



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์
การศึกษาการลดสีน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มด้วยวิธีทางชีวภาพ
(Study of biological decolorization of palm oil mill effluent)

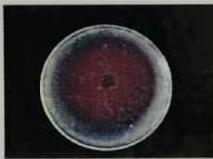
โดย นายอภิวัฒน์ ห่อเพชร และคณะ
มหาวิทยาลัยบูรพา เมษายน 2552



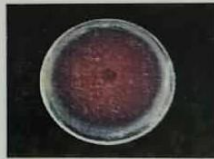
CH-1



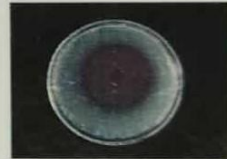
CH-2



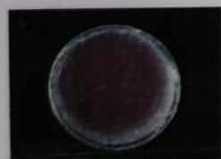
NA-1



NA-2



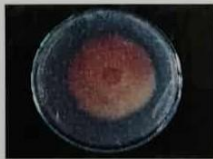
NA-3



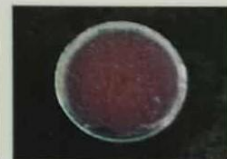
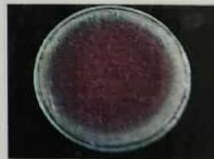
NA-4



SU-1



SU-2



628.35
ฉ266ก

BURAPHA UNIVERSITY LIBRARY



3 2498 00426173 9

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณ

สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

กิตติกรรมประกาศ

สถาบันสังคมและสิ่งแวดล้อมศึกษา คณะมนุษยศาสตร์และสังคมศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา(สกอ.) ที่สนับสนุนทุนวิจัยเรื่อง “การศึกษาการลดสี
น้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มด้วยวิธีทางชีวภาพ” (Study of biological decolorization of palm
oil mill effluent) และขอขอบคุณบุคลากรของหน่วยงานราชการที่เกี่ยวข้อง ตลอดจนบริษัท ทักษิณ
ปาล์ม (2521) จำกัด จ.สุราษฎร์ธานีในการสนับสนุนตัวอย่างน้ำเสีย ในการปฏิบัติงานวิจัยครั้งนี้

นายอภิวัฒน์ ห่อเพชรและคณะผู้วิจัย
สถาบันสังคมและสิ่งแวดล้อมศึกษา
มหาวิทยาลัยบูรพา

040145625

29 พ.ค. 2560

370932

เริ่มบริการ

28 ส.ย. 2560

รายชื่อคณะผู้วิจัย

- | | |
|--|---------------------|
| 1. รองศาสตราจารย์ ดร. นุรักษ์ กฤษดาบุรุษย์ | ที่ปรึกษาโครงการ |
| 2. นายอภิวัฒน์ ห่อเพชร | หัวหน้าโครงการวิจัย |
| 3. นางสาวพรพรรณ วิชาลวรรณ | นักวิจัย |

บทคัดย่อ

จากการคัดเลือกเชื้อราที่มีความสามารถในการลดสีน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มดิบจำนวน 10 สายพันธุ์ พบว่าเชื้อราทุกสายพันธุ์สามารถเจริญได้ดีที่สุดที่ระดับความเจือจาง 1:3 และสามารถผลิตเอนไซม์แลคเคสได้ในอาหารคัดเลือก โดยเชื้อราสายพันธุ์ SU-4 มีขนาดโคโลนีใหญ่ที่สุด

เมื่อทดสอบที่สภาวะให้อากาศ พบว่า เชื้อราสายพันธุ์ SU-4 สามารถเจริญได้สูงสุด ผลิตเอนไซม์แลคเคสได้ 12.26 U/ml ลดปริมาณฟีนอลได้ 3.37 mg/l ลดค่าสีได้ 758.2 unit และลดค่าซีโอดีได้ 37.24% ในขณะที่สภาวะไม่ให้อากาศ เชื้อราสายพันธุ์ SU-4 สามารถเจริญได้สูงที่สุด ผลิตเอนไซม์แลคเคสได้ 11.96 U/ml ลดค่าสีได้ 911.02 unit และลดค่าซีโอดีได้ 40.39% แต่เชื้อราสายพันธุ์ SU-3 สามารถลดปริมาณฟีนอลได้สูงสุด (3.00 mg/l) โดยความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมเอนไซม์แลคเคสและความสามารถในการลดสีมีค่าเท่ากับ 0.78

ABSTRACT

Decolorization of palm oil mill effluent was studied to evaluate ten selective fungi from different areas in Nakorn Sri Thammarat, Suratthani and Chumporn, Thailand. All fungi were grown in selective media at a dilution rate of 1:1, 1:2 and 1:3. The biggest colonies was observed with fungi SU-4 at a dilution rate of 1:3.

To optimize the decolorization activities, aerobic and anaerobic treatment were compared. The highest aerobic decolorization activities was found in SU-4 with laccase activity of 12.26 U/ml, phenol reduction of 3.37 mg/l, color removal of 758.2 unit and COD removal of 37.24%. Under anaerobic conditions, the highest laccase activity (11.96 U/ml), color removal (911.02 unit) and COD removal (40.39%) were found in SU-4, however, phenol reduction was the highest in SU-3 (3.00 mg/l). Furthermore, the correlation between laccase activities and decolorization were determined to be 0.78

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ

รายชื่อคณะผู้วิจัย

บทคัดย่อ

1-2

สารบัญ

สารบัญตาราง

บทที่

1. บทนำ

ความเป็นมาของโครงการ

3 – 4

วัตถุประสงค์ของโครงการ

4

ขอบเขตการศึกษา

4

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

4

2. แนวคิด ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ทบทวนเอกสาร

6-12

3. วิธีการดำเนินการศึกษา

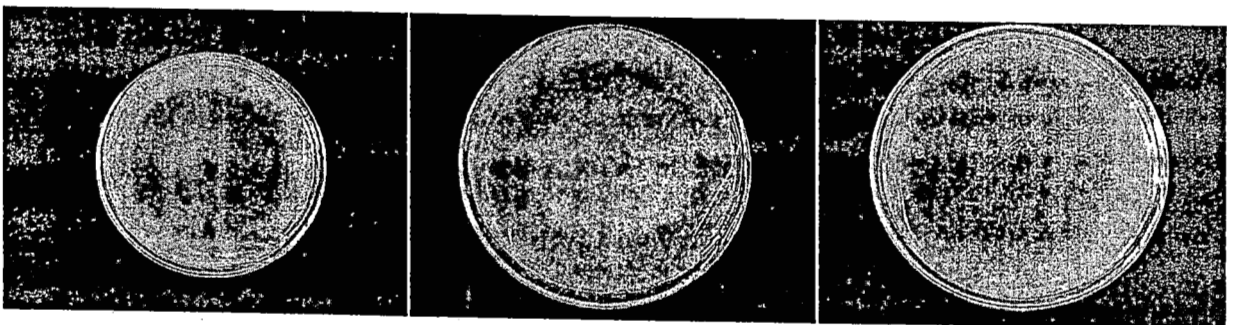
วิธีการทดลอง

14-15

สารบัญ(ต่อ)

บทที่	หน้า
4. ผลการทดลองและวิจารณ์	
ผลการทดลองและวิจารณ์	16 – 41
5. สรุปผลการทดลอง	
สรุปผลการทดลอง	42
6. ข้อเสนอแนะ	
ข้อเสนอแนะ	43
เอกสารอ้างอิง	44-51
ภาคผนวก	52-60

บทที่ 1



SU-1

SU-2

SU-3

การศึกษาการลดสีน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มด้วยวิธีทางชีวภาพ
(Study of biological decolorization of palm oil mill effluent)

บทที่ 1

1. บทนำ

อุตสาหกรรมสกัดน้ำมันปาล์มดิบจัดว่ามีความสำคัญต่อประเทศไทยเป็นอย่างมาก ข้อมูลปี 2550 จากกรมการค้าภายใน กระทรวงพาณิชย์ระบุจำนวนโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มภายในประเทศทั้งสิ้น 60 โรงงาน มีกำลังการผลิตรวม 2,319 ตันผลปาล์มสด/ชั่วโมง โดยจัดเป็นโรงงานขนาดใหญ่ได้มาตรฐานซึ่งกำลังการผลิตอยู่ในช่วง 45-60 ตันผลปาล์มสด/ชั่วโมงจำนวน 34 โรงงาน

โดยทั่วไปผลปาล์มสดเมื่อถูกนำเข้าสู่กระบวนการสกัดน้ำมัน จะก่อให้เกิดของเสียสองส่วนใหญ่ ๆ ได้แก่ส่วนของ solid waste ซึ่งเป็นองค์ประกอบต่าง ๆ ของผลและทะลายปาล์ม ส่วนนี้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ทางการเกษตรและทางด้านพลังงานได้ (Kittikun et al., 2000) ในขณะที่อีกส่วนจะเป็นส่วนของ liquid waste ซึ่งก็คือน้ำเสียที่เกิดจากขั้นตอนต่าง ๆ ในกระบวนการผลิต โดยจะมีประมาณ 2/3 ของน้ำมันปาล์มดิบที่สกัดได้ (Cheah 1988)

กระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มดิบเป็นกระบวนการที่อาศัยความร้อนในการสกัดน้ำมันออกจากผลปาล์มสด ดังนั้นน้ำจึงเป็นปัจจัยสำคัญในกระบวนการผลิต ซึ่งโดยทั่วไปกระบวนการสกัดผลปาล์มสด 1 ตัน จะก่อให้เกิดน้ำเสียราว 0.47-0.5 ลบ.ม./ตันผลปาล์มสด จากรายงานการผลิตโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม บริษัท ทักซิณปาล์ม (2521) จำกัด ปี 2549

➤ ปริมาณผลปาล์มสด	184,475	ตันผลปาล์มสด
➤ อัตราการเกิดน้ำเสีย	0.45	ลบ.ม./ตันผลปาล์มสด
➤ ปริมาณน้ำเสีย	83,014	ลบ.ม./ปี
➤ น้ำทิ้งจาก decanter		
(i) ค่า COD เฉลี่ย	103,067	มก./ล.
(ii) ค่า BOD เฉลี่ย	68,000	มก./ล.

น้ำเสียที่เกิดขึ้นนี้ หากไม่มีการบำบัดด้วยวิธีที่เหมาะสมก่อนปล่อยลงสู่แหล่งน้ำสาธารณะแล้ว อาจก่อให้เกิดปัญหามลภาวะทางน้ำตามมาได้ โดยการจัดการน้ำเสีย โรงงานบางแห่งแก้ปัญหาด้วยการนำน้ำเสียไปรดแปลงเพาะปลูกปาล์ม ซึ่งวิธีการดังกล่าวอาจก่อให้เกิดปัญหาความไม่สมดุลของธาตุแมกนีเซียมและโปแตสเซียมในดิน สำหรับโรงงานบริษัท ทักซิณปาล์ม (2521) จำกัด ซึ่งทางคณะวิจัยขอความอนุเคราะห์ตัวอย่างน้ำเสียมาใช้ในการศึกษานั้น บำบัดน้ำเสียด้วยระบบบ่อผึ่ง (stabilization ponds) โดยน้ำเสียที่ออกจาก

ระบบสกัดน้ำมันปาล์มถูกเก็บกักในบ่อดินที่เรียงต่อกันเป็นลำดับจำนวน 6 บ่อ โดยใช้เวลาเก็บกัก (retention time) ประมาณ 30-40 วัน ทำให้โรงงานต้องใช้พื้นที่ในการบำบัดค่อนข้างมาก อย่างไรก็ตาม น้ำเสียที่ผ่านการบำบัดด้วยวิธีดังกล่าวยังมีสมบัติไม่ดีพอที่จะปล่อยลงสู่แหล่งน้ำสาธารณะโดยตรงได้

ปัญหาหลักที่พบในน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดแล้ว ทั้งจากโรงงานบริษัททักษิณปาล์ม (2521) จำกัด และโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มดิบทั่ว ๆ ไป ประสบอยู่เป็นเวลานาน ได้แก่ปัญหาเรื่องสี โดยปัญหาดังกล่าวไม่ได้รับการศึกษาและแก้ไขอย่างจริงจัง โดยสีของน้ำเสียนั้น เมื่อปล่อยลงสู่แหล่งน้ำจะยังไม่ถูกย่อยได้ทันที แต่จะคงตัวอยู่เช่นนั้นระยะหนึ่ง ผลที่ตามมาคือสีน้ำเสียเหล่านั้นจะไปยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์แสงของสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในแหล่งน้ำ ทำให้ออกซิเจนในลำนน้ำลดลง และเป็นสาเหตุให้ปริมาณ K Fe Zn และ Mn ที่เจือปนในแหล่งน้ำเพิ่มสูงขึ้น เกิดสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการดำรงอยู่ของสิ่งมีชีวิต เมื่อระบบนิเวศเปลี่ยนแปลงไป แหล่งน้ำจึงเน่าเสียไม่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ อีกทั้งยังส่งผลกระทบต่อโดยตรงต่อมนุษย์ทั้งทางด้านสุขภาพและความปลอดภัย (Hammel 1989)

2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- 2.1 เพื่อศึกษาองค์ประกอบที่ก่อให้เกิดสีในน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม
- 2.2 เพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถลดสีน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มได้
- 2.3 เพื่อทดสอบสภาวะที่จุลินทรีย์สามารถลดสีน้ำเสียได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด

3. ขอบเขตในการวิจัย

เป็นการศึกษาองค์ประกอบที่ก่อให้เกิดสีในน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม และคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถลดสีน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ตลอดจนศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของจุลินทรีย์

4. ประโยชน์ที่จะได้รับจากการวิจัย

- 4.1 สามารถคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถลดสีน้ำเสียได้อย่างมีประสิทธิภาพ
- 4.2 สามารถนำผลที่ได้จากการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของจุลินทรีย์
- 4.3 เป็นแนวทางในการศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการลดสีน้ำเสียในระดับต่อไปได้

5. หน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

- 5.1 โรงงานอุตสาหกรรมสกัดน้ำมันปาล์ม
- 5.2 โรงงานอุตสาหกรรมที่มีกระบวนการผลิตใกล้เคียงกัน เช่น โรงงานกากน้ำตาล
- 5.3 กระทรวงอุตสาหกรรม
- 5.4 กระทรวงเกษตร
- 5.5 กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม
- 5.6 สำนักงานนโยบายและแผนทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม
- 5.7 กรมควบคุมมลพิษ
- 5.8 องค์การจัดการน้ำเสีย

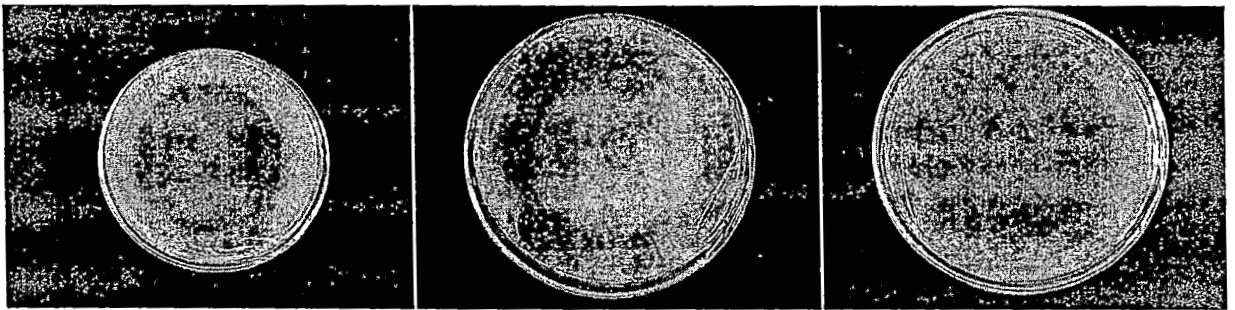
6. แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย

- 6.1 ถ่ายทอดข้อมูลผลการวิจัยสู่โรงงานอุตสาหกรรมเพื่อหาแนวทางร่วมในการแก้ปัญหาการลดสีน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม
- 6.2 ถ่ายทอดข้อมูลผลการวิจัยสู่โรงงานอุตสาหกรรมเพื่อประกอบการพิจารณาในการช่วยเหลือและสนับสนุนความร่วมมือในการวิจัยระดับอุตสาหกรรม
- 6.3 ถ่ายทอดข้อมูลผลการวิจัยสู่โครงการวิจัย การลดสีน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมสกัดน้ำมันปาล์มและอุตสาหกรรมอื่นที่มีกระบวนการผลิตที่อาศัยความร้อน เช่น โรงงานอุตสาหกรรมกากน้ำตาล เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการวิจัย
- 6.4 เผยแพร่ผลงานในวารสารวิชาการนานาชาติ

7. สถานที่ทำการทดลองและเก็บข้อมูล

- 7.1 ห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ชีวภาพ มหาวิทยาลัยบูรพา จ. ชลบุรี
- 7.2 บริษัท ทักษิณปาล์ม (2521) จำกัด จ.สุราษฎร์ธานี

บทที่ 2



SU-1

SU-2

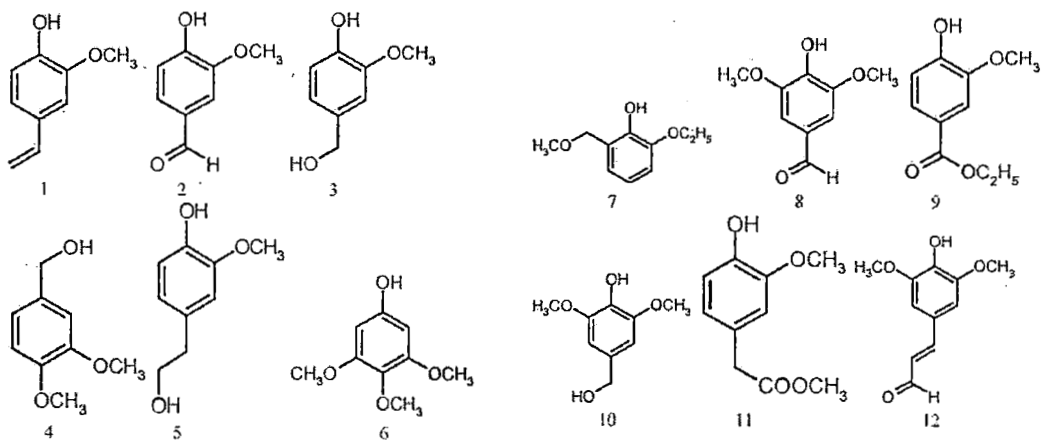
SU-3

การศึกษาการลดสีน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มด้วยวิธีทางชีวภาพ
(Study of biological decolorization of palm oil mill effluent)

บทที่ 2

บททวนเอกสาร

โดยทั่วไป สีของน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มดิบเกิดจากองค์ประกอบของสารฟีนอลิกที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการผลิต (Agustin *et al.*, 2008) สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารที่พบทั่วไปในอุตสาหกรรมการเกษตร เช่น ยาฆ่าแมลง น้ำยาเคลือบไม้ และของเสียจากอุตสาหกรรมผลิตกระดาษ ตลอดจนอุตสาหกรรมปิโตรเคมีและสีย้อม (Duran and Esposito, 2000, Hardin *et al.*, 2000) จากการศึกษาของ Nang และคณะ (2007) ซึ่งทำการศึกษารายการประกอบของฟีนอลิกที่ตรวจพบในเส้นปาล์มด้วยวิธีการสกัดแบบ supercritical carbon dioxide (SC-CO₂) แสดงดังภาพ 2.1



ภาพที่ 2.1 สารฟีนอลิกที่ละลายน้ำได้พบในเส้นปาล์ม
ที่มา : Nang และคณะ (2007)

ความเข้มข้นของน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มขึ้นกับอายุ ชนิดของวัตถุดิบ และเทคโนโลยีที่เลือกใช้ในกระบวนการสกัดน้ำมัน ตารางที่ 2.1 แสดงความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกชนิดต่างๆ ในผลปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis*)

ตารางที่ 2.1 ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกต่างๆ ที่พบในผลปาล์มสด

สารประกอบ	ค่าที่วิเคราะห์ได้
Total Phenolic Content (TPC)	5.64-83.97 g L ⁻¹ gallic acid equivalent (GAE)
Total Flavonoid Content (TFC)	0.31-7.53 g L ⁻¹ catechin equivalent
o-Diphenols Index	4.90-93.20 g L ⁻¹ gallic acid equivalent (GAE)
Hydroxycinnamic Acid Index	23.74-77.46 g L ⁻¹ ferulic acid equivalent
Flavonols Index	3.62-95.33 g L ⁻¹ rutin equivalent
Phenol Index	15.90-247.22 g L ⁻¹ gallic acid equivalent (GAE)

ที่มา : Yun Ping et al. (2008)

กระบวนการลดสีน้ำเสียส่วนใหญ่อาศัยวิธีทางเคมีและทางฟิสิกส์ เช่น การใช้สารประกอบคลอรีนหรือถ่านกัมมันต์ และการตกตะกอน (Gomez-Millan *et al.*, 1983, Brenes & Carrido 1988, Brenes *et al.*, 1990) แต่เนื่องจากน้ำเสียจากโรงงานน้ำมันปาล์มดิบมีองค์ประกอบเป็นสารแขวนลอยอยู่ค่อนข้างมาก งานวิจัยส่วนใหญ่จึงพยายามศึกษาการตกตะกอนเพื่อลดสีและสารปนเปื้อนอื่นที่เจือปนอยู่ เช่น การกรองด้วยเมมเบรน (Admad *et al.*, 2003) การใช้สารตกตะกอนชีวภาพ *Moringa oleifera* (Bhatia *et al.*, 2006) และการตกตะกอนด้วยวิธี electrocoagulation โดยจากการศึกษาของ Agustin และคณะ (2008) ซึ่งทำการศึกษาการลดสีน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มดิบในระดับห้องปฏิบัติการโดยใช้อลูมิเนียมเป็นอิเล็กโทรด (electrode) และโซเดียมคลอไรด์เป็นสารอิเล็กโทรไลต์ (electrolyte) พบว่า วิธีดังกล่าวสามารถกำจัดความขุ่น ความเป็นกรด ค่าความสกปรกในรูปซีไอดีและบีไอดี สารประกอบฟีนอลิกตลอดจนสารโลหะหนัก (heavy metal) ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่พบในน้ำเสียได้ อย่างไรก็ตามวิธีการดังกล่าวยังต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเรื่องการจัดตะกอนที่เกิดขึ้นและประสิทธิภาพการนำไปใช้ระดับอุตสาหกรรม

สำหรับการลดสีด้วยวิธีทางชีวภาพซึ่งเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยลดปัญหาการตกค้างของสารเคมีในน้ำเสียลงได้ โดยจากรายงานที่ผ่านมาพบว่าการลดสีน้ำเสียด้วยวิธีทางชีวภาพทำได้โดยอาศัยการทำงานของจุลินทรีย์ทั้งในกลุ่มที่ใช้อากาศและไม่ใช้อากาศ ในจุลินทรีย์กลุ่มที่ไม่ใช้อากาศ ส่วนใหญ่เป็นพวกแบคทีเรีย เช่น *Bacillus sp.* (Kambe *et al.*, 1998) *Pseudomonas sp.* (Zimmerman *et al.*, 1982)

จุลินทรีย์กลุ่มที่ใช้อากาศ ส่วนใหญ่เป็นพวกเชื้อรา เช่น *Phanerochaetes chrysosporium* (Shahvali *et al.*, 2000, Paszcaynski *et al.*, 1991) *Aspergillus niger* (Moayedhi & Mazaheri 1998) *Coriolus hirsutus* (Miyata *et al.*, 1999) *Rhizopus oryzae*

(Nagarathnamma & Bajpai 1999) *Pycnoporus cinnabarinus* (Schliephake et al., 1993) *Pleurotus* sp. (Sannia et al., 1991) *Trametes versicolor* (Swanmy and Ramsy 1999) และ *Bjerkandera adusta* (Heinfling et al., 1998)

จากรายงานของ Cropps และคณะ (1990) พบว่ากระบวนการลดสีน้ำเสียด้วยวิธีทางชีวภาพแบ่งได้ 2 ประเภท คือ การดูดซับ (adsorption) และการย่อย (biodegradation) โดยเชื้อรา

ในกลไกการดูดซับพบว่าเชื้อราสามารถลดสีน้ำเสียจากโรงงานสิ่งทอได้ถึง 70 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลาไม่กี่ชั่วโมง (Chao and Lee 1994) สำหรับการลดสีน้ำเสียโดยกระบวนการย่อยของเชื้อราเกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์เป็นหลัก โดยเฉพาะอย่างยิ่ง เอนไซม์แลคเคส (Laccase) EC 1.10.3.2; benzonediol:oxygen oxidoreductase จัดเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม blue copper containing enzyme ซึ่งมีการนำมาใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลาย พบได้ทั่วไปในพืชและเชื้อราหลากหลายสายพันธุ์ (Leontievsky et al., 1997)

โดยเอนไซม์แลคเคสจากจุลินทรีย์ในกลุ่มเชื้อราขาว (white rot fungi) จัดเป็นกลุ่มที่มีการศึกษาการนำมาใช้ประโยชน์ทางด้านลดสีน้ำเสียกันอย่างกว้างขวาง จากรายงานของ Pointing และ Vrijmoed (2000) พบว่าเชื้อราสายพันธุ์ *Pycnoporus sanguineus* สามารถผลิตเอนไซม์แลคเคสซึ่งเป็นเอนไซม์หลักที่เกี่ยวข้องในกระบวนการย่อยลิกนิน และมีความสามารถในการลดความเข้มข้นของสีย้อมผ้าได้อย่างมีประสิทธิภาพ

เอนไซม์แลคเคสสามารถออกซิไดซ์สารประกอบในกลุ่ม *ortho*-, *para*-, *diphenol* และสารประกอบอะโรมาติกที่มีหมู่ไฮดรอกซิลและเอมีนได้ โดยคุณสมบัติของเอนไซม์แลคเคสที่คัดเลือกจากจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์จะมีความแตกต่างกันไปดังตาราง 2.2

นอกจากสามารถย่อยลิกนินแล้ว เอนไซม์แลคเคสยังสามารถทำงานได้หลากหลายหน้าที่เช่น มีส่วนเกี่ยวข้องในกระบวนการสร้างสารสีในเชื้อรา (pigmentation) (Clutterbuck, 1990) และการย่อยสารประกอบอะโรมาติก (Xiao et al., 2003)

ตารางที่ 2.2 คุณสมบัติของเอนไซม์แลคเคสจากจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆ

Organism	Number of isozymes	M _r (Da)	Reference
Podospora anserina	3	70 000 80 000 390 000	Thurston, 1994
Neurospora crassa	1	65 000	Germann <i>et al.</i> , 1988
Agaricus bisporus	2	100 000 65 000	Perry <i>et al.</i> , 1993b
Botrytis cinerea	2	72 000 72 000	Thurston, 1994
Phlebia radiata	1	64 000	Saloheimo <i>et al.</i> , 1991
Armillaria mellea	1	80 000	Curir <i>et al.</i> , 1997
Monocillium indicum	1	72 00	Thakker <i>et al.</i> , 1992
Pleurotus ostreatus	2	54 000 59 000 57 000	Palmieri <i>et al.</i> , 1997;
Phanerochaete flavido-albans	1	94 000	Perez <i>et al.</i> , 1996
Rhizoctonia solani	4	50 000 to 100 000	Wahleitner <i>et al.</i> , 1996
Pleurotus ostreatus RK 36	1	67 000	Giardina <i>et al.</i> , 1999
Ceriporiopsis subvermispora	2	71 000 68 000	Fukushima and Kirk, 1995
Pycnoporus cinnabarinus (a)	1	81 000	Eggert <i>et al.</i> , 1996
Coriolus hirsutus	1	80 000	Shin and Kim, 1998
Pycnoporus cinnabarinus (b)	1	63 000	Schliephake <i>et al.</i> , 2000
Trametes villosa	1	63 000	Yaver <i>et al.</i> , 1996
Trichoderma	1	71 000	Assavanig <i>et al.</i> , 1992
Marasmius quercophilus	2	61 000	Farnet <i>et al.</i> , 2000

เอนไซม์แลคเคสเป็นโปรตีนที่หลั่งออกมานอกเซลล์ (extracellular glycol-proteins) ซึ่งเป็นแบบ multinuclear มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ที่ 60-80 kDa (Heinzkill et al., 1998) โดยโมเลกุลของเอนไซม์ประกอบด้วยทองแดง (Cu) 4 อะตอม จัดประเภทด้วยหลักการ UV/visible และ paramagnetic resonance (ERP) spectroscopy (Leontiersky et al., 1997) ได้เป็น 3 กลุ่มดังนี้

1) Type I (T1)

มีสีฟ้าเข้ม ตรวจพบได้ด้วยความยาวคลื่น 600 nm และสามารถตรวจพบได้ด้วยวิธี ERP

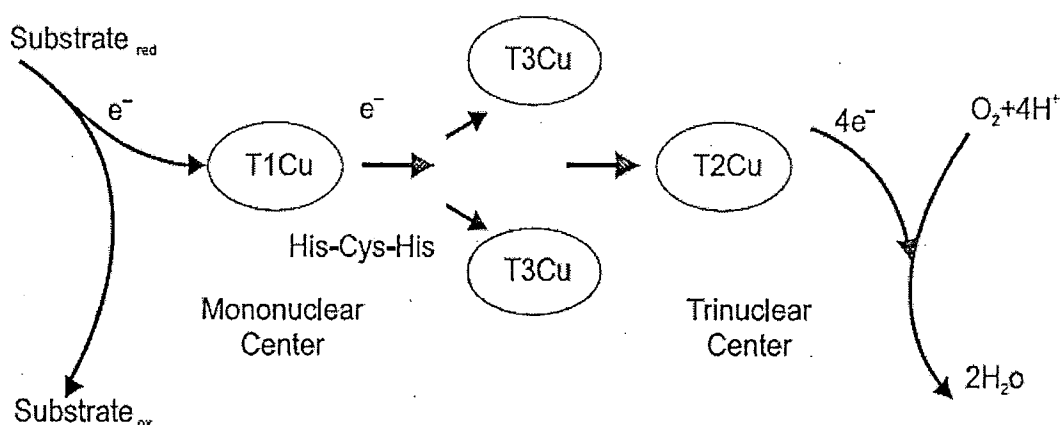
2) Type II (T2)

ไม่มีสีและตรวจพบได้ด้วยวิธี ERP

3) Type III (T3)

ประกอบด้วยทองแดงอะตอมคู่ ดูดกลืนแสงได้ด้วยความยาวคลื่นใกล้ช่วงแสง UV แต่ไม่สามารถตรวจพบได้ด้วยวิธี ERP

ทองแดงที่ประกอบอยู่ใน T2 และ T3 อยู่ค่อนข้างใกล้กัน โดยจะประกอบขึ้นเป็น trinuclear centre ซึ่งจะทำหน้าที่หลักในการเร่งกระบวนการย่อยลิแกนด์ (ภาพที่ 2.2)

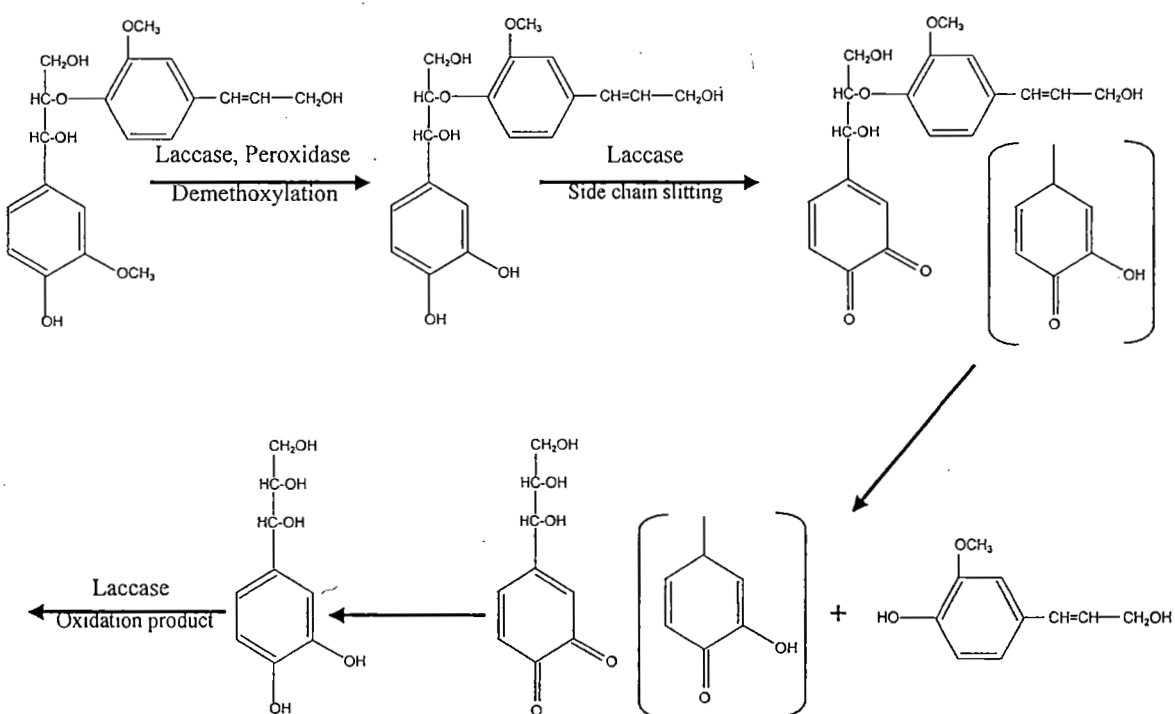


ภาพที่ 2.2 กลไกการทำงานของเอนไซม์แลคเคส

ที่มา : Kluczek-Turpeinen (2007)

เชื้อราขาวจะสร้างเอนไซม์ขึ้นในกระบวนการเมทาบอลิซึมขั้นทุติยภูมิ (secondary metabolism) ในสภาพที่พบทั่วไปในธรรมชาติและที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ปัจจัยหลักที่มีผลต่อการสร้างเอนไซม์ เช่น พีเอช อุณหภูมิ แหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน แม้ว่าเอนไซม์จะถูกผลิตขึ้นในขั้น stationary phase แต่ปัจจัยข้างต้นก็ยังส่งผลเชื้อราในการสร้างเอนไซม์

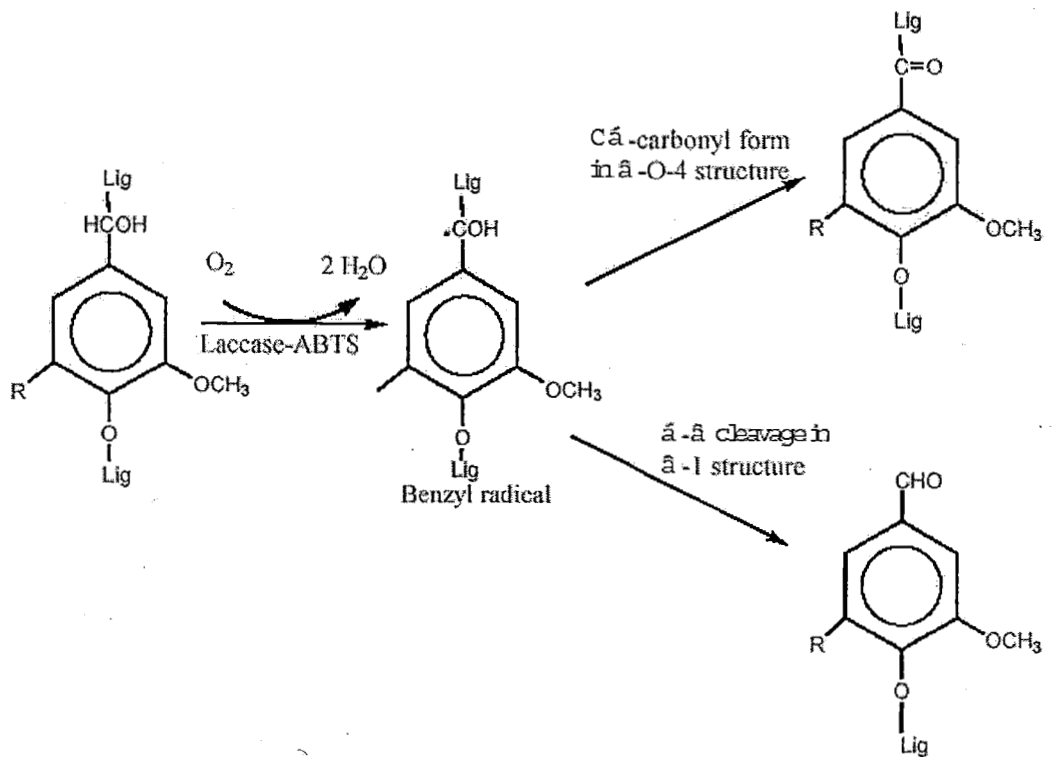
เอนไซม์แลคเคสสามารถเร่งกระบวนการออกซิเดชันสารประกอบฟีนอลิกและสารประกอบที่ไม่ใช่ฟีนอลิก (nonphenolic compound) ด้วยออกซิเจน (Miyata *et al.*, 1999) เอนไซม์จะทำหน้าที่แยกโมเลกุลของฟีนอลซึ่งเป็นองค์ประกอบของลิกนิน ปฏิกริยา oxidation นี้ทำให้เกิดอนุมูลอิสระ (free radical) และ quinone จากการศึกษานของ Ohkuma และคณะ (2001) พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสที่พบในเชื้อรา *Elfvigia applanat* มีค่า $0.09 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ ml}^{-1}$



ภาพที่ 2.3 กลไกการสลายสารประกอบฟีนอลโดยเชื้อรา

ที่มา : ดัดแปลงจาก Trojanowski (2001)

ในกลไกการย่อยลิกนินซึ่งมีไม่มีฟีนอลเป็นองค์ประกอบ (non-phenolic lignin) pigment ในเชื้อราจะทำหน้าที่ในขั้นตอน morphogenesis และการเปลี่ยนไปเป็นโครงสร้างส่วนต่างๆ (differentiation) ใน basidiomycetes โดยเชื้อราจะสร้าง pigment ขึ้นใน mycelia และ fruiting bodies ทำให้เกิดแรงยึดติดระหว่างเซลล์ต่อเซลล์ (cell-cell adhesion) ช่วยทำให้เกิดการสร้าง rhizomorphs และเกิดการสร้าง polyphenolic glue ซึ่งจะทำให้ hyphae ยึดติดกันได้



ภาพที่ 2.4 กลไกการสลายลิกนินที่ไม่มีองค์ประกอบของฟีนอลโดยเชื้อรา

ที่มา : ดัดแปลงจาก Archibald *et al.* (1997)

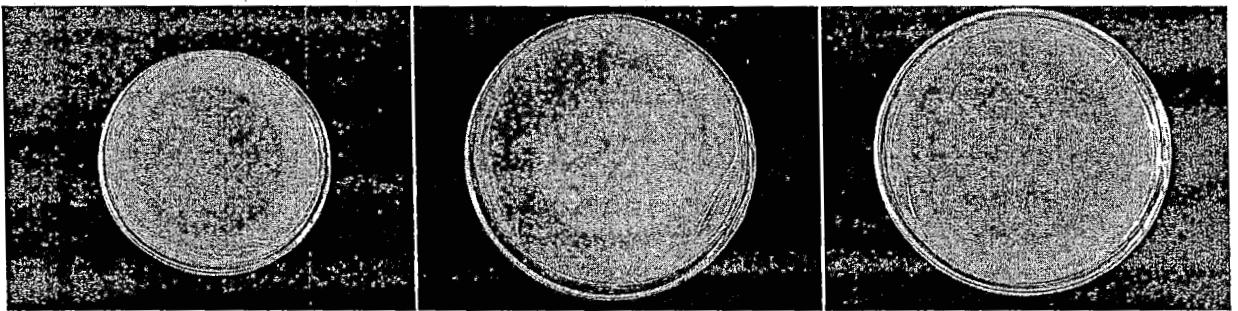
จากรายงานของ Paice และคณะ (1995) เอนไซม์แลคสามารถนำไปใช้ฟอกขาวเยื่อกระดาษได้ค่อนข้างดี โดยใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาน้อย แต่อย่างไรก็ตาม ยังต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงสภาวะที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการนำไปใช้งานในระดับอุตสาหกรรม

ด้วยการทำงานของเอนไซม์ทำให้เชื้อราต่าง ๆ ข้างต้นสามารถย่อยองค์ประกอบที่อยู่ในน้ำเสีย เช่น สารอินทรีย์ และสารประกอบที่ก่อให้เกิดสีได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ยังสามารถนำเชื้อราเหล่านี้ไปใช้ประโยชน์ในการบำบัดน้ำเสียเพื่อ

ลดองค์ประกอบที่มีพิษได้ เช่น สารประกอบไฮโดรคาร์บอน ยาฆ่าแมลง และสีย้อมผ้า เป็นต้น (Hammel 1989)

จากที่กล่าวมาข้างต้น จะเห็นได้ว่าหากมีการศึกษาปัญหาของน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มอย่างจริงจัง นอกจากจะเป็นการช่วยลดปัญหาของโรงงานประการหนึ่งแล้ว ยังเป็นการช่วยลดปัญหามลภาวะทางสิ่งแวดล้อมได้อีกประการ

บทที่ 3



SU-1

SU-2

SU-3

การศึกษาการลดสีน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มด้วยวิธีทางชีวภาพ

(Study of biological decolorization of palm oil mill effluent)

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

1. ศึกษาองค์ประกอบน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

ตัวอย่างน้ำเสียจากบ่อบำบัดแบบเปิด (open pond system) ได้รับความอนุเคราะห์จากโรงงานบริษัท ทักษิณปาล์ม (2521) จำกัด จังหวัดสุราษฎร์ธานี โดยเก็บตัวอย่างน้ำเสียจากบ่อสุดท้าย วิเคราะห์คุณลักษณะน้ำเสียตามพารามิเตอร์ต่าง ๆ ดังนี้

1.1 pH

- วิเคราะห์ด้วยเครื่อง pH meter

1.2 Chemical oxygen demand (COD)

- วิเคราะห์ด้วยวิธี Dichromate oxidation แบบ open reflux

1.3 Biological oxygen demand (BOD)

- วิเคราะห์ด้วยวิธี Azide modification of Winkler Method

1.4 Total Kjeldahl nitrogen (TKN)

- วิเคราะห์ด้วยวิธี Kjeldahl nitrogen

1.5 Oil & grease

- วิเคราะห์ด้วยเครื่อง Soxhlet

1.6 สี

- วิเคราะห์ด้วยเครื่อง Spectrophotometer โดยวิธีแพลทตินัม-โคบอลท์ (Livernoche et al., 1983)

2. คัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถลดสีน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

สุ่มเก็บตัวอย่างเชื้อราที่ได้จากบริเวณต่าง ๆ ในจังหวัดสุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช และชุมพร นำตัวอย่างที่ได้เพาะลงอาหาร PDA จากนั้นกระตุ้นเชื้อเริ่มต้นโดยการถ่ายเส้นใยเห็ดแต่ละชนิดลงบนจานอาหาร PDA บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) ตัดเส้นใยเห็ดที่เจริญบนอาหารอายุ 5 วัน บริเวณขอบโคโลนี ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 ซม. วางเลี้ยงบนอาหารแข็งที่มีตัวอย่างน้ำเสียที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 1:0 1:1 1:2 และ 1:3 โดยเติมผงวุ้น 1.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

สังเกตและบันทึกการเจริญของเส้นใยและสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ คัดเลือกเชื้อราที่มีความสามารถในการเจริญและกำจัดสีได้ที่มีความเข้มข้นของน้ำเสียต่ำสุด

3. ทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์แลคเคส

นำจุลินทรีย์ที่ได้จากการคัดเลือกในข้อ 2 เพาะลงอาหาร PDA จากนั้นกระตุ้นเชื้อเริ่มต้นโดยการถ่ายเส้นใยเห็ดแต่ละชนิดลงบนจานอาหาร PDA บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) ตัดเส้นใยเห็ดที่เจริญบนอาหารอายุ 5 วัน บริเวณขอบโคโลนี ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 ซม. วางเลี้ยงบนอาหารแข็งที่เติม ABTS 0.03 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

สังเกตและบันทึกการเจริญของเส้นใยและสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ คัดเลือกเชื้อราที่มีความสามารถในการเจริญและผลิตเอนไซม์แลคเคส

4. ทดสอบสภาวะที่เชื้อราความสามารถเจริญและกำจัดสีสูงสุด

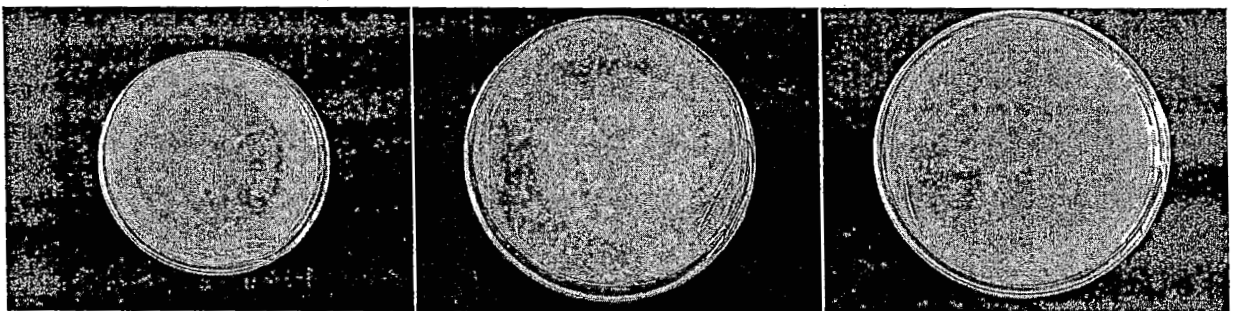
4.1 สภาวะให้อากาศ

นำเชื้อที่คัดเลือกได้เพาะลงอาหารเหลวที่ความเข้มข้นน้ำเสียระดับต่างๆ ได้แก่ 1:1 1:2 และ 1:3 ทดสอบที่สภาวะให้อากาศ (เขย่า 200 รอบต่อนาที) เป็นเวลา 12 วัน สังเกตการเจริญและบันทึกระยะเวลาที่เริ่มมีเส้นใยปรากฏ ที่เวลาบ่มต่าง ๆ นำตัวอย่างน้ำหมักวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แลคเคส pH color COD และ total phenol เปรียบเทียบผลที่ได้เพื่อเลือกระดับความเข้มข้นของน้ำเสียที่เชื้อสามารถเจริญได้โดยเปรียบเทียบกับเชื้อ *P. Chrysosporium*

4.2 สภาวะไม่ให้อากาศ

นำเชื้อที่คัดเลือกได้เพาะลงอาหารเหลวที่ความเข้มข้นน้ำเสียระดับต่างๆ ได้แก่ 1:1 1:2 และ 1:3 ทดสอบที่สภาวะไม่ให้อากาศ เป็นเวลา 12 วัน สังเกตการเจริญและบันทึกระยะเวลาที่เริ่มมีเส้นใยปรากฏ ที่เวลาบ่มต่าง ๆ นำตัวอย่างน้ำหมักวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แลคเคส pH color COD และ total phenol เปรียบเทียบผลที่ได้เพื่อเลือกระดับความเข้มข้นของน้ำเสียที่เชื้อสามารถเจริญได้โดยเปรียบเทียบกับเชื้อ *P. chrysosporium*

บทที่ 4



SU-1

SU-2

SU-3

การศึกษาการลดสีน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มด้วยวิธีทางชีวภาพ

(Study of biological decolorization of palm oil mill effluent)

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ศึกษาองค์ประกอบน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

จากการวิเคราะห์น้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มดิบจะเห็นว่าสีน้ำตาลเข้มที่สังเกตเห็นเกิดจากองค์ประกอบของสารฟีนอลิก โดยจากการทดสอบเบื้องต้นด้วยวิธี FeCl_3 ได้ผลเป็นบวก และเมื่อนำมาวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลพบว่ามีค่า 12 มก./ล. ผลวิเคราะห์พารามิเตอร์ต่างๆ ของน้ำเสีย แสดงดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 คุณลักษณะน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

พารามิเตอร์	ค่าที่วิเคราะห์ได้*
pH	7.4
Appear color	Dark-brown
Color (OD_{475})	1,400
Total phenol (มก./ล.)	12
COD (มก./ล.)	8,100
TVFA (มก./ล.)	420
ของแข็งทั้งหมด (มก./ล.)	6,780
ของแข็งแขวนลอย (มก./ล.)	4,390
Kjeldahl nitrogen (มก./ล.)	2,200
P (มก./ล.)	90
Cu (มก./ล.)	0.2
Fe (มก./ล.)	12
Mn (มก./ล.)	1.2

*ค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวน 3 ซ้ำ

2.คัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถลดสีน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

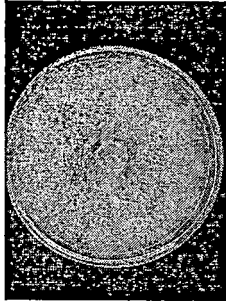
เมื่อใช้น้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ระดับความเจือจาง 1:1 1:2 และ 1:3 วางเลี้ยงเส้นใยเชื้อราบนอาหารแข็งและปมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน พบว่า ที่ระดับความเจือจาง 1:1 เชื้อราทุกสายพันธุ์สามารถเจริญได้โดยมีขนาดโคโลนีอยู่ในช่วง 2.3-4.2 เซนติเมตร ส่วนที่ระดับความเจือจาง 1:2 เชื้อราทุกสายพันธุ์สามารถเจริญได้โดยมีขนาดโคโลนีอยู่ในช่วง 2.9-5.3 เซนติเมตร และที่ระดับความเจือจาง 1:3 เชื้อราทุกสายพันธุ์สามารถเจริญได้โดยมีขนาดโคโลนีอยู่ในช่วง 3.4-6.3 เซนติเมตร (ตารางที่ 4.2 และภาพที่ 4.1-4.4)

ตารางที่ 4.2 ผลการจัดเลือกเชื้อราที่มีความสามารถในการเจริญและกำจัดสื่อน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มบนอาหารแห้งที่ความเข้มข้น
น้ำเสียระดับต่างๆ โดยไม่ที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

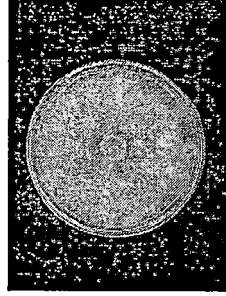
Dilution rate	1:0			1:1			1:2			1:3		
	ขนาด โคโลนี	Mycelia density	กำจัด สี	ขนาด โคโลนี	Mycelia density	กำจัด สี	ขนาด โคโลนี	Mycelia density	กำจัด สี	ขนาด โคโลนี	Mycelia density	กำจัด สี
CH-1	3.2	4	-	4.1	3	-	5.1	2	-	6.0	1	-
CH-2	3.0	4	-	3.9	3	-	4.2	2	-	5.5	1	+
NA-1	2.5	4	-	3.0	3	-	3.7	2	-	4.3	1	-
NA-2	2.0	4	-	2.3	3	-	2.9	2	-	3.4	1	-
NA-3	2.9	4	-	3.2	3	-	3.9	2	+	4.7	1	+
NA-4	3.2	4	-	4.2	3	+	5.3	2	+	6.3	1	+
SU-1	3.5	4	-	3.7	3	-	4.3	2	-	5.0	1	-
SU-2	3.0	4	-	3.5	3	-	4.2	2	-	5.0	1	+
SU-3	2.7	4	-	3.2	3	-	4.3	2	-	5.3	1	-
SU-4	2.0	4	-	2.4	3	-	3.0	2	-	3.7	1	-

* ค่าที่แสดง : (+)-ผลเป็นบวก (-)-ผลเป็นลบ (1-4)- ระดับความหนาแน่นของน้ำเสีย

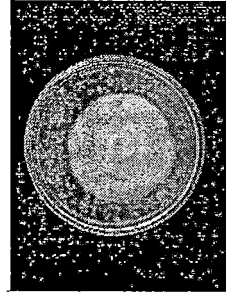
**ทดสอบจากตัวอย่างจำนวน 5 ซ้ำ



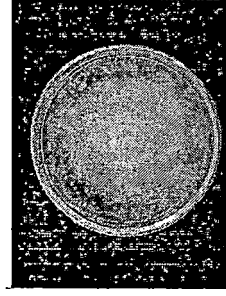
CH-1



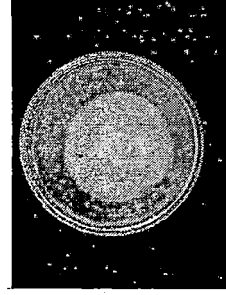
CH-2



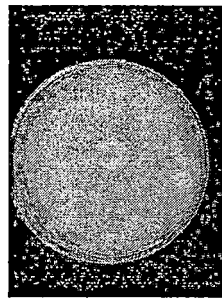
NA-1



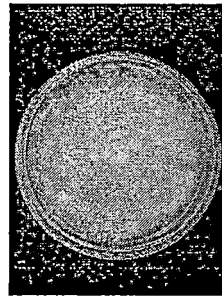
NA-2



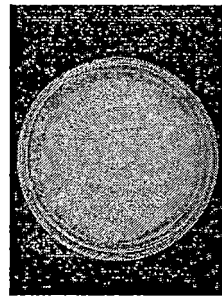
NA-3



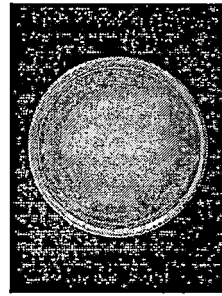
NA-4



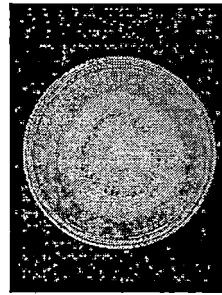
SU-1



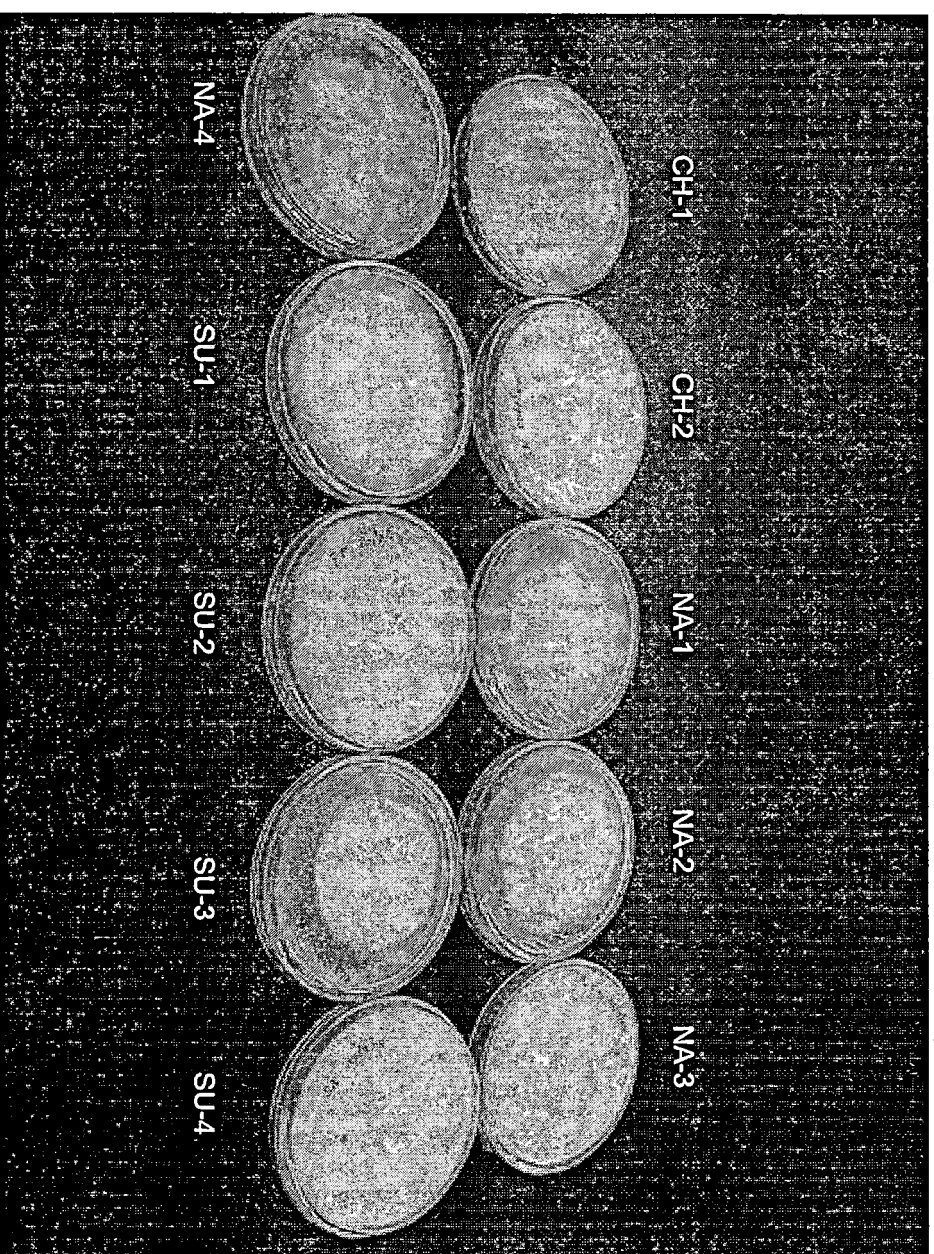
SU-2



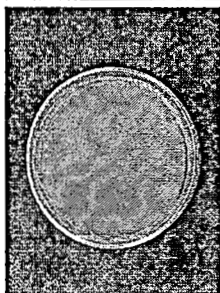
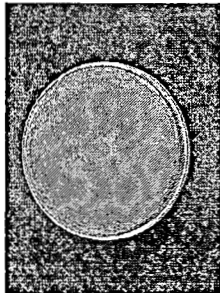
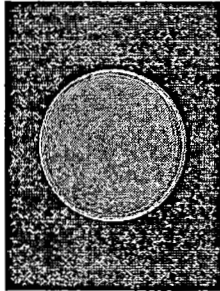
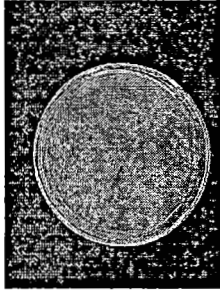
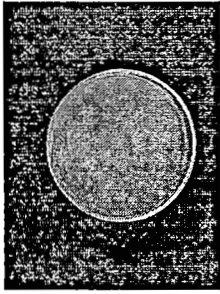
SU-3



SU-4



ภาพที่ 4.1 การเจริญของจุลินทรีย์ในอาหาร PDA



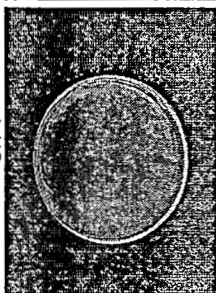
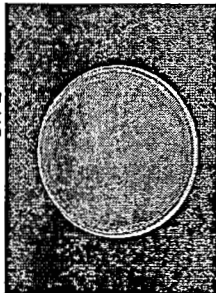
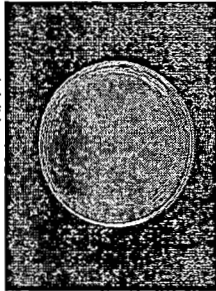
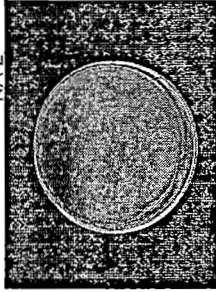
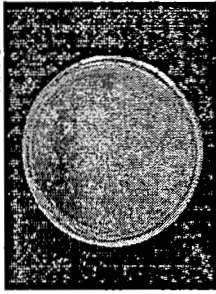
NA-3

NA-2

NA-1

CH-2

CH-1



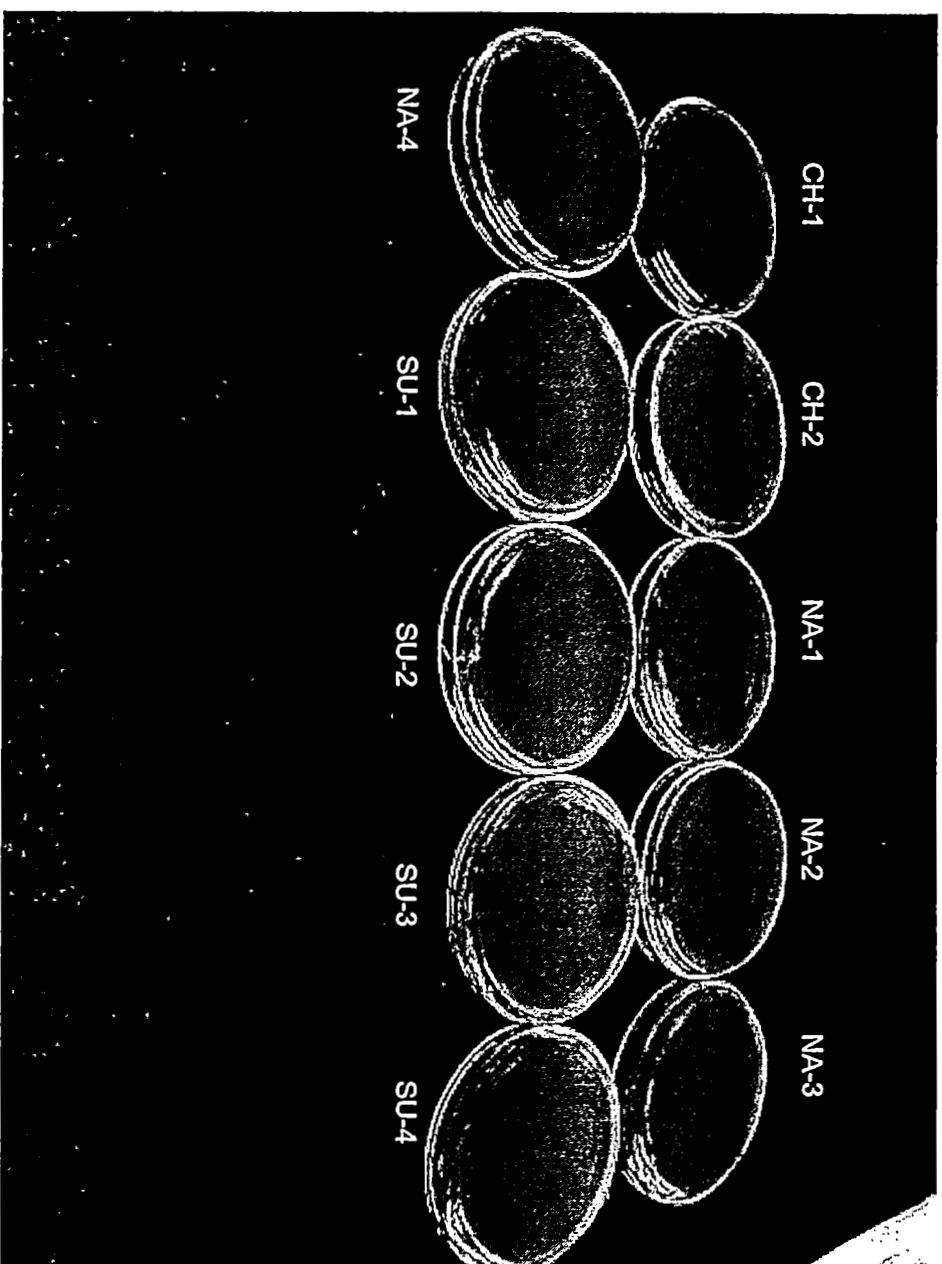
SU-4

SU-3

SU-2

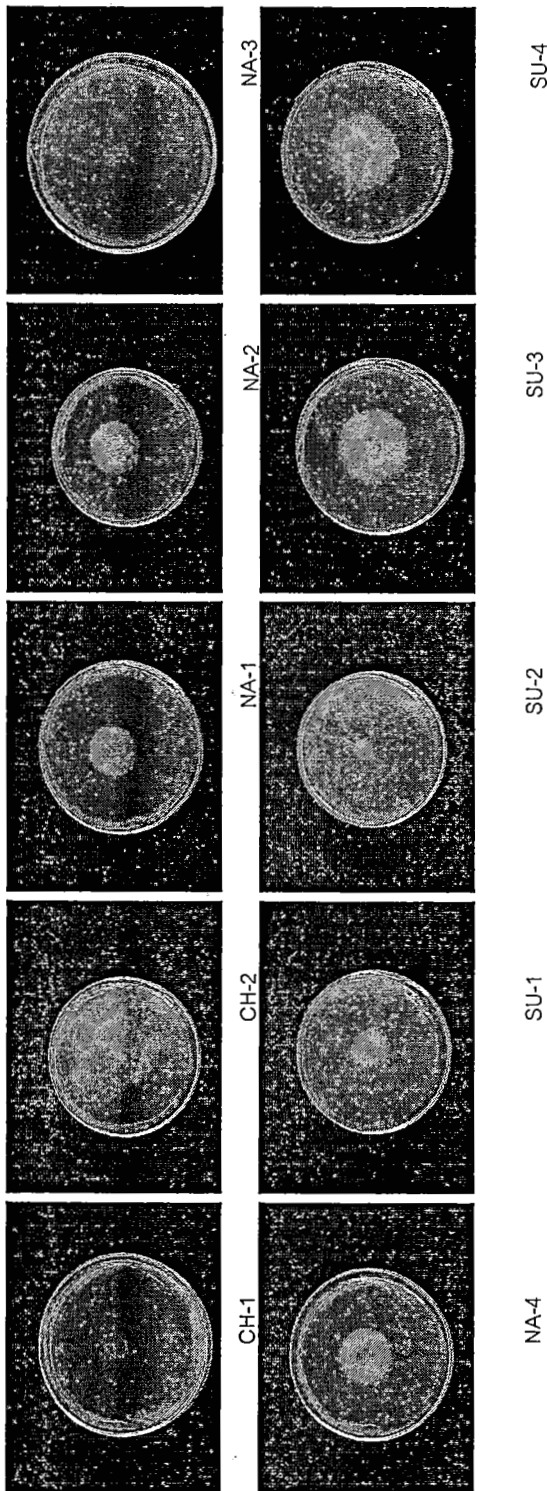
SU-1

NA-4



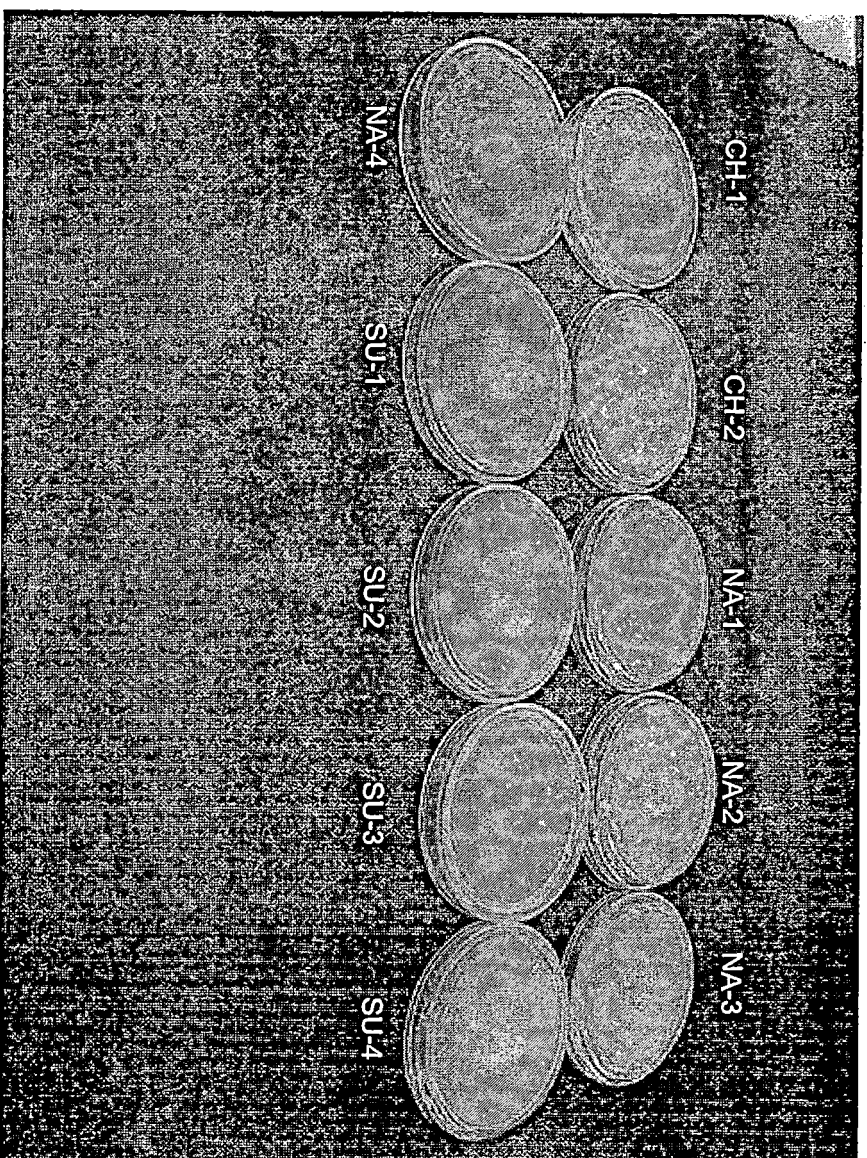
ภาพที่ 4.2 การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถลดสีน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ที่ความเข้มข้น 1:1

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
 ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 2013

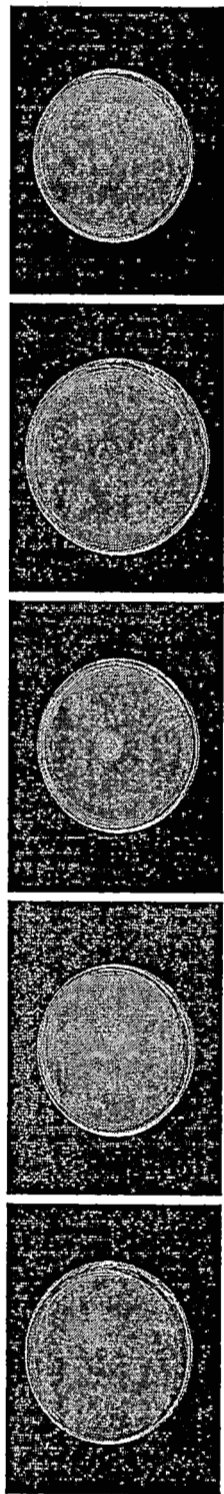


370932

628.35
 02667
 8.4



ภาพที่ 4.3 การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ที่ความเข้มข้น 1:2



CH-1

CH-2

NA-1

NA-2

NA-3



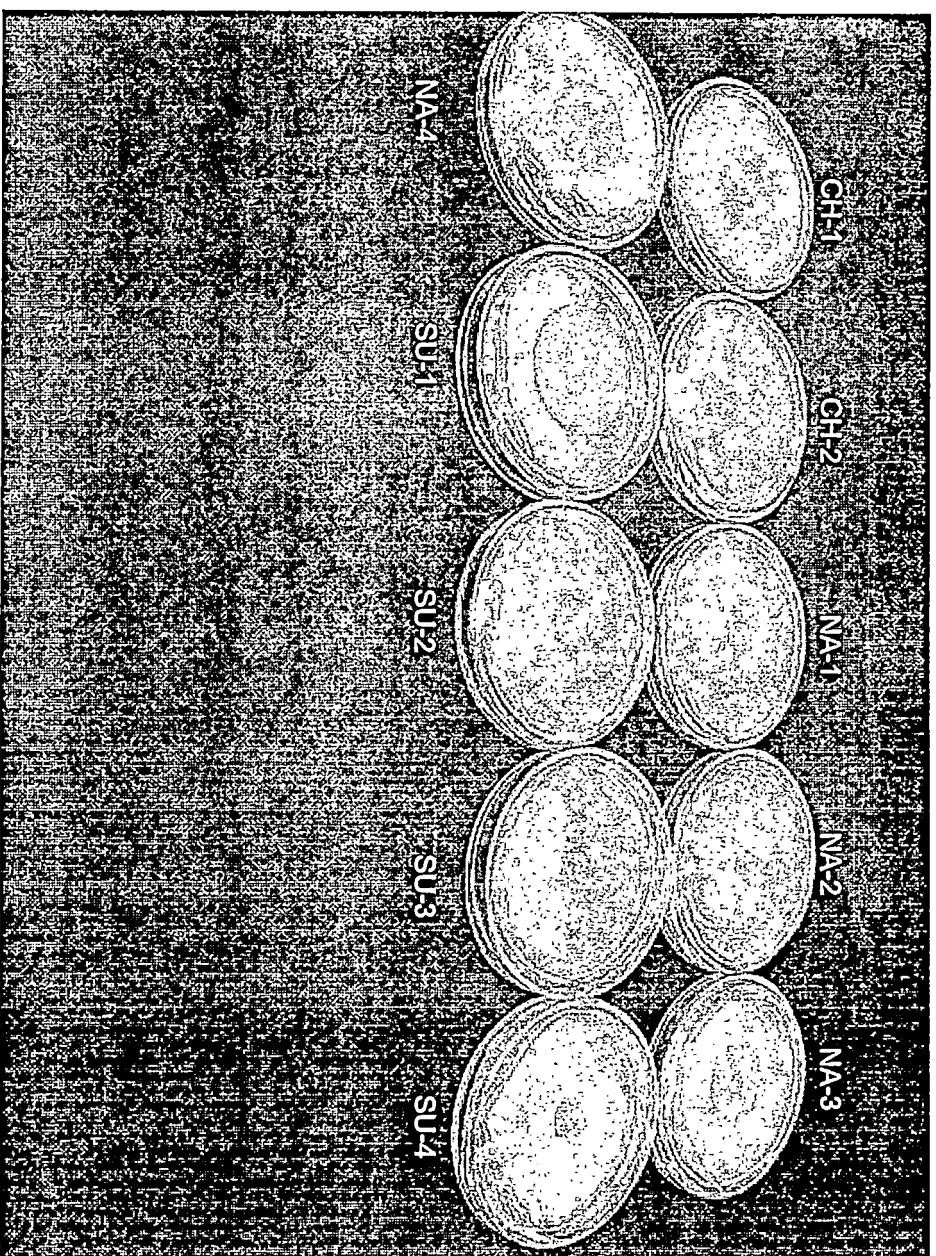
NA-4

SU-1

SU-2

SU-3

SU-4



ภาพที่ 4.4 การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถลดสีน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ที่ความเข้มข้น 1:3

3. ทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์แลคเคส

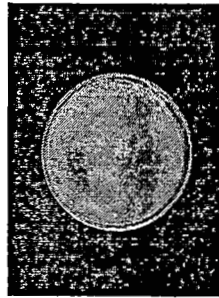
เมื่อใช้อาหาร PDA และเติม ABTS วางเลี้ยงเส้นใยเชื้อราบนอาหารแข็งและบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน พบว่า เชื้อราทุกสายพันธุ์สามารถเจริญได้ และเปลี่ยนอาหารเป็นสีเข้ม (ภาพที่ 4.5) แสดงให้เห็นว่าเชื้อราทุกสายพันธุ์สามารถผลิตเอนไซม์แลคเคสได้ โดยเชื้อราสายพันธุ์ SU-4 มีขนาดโคโลนีใหญ่ที่สุด เท่ากับ 7.6 เซนติเมตร (ตารางที่ 4.3)

ตารางที่ 4.3 ผลการคัดเลือกเชื้อราที่มีความสามารถในการเจริญและสามารถผลิตเอนไซม์แลคเคสโดยบ่มที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

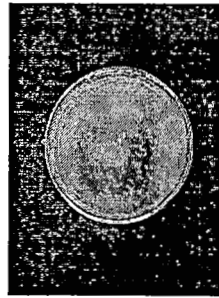
เชื้อรา	ABTS		
	ขนาดโคโลนี	Mycelia density	กำจัดสี
CH-1	3.4	1	+
CH-2	4.0	1	+
NA-1	7.1	4	+
NA-2	7.0	4	+
NA -3	4.8	2	+
NA -4	7.3	4	+
SU-1	6.0	3	+
SU -2	5.5	3	+
SU -3	7.4	4	+
SU -4	7.6	4	+

* ค่าที่แสดง : (+)-ผลเป็นบวก (-)-ผลเป็นลบ (1-4)- ระดับความหนาแน่นของไมซีเลีย

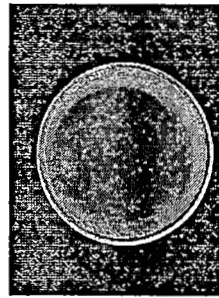
**ทดสอบจากตัวอย่างจำนวน 5 ซ้ำ



CH-1



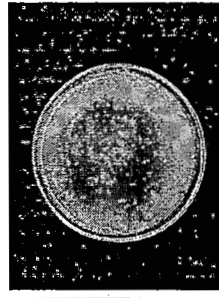
CH-2



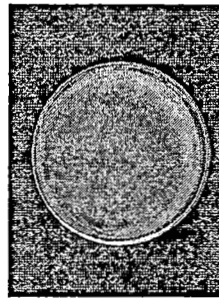
NA-1



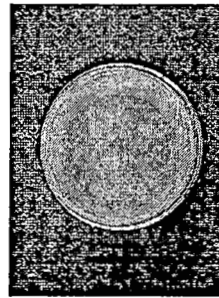
NA-2



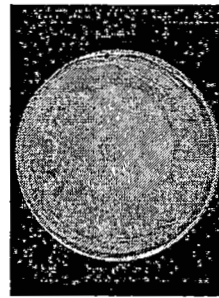
NA-3



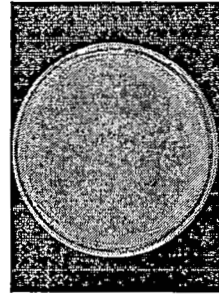
NA-4



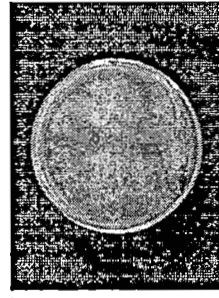
SU-1



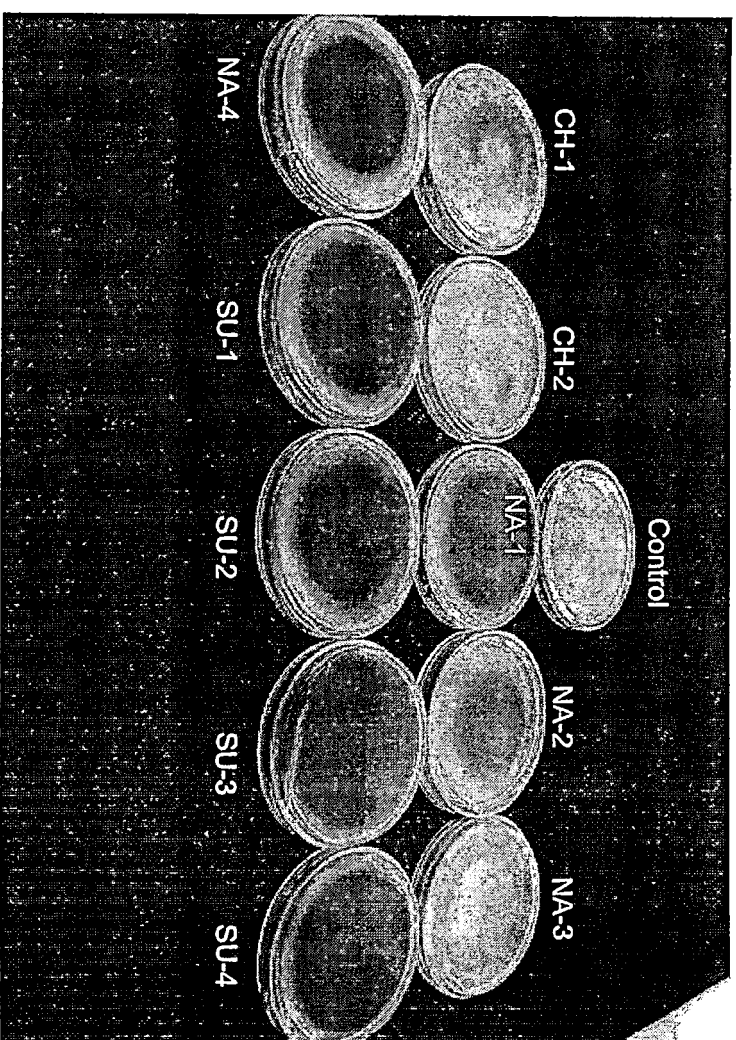
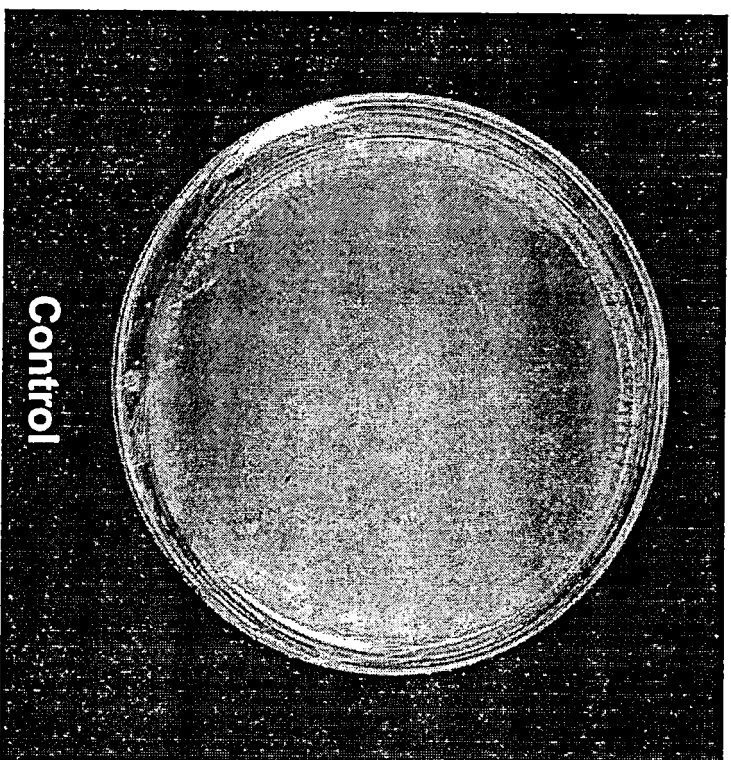
SU-2



SU-3



SU-4



ภาพที่ 4.5 คัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอโนไซม์แลคเคสได้

4. ทดสอบสภาวะที่เชื้อราความสามารถเจริญและกำจัดสีสูงสุด

4.1 สภาวะให้อากาศ

จากตาราง 4 จะเห็นว่า ที่ระดับความเจือจาง 1:3 เชื้อราทุกสายพันธุ์สามารถเจริญได้สูงที่สุดโดยเชื้อราสายพันธุ์ SU-4 (1.196 g/l) รองลงมาคือ SU-3, NA-4, NA-1, NA-2, SU-1 และ SU-2 เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ *P. chrysosporium* ส่วนที่ระดับความเจือจาง 1:1 และ 1:2 มีการเจริญของเชื้อราต่ำทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสารฟีนอลในน้ำเสียมีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อรา จากรายงานของ Yesilada และคณะ (1995) พบว่า การกำจัดฟีนอลซึ่งเป็นสัดส่วนกับการเจริญของเชื้อรา แสดงให้เห็นว่าสารประกอบฟีนอลที่เชื้อราสามารถนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนปฐมภูมิ (primary carbon source)

นอกจากนี้พบว่า พีเอชของน้ำเสียมีค่าเพิ่มขึ้นอาจเนื่องมาจากเชื้อราสามารถใช้กรดอินทรีย์ เช่น กรดอะซิติก กรดโพรพิโอนิก และกรดบิวทิริก ซึ่งเป็นองค์ประกอบของน้ำเสียได้

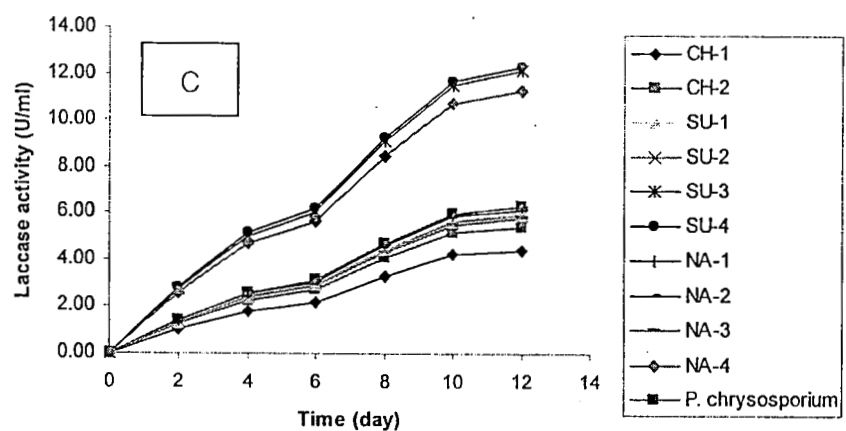
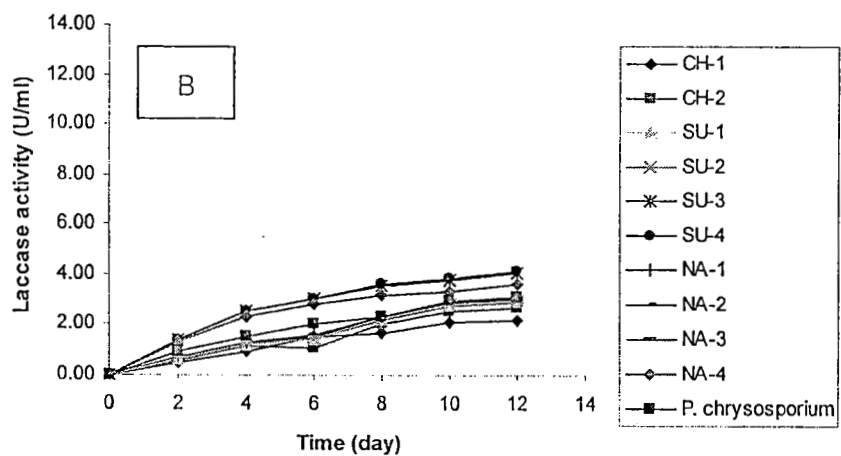
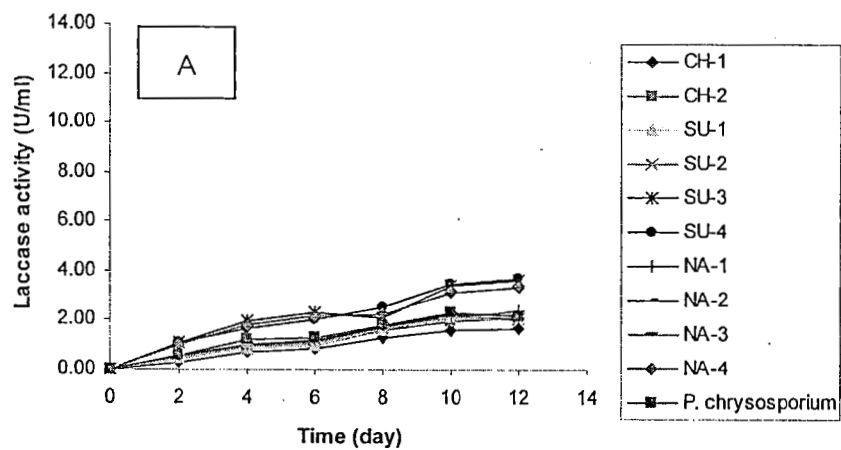
ตาราง 4.4 การเจริญของเชื้อรา และ พีเอช ในการหมักเชื้อราในน้ำทิ้งโรงงานปาล์ม ที่ความเข้มข้นน้ำเสียระดับ 1:1 1:2 และ 1:3 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทดสอบที่สภาวะให้อากาศ (200 รอบต่อนาที) เป็นเวลา 12 วัน

เชื้อรา	1:1		1:2		1:3	
	pH	Growth (g/l)	pH	Growth (g/l)	pH	Growth (g/l)
CH-1	4.7	0.178	5.3	0.284	7.2	0.920
CH-2	5.1	0.203	5.6	0.324	6.5	0.968
NA-1	5.0	0.357	5.9	0.572	6.7	1.148
NA-2	5.2	0.353	6.2	0.564	6.8	1.144
NA-3	5.5	0.244	6.1	0.390	7.0	0.978
NA-4	4.9	0.365	5.8	0.584	7.1	1.168
SU-1	4.8	0.345	5.6	0.552	6.3	1.128
SU-2	5.1	0.288	6.0	0.460	7.2	1.104
SU-3	5.1	0.373	6.0	0.596	6.1	1.192
SU-4	5.3	0.374	5.9	0.598	6.0	1.196
<i>P. chrysosporium</i>	4.9	0.311	5.7	0.509	6.5	0.988

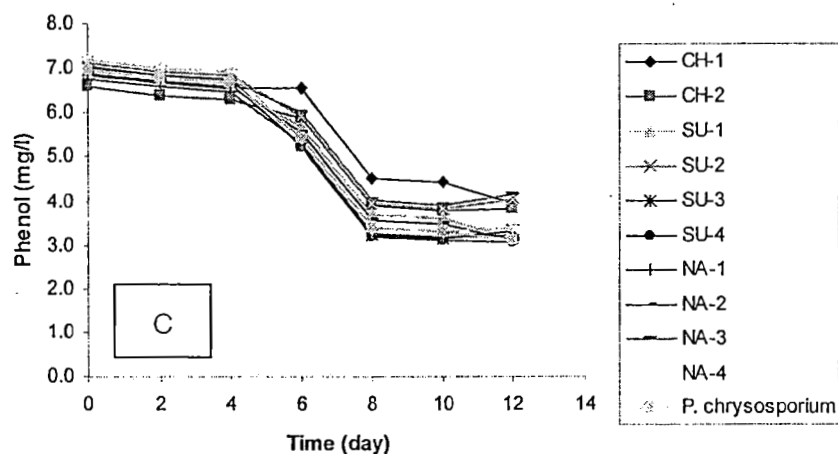
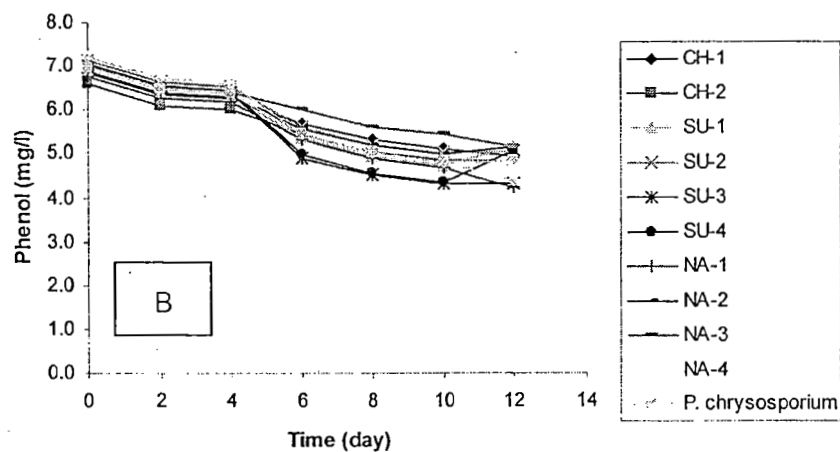
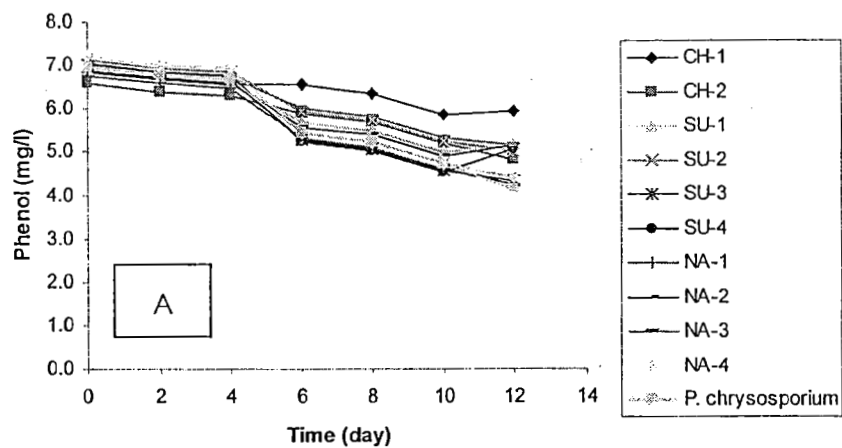
จากการศึกษาของ Shimada และคณะ (1981) กล่าวว่า การกวนอาจส่งผลต่อสัณฐานวิทยาของเชื้อราในกระบวนการเมทาบอลิซึมขั้นทุติยภูมิ (secondary metabolism) แต่จากผลการทดลองจะเห็นว่า กิจกรรมของเอนไซม์แลคเคส (ภาพที่ 4.5) ที่ระดับความเจือจาง 1:3 มีแนวโน้มของกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสที่คล้ายคลึงกันของเชื้อราทุกสายพันธุ์โดยกิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วหลังจากวันที่ 6 และตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสได้สูงสุดในวันที่ 12 (ภาพที่ 4.5C) โดยเชื้อราสายพันธุ์ SU-4 สามารถผลิตเอนไซม์แลคเคสได้สูงสุด (12.26 U/ml) รองลงมาคือ SU-3 และ NA-4 เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ *P. chrysosporium* ส่วนที่ระดับความเจือจาง 1:1 และ 1:2 มีกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสค่อนข้างต่ำ

การเปลี่ยนแปลงค่าสารฟีนอล (ภาพที่ 4.6) พบว่า ที่ระดับความเจือจาง 1:3 ปริมาณสารฟีนอลลดลงอย่างรวดเร็วหลังจากวันที่ 6 โดยเชื้อราสายพันธุ์ SU-4 สามารถลดปริมาณสารฟีนอลได้สูงสุด ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าปริมาณสารฟีนอลที่ลดลงมีความสัมพันธ์กับกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคส ทั้งนี้เนื่องมาจากการทำงานของเอนไซม์แลคเคสโดยเริ่มจากกระบวนการ demethoxylation ได้สารประกอบ o-quinone จากนั้นเอนไซม์แลคเคสตัดพันธะในสารประกอบ o-quinone ได้เป็น o-phenol (Trojanowski, 2001) ส่วนที่ระดับความเจือจาง 1:1 และ 1:2 ปริมาณสารฟีนอลลดลงเล็กน้อย

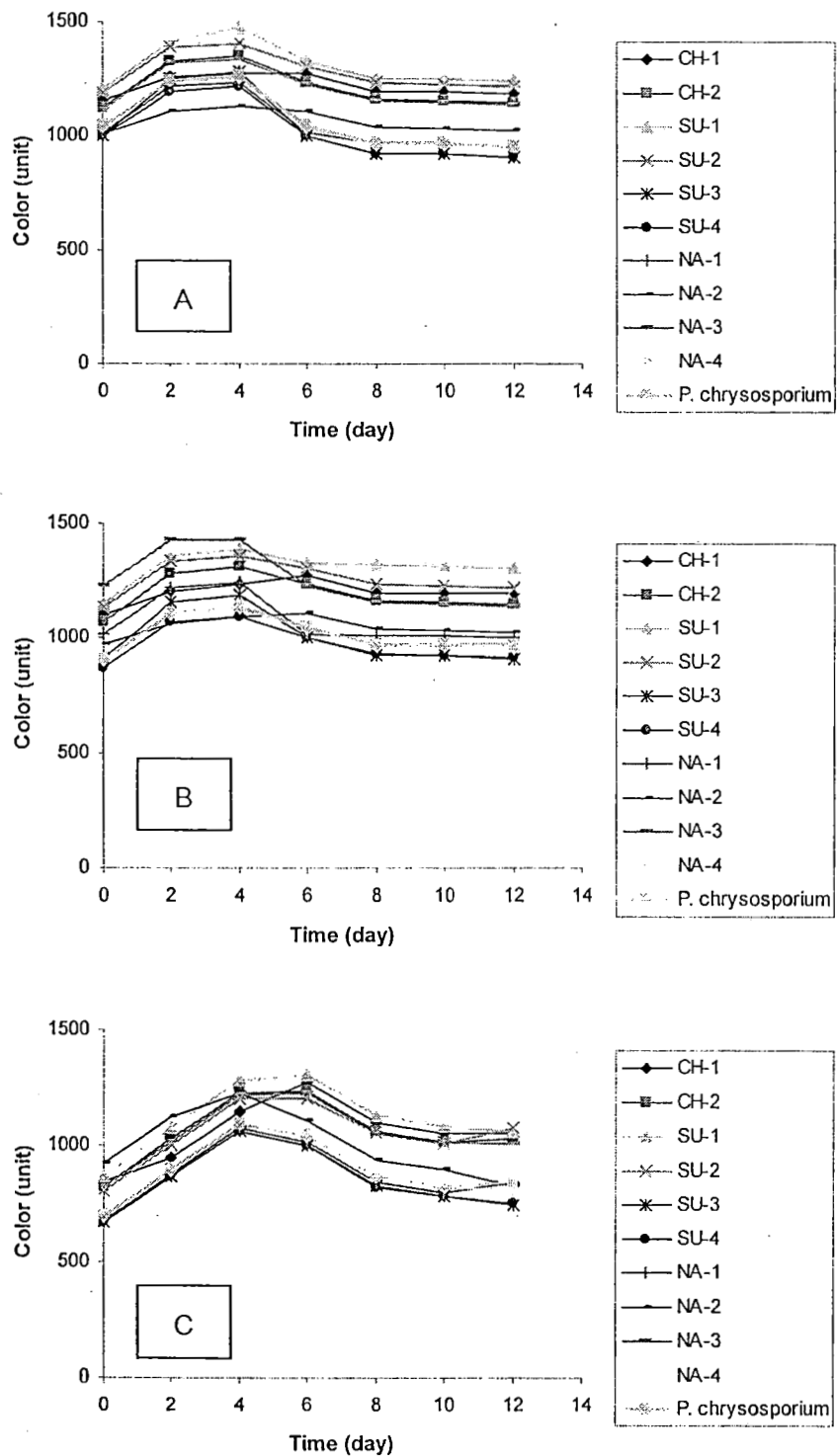
การเปลี่ยนแปลงค่าสี (ภาพที่ 4.7) พบว่า ค่าสีเพิ่มขึ้นในช่วงแรกและลดลงหลังจากวันที่ 6 ซึ่งที่ระดับความเจือจาง 1:3 ค่าสีลดลงอย่างรวดเร็วหลังจากวันที่ 6 โดยเชื้อราสายพันธุ์ SU-4 สามารถลดสีได้สูงสุด และสอดคล้องกับรายงานของ Dias และคณะ (2004) ที่ใช้เชื้อรา Basidiomycete Euc-1 ลดสีในน้ำทิ้งจากโรงงานน้ำมันมะกอก นอกจากนี้ยังพบว่า การลดสีมีความสัมพันธ์กับการเจริญซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Machado และคณะ (2006) โดยพบว่า การเจริญของเชื้อรา *Trametes villosa* และ *Pycnoporus sanguineus* มีความสัมพันธ์กับประสิทธิภาพการลดสี จากการศึกษาของ Soares และคณะ (2001) พบว่า เอนไซม์แลคเคสมีบทบาทสำคัญในการลดสี Remazol Brilliant Blue R (RBBR) แต่การใช้เอนไซม์แลคเคสเพียงอย่างเดียวไม่สามารถลดสีได้ โดยเอนไซม์แลคเคสต้องการโมเลกุลขนาดเล็ก คือ N-hydroxybenzotriazole (HBT) เพื่อทำหน้าที่เป็น redox mediator หรือเป็นสารตัวกลางในการเกิดปฏิกิริยาการโมเลกุลของสี นอกจากนี้เชื้อราชนิดอื่น เช่น *Phanerochaete flavidio-alba* สามารถลดสีน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันมะกอก (Blancuez et al., 2002) *Rhizopus oryzae* สามารถลดสีและค่าซีโอดีได้เท่ากับ 92-95% และ 50% ตามลำดับ ในน้ำเสียที่ผ่านขั้นตอนการฟอกขาว (Nagarathnamma and Bajpai, 1999) *Coriolus (Trametes) versicolor* (Archibald et al., 1990)



ภาพที่ 4.5 กิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสที่ความเข้มข้นน้ำเสียระดับ 1:1 (A) 1:2 (B) และ 1:3 (C) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทดสอบที่สภาวะให้อากาศ (200 รอบต่อนาที) เป็นเวลา 12 วัน



ภาพที่ 4.6 การเปลี่ยนแปลงค่าฟีนอล ที่ความเข้มข้นน้ำเสียระดับ 1:1 (A) 1:2 (B) และ 1:3 (C) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทดสอบที่สภาวะให้อากาศ (200 รอบต่อนาที) เป็นเวลา 12 วัน



ภาพที่ 4.7 การเปลี่ยนแปลงค่าสี ที่ความเข้มข้นน้ำเสียระดับ 1:1 (A) 1:2 (B) และ 1:3 (C) ที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทดสอบที่สภาวะให้อากาศ (200 รอบต่อนาที) เป็นเวลา 12 วัน

4.2 สภาวะไม่ให้อากาศ

จากตารางที่ 4.5 จะเห็นว่า ที่ระดับความเจือจาง 1:3 เชื้อราทุกสายพันธุ์สามารถเจริญได้สูงที่สุดโดยเชื้อราสายพันธุ์ SU-4 (1.380 g/l) รองลงมาคือ SU-3 และ NA-4 เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ *P. chrysosporium* ส่วนที่ระดับความเจือจาง 1:1 และ 1:2 มีการเจริญของเชื้อราต่ำทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสารฟีนอลในน้ำเสียมีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อรา นอกจากนี้พบว่า เชื้อราสามารถเจริญได้ดีในสภาวะไม่ให้อากาศมากกว่าในสภาวะให้อากาศโดย Haddadin และคณะ (2002) อธิบายว่า การให้อากาศโดยการเขย่ามีผลยับยั้งการย่อยสลายลิกนินเนื่องจากการถ่ายเทออกซิเจนเข้าสู่เส้นใยต่ำ

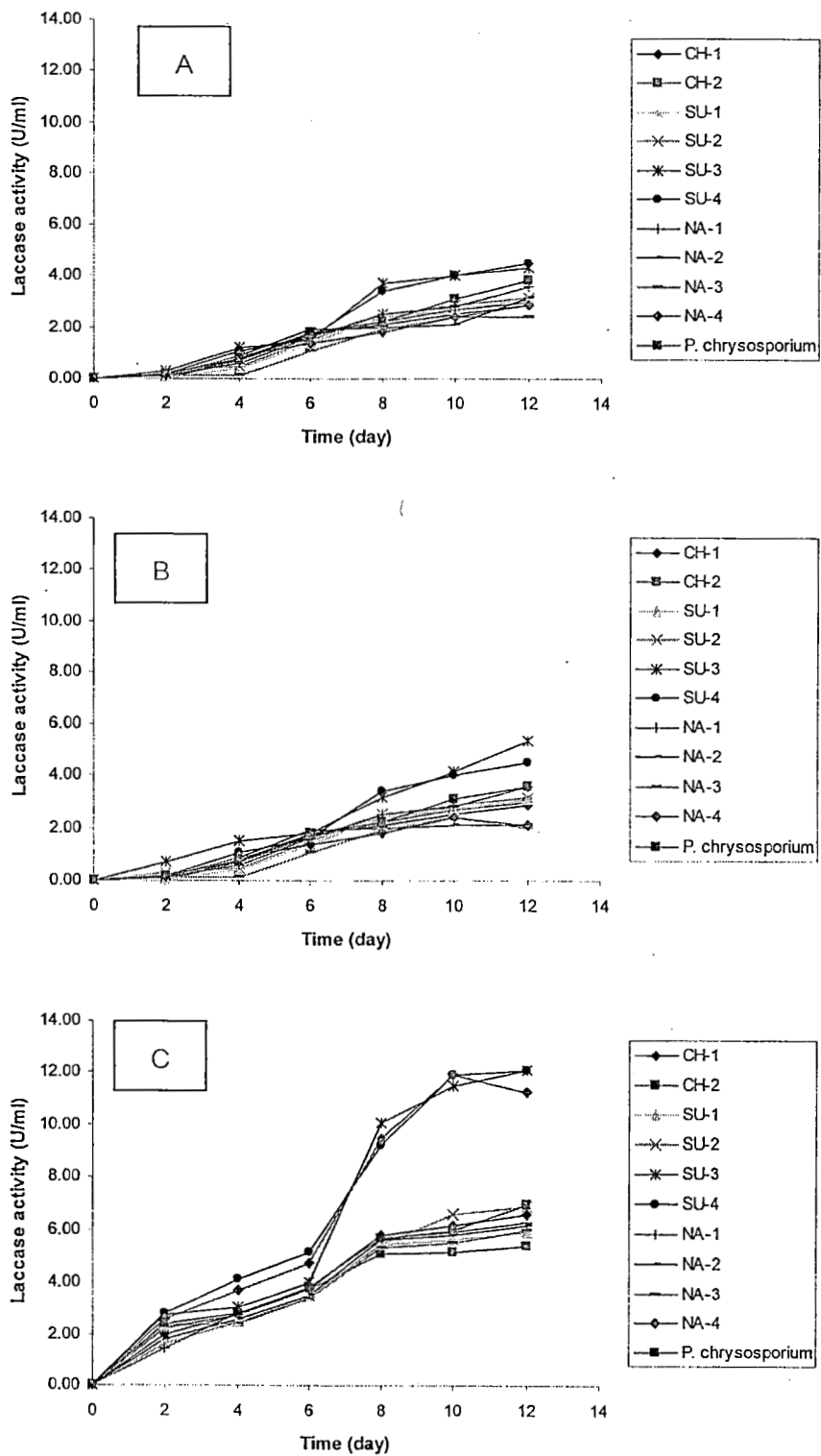
ตารางที่ 4.5 การเจริญของเชื้อรา และ พีเอช ในการหมักเชื้อราในน้ำทิ้งโรงงานปาล์ม ที่ความเข้มข้นน้ำเสียระดับ 1:1 1:2 และ 1:3 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทดสอบที่สภาวะไม่ให้อากาศ เป็นเวลา 12 วัน

เชื้อรา	1:1		1:2		1:3	
	pH	Growth (g/l)	pH	Growth (g/l)	pH	Growth (g/l)
CH-1	4.3	0.182	5.1	0.240	7.0	1.120
CH-2	5.0	0.216	5.4	0.350	6.7	1.168
NA-1	4.8	0.366	5.2	0.595	6.5	1.179
NA-2	5.1	0.343	5.9	0.515	7.2	1.194
NA-3	5.2	0.202	5.9	0.386	7.1	1.154
NA-4	4.8	0.387	5.1	0.584	7.2	1.296
SU-1	4.9	0.300	5.4	0.560	7.0	1.200
SU-2	5.0	0.211	5.6	0.441	7.2	1.208
SU-3	4.8	0.367	5.0	0.605	7.1	1.356
SU-4	5.4	0.381	5.7	0.612	7.0	1.380
<i>P. chrysosporium</i>	5.0	0.323	5.4	0.512	6.9	1.231

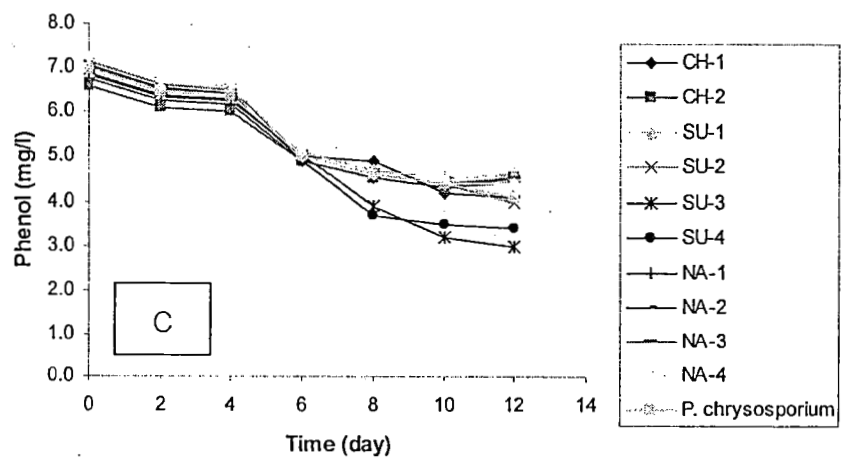
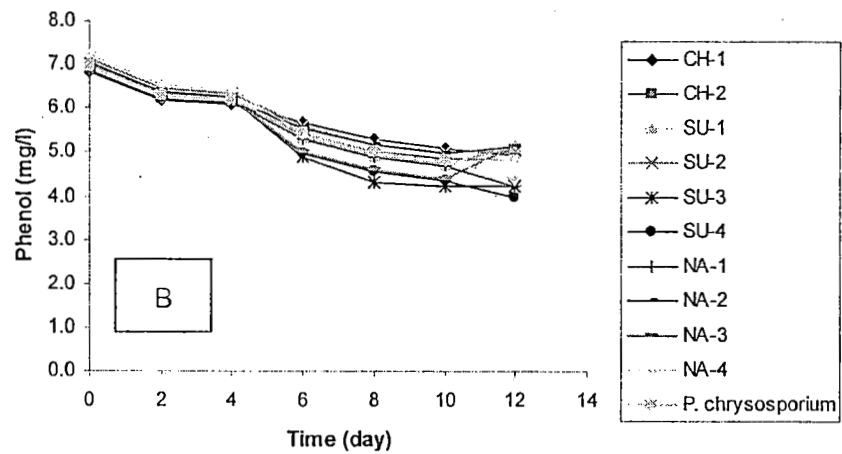
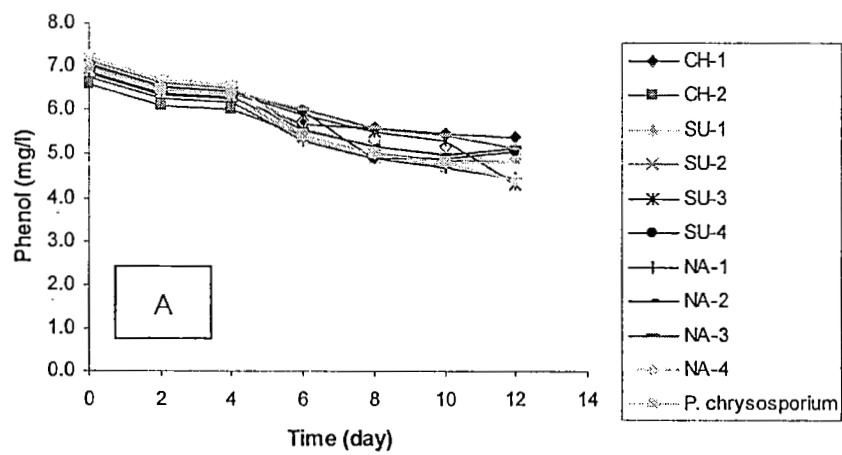
กิจกรรมของเอนไซม์แลคเคส (ภาพที่ 4.8) พบว่า ที่ระดับความเจือจาง 1:3 มีแนวโน้มของกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสที่คล้ายคลึงกันของเชื้อราทุกสายพันธุ์โดยกิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วหลังจากวันที่ 6 และตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสได้สูงสุดในวันที่ 12 (ภาพที่ 4.8C) โดยเชื้อราสายพันธุ์ SU-4 สามารถผลิตเอนไซม์แลคเคสได้สูงสุด (11.91 U/ml) รองลงมาคือ SU-3 และ NA-4 เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ *P. Chrysosporium* ส่วนที่ระดับความเจือจาง 1:1 และ 1:2 มีกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสค่อนข้างต่ำ จากการศึกษานี้ของ Kerem และคณะ (1992) ได้ทำการศึกษาเชื้อ *P. ostreatus* ในการย่อยลำต้นฝ้ายแบบ solid state พบว่า กิจกรรมเอนไซม์แลคเคสจะเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงการบ่ม 2-6 วัน จากนั้นจะลดต่ำลงเหลือ ¼ ที่อายุการบ่ม 18 วัน

การเปลี่ยนแปลงค่าสารฟีนอล (ภาพที่ 4.9) พบว่า ที่ระดับความเจือจาง 1:3 ปริมาณสารฟีนอลลดลงอย่างรวดเร็วหลังจากวันที่ 6 โดยเชื้อราสายพันธุ์ SU-4 สามารถลดปริมาณสารฟีนอลได้สูงสุด ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าปริมาณสารฟีนอลที่ลดลงมีความสัมพันธ์กับกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคส ทั้งนี้เนื่องมาจากการทำงานของเอนไซม์แลคเคสโดยเริ่มจากกระบวนการ demethoxylation ได้สารประกอบ o-quinone จากนั้นเอนไซม์แลคเคสตัดพันธะในสารประกอบ o-quinone ได้เป็น o-phenol (Trojanowski, 2001) ส่วนที่ระดับความเจือจาง 1:1 และ 1:2 ปริมาณสารฟีนอลลดลงเล็กน้อย

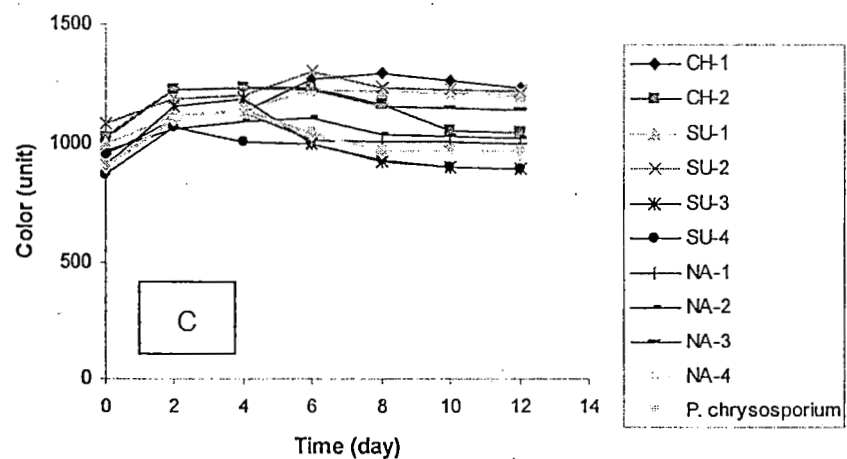
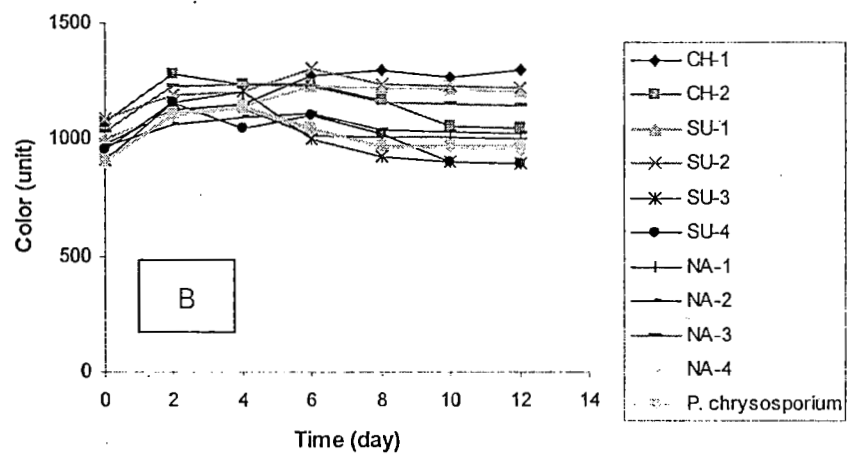
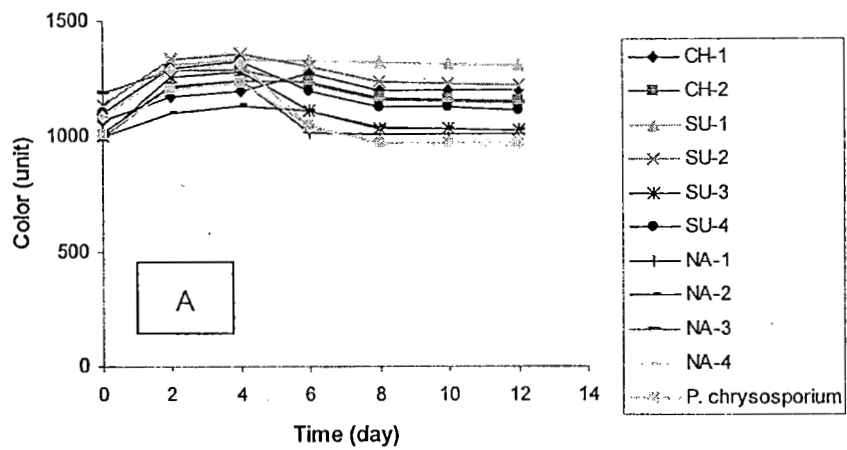
การเปลี่ยนแปลงค่าสี (ภาพที่ 4.10) พบว่า ค่าสีเพิ่มขึ้นในช่วงแรกและลดลงหลังจากวันที่ 6 ซึ่งที่ระดับความเจือจาง 1:3 ค่าสีลดลงอย่างรวดเร็วหลังจากวันที่ 6 โดยสอดคล้องกับรายงานของ Dias และคณะ (2004) ที่ใช้เชื้อรา Basidiomycete Euc-1 ลดสีในน้ำทิ้งจากโรงงานน้ำมันมะกอก นอกจากนี้ยังพบว่า การลดสีมีความสัมพันธ์กับการเจริญซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Machado และคณะ (2006) โดยพบว่า การเจริญของเชื้อรา *Trametes villosa* และ *Pycnoporus sanguineus* มีความสัมพันธ์กับประสิทธิภาพการลดสี และจากการศึกษาของ Aggelis และคณะ (2002) เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อราไวทรีอัท 8 สายพันธุ์ ได้แก่ *Abortiporus biennis*, *Dichomitus squalens*, *Inonotus hispidus*, *Panellus stipticus*, *Pleurotus ostreatus*, *Trametes hirsute*, *Irpex lacteus* และ *Lentinus tigrinus* ในน้ำเสียจากขั้นตอนการกำจัดความขมในผลมะกอกเขียวในสภาวะไม่ให้อากาศ พบว่า เชื้อราไวทรีอัททั้ง 8 สายพันธุ์ สามารถลดปริมาณฟีนอลในน้ำเสียได้ โดย *A. biennis* ลดปริมาณฟีนอลได้สูงสุด (55%) และ *P. ostreatus* ลดสีได้สูงสุด (49%)



ภาพที่ 4.8 กิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสที่ความเข้มข้นน้ำเสียระดับ 1:1 (A) 1:2 (B) และ 1:3 (C) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทดสอบที่สภาวะไม่ให้อากาศ เป็นเวลา 12 วัน

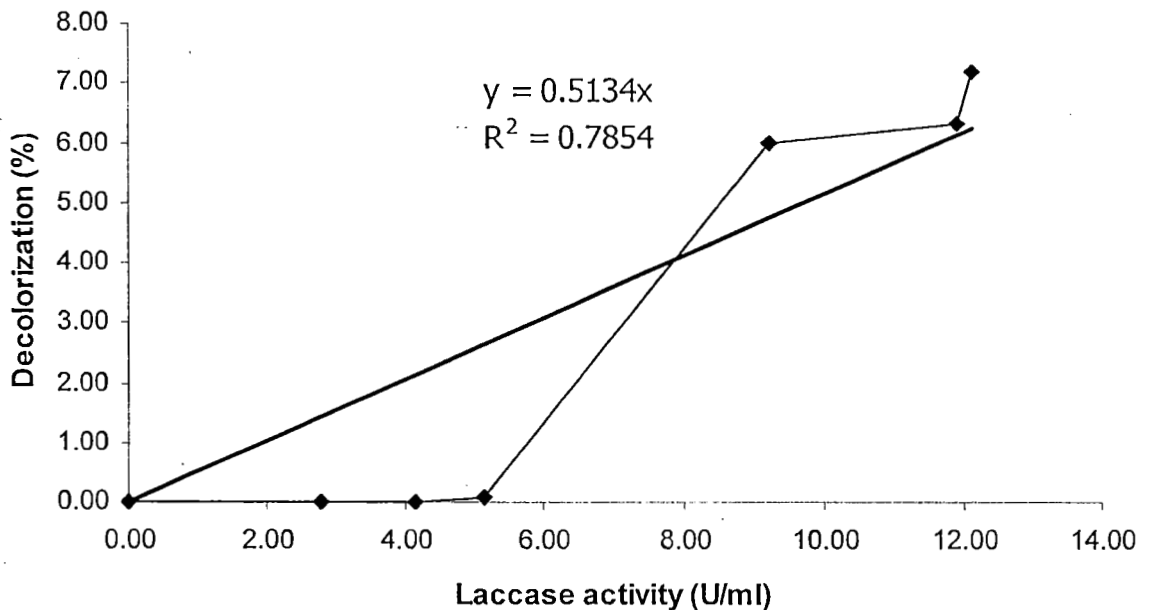


ภาพที่ 4.9 การเปลี่ยนแปลงค่าฟีนอล ที่ความเข้มข้นน้ำเสียระดับ 1:1 (A) 1:2 (B) และ 1:3 (C) ที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทดสอบที่สภาวะไม่ให้อากาศ เป็นเวลา 12 วัน



ภาพที่ 4.10 การเปลี่ยนแปลงค่าสี ที่ความเข้มข้นน้ำเสียระดับ 1:1 (A) 1:2 (B) และ 1:3 (C) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทดสอบที่สภาวะไม่ให้อากาศ เป็นเวลา 12 วัน

ในการศึกษานี้ จะเห็นว่า SU-4 มีความสามารถสูงสุดในการลดสีน้ำเสียจึงคัดเลือกมาเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสและความสามารถในการลดสี จากภาพที่ 4.11 พบว่าค่าทั้งสองมีความสัมพันธ์กัน ($R^2=0.78$)



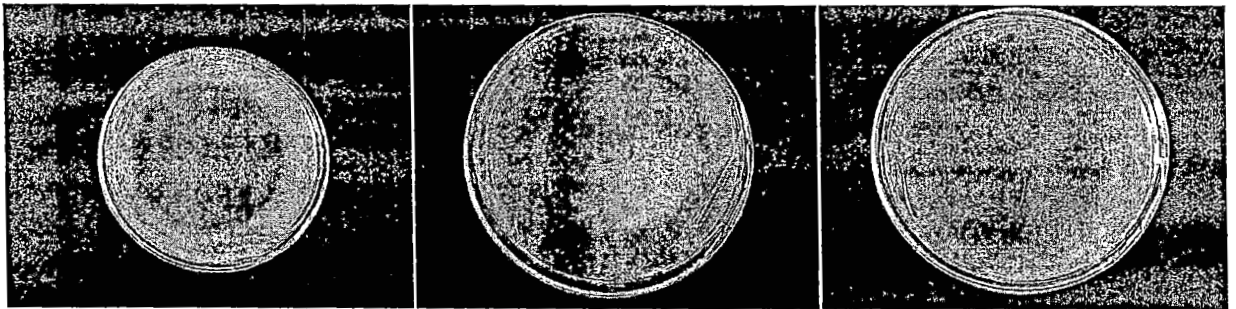
ภาพที่ 4.11 ความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสและความสามารถในการลดสี

นอกจากนี้ยังพบว่า น้ำเสียที่ระดับความเจือจาง 1:3 เป็นสภาวะที่ดีที่สุดในการผลิตเอนไซม์แลคเคส ลดปริมาณฟีนอลและลดค่าสี ดังนั้นจึงนำน้ำเสียที่ระดับความเจือจาง 1:3 มาหาประสิทธิภาพในการลดค่าสีโอดีในน้ำเสีย โดยพบว่า ในสภาวะไม่ให้อากาศเชื้อราสามารถลดค่าสีโอดีในน้ำเสียได้ดีกว่าในสภาวะให้อากาศ โดยเชื้อราสายพันธุ์ SU-4 ลดค่าสีโอดีในน้ำเสียได้สูงสุด (40.39%) รองลงมาคือ SU-3 เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ *P. chrysosporium* ซึ่งการลดค่า สีโอดีในน้ำเสียมีความสัมพันธ์กับการเจริญของเชื้อรา เพราะเชื้อราต้องใช้สารอินทรีย์ในน้ำเสียเพื่อการเจริญ จากการศึกษาของ Aggelis และคณะ (2002) เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อราไวที่รื้อท 8 สายพันธุ์ ได้แก่ *A. biennis*, *D. squalens*, *I. hispidus*, *P. stipticus*, *P. ostreatus*, *T. hirsute*, *I. lacteus* และ *L. tigrinus* ในน้ำเสียจากขั้นตอนการกำจัดความขมในผลมะกอกเขียวในสภาวะไม่ให้อากาศพบว่า เชื้อราไวที่รื้อททั้ง 8 สายพันธุ์ สามารถลดค่าสีโอดีได้เพียงเล็กน้อย (12.3%)

ตารางที่ 4.6 ค่า COD ในการหมักเชื้อราในน้ำทิ้งโรงงานปาล์ม ที่ความเข้มข้นน้ำเสียระดับ 1:3 (COD เริ่มต้น 8,100 mg/l) อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทดสอบที่สภาวะให้อากาศ (200 รอบต่อนาที) และไม่ให้อากาศ เป็นเวลา 12 วัน

เชื้อรา	สภาวะให้อากาศ		สภาวะไม่ให้อากาศ	
	COD (mg/l)	COD removal (%)	COD (mg/l)	COD removal (%)
CH-1	4,565	10.49	4,230	17.06
CH-2	4,470	12.35	4,400	13.73
NA-1	4,147	18.69	4,200	17.65
NA-2	4,600	9.80	4,392	13.88
NA-3	4,321	15.27	4,020	21.18
NA-4	4,300	15.69	4,000	21.57
SU-1	4,120	19.22	4,088	19.84
SU-2	4,082	19.96	3,950	22.55
SU-3	3,260	36.08	3,094	39.33
SU-4	3,201	37.24	3,040	40.39
<i>P. chrysosporium</i>	3,370	33.92	3,200	37.25

บทที่ 5



SU-1

SU-2

SU-3

การศึกษาการลดสีน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มด้วยวิธีทางชีวภาพ

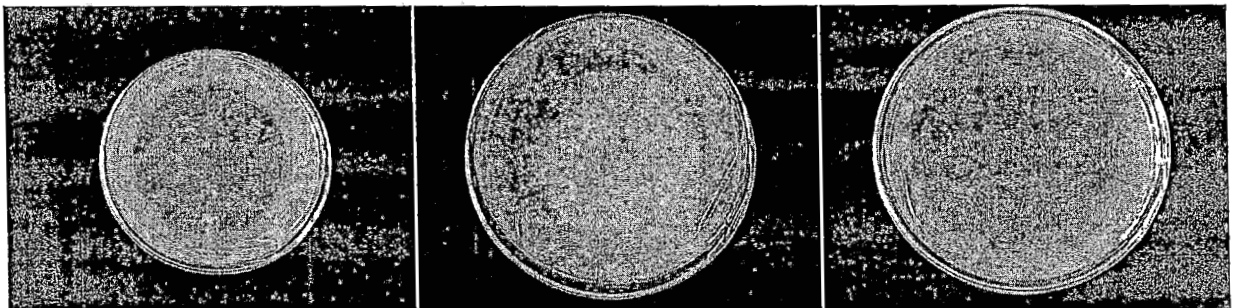
(Study of biological decolorization of palm oil mill effluent)

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

1. คัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถลดสีน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม
เชื้อราทุกสายพันธุ์สามารถเจริญได้ดีที่สุดที่ระดับความเจือจาง 1:3 โดยมีขนาดโคโลนีอยู่ในช่วง 3.4-6.3 เซนติเมตร
2. ทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์แลคเคส
เชื้อราทุกสายพันธุ์สามารถผลิตเอนไซม์แลคเคสได้ในอาหารคัดเลือก โดยเชื้อราสายพันธุ์ SU-4 มีขนาดโคโลนีใหญ่ที่สุด
3. ทดสอบสมรรถนะที่เชื้อราความสามารถเจริญและกำจัดสีสูงสุด
 - 3.1 สมภาวะให้อากาศ
ที่ระดับความเจือจาง 1:3 เชื้อราสายพันธุ์ SU-4 สามารถเจริญได้สูงที่สุด ผลิตเอนไซม์แลคเคสได้สูงสุด (12.26 U/ml) ลดปริมาณฟีนอลได้สูงสุด (3.37 mg/l) ลดค่าสีได้สูงสุด (758.2 unit) และลดค่าซีโอดีได้สูงสุด (37.24%)
 - 3.2 สมภาวะไม่ให้อากาศ
ที่ระดับความเจือจาง 1:3 เชื้อราสายพันธุ์ SU-4 สามารถเจริญได้สูงที่สุด ผลิตเอนไซม์แลคเคสได้สูงสุด (11.96 U/ml) ลดค่าสีได้สูงสุด (911.02 unit) และลดค่าซีโอดีได้สูงสุด (40.39%) แต่เชื้อราสายพันธุ์ SU-3 สามารถลดปริมาณฟีนอลได้สูงสุด (3.00 mg/l)
4. ความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมเอนไซม์แลคเคสและความสามารถในการลดสี
ค่าทั้งสองมีความสัมพันธ์กันที่ $R^2=0.78$

บทที่ 6



SU-1

SU-2

SU-3

การศึกษาการลดสีน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มด้วยวิธีทางชีวภาพ

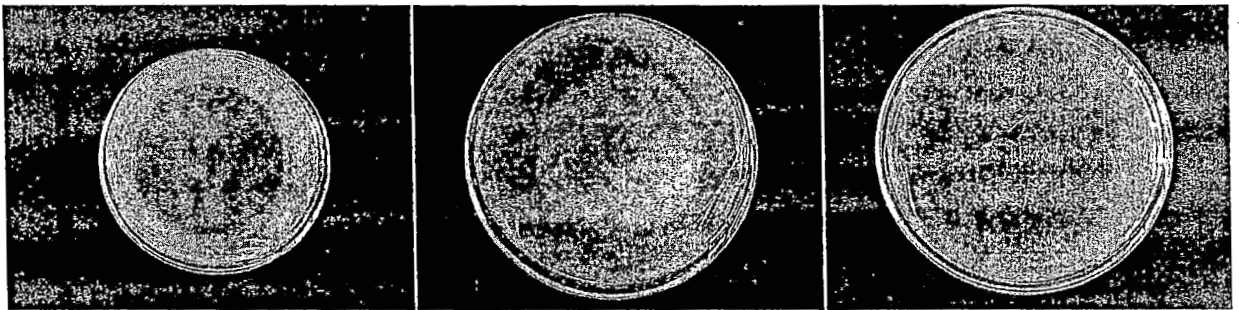
(Study of biological decolorization of palm oil mill effluent)

บทที่ 6

ข้อเสนอแนะ

1. เชื้อราสายพันธุ์ SU-4 มีประสิทธิภาพในการลดสีน้ำเสียจากโรงงานสกัดปาล์มน้ำมัน ดังนั้นควรมีการศึกษาเพิ่มเติมดังนี้
 - จำแนกและระบุสายพันธุ์
 - ศึกษาปัจจัยเพิ่มเติมที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อรา
 - ศึกษาปัจจัยเพิ่มเติมที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์
2. เนื่องจากค่าซีโอดีของการศึกษานี้ลดลงไม่มาก ควรมีการนำน้ำเสียมาบำบัดซ้ำโดยเชื้อราสายพันธุ์ SU-4 หรือใช้ร่วมกับเชื้อราสายพันธุ์อื่น
3. ปรับปรุงสายพันธุ์ของเชื้อ SU-4 เพื่อเพิ่มความสามารถในการกำจัดสีและกำจัดซีโอดี
4. ในการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมควรมีการศึกษาการนำเซลล์กลับมาใช้ซ้ำ เช่น การใช้วิธีตรึงเซลล์ เพื่อลดค่าใช้จ่าย
5. พัฒนาแนวทางการนำ by-product ที่ได้จากกระบวนการลดสีด้วยเชื้อรามาใช้ประโยชน์ในเชิงอุตสาหกรรม เช่น นำมาทำปุ๋ยรดแปลงเพาะปลูก หรือเป็นอาหารสัตว์ เป็นต้น

เอกสารอ้างอิง



SU-1

SU-2

SU-3

การศึกษาการลดสีน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มด้วยวิธีทางชีวภาพ

(Study of biological decolorization of palm oil mill effluent)

เอกสารอ้างอิง

- โสภารวรรณ รัตนพันธุ์. (2547). การบำบัดและกำจัดสีของน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยเส้นใย *Lentinus spp.* (วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์).
- Agustin, M.B., Sengprache, W.P. and Phutdsawong, W. 2008. Electrocoagulation of palm oil mill effluent. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. **5**, 177-180.
- Aggelis, G., Ehaliotis, C., Nerud, F., Stoychev, I., Lyberatos, G. and Zervakis, G.I. (2002). Evaluation of white-rot fungi for detoxification and decolorization of effluents from the green olive debittering process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **59**, 353-360.
- Ahmad, A. L., Ismail, S. and Bhatia, S. (2003) Water recycling from palm oil mill effluent (POME) using membrane technology. *J. Desalination*. **157**, 87-195.
- Archibald, F., Paice, M.G. and Jurasek, L. (1990). Decolorization of kraft bleaching effluent chromophores by *Coriolus (Trametes) versicolor*. *Enzyme Microb. Technol.* **12**, 846-853.
- Assavanig, A., Amornkitticharoen, B., Ekpaisal, N., Meevootisom, V. and Flegel, T.M. (1992). Isolation, characterization and function of laccase from *Trichoderma*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **38**: 198-202.
- Bhatia, S., Othman, Z. and Ahmad, A.L. 2006. Palm oil mill effluent pretreatment using *Moringa oleifera* seeds as an environmentally friendly coagulant: Laboratory and pilot plant studies. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **81**, 1852-1858.
- Blanquez, P., Caminal, G., Sarra, M., Vicent, M.T. and Gabarrell, X. (2002). Olive oil mill waste waters decolorization and detoxification in a bioreactor by the white rot fungus *Phanerochaete flavidio-alba*. *Biotechnol. Prog.* **18**, 660-662.

- Brenes M. and Corrido A. 1988. Regeneration de salmueras de acitunas verdes estiloo espanol con resinas cambiadoras de iones. *Grasas Aceites* **39**, 96-101.
- Brenes M., Montano A., Garrido A. 1990. Ultrafiltration of green table olive: influence of operating parameters and effects on polyphenol composition. *J. Food Sci.* **55**, 214-217.
- Chao, W.L., Lee. 1994. Decolorization of azo dyes by three white rot fungi : Influence of carbon source. *Wolrd J.Microb.Biotech.* **10**, 556-559.
- Clutterbuck A.J. 1990 Absence of laccase from yellow-spored mutants of *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* **136**, 1731-1738.
- Cripps, C., Bumpus, J.A., Aust, S.D. 1990. Biodegradation of azo and heterocyclic dyes by *P. cryosporium*. *Appl.Environ.Microb.* **56**, 1114-1118.
- Cheah, S. C., Ma, A. N and Obi, L. C. L.1988. Biotechnological Application for Utilization of Waste from POME. *Fat.Sci.Tech.* **90**, 536-540.
- Chigusa, K., Hasegawa, T., Yamamota, N. and Watanabe, Y. 1996. Treatment of wastewater from oil manufacture plant by yeasts. *Water Sci. Technol.* **34**, 51-58.
- Curir, P., Thurston, C.F., D'Aquila, F., Pasini, C. and Marchesini, A. (1997). Characterisation of a laccase secreted by *Armillaria mellea* pathogenic for Genista. *Plant Physiological Biochemistry*, **35** (2): 147-153.
- Dias, A.A., Bezerra, R.M. and Pereira, A.N. (2004). Activity and elution profile of laccase during biological decolorization and dephenolization of olive mill wastewater. *Bioresour. Technol.* **92**, 7-13.
- Duran, N. and Esposito, E. (2000). Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. *Applied*

Catalysis B: Environmental, **28**: 83-99.

Eggert, C., Temp, U. and Eriksson, K.L. (1996). The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: Purification and characterisation of the laccase. *Applied and Environmental Microbiology*, **62** (4): 1151-1158.

Farnet, A.M., Criquet, S., Tagger, S., Gil, G. and Le Petit, J. (2000). Purification, Partial characterisation, and reactivity with aromatic compounds of two laccases from *Marasmius quercophilus* strain 17. *Canadian Journal of Microbiology*, **46**: 189-194.

Germann, U.A., Muller, G., Hunziker, P.E. and Lerch, K. (1988). Characterisation of two allelic forms of *Neurospora crassa* laccase. *The Journal of Biological Chemistry*, **263** (2): 885-896.

Giardina, P., Palmieri, G., Scaloni, A., Fontanella, B., Faraco, V., Cennamo, G. and Sannia, G. (1999). Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Biochem. J.*, **341**: 655-663.

Gomez-Millan A., Duran M.C., Garcia Garrido P.A., Gonzalez F., Rejano L., Sanchez F. and Sanchez J.C. 1983. Elaboracion de aceitunas verdes estilo espanol de la variedad Gordal con reutilizacion de lejias y supresion de lavados. Estudio de sus aguas residuales y algunos ensayos de purificacio. *Grasas Aceites* **1**, 162-167.

Haddadin, M.S., Al-Natour, R., Al-Qsous, S. and Robinson, R.K. (2002). Bio-degradation of lignin in olive pomace freshly-isolated species of Basidiomycete. *Bioresour. Technol.* **82**, 131-137.

Hammel, K.E. 1989. Organopollutant degradation by ligninolytic fungi. *Enzyme Microb. Technol.* **11**, 776-777.

- Hardin, I.R., Cao, H., Wilson, S.S. and Akin, D.E. (2000). Decolourisation of textile wastewater by selective fungi. *AATCC Review*, **32** (11): 38-42.
- Heinfling, A., Martinez, M.J., Mantinez, A.T. Bergbuer, M., Szewzyk, U. 1998. Transformantion of industrial dyes by manganese peroxidase from *Bjerkandera adusta* and *Pleurotus eryngii* in a manganese-independent reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 2788-2793.
- Kambe, T.N., Shimomura M., Nomura, N., Chanpornpong, T. and Nakahara, T. 1999. *J. Biosci & Boieng.* **87**, 119-121.
- Kerem, Z. Friesem, D, and Hadar, Y. (1992) Lignocellulose Degradation during Solid-State Fermentation: *Pleurotus ostreatus* versus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. And Environ. Microbiol.* **58**, 1121-1127.
- Kittikun, A. H., Prasertsan, P., Srisuwan, G. & Krause, A.2000. Environmental Management for Palm Oil Mill. <http://www.ias.unu.edu/proceedings/icibs/ic-mfa/kittikun/paper.html>
- Livernoche, K., Jurasek, L., Desrochers, M., Dorica, J. 1983. Removal of color from kraft mill wastewaters with cultures of white-rot fungi and with immobilized mycelium of *Coriolus versicolor*. *Biotechnol.Bioeng.* **25**, 2055-2065.
- Miyata, N., Mori, T., Iwahori, K. and Fujita, M. 2000. Microbial decolorization of melanoidin-containing wastewater: combined use of activated sludge and the fungus. *Coritolus hirsutus*. *J. Biosci. & Bioeng.* **89**, 145-150.
- Machado, K.M.G., Compart, L.C.A., Morais, R.O., Rosa, L.H. and Santos, M.H. (2006). Biodegradation of reactive textile dyes by basidiomycetous fungi from brazilian ecosystems. *Braz. J. Microbiol.* **37**, 481-487.
- Moayed, P. and Asti, M.B. 1998. Decolorinzation of textile wastewater by *A. niger*. (Marine and Terrestrail). *Frensius Environ. Bulletin.* **5**, 223-120.

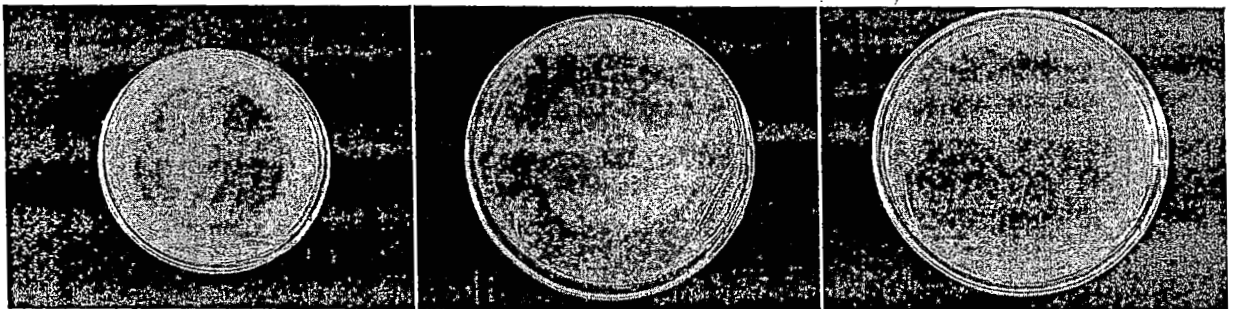
- Nagarathnamma, R. and Bajpai, P. (1999). Decolorization and detoxification of extraction-stage effluent from chlorine bleaching of kraft pulp by *Rhizopus oryzae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1078-1082.
- Nang, H.L.L. May, C.Y., Ngan, M.A., and Hock, C.C. (2007) Extraction and Identification of Water-Soluble Compounds in Palm-Pressed Fiber by SC-CO₂ and GC-MS. *American Journal of Environmental Sciences*, 3 (2): 54-59,
- Ohkuma M., Maeda Y. and Kudo T. (2001) Lignin degradation and roles of white rot fungi: Study on an efficient symbiotic system in fungus-growing termites and its application to bioremediation. *Focused on Ecomolecular Science Research*, 42, 12-18.
- Paice, M.G., Bourbonnais, R., Reid, I.D., Archibald, F.S. and Jurasek, L. (1995). Oxidative bleaching enzymes: A review. *Journal of pulp and paper science*, 21 (8): 280-284.
- Palmieri, G., Giardina, P., Bianco, C., Scaloni, A., Capasso, A. and Sannia, G. (1997). A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. *The Journal of Biological Chemistry*, 272 (50): 31301-31307.
- Paszczynski, A., Pasti, M.B., Goszcaynski, S., Crawford, D.L. 1991. New approach to improve degradation of recalcitrant azo dyes by *Streptomyces* spp. And *Phanerochaete chrysosporium*. *Enzyme Microb. Technol.* 13, 378-384.
- Perez, J., Marinez, J. and De la Rubia, T. (1996). Purification and partial characterisation of a laccase from the white rot fungus *Phanerochaete flavid-alba*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 4263-4267.
- Pointing, S.B. and Vrijmoed, L.L.P. (2000). Decolourisation of azo and triphenylmethane dyes by *Pycnoporus sanguineus* producing laccase as the sole phenoloxidase. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16: 317-318.

- Sannia, P., Ligmongi, P., Cocca, E., Buonocore, F., Nitti, G. 1991. Purification and characterization of veratryl alcohol oxidase enzyme the lignin degrading basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Biochem. Biophys., Acta* **1074**, 114-119.
- Saloheimo, M., Niku-Paavola, M.L. and Knowles, J.K.C. (1991). Isolation and structural analysis of the laccase gene from the lignin-degrading fungus *Phlebia radiata*. *Journal of General Microbiology*, **137**: 1537-1544.
- Schliephake, K., Lonerhan, G.T., Jones, C.L., Maniwareing, D.E. 1993. Decolorization of a pigment plant effluent by *Pycnoporus cinnabarinus* in a packed-bed bioreactor. *Biotechnol. Lett.* **15**, 1185-1188.
- Schliephake, K. and Lonerhan, G.T. (1996). Laccase variation during dyedecolourisation in a 200 L packed-bed bioreactor. *Biotechnology Letters*, **18(8)**: 881-886.
- Shavali, M., Assaki, M.M. and Rostami K. 2000. Effect of environmental parameters on decolorization of textile wastewater using *Phanerochate chrysosporium*. *Bioprocess Eng.* **23**, 721-726.
- Shimada, M. F., Nakasubo, T. K. and Higuchi, T. (1981) Biosynthesis of the secondary metabolite veratryl alcohol in relation in lignin degradation in *Phanerochate chrysosporium*. *Arch. Microbiol.* **129**, 321-324.
- Shin, K.S. and Kim, C.J. (1998). Properties of laccase purified from nitrogen limited culture of white-rot fungus *Coriolus hirsutus*. *Biotechnology Techniques*, **12 (2)**: 101-104.
- Soares, G.M.B., Costa-Ferreira, M and Pessoa de Amorim, M.T. (2001). Decolorization of anthraquinone-type dye using a laccase formation. *Bioresour. Technol.* **79**, 171-177.

- Swamy, J., Ramsay, J.A. 1999. The evaluation of white rot fungi laccases. *Microbiology* **140**, 19-26.
- Thakker, G.D., Evans, C.S. and Rao, K.K. (1992). Purification and characterisation of laccase from *Monocillium indicum* Saxena. *Applied Microbiol Biotechnology*, **37**: 321-323.
- Thurston, C.F. (1994). The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*, **140**: 19-26.
- Trojanowski, J. (2001). Biological degradation of lignin. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **48**, 213-218.
- Wahleitner, J.A., Xu, F., Brown, K.M., Brown, S.H., Golightly, E.J., Halkier, T., Kauppinen, S., Pederson, A. and Schneider, P. (1996). The identification and characterisation of four laccases from the plant pathogenic fungus *Rhizoctonia solani*. *Curr Genet.*, **29**: 395-403.
- Xiao Y.X., Tu J., Wang M., Zhang Q and Shi Y (2003) Purification, molecular characterization and reactivity with aromatic compounds of a laccase from basidiomycete *Trametes* sp. Strain AH28-2. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60**, 700-707.
- Yaver, D.S., Xu, F., Golightly, E.J., Brown, K.M., Brown, S.H., Rey, M.W., Schneider, P., Halkier, T., Mondorf, K. and Dalboge, H. (1996). Purification, characterisation, molecular cloning, and expression of two laccase genes from the white rot basidiomycete *Trametes villosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, **62** (1): 834-841.
- Yosilada O., Fiskin K., Yosilada E. (1995) The use of white-rot fungus *Funalia trogii* (Malatya) for the decolorization and phenol removal from olive oil wastewater. *Environmental Tech.* **16**, 95-100.

Yun Ping N., Azis A., Chin P.T., Yew A.T. (2008) Determination of oil palm fruit phenolic compounds and their antioxidant activities using spectrophotometric methods. *International Journal of Food Science and Technology*, **43**, 1843-1837

ภาคผนวก



SU-1

SU-2

SU-3

การศึกษาการลดสีน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มด้วยวิธีทางชีวภาพ

(Study of biological decolorization of palm oil mill effluent)

1. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แลคเคส (Buswell et al., 1995)

สารเคมี

-0.03% (w/v) 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline)-6-sulfonate (ABTS)	2	ml
-0.1 M Sodium acetate buffer pH 5.0	2	ml
-Crude enzyme	0.1	ml

วิธีการ

-ปิเปตสารละลาย ABTS และ acetate buffer ลงในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer และแช่หลอดทดลองใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

-ปิเปต crude enzyme ลงในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากันและทิ้งให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

-นำสารละลายในหลอดมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 nm ด้วยเครื่อง UV/VIS spectrophotometer (กำหนดค่า discriminating = 10 %) ที่เวลา 1 2 3 4 5 และ 6 นาที

-เตรียม blank โดยใช้ น้ำกลั่น แทน crude enzyme

1 unit ของเอนไซม์แลคเคส หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ที่ใช้ในการออกซิไดส์ ABTS 1 μ mol ในเวลา 1 นาที ต่อเอนไซม์ 1 ml

2. การวัดค่าสี โดยวิธีเปรียบเทียบแพลทตินัมโคบอลต์มาตรฐาน (Platinum cobalt standard) (APHA AWWA and WEF, 1998)

สารเคมี

- สารละลายมาตรฐานคลอโรแพลทตินัม (สารละลายโพแทสเซียมคลอโรแพลทตินัม 0.1246 g และผลึกโคบอลต์สกลอไรด์ 0.1 g ละลายในน้ำกลั่นที่มีกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 10 ml ปรับปริมาตรเป็น 100 ml ดังนั้นจะได้สารละลายมาตรฐานคลอโรแพลทตินัมที่มีความเข้มข้น 500 หน่วยสี)

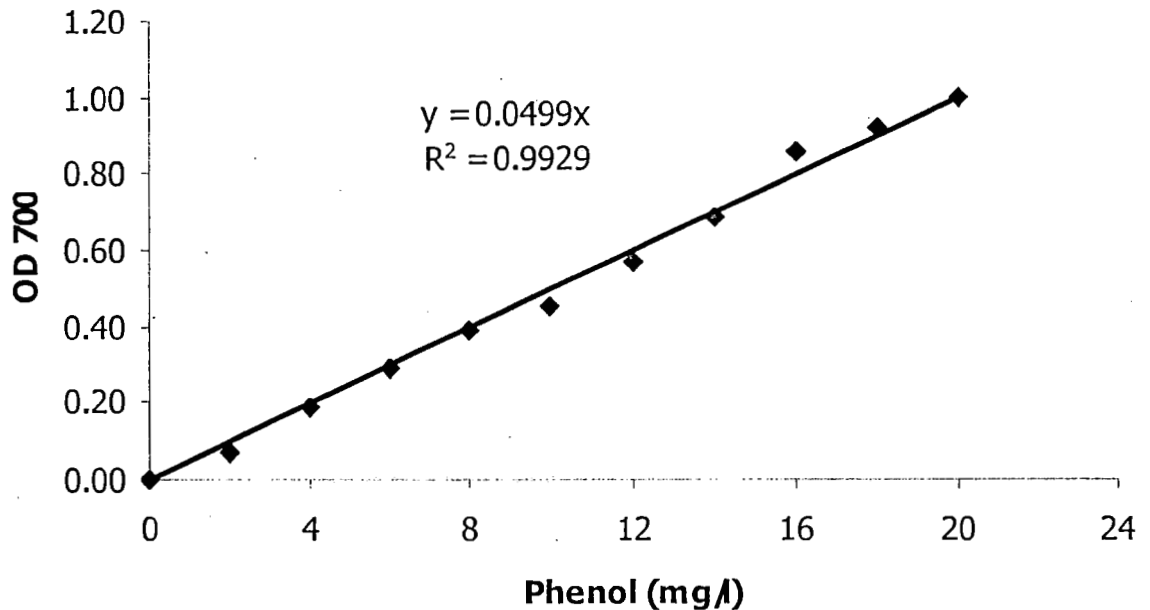
วิธีการ

- นำตัวอย่างน้ำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 นาที
- นำตัวอย่างสีที่ได้มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ความเจือจางที่เหมาะสม และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร โดยใช้ น้ำกลั่นเป็น blank
- เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

หน่วยสี (color units) = $C \times D$

C = ค่าสีที่อ่านได้จากกราฟมาตรฐาน

D = อัตราการเจือจาง



3. สารฟีนอล (Substances Reducing Folin's Phenol) (จินตนา (2541) ดัดแปลงจากวิธีการวิเคราะห์แทนนิน APHA AWWA and WEF, 1998)

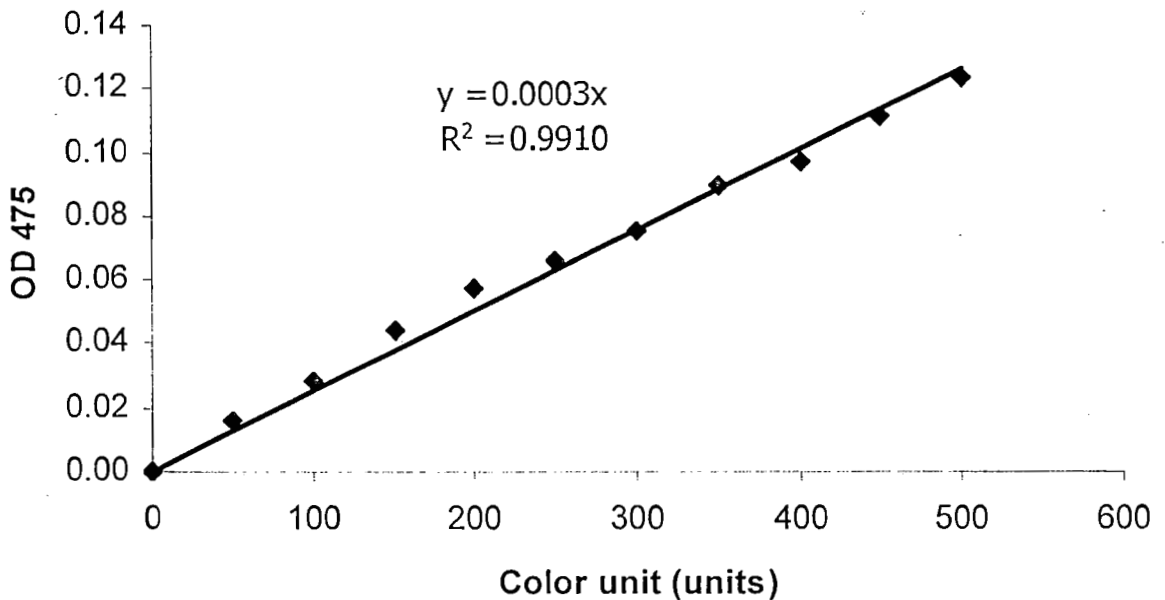
สารเคมี

- น้ำยาคาร์บอเนต-ทาร์เทรต : ละลาย $\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ปริมาณ 12 g ในน้ำกลั่นต้มเดือด 750 ml ทิ้งให้เย็นและปรับปริมาตรเป็น 1 L
- สารโฟลินส์ฟีนอล

วิธีการ

- นำตัวอย่างน้ำที่เจือจางเหมาะสมปริมาตร 5 ml
- เติมสารโฟลินส์ฟีนอล 0.1 ml
- เติมน้ำยาคาร์บอเนต-ทาร์เทรต 1.0 ml ทิ้งให้เกิดสี 30 นาที
- วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร โดยใช้ น้ำกลั่นเป็น blank
- เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

$$\text{ความเข้มข้นสารฟีนอล (mg/l)} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง} \times \text{อัตราค่าการเจือจาง}}{\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน}}$$



4. ปริมาณของแข็ง (Solids)

วิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐาน (APHA, 1998)

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ขามระเหย/ถ้วยกระเบื้อง (Crusible)
2. เครื่องอ่างไอน้ำ (water bath)
3. ตู้อบความร้อน (hot air oven)
4. เตาเผาอุณหภูมิสูง (muffle furnace)
5. ตู้ดูดความชื้น (desiccator)
6. เครื่องชั่งละเอียด
7. กระดาษกรองใยแก้ว (GF/C) เส้นผ่านศูนย์กลาง 4.7 เซนติเมตร
8. ชุดกรองสุญญากาศ
9. กระจกนาฬิกา (watch glass)

(ก) การวิเคราะห์ปริมาณของแข็งทั้งหมด (Total solids)

1. นำจานระเหยเข้าอบที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วนำไปทำให้เย็นในตู้ดูดความชื้น (desiccator) แล้วจึงนำมาชั่งน้ำหนักละเอียด 4 ตำแหน่ง บันทึกเป็น (B)
2. เลือกใช้ตัวอย่างน้ำปริมาตร 50 มล. แกว่งให้เข้ากันแล้วเทลงในชามระเหย จากนั้นนำไปตั้งบนเครื่องอังไอน้ำ
3. นำเข้าอบแห้งที่ อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วทำให้เย็นในตู้ดูดความชื้น จากนั้นนำมาชั่งน้ำหนักละเอียด 4 ตำแหน่ง บันทึกเป็น (A)

$$\text{ปริมาณของแข็งทั้งหมด (มก./ล.)} = \frac{(A-B) \times 10^6}{\text{ปริมาตรน้ำตัวอย่าง (มล.)}}$$

(ข) การวิเคราะห์ปริมาณของแข็งแขวนลอย (Suspended solids)

1. นำกระดาษกรอง Whatman 4.7 เซนติเมตร วางบนกระจกนาฬิกา อบที่อุณหภูมิ 103-105 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในตู้ดูดความชื้น นำมาชั่งละเอียด บันทึกเป็น (B) วางกระดาษกรองลงในกรวยบุชเนอร์ซึ่งต่อกับเครื่องดูดอากาศ ใช้น้ำกลั่นฉีดกระดาษให้เปียก แล้วจึงเปิดเครื่องดูดอากาศ เพื่อให้กระดาษกรองติดกับกรวย
2. เลือกใช้ตัวอย่างน้ำปริมาตร 15-20 มล. แกว่งตัวอย่างให้เข้ากันดีแล้วเทลงในกรวยบุชเนอร์ที่เปิดเครื่องดูดอากาศไว้แล้ว จากนั้นใช้น้ำกลั่นประมาณ 10 มล. กลั้วล้างสารที่ตกค้างในกระบอกตวง ปล่อยให้เครื่องดูดอากาศดูดจนกระดาษกรองแห้ง แล้วจึงเปิดสวิตช์ให้เครื่องทำงาน
3. นำกระดาษกรองวางบนกระจกนาฬิกา แล้วอบที่ 103-105 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทำให้เย็นในตู้ดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักละเอียด บันทึกเป็น (A)

$$\text{ปริมาณของแข็งแขวนลอย (มก./ล.)} = \frac{(A-B) \times 10^6}{\text{ปริมาตรน้ำตัวอย่าง (มล.)}}$$

(ค) การวิเคราะห์ปริมาณของแข็งคงตัว (Fixed suspended solids) และของแข็งแขวนลอยระเหย (VSS)

นำกระดามกรองที่ผ่านการวิเคราะห์หาปริมาณของแข็งแขวนลอย เฝาทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 550±50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วทิ้งไว้ให้เย็นในตู้อบความชื้น จากนั้นนำมาชั่งหาปริมาณสารที่เหลืออยู่

$$\text{ของแข็งคงตัว (มก./ล.)} = \frac{\text{น้ำหนักสารที่เหลืออยู่ (ก.)} \times 10^6}{\text{ปริมาตรน้ำตัวอย่าง (มล.)}}$$

ของแข็งแขวนลอยระเหย (มก./ล.) = ปริมาณของแข็งแขวนลอย - ปริมาณของแข็งคงตัว

หมายเหตุ

Mixed Liquor Volatile Suspended Solids (MLVSS) หมายถึง ปริมาณสารอินทรีย์ที่เป็นของแข็งที่ระเหยไปหลังจากนำไปเฝาทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส และเป็นตัวแทนของมวลจุลินทรีย์ในระบบบำบัด ใช้วิธีการวิเคราะห์เช่นเดียวกันกับการหาของแข็งแขวนลอยระเหย

5. ซีโอดี (Chemical Oxygen Demand, COD)

วิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐาน (APHA, 1998)

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. Erlenmeyer flask ขนาด 250 มล. คอเป็น ground-glass 24/40
2. Condenser ขนาด jacket 300 มม. มี ground-glass joint 24/40
3. Hot plate

สารเคมี

1. สารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมต
นำสาร $K_2Cr_2O_7$ อบให้แห้งที่ 103 องศาเซลเซียส แล้วปล่อยให้เย็นในตู้ดูดความชื้น จากนั้นชั่งมา 12.259 ก. ละลายในน้ำกลั่น เจือจางให้เป็น 1 ล.
2. สารละลายกรดซัลฟิวริก

เติม Ag_2SO_4 22 ก. ลงในขวดกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 2.5 ล. ปล่อยทิ้งไว้ 1-2 วัน เพื่อให้ผลึก Ag_2SO_4 ละลาย

3. mercuric sulfate

4. sulfamic acid

ใช้เมื่อมี nitrate ในตัวอย่างเท่านั้น ในอัตราส่วน 10 มก./1 มก. ในเตา

5. ferroin indicator solution

ละลาย 1,10-ฟีแอนทรอลีน monohydrate ($\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 1.485 ก. และ ferrous sulfate ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 695 มก. ในน้ำกลั่น แล้วเจือจางให้ได้ 100 มล.

6. สารละลายมาตรฐาน ferrous ammonium sulfate (FAS)

ละลาย $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 98 ก. ในน้ำกลั่น แล้วเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 20 มล. จากนั้นทำให้เย็น แล้วเจือจางให้ได้ 1 ล. หาความเข้มข้นที่แน่นอนทุกครั้งที่ใช้

วิธีวิเคราะห์

1. เตรียมตัวอย่างความเข้มข้นที่เหมาะสมปริมาตร 20 มล. ลงใน refluxing flask ขนาด 250 มล.
2. เติมผง HgSO_4 ประมาณ 0.4 ก. พร้อมด้วย glass bead
3. ค่อย ๆ เติมกรดซัลฟิวริก 5.0 มล. แล้วผสมให้เข้ากันดีจน HgSO_4 ละลายหมด ขณะผสมควรทำให้ของผสมเย็น เพื่อป้องกันไม่ให้อาหารจำพวกระเหยง่าย (volatile material) สูญหายไป
4. เติมสารละลายมาตรฐานโปรแตสเซียมไดโครเมต 10.0 มล. ผสมให้เข้ากันจนดี
5. ค่อย ๆ เติมกรดซัลฟิวริก อีก 25.0 มล. ขณะเติมควรแกว่งของเหลวให้ผสมเข้ากันจนดี แล้วจึงติดตั้งฟลask เข้ากับท่อหล่อเย็น เปิดน้ำที่ใช้หล่อเย็น จากนั้นเปิดเตาให้ความร้อน ใช้ปิเปตเกอร์เล็ก ๆ ปิดปลายเปิดของท่อหล่อเย็นไว้เพื่อป้องกันสิ่งปนเปื้อนจากภายนอก
6. ทำการรีฟลักซ์นาน 2 ชั่วโมง แล้วจึงทิ้งไว้ให้เย็น
7. เทน้ำกลั่นจากปลายบนของท่อหล่อเย็นเพื่อล้างสิ่งตกค้างผสมลงในฟลask
8. ถอดฟลask ออก เจือจางของเหลวให้เป็น 150 มล.
9. เมื่อเย็นลงเท่าอุณหภูมิห้องแล้ว นำไปไตเตรตด้วยสารละลายมาตรฐาน FAS โดยเติมสารละลาย ferroin 2-3 หยด เป็นอินดิเคเตอร์ ซึ่งจุดยุติสังเกตได้จากสารละลายจะเปลี่ยนสีจากเขียวอมฟ้าเป็นสีน้ำตาลแดงทันที โดยให้จุดบั้นที่กปริมาตร FAS ที่ทำให้สารละลายเปลี่ยนสีเป็นครั้งแรกในการนำไปคำนวณเพื่อหาค่าซีโอดี
10. แปลงค่าตามขั้นตอนทุกประการ

$$\text{ซีโอดี (มก./ล.)} = \frac{(A-B) \times \text{ความเข้มข้นของ FAS} \times 8000}{\text{ปริมาตรตัวอย่างน้ำเสีย (มล.)}}$$

6. ปริมาณเจลดาร์ลไนโตรเจน (Total Kjeldahl-Nitrogen)

วิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐาน (APHA, 1998)

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ชุดย่อยโปรตีน ยี่ห้อ Gerhardt รุ่น Turbosog
2. ชุดกลั่นตามวิธีวิเคราะห์แอมโมเนียไนโตรเจน
3. เครื่องวัดพีเอช

สารเคมี

1. HgSO_4 solution
ละลาย red mercuric oxide (HgO) 8 ก. ในกรดซัลฟิวริก 6 โมลาร์ 100 มล.
2. Digestion reagent
3. ละลาย K_2SO_4 134 ก. ในน้ำกลั่น 650 มล. และกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 200 มล. เติมน้ำ HgSO_4 solution จากข้อ 1 ปริมาตร 25 มล. คนให้เข้ากันดี ปรับปริมาตรเป็น 1 ล. เก็บที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เพื่อป้องกันการตกผลึก
4. Sodium hydroxide-sodium thiosulfate reagent
ละลาย NaOH 500 ก. และ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 25 ก. ในน้ำกลั่น 1 ล.
5. สารเคมีที่ใช้ในวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจน

วิธีวิเคราะห์

1. ใช้ตัวอย่าง 300 มล. หรือเจือจางให้เป็น 300 มล. ปรับพีเอชให้เป็นกลาง
2. เติมน้ำ digestion reagent 50 มล.
3. นำฟลาสก์ตัวอย่างไปติดตั้งเข้ากับชุดย่อย ต้มจนปริมาตรตัวอย่างลดลงเหลือ 25-50 มล. จะเห็นควันสีขาวทึบ (อาจเป็นสีดำกรณีที่มีตัวอย่างมีสารประกอบอินทรีย์ปริมาณมาก) ต้มต่ออีก 30 นาที จะได้ของเหลวใส

370932

4. หลังจากย่อยเสร็จ ปล่อยให้เย็นลง เจือจางด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 300 มล. เติม phenolphthalein 0.5 มล. ผสมให้เข้ากันดี

5. เอียงฟลาสก์ แล้วค่อย ๆ เท Sodium hydroxide-sodium thiosulfate reagent ลงไป จะได้ alkaline layer ที่บริเวณก้นฟลาสก์

6. นำฟลาสก์เข้าติดตั้งกับชุดกลั่นที่เตรียมสำหรับวิเคราะห์แอมโมเนียไนโตรเจน จากนั้นแกว่งฟลาสก์ให้สารทั้งสองชั้นผสมเข้ากันดี ถ้าตัวอย่างไม่เป็นสีชมพูให้เติม Sodium hydroxide-sodium thiosulfate reagent อีกจนได้สีชมพู อาจมีตะกอนดำของ HgS เกิดขึ้น

7. กลั่นตามวิธีวิเคราะห์แอมโมเนียไนโตรเจน จนได้ distillate ประมาณ 200 มล. แล้วนำไปไทเทรต