถออกซิไดซ์ 1 ไมโครโมลของ ABTS ใน 1 นาที เมื่อได้ค่าดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตรแล้วนำมาแทนค่าตามสูตร

$$\text{แลคแคสแอกติวิตี(U/ml)} = \frac{\Delta A/\text{ml} * \text{Volume reaction mixture} * 1000}{36,000 * 1 * \text{Volume enzyme solution}}$$

$$\epsilon \text{ 420 นาโนเมตร} = 36000 \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

ภาคผนวก จ
การวิเคราะห์ค่าซีไอดี

วิธี Close Reflux Titrimetric Method (AOAC Official Method 2000)

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. หลอดทดลองชนิดฝาปิด ขนาด 25 x 150 มิลลิลิตร
2. ที่ใส่หลอดทดลอง
3. เตาอบที่อุณหภูมิ 150±2 องศาเซลเซียส
4. ปิเปตขนาด 1, 10 มิลลิลิตร
5. บิวเรตขนาด 50 มิลลิลิตร
6. ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร

สารเคมี

1. สารละลาย (Digestion reagent): ละลายสาร $K_2Cr_2O_7$ 4.913 กรัม ที่ผ่านการอบแห้งที่ 103 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตรค่อยๆเติมกรดซัลฟิวริก เข้มข้น 167 มิลลิลิตรเติม $HgSO_4$ ลงไป 33.3 กรัม คนให้ละลายตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่ อุณหภูมิห้องแล้วปรับปริมาตร เป็น 1 ลิตร

2. กรดซัลฟิวริกเข้มข้นที่ผสม $AgSO_4$ (Sulfuric acid reagent): $AgSO_4$ 22 กรัมในกรดซัลฟิวริกเข้มข้น น้ำหนัก 4.1 กิโลกรัม (2.5 ลิตร) แล้วตั้งทิ้งไว้ 1-2 วันเพื่อให้ละลาย

3. สารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต (Ferrous acid reagent: FAS) 0.1 นอร์มอล: ละลาย $(NH_4)_2SO_4 \cdot FeSO_4 \cdot 6H_2O$ 39 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นลงไป 20 มิลลิลิตร ทำให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่นลงไปจนปริมาตร 1 ลิตร สารละลายนี้ต้องนำมาหาความเข้มข้นที่แน่นอนด้วยสารละลาย Digest reagent ดังนี้เติมน้ำ กลั่น 10 มิลลิลิตร สารละลาย Digest reagent 14 มิลลิลิตรจากนั้นใช้ ปิเปตค่อยๆเติม Sulfuric sulfate (FAS) โดยใช้ Ferroin จำนวน 2-3 หยด เป็นอินดิเคเตอร์ สารละลายจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีเขียวอมเขียวและเป็นสีน้ำตาลแดงที่จุดยุติ

$$\text{ความเข้มข้น (นอร์มอล)} = \frac{\text{ปริมาณสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต (มิลลิลิตร)} \times 0.05}{\text{ปริมาณสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต (มิลลิลิตร)}}$$

4. สารละลาย Ferroin อินดิเคเตอร์: ละลาย 1-10 Phenantroline monohydrate 1.485 กรัม และ $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 695 มิลลิลิตรในน้ำกลั่น แล้วเติมน้ำ กลั่น จนมีปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร

วิธีการทดลอง

1. ล้างหลอดทดลองและฝาจุกด้วยกรดซัลฟูริกร้อยละ 20 ปริมาตรต่อปริมาตร ก่อนเพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากสารอินทรีย์
2. ปิเปตตัวอย่างน้ำ มา 10 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอดทดลองแล้วเติม Digestion reagent ลงไป 6 มิลลิลิตร
3. ค่อยๆเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น ที่ผสม AgSO_4 ลงไป 14 มิลลิลิตรให้ไหลลงก้นหลอดแก้ว เพื่อให้ชั้นของกรดอยู่ในชั้นของน้ำ ตัวอย่างและ Digestion reagent
หมายเหตุ ภายหลังจากเติมกรดซัลฟูริกให้สังเกตสีของตัวอย่างดังต่อไปนี้
 - ถ้าได้สีเขียวแสดงว่า ปริมาณ $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ เหลืออยู่มากใช้ปริมาณน้ำตัวอย่างน้อยเกินไปต้องเพิ่มปริมาณน้ำตัวอย่างอีก
 - ถ้าได้สีเขียวอมเหลืองแสดงว่า น้ำตัวอย่างเหมาะสมสามารถนำ ตัวอย่างไปรีฟลักซ์ได้
 - ถ้าได้สีเขียวอมฟ้าแสดงว่าปริมาณน้ำตัวอย่างมากเกินไป ต้องการเจือจางน้ำตัวอย่าง ให้มีความเข้มข้น น้อยกว่านี้
 โดยจะใช้อัตราส่วนระหว่างน้ำตัวอย่าง : น้ำกลั่นเท่าไรก็ได้แต่ผลรวมของปริมาตรน้ำตัวอย่าง ต้องเท่ากับ 10 มิลลิลิตร
4. ปิดจุกหลอดทดลองให้แน่นแล้วคว่ำ หลอดไปมาหลาย ๆ ครั้งอย่างทั่วถึงก่อนจะนำตัวอย่างไปรีฟลักซ์ เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดความร้อนสะสมอยู่ที่ก้นหลอดซึ่งอาจแตกได้ในขณะทำการรีฟลักซ์
5. ให้ทำแปลงค์โดยใช้ น้ำ กลั่นแทนน้ำ ตัวอย่างด้วยวิธีการทดลองเช่นเดียวกับการวิเคราะห์น้ำตัวอย่างประมาณ 1-2 หลอด
6. นำหลอดทดลองทั้งหมดที่ใส่น้ำตัวอย่างและแปลงค์วางบนที่ตั้งหลอดทดลองแล้วเข้าเตาอบที่ทำให้อุณหภูมิสูงถึง 150 ± 2 องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลา 2 ชั่วโมง ให้นำตัวอย่างออกมาทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนเย็น
7. เทตัวอย่างจากหลอดใส่ลงในขวดรูปชมพู่ไทเทรตด้วยสารละลาย FAS จนกระทั่งถึงจุดจะเห็นการเปลี่ยนสีจากสีเหลืองเป็นสีฟ้าอมเขียวและเป็นสีน้ำตาลแดงที่จุดยุติอ่านปริมาตรที่ไทเทรตตอนเริ่มเปลี่ยนน้ำตาลแดง

การคำนวณ

$$\text{COD (mg/L)} = \frac{(a-b) \times N \times 8000}{\text{mL sample}}$$

a = mL ของ $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ ที่ใช้ไทเทรตแบลงค์

b = mL ของ $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ ที่ใช้ไทเทรตน้ำตัวอย่าง

N = Normality ของ $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ ที่ใช้



ภาคผนวก ฉ

การวิเคราะห์วัดสีโดยวิธีการเปรียบเทียบแพลตินัมโคบอลต์มาตรฐาน (Platinum cobalt standard) (APHA AWWA and WEF, 1998)

สารเคมี

การเตรียมสารละลายสลายสีต่อสีมาตรฐาน โดยละลายโพแทสเซียมคลอโรแพลตินเนต (K_2PtCl_6) 1.246 กรัม และโคบอลต์คลอไรด์ ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$) 1.00 กรัม ในน้ำกลั่นซึ่งเติมกรดไฮโดรคลอริก 100 มิลลิลิตร แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ซึ่งจะได้สารละลายที่มีความเข้มของสีเท่ากับ 500 หน่วย

ตารางที่ ง.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานความเข้มสี 0-500 หน่วยสี

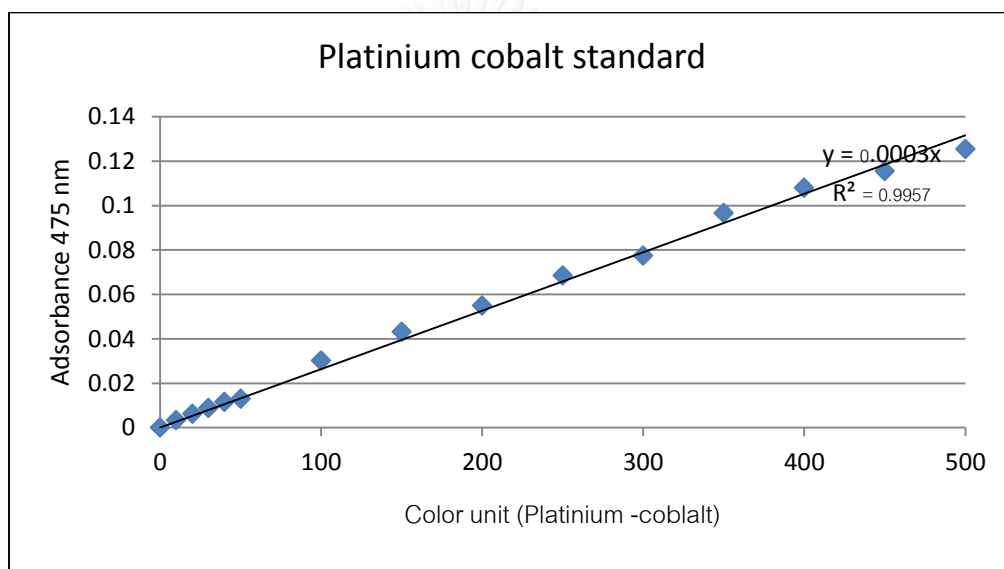
สารละลายความเข้มสีมาตรฐาน (หน่วยสี)	ปริมาตรของสารละลายมาตรฐาน (มิลลิลิตร)
0	-
10	0.5
20	1.0
30	1.5
40	2.0
50	2.5
100	5.0
150	7.5
200	10.0
250	12.5
300	15.0
350	17.5
400	20.0
450	22.5
500	25.0

การเตรียมกราฟมาตรฐาน

เตรียมสารละลายที่มีความเข้มข้นที่มีความเข้มข้นสีระหว่าง 0-500 หน่วยสีจากสารละลายมาตรฐานได้ตามตารางภาคผนวกที่ ๑ เตรียมสารละลายสีมาตรฐานเข้มข้นต่างๆ โดยเปิดสารละลายสีมาตรฐาน (500 หน่วยสี) ตามปริมาตรที่กำหนดในแต่ละความเข้มข้นปรับปริมาตรให้เป็น 25 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร

วิธีการ

นำตัวอย่างน้ำ วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร โดยใช้ น้ำกลั่นเป็น blank นำค่าดูดกลืนแสงที่ 475 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อทราบค่าของตัวอย่าง



รูปที่ ๑.1 กราฟมาตรฐานของสารละลายสีมาตรฐานด้วยวิธี Platinum cobalt standard

ภาคผนวก ข
การเตรียมสารเคมีสกัดดีเอ็นเอ

1. Tris – HCl Buffer (50 มิลลิโมลาร์ pH 7.5)

TrisBase	6.1	กรัม
น้ำกรอง	800	มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 7.5 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น และปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น

2. 2X CTAB lysis buffer

CTAB	4	กรัม
1M Tris-HCl (pH 8.0)	20	มิลลิลิตร
0.5 M EDTA	8	มิลลิลิตร
NaCl	16.36	กรัม
2-mercaptoethanol	1	มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อจนได้เป็นปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันไว้ที่อุณหภูมิห้อง

3. TE buffer

Tris-Cl (pH8) 1 M	10	มิลลิลิตร
EDTA (pH8) 0.5 M	2	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1	ลิตร

เติมน้ำกลั่นลงในส่วนผสมของ Tris-Cl และ EDTA นำไปฆ่าเชื้อหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำที่อุณหภูมิห้อง 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

4. สารละลาย MTT 5 mg/ml ใน PBS

MTT	50	มิลลิลิตร
PBS	10	มิลลิลิตร

ละลาย MTT ใน PBS กรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร แบ่งใส่หลอดไมโครทิวหลอดเชื้อขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 1 มิลลิลิตร หุ้มแผ่นฟอยล์เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5. สารละลาย 0.04 N HCl ใน isopropanol

เติม HCl 0.331 มิลลิลิตร ลงใน 80 มิลลิลิตร isopropanol ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตรด้วย isopropanol เก็บที่อุณหภูมิห้อง

6. Washing buffer

PVP (polyvinylpyrrolidone)	2	กรัม
Ascorbic acid	1.76	กรัม
1 M Tris HCl (pH 8.0)	20	มิลลิลิตร
2-mercaptoethanol	4	มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อ (Autoclave water) จนได้ปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

7. Chloroform/isoamyl alcohol (24:1 v/v)

Chloroform	192	มิลลิลิตร
Isoamyl alcohol	8	มิลลิลิตร

8. Polyethylene glycol (PEG) 20%

โพลีเอธิลีนไกลคอล	20	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	14.61	กรัม
น้ำกลั่น	200	มิลลิลิตร

ละลาย PEG และ NaCl ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 200 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

9. 10X TBE buffer (10X Tris-boric acid EDTA)

ทริสเบส (Tris-base)	54	กรัม
บอริก (H_2BO_3)	27.5	กรัม
EDTA	4.65	กรัม
น้ำกลั่น	500	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 500 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

10. Ethidium bromide, 10 mg/ml

เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงในเอทีเดียมโบรไมด์ ($C_2H_20BrN_3$) 0.2 กรัม ผสมให้เข้ากันเก็บไว้ขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

11 Agarose gel 1.5% (w/v)

อะกาโรส (agarose)	1.65	กรัม
TBE	110	มิลลิลิตร
เอทีเดียมโบรไมด์	4	ไมโครลิตร



ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นาย สุพรชัย รัตนะรัต เกิดที่จังหวัดกรุงเทพมหานครฯ เมื่อวันที่ 10 ธันวาคม พ.ศ. 2533 จบการศึกษาระดับประถมศึกษา โรงเรียนทรงวิทยา ระดับมัธยมศึกษา โรงเรียนมัธยมด่านสำโรง และสำเร็จการศึกษา วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) เกียรตินิยมอันดับ 2 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ เมื่อปี 2556 และเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโทบัณฑิต หลักสูตรสหสาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม บัณฑิตวิทยาลัย และสำเร็จการศึกษาเมื่อปี 2559

ประวัติการนำเสนอผลงาน

Rattanarat S., Pongsatabodee N., Lotrakul P., Punnapayak .H., and Prasongsuk .S Screening of themotolerant laccase-producing white rot fungi from Thailand for decolorization pulp mill black liquor 20th Biological Science Graduate Congress (BSGC) 9 – 11 December 2015 Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

Rattanarat S., Pongsatabodee N., Lotrakul P., Punnapayak .H., and Prasongsuk .S Screening of themotolerant laccase-producing white rot fungi from Thailand for decolorization pulp mill black liquor ASEAN Youth Exchange on Biotechnology of Biomass Utilization for ASEAN development, Mulawarman University, Samadrinda, Indonesia

Rattanarat S., Pongsatabodee N., Lotrakul P., Punnapayak .H., and Prasongsuk .S Decolorization of pulp mill black liquor by a laccase-producing white rot fungus, Trametes polyzona, combined with coagulation. The 11th Conference on science and technology for Youth : 2016 Bangkok International trade and exhibition Centre (BITEC) BANGKOK, Thailand