



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาการย่อยสลายสารอินทรีย์ประเภทเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน โดยใช้ถัง  
ปฏิกรณ์ชีวภาพ

Development of degradation in cellulose hemicellulose and lignin by using  
bioreactor

รศ. ดร. วิทวัส แจ่มเอียด

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้

(จากเงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562

มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ.....

สัญญาเลขที่ 20/2562

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาการย่อยสลายสารอินทรีย์ประเภทเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน โดยใช้  
ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

Development of degradation in cellulose hemicellulose and lignin by using  
bioreactor

รศ. ดร. วิทวัส แจ่มเอียด

ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์

มหาวิทยาลัยบูรพา

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปี  
งบประมาณ พ.ศ. 2562 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา  
20/2562

## บทคัดย่อ

การพัฒนาการย่อยสลายสารอินทรีย์ประเภทเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนินโดยใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ มีความสำคัญอย่างยิ่งเนื่องจากเป็นระบบที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมซึ่งในปัจจุบันปัญหาด้านสิ่งแวดล้อมมีมากขึ้นเรื่อยๆตามความต้องการของประชากรที่เพิ่มขึ้น ดังนั้นการใช้ระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพจึงเป็นอีกตัวเลือกหนึ่งที่สามารถแก้ปัญหาทางสิ่งแวดล้อมและไม่ส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศน์ ซึ่งจากงานวิจัยการพัฒนากระบวนการบำบัดน้ำเสียโรงงานผลิตกระดาษโดยการตรึงเซลล์จุลินทรีย์บนเม็ดตรึงอัลจินเตในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแพคเบตเพื่อกำจัดเซลลูโลสในน้ำเสีย ที่ทางทีมผู้วิจัยได้วิจัยไว้นั้นสามารถแก้ปัญหาทางสิ่งแวดล้อมในการกำจัดสารอินทรีย์ประเภทเซลลูโลสได้เป็นอย่างดีแต่พบว่าในน้ำเสียนั้นมีองค์ประกอบของสารอินทรีย์ที่มากกว่าเซลลูโลสทางผู้วิจัยจึงนำงานวิจัยมาพัฒนาเติม โดยการย่อยสลายสารจำพวกเฮมิเซลลูโลสและลิกนินเพิ่มอีกสองชนิด ซึ่งสารอินทรีย์สองชนิดนี้มักอยู่เป็นกลุ่มและรวมตัวกับเซลลูโลส เรียกว่า สารลิกโนเซลลูโลส อีกทั้งจุลินทรีย์ที่เป็นแบคทีเรียที่ได้ทำการค้นหาไว้ในงานวิจัยก่อนหน้านั้น ไม่สามารถรองรับน้ำเสียที่มีสารลิกโนเซลลูโลสเข้มข้นได้ ทางผู้วิจัยจึง เปลี่ยนมาใช้จุลินทรีย์ในกลุ่มของรา โดยมีจุลินทรีย์ *Phanerocheate chysosporium* ซึ่งเป็นราที่สามารถย่อยสลายลิกนินได้อย่างมีประสิทธิภาพ ร่วมกับจุลินทรีย์ *Trichoderma reesei* ซึ่งมีศักยภาพในการย่อยสลายได้ทั้งเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงกว่าจุลินทรีย์ที่เป็นแบคทีเรีย อีกทั้งยังสามารถอาศัยอยู่ร่วมกันได้ ผู้วิจัยได้ทำการเลี้ยงจุลินทรีย์ร่วมกันสองชนิดคือ *Phanerocheate chysosporium* ร่วมกับ *Trichoderma reesei* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar พบว่าจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดสามารถอาศัยอยู่ร่วมกันได้และไม่สร้างสารที่เป็นปฏิปักษ์ต่อกัน จากนั้นนำจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดไปบำบัดน้ำเสียในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบกะเพื่อกำหนดสภาวะเหมาะสมสำหรับการใช้จุลินทรีย์ร่วมกัน พบว่าการใส่จุลินทรีย์ *Phanerocheate chysosporium* ก่อนใส่จุลินทรีย์ *Trichoderma reesei* เป็นเวลา 72 ชั่วโมงนั้น ส่งเสริมให้จุลินทรีย์ *Trichoderma reesei* ทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ ระยะเวลาในการย่อยสลายเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสหลังจากการเติมจุลินทรีย์ *Trichoderma reesei* อยู่ที่ 96 ชั่วโมง จึงกำหนดเวลาสำหรับการบำบัดน้ำเสียในปฏิกรณ์แบบ CSTR ให้มีสภาวะเช่นเดียวกับถังปฏิกรณ์แบบกะ ซึ่งได้ผลการทดลอง ที่ 96 ชั่วโมงพบว่า สามารถลดปริมาณเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสได้ อีกทั้งสามารถย่อยสลายลิกนินได้ 73 เปอร์เซ็นต์ โดยสรุปในน้ำเสียตัวอย่างเริ่มต้น มีปริมาณของสารแขวนลอย เริ่มต้น 2751 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีค่า COD 10,667 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งหลังจากการบำบัดน้ำเสียของทีมผู้วิจัยแล้วสามารถลดค่า COD เหลือเพียง 4% (533 มิลลิกรัมต่อลิตร)

## Abstract

The development of organic-substance degradation, cellulose hemicellulose and lignin, by using bioreactor is promising the implementing environmentally friendly practices. Nowadays the environmental problem is increasing proportional with the increasing of human needed, so the biological waste water treatment is an option to resolve the problem and not affect to the ecosystem. From our previous research project was to develop the wastewater treatment of paper company by using bacterial immobilized in the alginate beads in packed bed bioreactor to remove cellulose in wastewater. These project was successful to remove the organic substance in term of cellulose. But in the real wastewater from industry is contained other organic substances beside cellulose which are hemicellulose and lignin. The cellulose hemicellulose and lignin often gather and are called lignocellulose. Moreover, our bacteria from previous research did not have the ability to remove lignocellulose. So, we decided to change the method from our bacteria to fungi by using *Phanerocheate chysosporium* which has the acceptably ability to remove lignin and using co-culture techniques with *Trichoderma reesei* which has the fine ability to degrade both cellulose and hemicellulose. Both fungi not only have the ability to remove lignocellulose better than bacteria but also can culture together. *Phanerocheate chysosporium* and *Trichoderma reesei* were co-culture in the potato dextrose agar and found that both can live together and not creating any substances that are antagonistic one another. Furthermore, the co-culture fungi were used in the batch bioreactor to find the suitable condition. We found that by culturing *Phanerocheate chysosporium* 72 hours before *Trichoderma reesei* increase the *Trichoderma reesei* activity. The best time-point to remove the cellulose and hemicellulose after add *Trichoderma reesei* was 96 hours. Then, we used the previous batch bioreactor condition in the CSTR bioreactor. In 96 hours, the cellulose hemicellulose and lignin were decreased especially lignin was 73% removed. From the initial wastewater we found that total suspension is 2751 mg/L and COD is 10,667 mg/L, after treated we can decrease the COD level as low as 4% (533 mg/L).

## สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูปภาพ	ฉ
1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
2. วัตถุประสงค์	5
3. ขอบเขตของการทำโครงการวิจัย	5
4. ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวความคิดของการวิจัย	6
5. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	31
6. วิธีการทดลอง	31
7. ผลการทดลองและอภิปรายผล	43
8. สรุปผลการทดลอง	69
9. ข้อเสนอแนะ	69
10. ผลผลิต (Output)	71
บรรณานุกรม	72
ภาคผนวก	74
ประวัตินักวิจัยและคณะ พร้อมหน่วยงานสังกัด	83

## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 องค์ประกอบของเซลล์โลส เฮมิเซลล์โลส และลิกนินในวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร	8
ตารางที่ 2 มาตรฐานคุณภาพน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมและนิคมอุตสาหกรรม	13
ตารางที่ 3 วิธีการบำบัดสารลิกโนเซลลูโลส	17
ตารางที่ 4 ตารางจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายลิกนิน	26
ตารางที่ 5 อัตราการย่อยสลายลิกนินในจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ	27
ตารางที่ 6 ตารางจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลล์โลส	27
ตารางที่ 7 อัตราการย่อยสลายเซลล์โลสในจุลินทรีย์ชนิดต่างๆในสภาวะใช้อากาศ	28
ตารางที่ 8 ปริมาณตัวอย่างและรีเอเจนต์ที่ใช้สำหรับขนาดต่างๆของภาชนะที่ใช้ในการย่อยสลาย	42
ตารางที่ 9 แสดงค่าปริมาณน้ำตาลที่วัดได้โดยวิธี DNS ตอนที่ 1	46
ตารางที่ 10 แสดงค่าปริมาณน้ำตาลที่วัดได้โดยวิธี DNS ตอนที่ 2	47
ตารางที่ 11 ปริมาณน้ำตาลที่เกิดขึ้น	48
ตารางที่ 12 ตัวอย่างน้ำเสียที่ย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์ <i>Phanerocheate chysosporium</i>	62
ตารางที่ 13 ตัวอย่างน้ำเสียที่ย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์ <i>Trichoderma reesei</i>	63
ตารางที่ 14 ตัวอย่างน้ำเสียที่ย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์ <i>P. chysosporium</i> และ <i>T. reesei</i>	64
ตารางที่ 15 การวิเคราะห์ค่าซีไอดีของน้ำเสียของการใช้จุลินทรีย์ <i>Phanerocheate chysosporium</i>	65
ตารางที่ 16 การวิเคราะห์ค่าซีไอดีของน้ำเสียของการใช้จุลินทรีย์ <i>Trichoderma reesei</i>	66
ตารางที่ 17 การวิเคราะห์ค่าซีไอดีของน้ำเสียของการใช้จุลินทรีย์ร่วมกันสองชนิด	67
ตารางที่ 1ก แสดงความเข้มข้นของสารลิกโนเซลลูโลสสำหรับกราฟมาตรฐานร้อยละของลิกนิน	76

## สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 มลพิษจากขั้นตอนต่างๆของการผลิตกระดาษ	2
รูปที่ 2 ลักษณะโครงสร้างของเส้นใย	6
รูปที่ 3 โครงสร้างเซลโลไบโอส (cellobiose)	7
รูปที่ 4 องค์ประกอบทางเคมีของเฮมิเซลลูโลส	9
รูปที่ 5 ลักษณะโครงสร้างของลิกนิน	11
รูปที่ 6 หน่วยพื้นฐานของลิกนิน	11
รูปที่ 7 Cellulose degradation pathway	19
รูปที่ 8 กลไกการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส	20
รูปที่ 9 Hemicellulose degradation pathway	21
รูปที่ 10 Lignin degradation pathway	22
รูปที่ 11 ประเภทและลักษณะของจุลินทรีย์	23
รูปที่ 12 แสดงประเภทของเชื้อรา	25
รูปที่ 13 ลักษณะการเลี้ยงจุลินทรีย์ร่วมกัน	29
รูปที่ 14 แสดงการอยู่ร่วมกันของจุลินทรีย์	30
รูปที่ 15 ถึงปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเติมอากาศไหลต่อเนื่อง	30
รูปที่ 16 ลักษณะการเลี้ยงจุลินทรีย์ร่วมกัน	34



รูปที่ 17 แสดงแผนผังและการต่ออุปกรณ์สำหรับถังปฏิกรณ์แบบกะ	36
รูปที่ 18 แสดงแผนผังและการต่ออุปกรณ์สำหรับถังปฏิกรณ์แบบเติมอากาศไหลต่อเนื่อง	37
รูปที่ 19 แผนผังการดำเนินการเลี้ยงจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเติมอากาศไหลต่อเนื่อง	38
รูปที่ 20 ตัวอย่างวงใสที่เกิดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์	44
รูปที่ 21 กราฟแสดงความกว้างของวงใสที่เกิดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ ณ วันที่ 1	44
รูปที่ 22 กราฟแสดงความกว้างของวงใสที่เกิดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ ณ วันที่ 2	45
รูปที่ 23 กราฟเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เกิดจากการย่อยสลายเซลลูโลส	49
รูปที่ 24 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์ CDB4	50
รูปที่ 25 การวิเคราะห์อัตราการย่อยสลายเซลลูโลสโดยวิธี TLC	51
รูปที่ 26 ค่าซีไอดีของการบำบัดแบบมีและไม่มีจุลินทรีย์ CDB4	53
รูปที่ 27 ค่าพีเอชก่อนและหลังการบำบัด	53
รูปที่ 28 ลักษณะของจุลินทรีย์ <i>Phanerocheate chysosporium</i>	55
รูปที่ 29 ลักษณะของจุลินทรีย์ <i>Trichoderma reesei</i>	55
รูปที่ 30 การอยู่ร่วมกันของจุลินทรีย์สองชนิด	56
รูปที่ 31 แสดงลายละเอียดถังปฏิกรณ์แบบกะ	58
รูปที่ 32 แสดงลายละเอียดถังปฏิกรณ์แบบเติมอากาศไหลต่อเนื่อง	59
รูปที่ 33 แผนผังการทำงานของถังปฏิกรณ์แบบเติมอากาศไหลต่อเนื่อง	60
รูปที่ 34 ลักษณะของจุลินทรีย์นอนกันระหว่างอยู่ในถังพัก	60

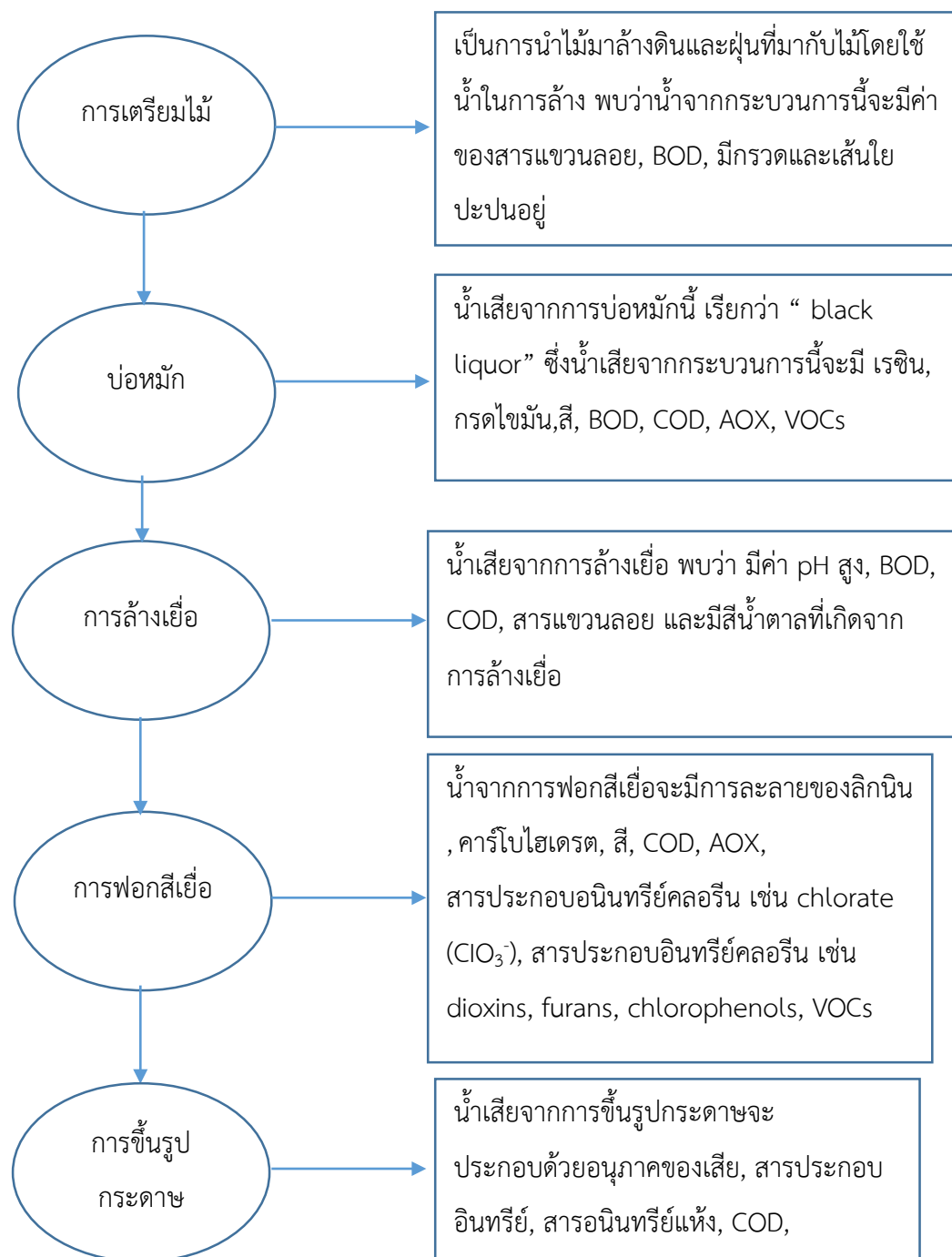
รูปที่ 35 แสดงชนิดของคาร์โบไฮเดรตโดยวิธีการแยกสารโดยใช้ Thin-layer chromatography	61
รูปที่ 36 กราฟแสดงการย่อยสลายลิกนินโดยใช้จุลินทรีย์ <i>Phanerocheate chysosporium</i>	63
รูปที่ 37 กราฟแสดงการย่อยสลายลิกนินโดยใช้จุลินทรีย์ <i>Trichoderma reesei</i>	64
รูปที่ 38 กราฟแสดงการย่อยสลายลิกนินโดยใช้จุลินทรีย์ร่วมกันสองชนิด	65
รูปที่ 39 แสดงค่า COD จากากการเก็บผลทุก 72 ชั่วโมงของการใช้จุลินทรีย์ <i>P.chysosporium</i>	66
รูปที่ 40 แสดงค่า COD จากากการเก็บผลทุก 72 ชั่วโมงของการใช้จุลินทรีย์ <i>T.reesei</i>	67
รูปที่ 41 แสดงค่า COD จากากการเก็บผลทุก 72 ชั่วโมงของการใช้จุลินทรีย์ร่วมกันสองชนิด	68
รูปที่ 1ก แสดงน้ำหนักรับการอบสารแขวนลอยทั้งหมด	74
รูปที่ 2ก แสดงกราฟมาตรฐานในการคำนวณปริมาณลิกนิน	77
รูปที่ 1ข การเตรียมไม้สำหรับทำน้ำเสียสังเคราะห์	78
รูปที่ 2ข ลักษณะการเลี้ยงจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดด้วยกันเพื่อทดสอบการอาศัยอยู่ร่วมกัน	78
รูปที่ 3ข ทดสอบปริมาณลิกนินด้วยเครื่อง Spectrophotometer	79
รูปที่ 4ข การทดสอบหาชนิดน้ำตาลโดยวิธีแยกสาร Thin-layer chromatography	79
รูปที่ 5ข การสกัดสารแทรกเพื่อหาร้อยละของเฮมิเซลลูโลสในเนื้อไม้ยางพารา	80
รูปที่ 6ข การเตรียมอาหาร potato dextrose agar สำหรับเลี้ยงจุลินทรีย์	80
รูปที่ 7ข ลักษณะของจุลินทรีย์ <i>Phanerocheate chysosporium</i> ในอาหารเหลว	81
รูปที่ 8ข ลักษณะของจุลินทรีย์ <i>Trichoderma reesei</i> ในอาหารเหลว	81
รูปที่ 9ข การเตรียมตัวอย่างสำหรับการวัดค่า COD	82

## 1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ในปัจจุบันประเทศไทยมีอัตราการเติบโตในภาคอุตสาหกรรมจำนวนมาก และยังคงมีอัตราที่เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง หนึ่งในนั้นก็คือระเบียบเศรษฐกิจภาคตะวันออกซึ่งเป็นเขตเศรษฐกิจเพื่อขับเคลื่อนอนาคต มีแผนการในการส่งเสริม 10 อุตสาหกรรมใน 3 จังหวัดทางภาคตะวันออกได้แก่ ระยอง ชลบุรี ฉะเชิงเทรา และขยายครอบคลุมบางส่วนของจังหวัดในภาคตะวันออก ซึ่งมีผลทำให้เกิดการขยายตัวอย่างรวดเร็วและมีการตั้งโรงงานเป็นจำนวนมาก โดยเป็นไปตามนโยบายของ Thailand 4.0 ที่มีการปฏิวัติอุตสาหกรรมให้มีความก้าวหน้ายิ่งขึ้น แต่ในขณะที่อุตสาหกรรมกำลังก้าวหน้าเติบโตอย่างแพร่หลายนั้น สิ่งก็ตามมาจากการเติบโตของอุตสาหกรรมก็คือปัญหาทางด้านสิ่งแวดล้อม เช่น ทางด้านอากาศ โรงงานอุตสาหกรรมใช้กระบวนการเผาไหม้ในการผลิต แล้วปล่อย ของเสียออกสู่สิ่งแวดล้อมภายนอก ทางภาคพื้นดิน โรงงานต้องขนของเสียภายในโรงงานออกสู่ภายนอกไปยังหลุมฝังกลบของเสียอันตรายหรือแลนด์ฟิลล์ (Landfill) และอีกด้านที่เป็นปัญหายุ่งยากกับการเจริญเติบโตทางด้านอุตสาหกรรมมาอย่างยาวนานนั้นก็คือ ปัญหาด้านน้ำเสียเนื่องจากในประเทศไทยมีอุตสาหกรรมที่ทำให้เกิดปัญหาด้านสิ่งแวดล้อมด้านน้ำเสียมากมาย เช่น อุตสาหกรรมสี ย้อม อุตสาหกรรมผลิตสารเคมี อุตสาหกรรมฟอกเครื่องหนัง อุตสาหกรรมอาหาร และหนึ่งในนั้นคือ อุตสาหกรรมการผลิตกระดาษ น้ำเสียที่ออกจากอุตสาหกรรมทางด้านการผลิตกระดาษจะส่งปัญหาด้านน้ำเน่าเสียเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งเมื่อไม่นานมานี้มีการร้องเรียนปัญหาน้ำเสียจากโรงงานผลิตกระดาษในประเทศไทย โดยน้ำเสียของโรงงานผลิตกระดาษได้เกิดการรั่วไหลออกจากโรงงานเป็นบริเวณกว้างและ ส่งกลิ่นเหม็นอย่างรุนแรงสร้างความเดือดร้อนให้ประชาชนที่อาศัยอยู่ใกล้เคียงกับพื้นที่ของโรงงานผลิตกระดาษ เนื่องจากอุตสาหกรรมกระดาษเป็นอุตสาหกรรมที่ใช้น้ำในการเดินกระบวนการผลิตมากอย่างมาก (ไทยรัฐออนไลน์ 29 ก.ค. 2556) ซึ่งน้ำที่ใช้ในกระบวนการผลิตกระดาษมีหลายกระบวนการที่ต้องใช้น้ำในการผลิต เช่น การเตรียมไม้ การล้างเยื่อ การฟอกสี การทำความสะอาดเยื่อกระดาษ จนไปถึงกระบวนการขึ้นแผ่นรูปเป็นกระดาษอย่างเสร็จสมบูรณ์ กระบวนการเหล่านี้ล้วนใช้น้ำในเดินกระบวนการทั้งสิ้น ซึ่งเป็นที่ทราบกันว่าในเนื้อไม้จะมีสารประกอบจำพวกเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และ ลิกนิน เป็นส่วนประกอบหลัก อีกทั้งสารเคมีต่างๆที่ใช้ในกระบวนการผลิตกระดาษ เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ที่ช่วยกำจัดลิกนินในเนื้อไม้ซึ่งมีสีน้ำตาลคลอรีน (Cl) ซึ่งช่วยให้เยื่อมีความสว่าง เป็นต้น และสารเคมีอื่นๆที่ใช้ในกระบวนการผลิต โดยน้ำที่มีส่วนประกอบของสารอินทรีย์และสารเคมี เหล่านี้จำนวนมากจะก่อให้เกิดปัญหาน้ำเน่าเสีย โดยส่งผลให้ค่า BOD (Biochemical Oxygen Demand) ซึ่งเป็นค่าปริมาณออกซิเจนที่จุลินทรีย์ต้องการใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ที่มีอยู่ในน้ำ และค่า COD (Chemical Oxygen Demand) เป็นค่าที่บอกปริมาณออกซิเจนทั้งหมดที่ต้องการใช้เพื่อออกซิเดชันสารอินทรีย์ในน้ำให้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำมีค่าสูงมาก ค่าความกระด้าง (Hardness) ค่า VOC (Volatile Organic Compounds) และค่าพารามิเตอร์ต่างๆที่ส่งผลให้เกิดน้ำเสีย โดยทางกระทรวงอุตสาหกรรมอนุญาตให้ปล่อยน้ำลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติได้นั้นต้องมีค่า BOD ไม่เกิน 20 mg/l

และค่า COD ไม่เกิน 120 mg/l ค่าความกระด้าง ไม่เกิน 300 mg/l เป็นต้น น้ำจากกระบวนการผลิตกระดาษ จะถูกส่งไปบำบัดที่บ่อบำบัดของโรงงาน

จากการศึกษาปัญหาของน้ำเสียจากโรงงานผลิตกระดาษพบว่าทุกขั้นตอนของการผลิตกระดาษก่อให้เกิดมลภาวะทางน้ำดังต่อไปนี้



รูปที่ 1 มลพิษจากขั้นตอนต่างๆของการผลิตกระดาษ

ที่มา :ดัดแปลงจาก Pokhrel at el., 2004

เทคโนโลยีต่างๆ ที่ใช้การบำบัดน้ำเสียจากอุตสาหกรรมกระดาษมักจะมุ่งเน้นไปในทางที่จะปรับค่า pH ของน้ำเสีย ลดปริมาณสารแขวนลอย (suspended solids, SS) เช่น เส้นใย นอกจากนี้ในกรณีที่ใช้เศษกระดาษเก่าเป็นวัตถุดิบในการผลิตเยื่อ จะมีน้ำเสียที่เกิดจากการล้างหมึกของเศษกระดาษเดิม (de-inking process) ซึ่งน้ำเสียส่วนนี้จะมีค่าของสารแขวนลอย และความสกปรกในรูป BOD และ COD สูง โดยน้ำเสียที่เกิดขึ้นจากกระบวนการผลิตกระดาษส่วนหนึ่งได้มีการนำกลับไปใช้ใหม่ตามลำดับความสะอาด

จากงานวิจัยที่เกี่ยวข้องเกี่ยวกับปัญหาน้ำเสียจากโรงงานผลิตกระดาษ Viraraghavan และคณะ (Viraraghavan et al., 2004) พบว่า มลภาวะส่วนใหญ่มาจากกระบวนการผลิตต่างๆ โดยเริ่มจากขั้นตอน ดังนี้ การเตรียมไม้ การผลิตเยื่อ การล้างเยื่อ การกรอง การล้างทำความสะอาด การฟอกสี และการเข้าเครื่องผลิตกระดาษ รวมไปถึง การเคลือบแบบต่างๆ จากกระบวนการผลิตเยื่อกระดาษเป็นกระบวนการที่สร้างน้ำเสียที่สกปรกมากที่สุด ซึ่งเป็นการผลิตเยื่อโดยใช้วิธีทางเคมี โดยการใส่สารละลายเคมี ที่อุณหภูมิและความดันสูง เพื่อให้ไม้แตกออกมาเป็นเส้นใย โดยผลผลิตที่ได้ประมาณ 40-50 % สารเคมีที่ใช้ คือ สารจำพวกแอลคาไลน์ และ กรด โดยน้ำเสียจากการผลิตเยื่อนี้จะประกอบไปด้วย เศษไม้ และสารละลายต่างๆ ที่เป็นองค์ประกอบของไม้ ซึ่งการบำบัดจะใช้การบำบัดแบบผสมผสานระหว่างการบำบัดโดยใช้ จุลินทรีย์ที่ใช้อากาศ และไม่ใช้อากาศ พบว่ามีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารอินทรีย์ที่ละลายน้ำได้ นอกจากนี้ยังสามารถกำจัดสี โดยการใช้ออกซิเจน การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันและโอโซนเนชันของสารเคมี และกำจัดสารประกอบประเภทคลอรีนให้ลดลงได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยวิธีการดูดซับโดยเทคนิคการใช้เมมเบรน

นอกจากนี้การบำบัดน้ำเสียจากโรงงานผลิตกระดาษโดยใช้วิธีการดูดซับโดยเมมเบรนแล้ว ยังพบว่าการนำสารโพลีเมอร์ประจุบวกมาสร้างตะกอนสามารถช่วยลดค่า COD ในน้ำเสียได้โดยคิดเป็นร้อยละ 87-90 (สินีนานู ทิพย์ดนตรี, 2543) และมีการใช้เทคโนโลยีสะอาดมาใช้ในการผลิตเยื่อกระดาษเพื่อลดปัญหาน้ำเสียที่เกิดจากการกระบวนการผลิตโดยมีการนำเทคโนโลยีทางเอนไซม์และกระบวนการทางเอนไซม์มาใช้ เช่น กระบวนการเยื่อกระดาษออกจากเนื้อไม้จะใช้เอนไซม์ Xylanase มาแทนการล้างด้วยน้ำเพียงครั้งเดียว พบว่าสามารถกำจัดเยื่อกระดาษออกได้ง่ายและลดปริมาณการใช้น้ำและที่สำคัญลดปริมาณสารเคมีที่ใช้ด้วย (ศิริรัตน์ ศิริพรวิศาล, 2010)

จากปัญหาที่ได้อธิบายและเทคนิคการกำจัดอินทรีย์ที่ปะปนอยู่ในน้ำเสีย ทางผู้วิจัยจึงได้คิดหาแนวทางเพื่อพัฒนาการย่อยสลายสารอินทรีย์ประเภท ลิกโนเซลลูโลสให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม โดยมีแนวคิดจากงานวิจัยของ J. Moore et al., 2001 ซึ่งได้ระบุว่า ความเข้มข้นของลิกนินซึ่งเป็นองค์ประกอบของสารลิกโนเซลลูโลสที่มีอยู่ในเนื้อไม้และผนังเซลล์มีปริมาณมากเท่าไร ยิ่งทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารอินทรีย์ประเภทเส้นใย (เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส) ลดลงตามมาด้วยและ

จากงานวิจัย ซึ่งเป็นจุดกำเนิดในแนวคิดของการบำบัดน้ำเสียประเภทลิกโนเซลลูโลส ซึ่งน้ำเสียทางการเกษตรจะมีสารประกอบเหล่านี้อยู่มากในน้ำเสีย

จากงานวิจัยที่ทางผู้วิจัยได้ทำไว้ เรื่อง การพัฒนากระบวนการบำบัดน้ำเสียโรงงานผลิตกระดาษโดยการตรึงเซลล์จุลินทรีย์บนเม็ดตรงอัลจิเนตในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแพคเบตเพื่อกำจัดเซลลูโลสในน้ำเสียซึ่งมีจุลินทรีย์ทั้งหมด 8 ชนิดที่เก็บตัวอย่างมาจากบ่อบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพของโรงงานผลิตกระดาษที่มีความสามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ดี โดยเฉพาะจุลินทรีย์ CDB6 สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับจุลินทรีย์ตัวอื่นๆ เนื่องจากสามารถย่อยสลายอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของเซลลูโลสได้มากที่สุดแต่เมื่อนำไปทดสอบโดยวิธี DNS จึงพบว่า จุลินทรีย์ CBD4 สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยเซลลูโลสได้ดีกว่า CBD6 จึงใช้จุลินทรีย์ CBD4 เป็นตัวแทนในการย่อยสลายน้ำเสียจากโรงงานผลิตกระดาษ ซึ่งสามารถลดค่า COD จาก 1171 เหลือ 267 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งถือว่าเป็นจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการกำจัดสารอินทรีย์ได้อย่างดี แต่สิ่งที่ทางผู้วิจัยพบระหว่างทำการทดลองคือ การย่อยสลายเพียง เซลลูโลสนั้น ไม่สามารถลดค่าพารามิเตอร์ได้อย่างดีที่สุดและสีของน้ำเสียที่ออกมาแล้วยังคงมีสีเหลืองออกน้ำตาล จึงได้มีแนวคิดที่จะลดสารอินทรีย์ชนิดอื่นที่อยู่ด้วย นั่นก็คือ เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ซึ่งลิกนินเป็นตัวการสำคัญทำให้น้ำมีสีดำหรือน้ำตาลและย่อยสลายได้ยากในธรรมชาติ (Aldison et al. (2005)) หากทำการกำจัด สารลิกโนเซลลูโลสซึ่งเป็นสารที่ประกอบด้วยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนิน ออกพร้อมกันทั้งหมด จะทำให้น้ำเสียมีคุณภาพที่ดีขึ้นกว่าการกำจัดเซลลูโลสเพียงชนิดเดียว นอกจากนี้ยังเพิ่มศักยภาพให้สามารถใช้งานได้ใกล้เคียงกับระบบจริงของโรงงานมากยิ่งขึ้น โดยใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ แบบถังเติมอากาศหมุนวน (Air mixed flow bioreactor) ที่สามารถประยุกต์ใช้งานได้ใกล้เคียงกับระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงาน

งานวิจัยนี้ผู้วิจัยจึงทำการทดลองในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเติมอากาศหมุนวนซึ่งจะมีจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารอินทรีย์ร่วมกัน 2 ชนิดระหว่าง จุลินทรีย์ *Phanerochaete chrysosporium* กับ *Trichoderma reesei* เนื่องจาก จุลินทรีย์เดิมซึ่งเป็นแบคทีเรียมีกิจกรรมการย่อยสลายที่ต่ำ ความคงทนของเซลล์ที่มีความแข็งแรงน้อยกว่าจุลินทรีย์ประเภทเชื้อรา และจุลินทรีย์ที่หาได้จากบ่อบำบัดทางชีวภาพนั้นไม่สามารถย่อยสลายลิกนินและเฮมิเซลลูโลส โดยจุลินทรีย์ *Phanerochaete chrysosporium* มีคุณสมบัติในการย่อยสลายลิกนิน ส่วนจุลินทรีย์ *Trichoderma reesei* มีคุณสมบัติในการย่อยสลายได้ทั้งเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส อีกทั้งจุลินทรีย์ CBD4 ซึ่งเป็นแบคทีเรียไม่สามารถอาศัยอยู่ร่วมกับเชื้อรา งานวิจัยนี้จึงใช้จุลินทรีย์ที่เป็นเชื้อรา 2 ชนิดมาใช้บำบัดน้ำเสียร่วมกันโดยอาศัยอยู่ร่วมกันภายในถังปฏิกรณ์ ซึ่งมีการเดินระบบเลียนแบบ CSTR ซึ่งเดินระบบได้ตลอด 24 ชั่วโมง และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมอีกทั้งจุลินทรีย์สามารถขยายพันธุ์ได้เองในธรรมชาติเนื่องจากย่อยสลายสารอินทรีย์ที่มากับน้ำเสียเพียงแค่เติมสารอาหารที่จำเป็นสำหรับจุลินทรีย์ก็

สามารถเดินระบบได้ตลอด ทำให้ลดค่าใช้จ่ายได้เมื่อเทียบกับระบบบำบัดที่ใช้สารเคมีเพียงอย่างเดียว โดยงานวิจัยนี้มุ่งเน้นศึกษาผลของการใช้จุลินทรีย์ร่วมกันสองชนิดว่าสามารถให้ผลลัพธ์ที่ดีที่สุดในการย่อยสลายสารประเภทลิกโนเซลลูโลสที่เวลาใดและเปรียบเทียบกับการใช้จุลินทรีย์เพียงชนิดเดียว โดยวัดประสิทธิภาพการย่อยสลายสารลิกโนเซลลูโลสจาก ความเข้มข้นของลิกนิน ค่าอนุพันธ์น้ำตาลที่เกิดขึ้น และ ค่า COD ที่อยู่ในน้ำเสีย สำหรับงานวิจัยนี้อาจเป็นตัวเลือกในอนาคตสำหรับโรงงานที่กำลังจะก่อตั้งขึ้นและเป็นแบบอย่างให้กับโรงงานที่มีของเสียที่มาสารอินทรีย์ประเภทนี้ได้ตัดสินใจในการเลือกใช้

## 2. วัตถุประสงค์

- 2.1 เพื่อศึกษาขั้นตอนการบำบัดน้ำเสียที่มีสารอินทรีย์ประเภท เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน
- 2.2 เพื่อเป็นแบบอย่างให้กับอุตสาหกรรมที่มีการย่อยสลายสารอินทรีย์ประเภทเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในโรงงานอุตสาหกรรม
- 2.3 เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารอินทรีย์ประเภทเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนิน ระหว่างการใช้จุลินทรีย์เพียงชนิดเดียวกับการใช้จุลินทรีย์ร่วมกันสองชนิด
- 2.4 เพื่อเพิ่มศักยภาพในการย่อยสลายสารอินทรีย์ประเภทเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนินในน้ำเสีย

## 3. ขอบเขตของการทำโครงการวิจัย

- 3.1 ใช้จุลินทรีย์ที่ได้จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยและศูนย์ชีววัสดุแห่งประเทศไทย
- 3.2 ใช้น้ำเสียสังเคราะห์ที่จำลองค่าพารามิเตอร์จากน้ำเสียจริงโดยใช้สารลิกโนเซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอนแทนเยื่อกระดาษในน้ำเสีย
- 3.3 ใช้ถังปฏิกรณ์แบบกะที่มีการเติมอากาศแบบเป่าหมุนวนเพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำเสียและกำหนดเวลาสำหรับถังปฏิกรณ์แบบไหลต่อเนื่อง
- 3.4 วิเคราะห์ความสามารถในการย่อยสลายสารอินทรีย์โดยวัดจากพารามิเตอร์ที่ลดลงที่สภาพวะและเวลาต่างๆดังนี้

3.4.1 วัดการลดลงของสารลิกนินโดยใช้เครื่องมือ Spectrophotometer

3.4.2 วัดค่า COD โดยใช้วิธี Close reflux

3.4.3 วัดค่า pH ของน้ำที่ผ่านการบำบัดแล้ว

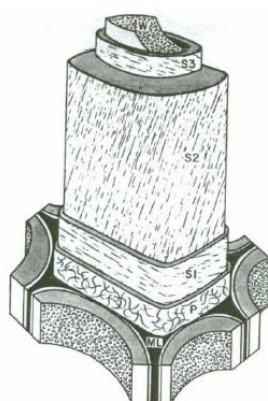
3.4.4 วัดค่าสารแขวนลอยโดยวิธี (APHA, AWWA and WEF, 1995)

3.4.5 วัดการย่อยสลายสารเซลลูโลส และ เฮมิเซลลูโลส โดยแสดงผลเป็นอนุพันธ์ของน้ำตาลที่เกิดขึ้นโดยใช้เครื่องมือ Thin-layer Chromatography

3.5 ใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ CSTR ในการย่อยสลายสารอินทรีย์

#### 4. ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวความคิดของการวิจัย

เนื่องจากวัตถุประสงค์ที่ใช้ในมาจากต้นไม้ และสิ่งที่พบมากที่สุด คือ เส้นใย ซึ่งเส้นใยมีองค์ประกอบทางเคมีดังนี้



รูปที่ 2 ลักษณะโครงสร้างของเส้นใย

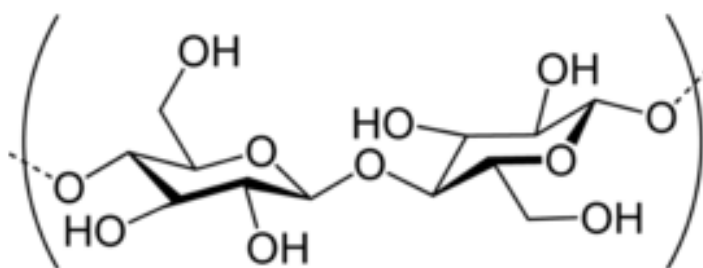
ที่มา : Smook, 1986

#### 4.1 เซลลูโลส (Cellulose)

เซลลูโลสเป็นสารพอลิแซคคาไรด์ (Polysaccharides) เชิงเส้นตรงที่ประกอบด้วยหน่วยของกลูโคส (anhydroglucose unit) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเบต้า-ไกลโคซิดิก ในตำแหน่งที่ 1 และตำแหน่งที่ 4 ของกลูโคสที่เป็นองค์ประกอบในโมเลกุล ( $\beta$ -1,4 glycosidic linkage) โดยหน่วยย่อยของเซลลูโลสที่เกิดจากการรวมกันของหน่วยกลูโคสจำนวน 2 หน่วย จะเรียกว่า เซลโลไบโอส (Cellobiose unit) แสดงดังภาพที่ 3 ซึ่งส่วนปลายเซลโลไบโอสจะประกอบด้วยส่วนรีดิวซิงค์ (Reducing end group; C-1) ซึ่งเป็นส่วนที่ง่าย



ต่อการเกิดปฏิกิริยา และส่วนของนอนรีดิวซิงค์ (Non-Reducing end group; C-4) ซึ่งเป็นส่วนที่ไม่เกิดปฏิกิริยาโดยทั่วไประดับการเกิดพอลิเมอร์ไรเซชัน (degree of polymerization; DP) ของเซลลูโลสจะเกิดจากการรวมกันของหน่วยกลูโคสจำนวนประมาณ 1000-3000 หรือ 4000 หน่วย จึงมีสูตรโครงสร้างทางเคมี คือ  $(C_6H_{10}O_5)_n$  ซึ่งลักษณะการจัดเรียงตัวของโครงสร้างโมเลกุลเซลลูโลสสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ลักษณะ คือ 1) แบบผลึก (crystalline) 2) แบบอสัณฐาน (amorphous) โดยทั่วไปโครงสร้างของเซลลูโลสจะมีการจัดเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบ จึงทำให้เซลลูโลสมีความเป็นผลึกสูง อุณหภูมิในการหลอมตัวจึงสูงมาก มักจะเกิดการสลายตัวก่อนถึงอุณหภูมิหลอมตัว โครงสร้างแบบผลึกของเซลลูโลสจะทำให้การซึมผ่านของสารละลายเกิดได้ยากกว่าลักษณะโครงสร้างแบบอสัณฐาน จึงทำให้ลักษณะโครงสร้างแบบอสัณฐานมีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาเคมีได้ง่ายขึ้น เซลลูโลสในธรรมชาติจะมีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยต่างกัน ซึ่งการกระจายน้ำหนักโมเลกุลของเซลลูโลสจะมีความสำคัญต่อสมบัติทางกายภาพ โดยเซลลูโลสที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำจะมีสมบัติทางกายภาพที่ไม่ดี (Gardner and Blackwell, 1974)



รูปที่ 3 โครงสร้างเซลโลไบโอส (cellobiose)

ที่มา : ดัดแปลงจาก Helmenstine (2013)

เซลลูโลสเป็นองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญของเนื้อไม้ซึ่งมีปริมาณมากที่สุด คือ ประมาณร้อยละ 40 ของเนื้อไม้ทั้งในไม้ใบแคบหรือไม้ตระกูลสน (softwood) และไม้ใบกว้าง (hardwood) โดยทั่วไปจะพบเซลลูโลสอยู่ร่วมกับลิกนิน เพนโตแซน กัม แทนนิน ไชมันและสารที่ทำให้เกิดสีในต้นไม้ โดยเซลลูโลสจะทำหน้าที่เป็นโครงสร้างของเส้นใยและให้ความแข็งแรงกับต้นไม้ เซลลูโลสสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ประเภทตามขนาดของโมเลกุลหรือระดับการเกิดพอลิเมอร์ไรเซชัน คือ

1. แอลฟา เซลลูโลส (Alpha cellulose; DP > 90)
2. เบต้า เซลลูโลส (Beta cellulose; DP = 15-90)
3. แกมมา เซลลูโลส (Gamma cellulose; DP < 15)

คุณสมบัติที่สำคัญประการหนึ่งของเซลลูโลส คือ เซลลูโลสจะไม่ละลายในน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์ สะเทิน (neutral organic solvent) เช่น เบนซีน (benzene) แอลกอฮอล์ (alcohol) และอีเธอร์ (Ether) แต่จะละลายได้ดีในกรดเกลือและกรดกำมะถันเข้มข้น ซึ่งความคงทนของเซลลูโลสต่อกรดหรือเอนไซม์จะขึ้นกับโครงสร้างแบบอสัณฐาน เมื่อนาสเซลลูโลสไปหาปฏิกิริยาทางเคมีจะเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทำให้คุณสมบัติของเซลลูโลสเปลี่ยนไป จึงสามารถนำเซลลูโลสไปใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตพลาสติก น้ำตาล เจล พิล์ม เส้นใยชนิดใหม่ และสารเคลือบ เป็นต้น (Kadla and Gilbert, 2000)

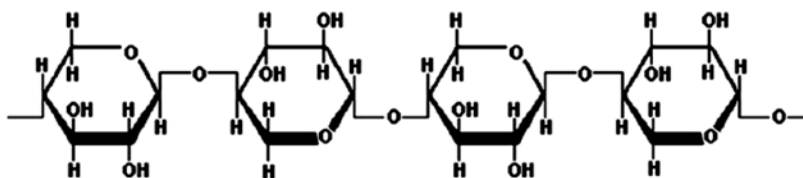
ตารางที่ 1 องค์ประกอบของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินในวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร	ร้อยละของ	ร้อยละของเฮมิ	ร้อยละของลิกนิน
	เซลลูโลส	เซลลูโลส	
ไม้เนื้อแข็ง	40-55	24-40	18-25
ไม้เนื้ออ่อน	45-50	25-35	25-35
เปลือกถั่ว	25-30	25-30	30-40
ซังข้าวโพด	45	35	15
หญ้า	25-40	35-50	10-30
ฟางข้าว	30	50	15
ใบไม้	15-20	80-85	0
ใยเมล็ดฝ้าย	80-95	5-20	0
หญ้าคอสทอล เบอมิวดา	25	35.7	6.4
หญ้าสวิช	45	31.4	12

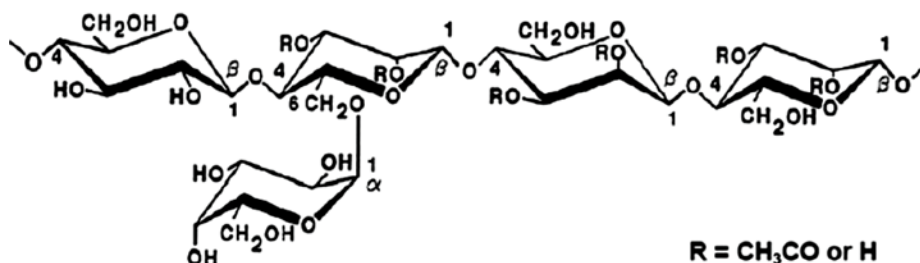
ที่มา : ดัดแปลงมาจาก Reshamwala et al.,1995; Cheung and Anderson, 1997; Boopathy, 1998; Dewes and Hunsche, 1998.

#### 4.2 เฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose)

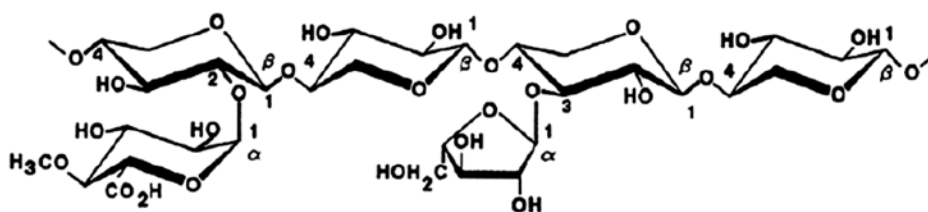
เฮมิเซลลูโลสเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ มีลักษณะคล้ายเซลลูโลสแต่จะประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่แตกต่างกัน 5 ประเภท คือ กลูโคส (glucose) กาแลกโตส (galactose) แมนโนส (mannose) อะราบินโนส (arabinose) ไชโลส (xylose) รวมทั้งกรดกลูคูโลนิก (glucuronic acid) และกรดกาแลกทูโรนิก (galacturonic acid) (แสดงดังรูปที่ 4) เฮมิเซลลูโลสมีสูตรทางเคมี คือ  $(C_6H_{12}O_5)_n$



Xylan



Galatoglucomannans



Arabinoglucuronoxylan

รูปที่ 4 องค์ประกอบทางเคมีของเฮมิเซลลูโลส

ที่มา : Bajpai, (2016)

โดยปกติจะพบเฮมิเซลลูโลสอยู่รวมปะปนกับเซลลูโลส และสารอื่นๆ เช่น ลิกนิน เฮมิเซลลูโลสที่พบในไม้ใบกว้าง (Hardwood) ได้แก่ ไซเลน (Xylan) และเฮมิเซลลูโลสที่พบในไม้ใบแคบ (Softwood) ได้แก่ กลูโคแมนแนน (Glucomannan) โดยเฮมิเซลลูโลสจะทำหน้าที่เป็นสารยึดเซลลูโลสไว้ด้วยกันและทำหน้าที่เสริมความแข็งแรงให้กับเส้นใย เฮมิเซลลูโลสสามารถละลายในตัวทำละลายและทำปฏิกิริยาได้ง่ายกว่าเซลลูโลส ดังนั้นเฮมิเซลลูโลสจะเสื่อมสภาพได้ง่ายและสลายตัวได้ดีกว่าเซลลูโลส ทำให้ปริมาณของเฮมิเซลลูโลสในเนื้อไม้มีมากกว่าในเยื่อกระดาษที่ผ่านกระบวนการย่อยด้วยสารเคมีแล้ว ในระหว่างที่เนื้อไม้ถูกย่อยไปเป็นเยื่อกระดาษนั้น ปริมาณและตำแหน่งของเฮมิเซลลูโลสจะมีการเปลี่ยนแปลงไป

เฮมิเซลลูโลสจะมีบทบาทอย่างมากในการส่งเสริมให้กระดาษมีความแข็งแรงเพิ่มสูงขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากเฮมิเซลลูโลสมีลักษณะเป็นสารไฮโดรฟิลิก (Hydrophilic materials) ซึ่งช่วยให้เส้นใยที่แขวนลอยในน้ำเยื่อมีการพองตัวและอุ้มน้ำได้ดี เนื่องจากเฮมิเซลลูโลสมีโครงสร้างเป็นอสัณฐานคือ อยู่รวมกันอย่างหลวมๆ นอกจากนี้

ยังพบว่า เมื่อนำเส้นใยไปผ่านกระบวนการตีบเยื่อเพื่อทำให้ผิวของเส้นใยแตกออกเป็นไมโครไฟบริล เฮมิเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบสำคัญที่ทำให้ไมโครไฟบริลระหว่างเส้นใยเกิดการประสานกันด้วย พันธะไฮโดรเจน (Hydrogen bond) ทำให้กระดาษมีความแข็งแรงเพิ่มมากขึ้น ( Sjöström, 1993)

### 4.3 ลิกนิน (Lignin)

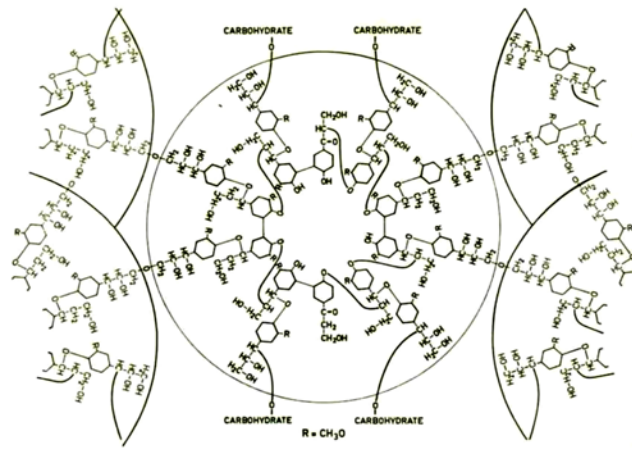
ลิกนินเป็นสารประกอบเชิงซ้อนอะโรมาติกที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (แสดงดังภาพที่ 5) โดยประกอบด้วยหน่วยพื้นฐานที่มีโครงสร้างวงแหวนของฟีนิลโพรเพน (phenylpropane) เชื่อมต่อกันเป็นลักษณะ 3 มิติกับกลุ่มของโพรเพน (Propane) และวงแหวนเบนซีน (Benzene ring) โดยมีการจัดเรียงตัวเป็นแบบอสัณฐาน (Higuchi, 1990) แม้ว่าลิกนินในพืชหรือต้นไม้จะไม่มีโครงสร้างที่แน่นอนชัดเจน แต่ลิกนินจะมีโครงสร้างจากหน่วยพื้นฐานหลัก 3 ส่วนคือ คอนนิเฟอร์ิล แอลกอฮอล์ (coniferyl alcohol) พารา-คูมาริล แอลกอฮอล์ (p-coumaryl alcohol) และ ซินาพิล แอลกอฮอล์ (sinapyl alcohol) ดังแสดงในภาพที่ 6 ลิกนินจะทำหน้าที่เป็นสารยึดหรือทำหน้าที่เป็นกาวเชื่อมประสานระหว่างเส้นใยและให้ความแข็งแรงกับเนื้อเยื่อของไม้ จึงมักพบลิกนินอยู่ร่วมกับเซลลูโลส โดยจะพบมากในส่วนของมิดเดิล ลามลล่า (Middle lamella)

โดยทั่วไปลิกนินจะไม่ละลายน้ำ ไม่มีสมบัติด้านความยืดหยุ่นแต่จะมีสมบัติเป็นเทอร์โมพลาสติก (Thermoplastic) คือ มีอุณหภูมิที่อ่อนตัวอยู่ในช่วง 120-200 องศาเซลเซียส เพราะฉะนั้นต้นไม้ที่มีปริมาณลิกนินสูงจึงมีความแข็งแรงทนทานมากกว่าพืชหรือต้นไม้ที่มีปริมาณลิกนินในเนื้อไม้ต่ำ ลิกนินจะถูกย่อยสลายได้ด้วยเอนไซม์ลิกเนส (Lignase) หรือ ลิกนินเนส (Ligninase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในเชื้อราไวท์ รอท (White rot)

ลิกนินสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ประเภท ตามลักษณะโครงสร้าง คือ (Lewin and Goldstein, 1991)

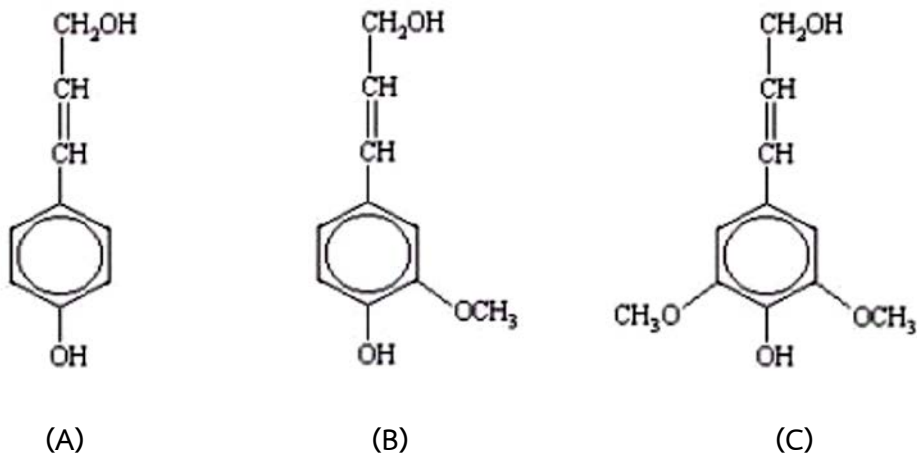
1. G type (Guaiacyl lignin) ประกอบด้วย คอนนิเฟอร์ิล แอลกอฮอล์ (coniferyl alcohol) พบในไม้ใบแคบทั่วไป
2. G-S type (Guaiacyl-Syringyl lignin) ประกอบด้วย คอนนิเฟอร์ิล แอลกอฮอล์ (coniferyl alcohol) และ ซินาพิล แอลกอฮอล์ (sinapyl alcohol) พบในไม้ใบกว้าง
3. H-G-S type (4-Hydroxyphenyl-Guaiacyl-Syringyl lignin) ประกอบด้วยโมโนเมอร์ (monomer) ทั้ง 3 ชนิดอยู่รวมกัน

4. H-G type (Hydroxylphenyl-Guaiacyl lignin) ประกอบด้วยคอนนิเฟอร์ิล แอลกอฮอล์ (coniferyl alcohol) และ พารา-คูมารี แอลกอฮอล์ (p-coumaryl alcohol) โดยมากพบในไม้ที่ผ่านการตัดแปลงแล้ว เช่น compression wood.



รูปที่ 5 ลักษณะโครงสร้างของลิกนิน

ที่มา : Smook (1986)



รูปที่ 6 หน่วยพื้นฐานของลิกนิน (A) p-coumaryl alcohol (B) coniferyl alcohol (C) sinapyl alcohol

ที่มา : บูรณาการรูป จากัด (2552)

#### 4.4 สารแทรก (Extractive)

สารแทรก คือ ส่วนประกอบในไม้ยืนต้นหรือไม้ล้มลุกที่สามารถละลายได้ในตัวทาลละลายอินทรีย์ (Organic solvents) เช่น อะซีโตน (Acetone) แอลกอฮอล์ (Alcohol) และคลอโรฟอร์ม (Chloroform) เป็นต้น โดยทั่วไปสารแทรกในพืชหรือต้นไม้จะประกอบด้วยสารจากพวกกรดเรซิน (Resin acid) กรดไขมันอิสระ (Free fatty acid) น้ำมันระเหย (Volatile oil) สารประกอบเทอร์ฟีนอยด์ (Turphenoid compounds) และสารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compounds) เป็นต้น สารแทรกบางประเภทจะมีผลเสียต่อการผลิตเยื่อกระดาษหากสภาวะการผลิตไม่เหมาะสม (Smook, 1986)

#### 4.5 ปัญหาน้ำเสียจากสารอินทรีย์ประเภทเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนินในประเทศไทย

ปัญหาจากการร้องเรียนกิจการการผลิตกระดาษและกิจการที่ใช้ผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร ได้แก่ ปัญหาน้ำเสียที่เกิดขึ้นจากกระบวนการผลิตที่เกิดกลิ่นเหม็น และเมื่อปล่อยลงสู่แหล่งน้ำสาธารณะ ทำให้เกิดสภาพน้ำเสียในแหล่งน้ำ มีผลกระทบต่อชุมชนที่อาศัยอยู่ใกล้เคียงและต่อระบบนิเวศของแหล่งน้ำ ดังเช่นกรณีต่อไปนี้

1. ในช่วงปี 2530 และหลังจากนั้น มีเกิดปัญหาสำคัญจากโรงงานผลิตกระดาษของ บริษัท ฟินคส์ พัลพ แอนด์เพเพอร์จำกัด ที่จังหวัดขอนแก่น ซึ่งปล่อยน้ำเสียที่มีกลิ่นเหม็นลงลำน้ำพอง เกิดผลกระทบต่อสุขภาพและสิ่งแวดล้อมเป็นอย่างมาก แต่หลังจากที่มีการปรับปรุงระบบการผลิตและการกำจัดน้ำเสียและมลพิษ ต่างๆ จากโรงงานแล้ว ปัญหาสามารถบรรเทาจนอยู่ในระดับที่ควบคุมได้
2. กลิ่นเหม็นของโรงงานผลิตกระดาษสีน้ำตาล มีสาเหตุของเรื่องร้องเรียน กลิ่นเหม็นที่เกิดขึ้นมาจากระบบบำบัดน้ำเสียแบบ Stabilization Pond
3. การปล่อยน้ำเสียจากโรงงานผลิตกระดาษให้ไหลลงสู่คลองชลองแวง มีสีดำเข้มและกลิ่นฉุน ทำให้ผู้สูดดมถึงกับเวียนศีรษะ บางรายทนกลิ่นเหม็นไม่ได้ ต้องอพยพออกจากพื้นที่
4. เกิดเหตุน้ำจากบ่อบำบัดน้ำเสียของโรงงานผลิตกระดาษแห่งหนึ่งในจังหวัดปราจีนบุรีรั่วไหลออกมาส่งผลกระทบต่ออย่างรุนแรง ชาวบ้านเดือดร้อนเนื่องจากกลิ่นเหม็นที่รุนแรงและน้ำสีดำที่ปนเปื้อนมากับน้ำฝนที่ไหลตามทาง
5. เกิดเหตุระบบกักเก็บน้ำเสียของโรงงานผลิตเอทานอลที่จังหวัดสุพรรณบุรีพังชำรุดเนื่องจากฝนตกส่งผลให้น้ำเสียที่มีสารอินทรีย์อยู่ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอทานอลไหลกระจายเป็นวงกว้างชาวบ้านได้รับความเดือดร้อนจากน้ำเสียที่เกิดขึ้น

#### 4.6 มาตรฐานการปล่อยน้ำลงสู่แหล่งธรรมชาติ

ตารางที่ 2 มาตรฐานคุณภาพน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมและนิคมอุตสาหกรรม

ดัชนีคุณภาพน้ำ	ค่ามาตรฐาน	วิธีวิเคราะห์
1. ค่าความเป็นกรดและด่าง (pH value)	5.5-9.0	pH Meter
2. ค่าที่ดีเอส (TDS หรือ Total Dissolved Solids)	<input type="checkbox"/> ไม่เกิน 3,000 มิลลิกรัม/ลิตร หรืออาจแตกต่างกันแล้วแต่ประเภทของแหล่งรองรับน้ำทิ้ง หรือประเภทของโรงงานอุตสาหกรรม ที่คณะกรรมการควบคุมมลพิษเห็นสมควรแต่ไม่เกิน 5,000 มิลลิกรัม/ลิตร <input type="checkbox"/> น้ำทิ้งที่จะระบายลงแหล่งน้ำกร่อยที่มีค่าความเค็ม (Salinity) เกิน 2,000 มิลลิกรัม/ลิตร หรือลงสู่ทะเลค่าที่ดีเอสในน้ำทิ้งจะมีค่ามากกว่าค่าที่ดีเอส ที่มีอยู่ในแหล่งน้ำกร่อยหรือน้ำทะเลได้ไม่เกิน 5,000 มิลลิกรัม/ลิตร	ระเหยแห้งที่อุณหภูมิ 103-105°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
3. สารแขวนลอย (Suspended Solids)	ไม่เกิน 50 มิลลิกรัม/ลิตร หรืออาจแตกต่างกันแล้วแต่ประเภทของแหล่งรองรับน้ำทิ้ง หรือประเภทของโรงงานอุตสาหกรรม หรือประเภทของระบบบำบัดน้ำเสียตามที่คณะกรรมการควบคุมมลพิษเห็นสมควรแต่ไม่เกิน 150 มิลลิกรัม/ลิตร	กรองผ่านกระดาษกรองใยแก้ว (Glass Fiber Filter Disc)
4. อุณหภูมิ (Temperature)	ไม่เกิน 40°C	เครื่องวัดอุณหภูมิ วัดขณะทำการเก็บตัวอย่างน้ำ
5. สีหรือกลิ่น	ไม่เป็นที่พึงรังเกียจ	ไม่ได้กำหนด
6. ซัลไฟด์ (Sulfide as H <sub>2</sub> S)	ไม่เกิน 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร	Titrate
7. ไซยาไนด์ (Cyanide as HCN)	ไม่เกิน 0.2 มิลลิกรัม/ลิตร	กลั่นและตามด้วยวิธี Pyridine Barbituric Acid
8. น้ำมันและไขมัน (Fat, Oil and Grease)	ไม่เกิน 5.0 มิลลิกรัม/ลิตร หรืออาจแตกต่างกันแล้วแต่ประเภทของแหล่งรองรับน้ำทิ้ง หรือ ประเภทของโรงงาน	สกัดด้วยตัวทำละลายแล้วแยกหาน้ำหนักของน้ำมันและไขมัน

	อุตสาหกรรมตามที่คณะกรรมการควบคุมมลพิษ เห็นสมควรแต่ไม่เกิน 15 มิลลิกรัม/ลิตร	
9. ฟอรัมาลดีไฮด์ (Formaldehyde)	ไม่เกิน 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร	Spectrophotometry
10. สารประกอบ ฟีนอล (Phenols)	ไม่เกิน 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร	กลั่นและตามด้วยวิธี 4-Aminoantipyrine
11. คลอรีนอิสระ (Free Chlorine)	ไม่เกิน 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร	Iodometric Method
12. สารที่ใช้ป้องกัน หรือกำจัดศัตรูพืช หรือสัตว์ (Pesticide)	ต้องตรวจไม่พบตามวิธีตรวจสอบที่กำหนด	Gas- Chromatography
13. ค่าบีโอดี (5 วันที่ อุณหภูมิ 20 °C (Biochemical Oxygen Demand : BOD)	ไม่เกิน 20 มิลลิกรัม/ลิตร หรือแตกต่างกันแล้วแต่ประเภท ของแหล่งรองรับน้ำทิ้ง หรือประเภทของโรงงาน อุตสาหกรรม ตามที่คณะกรรมการควบคุมมลพิษ เห็นสมควร แต่ไม่เกิน 60 มิลลิกรัม/ลิตร	Azide Modification ที่อุณหภูมิ 20°C เป็น เวลา 5 วัน
14. ค่าทีเคเอ็น (TKN) หรือ Total Kjeldahl Nitrogen)	ไม่เกิน 100 มิลลิกรัม/ลิตร หรืออาจแตกต่างกันแล้วแต่ละ ประเภทของแหล่งรองรับน้ำทิ้ง หรือประเภทของโรงงาน อุตสาหกรรม ตามที่คณะกรรมการควบคุมมลพิษ เห็นสมควร แต่ไม่เกิน 200 มิลลิกรัม/ลิตร	Kjeldahl
15. ค่าซีโอดี (Chemical Oxygen Demand : COD)	ไม่เกิน 120 มิลลิกรัม/ลิตรหรืออาจแตกต่างกันแล้วแต่ละ ประเภทของแหล่งรองรับน้ำทิ้ง หรือประเภทของโรงงาน อุตสาหกรรม ตามที่คณะกรรมการควบคุมมลพิษ เห็นสมควร แต่ไม่เกิน 400 มิลลิกรัม/ลิตร	Potassium Dichromate Digestion
16. โลหะหนัก (Heavy Metal)		
1. สังกะสี (Zn)	ไม่เกิน 5.0 มิลลิกรัม/ลิตร	
2. โครเมียมชนิด เฮกซะวาเลนต์ (Hexavalent Chromium)	ไม่เกิน 0.25 มิลลิกรัม/ลิตร	Atomic Absorption Spectro



3. โครเมียมชนิดไตรวาเลนต์ (Trivalent Chromium)	ไม่เกิน 0.75 มิลลิกรัม/ลิตร	Photometry ชนิด Direct Aspiration หรือวิธี Plasma Emission
4. ทองแดง (Cu)	ไม่เกิน 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร	Spectroscopy ชนิด Inductively Coupled Plasma : ICP
5. แคดเมียม (Cd)	ไม่เกิน 0.03 มิลลิกรัม/ลิตร	
6. แบเรียม (Ba)	ไม่เกิน 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร	
7. ตะกั่ว (Pb)	ไม่เกิน 0.2 มิลลิกรัม/ลิตร	
8. นิกเกิล (Ni)	ไม่เกิน 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร	
9. แมงกานีส (Mn)	ไม่เกิน 5.0 มิลลิกรัม/ลิตร	
10. อาร์เซนิก (As)	ไม่เกิน 0.25 มิลลิกรัม/ลิตร	Atomic Absorption Spectrophotometry ชนิด Hydride Generation หรือวิธี Plasma Emission Spectroscopy ชนิด Inductively Coupled Plasma : ICP
11. เซเลเนียม (Se)	ไม่เกิน 0.02 มิลลิกรัม/ลิตร	
12. ปรอท (Hg)	ไม่เกิน 0.005 มิลลิกรัม/ลิตร	Atomic Absorption Cold Vapour Techique

แหล่งที่มา : ประกาศกระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม ฉบับที่ 3 (พ.ศ. 2539) เรื่อง กำหนดมาตรฐานควบคุมการระบายน้ำทิ้งจากแหล่งกำเนิดประเภทโรงงานอุตสาหกรรมและนิคมอุตสาหกรรม ลงวันที่ 3 มกราคม 2539 ตีพิมพ์ในราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 113 ตอนที่ 13 ลงวันที่ 13 กุมภาพันธ์ 2539

#### 4.7 แนวทางการสารอินทรีย์ประเภทเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนินในน้ำเสีย

การกำจัดสารประเภทลิกโนเซลลูโลส สามารถแบ่งออกได้หลักๆ 4 แนวทางทางดังนี้ (ดัดแปลงจาก (Dahiya & Goyal, 2018) และ (Kucharska et al., 2018)) (แสดงในตารางที่ 3)

##### 4.7.1 การบำบัดทางกายภาพ (Physical treatment)

การบำบัดทางกายภาพ เป็นกระบวนการบำบัดเบื้องต้น ซึ่งประกอบไปด้วยการใช้เครื่องจักรต่างๆ เพื่อลดขนาด การทำให้ผลึกของลิกโนเซลลูโลสแตกตัว เพื่อลดการเกาะตัวของพันธะและเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ให้ดียิ่งขึ้น สามารถทำได้โดย การตัด หรือบดให้ละเอียด โดยจะมีขนาดของอนุภาคระหว่าง 0.2-2 มิลลิเมตร หลังจากการบดละเอียด การบำบัดทางกายภาพสามารถใช้ร่วมกับการบำบัดด้วยวิธีอื่นได้อย่างหลากหลายวิธี เช่น การทำให้แตกออกจากกัน (Fragmentation) การใช้คลื่นไมโครเวฟ (Microwave radiation) การใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (Sonication) การพ่นแห้งด้วยรังสีแกมมา (Spray frying with gamma radiation) และการเผาไหม้อุณหภูมิสูง (Pyrolysis)

##### 4.7.2 การบำบัดทางเคมี (Chemical treatment)

การบำบัดทางเคมี คือการย่อยสลายหรือแตกตัวพันธะ โดยใช้สารเคมี ซึ่งการบำบัดทางเคมีสามารถกำจัดลิกนิน ออกจากเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสได้อย่างง่ายดาย ซึ่ง สารเคมีที่ใช้ในการย่อยสลายลิกนินจาก เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส ได้แก่ สารละลายที่เป็น Oxidizing agent, Alkali, Acid และเกลือ สารที่เป็น Oxidizing agent ที่มีคุณสมบัติสูงในการกำจัดลิกนินเช่น โอโซน และ  $H_2O_2$  สามารถทำได้และไม่เป็นอันตรายในห้องที่มีอุณหภูมิและความดันบรรยากาศปกติ การบำบัดทางเคมีมีหลายวิธีเช่น การใช้กรดแตกพันธะ (Acid hydrolysis) การใช้ด่างปรับสภาพ (Alkaline pretreatment) ปฏิกริยาออกซิเดชันและโอโซนเนชัน (Oxidation and ozonation) การบำบัดโดยใช้สารละลายไอออนิก (Ionic liquid treatment) และการบำบัดโดยใช้สารละลายอินทรีย์ (Organic solvents treatment) เป็นต้น

##### 4.7.3 การบำบัดทางเคมีฟิสิกส์ (Physicochemical treatment)

การบำบัดทางเคมีฟิสิกส์ เป็นการนำกระบวนการทางกายภาพผสมกับการบำบัดทางเคมี โดยสามารถเพิ่มขีดความสามารถในการกำจัดลิกนินให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น (Rabemanolontsoa & Saka, 2016) โดยการบำบัดทางเคมีฟิสิกส์ที่นิยมใช้ในการบำบัดสารลิกโนเซลลูโลสได้แก่ การระเบิดด้วยไอน้ำแรงดันสูง (Steam explosion) การระเบิดด้วยคาร์บอน ไดออกไซด์แรงดันสูง (Carbon dioxide explosion) และ การใช้แอมโมเนียเพื่อให้เส้นใยขยายตัว (Ammonia-fiber expansion (AFEX))

#### 4.7.4 การบำบัดทางชีวภาพ (Biological treatment)

การบำบัดทางชีวภาพเป็นการใช้จุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย เชื้อรา เป็นต้น การย่อยสลายโดยใช้จุลินทรีย์ มีต้นทุนที่ค่อนข้างต่ำ เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม และเป็นอันตรายน้อยกว่าเมื่อเทียบกับ วิธีการบำบัดด้วยวิธีทางเคมีและเคมีฟิสิกส์ อย่างไรก็ตามการบำบัดทางชีวภาพมีประสิทธิภาพในการบำบัดที่ต่ำ ต้องการพื้นที่และสารอาหารจำนวนมากในการเติบโต การย่อยสลายสารลิกโนเซลลูโลส ใช้เอนไซม์ของจุลินทรีย์ในการแตกพันธะและย่อยสลาย จนได้อ่อนพันธะของสารที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตและเพิ่มปริมาณได้ โดยมีการใช้จุลินทรีย์ในการบำบัดทางชีวภาพดังนี้ ราขาว (White rot) ราน้ำตาล (Brown rot) ราอ่อน (Soft rot) การใช้แบคทีเรียบำบัด (Bacterial treatment) การใช้เอนไซม์บำบัด (Enzymatic treatment) การแช่ในของเหลว (Pickling)

ตารางที่ 3 วิธีการบำบัดสารลิกโนเซลลูโลส

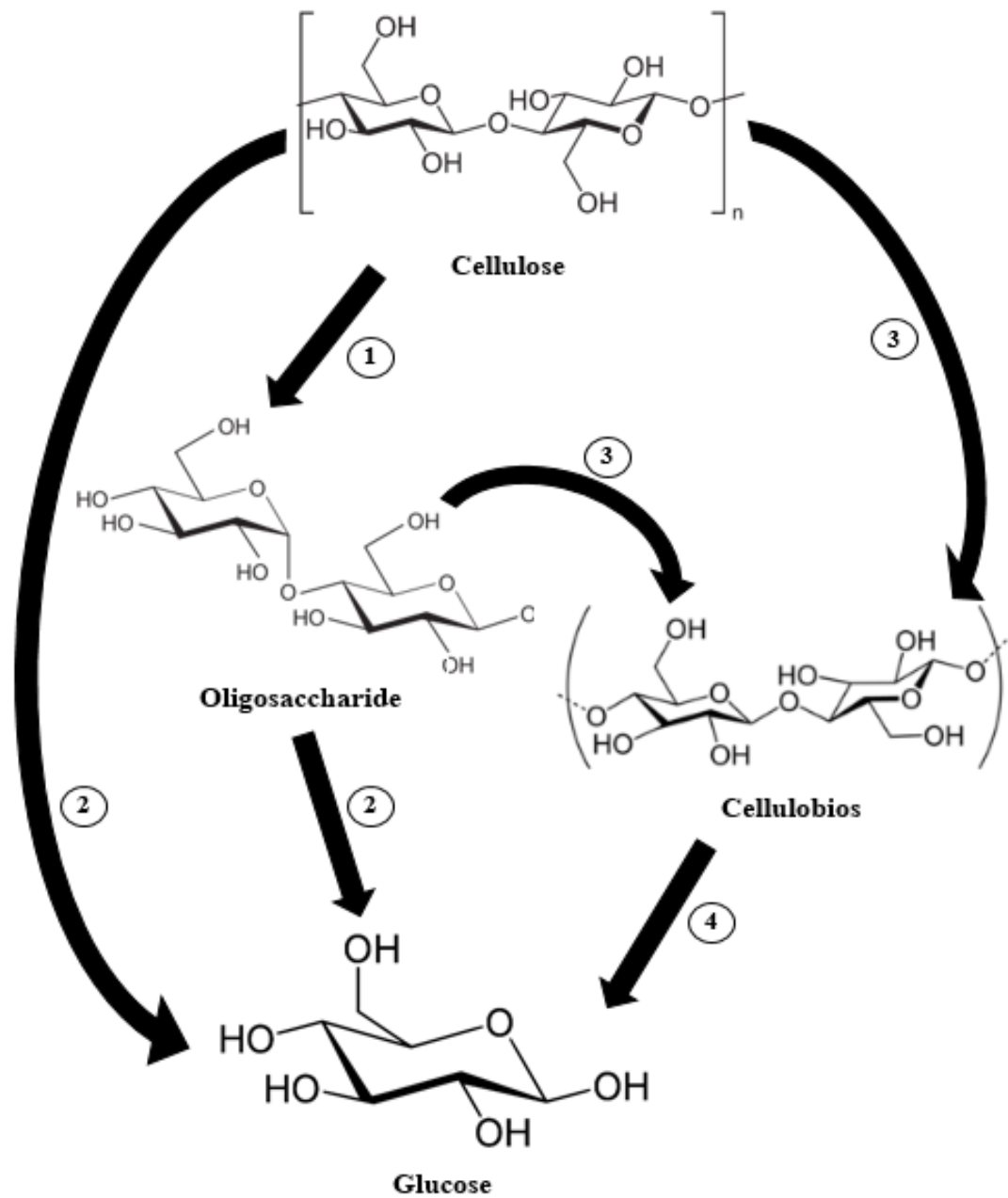
วิธีการบำบัด	ประเภทของการบำบัด	กลไกการทำงาน
Physical	Fragmentation (hacking, grinding, milling, rolling)	การตัดให้พันธะลิกโนเซลลูโลสสั้นลง โดยการบดให้ละเอียด
	Microwave radiation	ลดการก่อผลึกในเซลลูโลส
	Sonication (ultrasound)	ปลดปล่อยไฮโดรเจนในโครงสร้างของลิกโนเซลลูโลสเสีย
	Spray frying with gamma radiation	คลายพันธะ beta-1,4 ไกลโคซิดิก
	Pyrolysis	เกิดปรากฏการณ์คาร์บอนอัดตัวในเซลลูโลสที่อุณหภูมิสูงกว่า 300 °C
Chemical	Acid hydrolysis	คลายพันธะในโครงสร้างเฮมิเซลลูโลส และละลายสารลิกนิน
	Alkaline pretreatment	เกิดปฏิกิริยา สปอนนิฟิเคชัน กับโครงสร้างลิกโนเซลลูโลส
	Oxidation and ozonation	ละลายสารลิกนินและเฮมิเซลลูโลส แยกเซลลูโลสออกจากผลึก
	Ionic liquid treatment	แยกเซลลูโลสออกจากลิกโนเซลลูโลส
	Organic solvents treatment	คลายพันธะเฮมิเซลลูโลสและละลายสารลิกนิน

Physicochemical	Steam explosion	ละลายสารเฮมิเซลลูโลสที่อุณหภูมิ 150 °C ละลายสารลิกนินที่อุณหภูมิ 180 °C
	Carbon dioxide explosion	สลายโครงสร้างของลิกนินและเฮมิเซลลูโลส
	AFEX	กำจัดลิกนินและเฮมิเซลลูโลสบางส่วน
Biological	White rot <i>Phanerochete chrysosporium</i> , <i>Cyathus steercoreus</i> , <i>Pleurotus spp.</i>	ย่อยสลายสารเฮมิเซลลูโลสและลิกนิน
	Brown rot <i>Gloeophyllum trabeum</i>	ย่อยสลายลิกนิน
	Soft rot <i>Ascomycota</i> , <i>Deuteromycota</i> , <i>Trichoderma reesei</i> , <i>Chaetomium sp.</i> , <i>Ceretocystis sp.</i>	ย่อยสลายสารเฮมิเซลลูโลสและลิกนิน
	Bacterial treatment	ย่อยสลายสารเฮมิเซลลูโลสและลิกนิน
	Enzymatic treatment	ย่อยสลายสารเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลส
	Pickling	ย่อยสลายสารเฮมิเซลลูโลส

ที่มา : (Kucharska et al., 2018)

#### 4.8 การบำบัดเซลลูโลสในน้ำเสีย

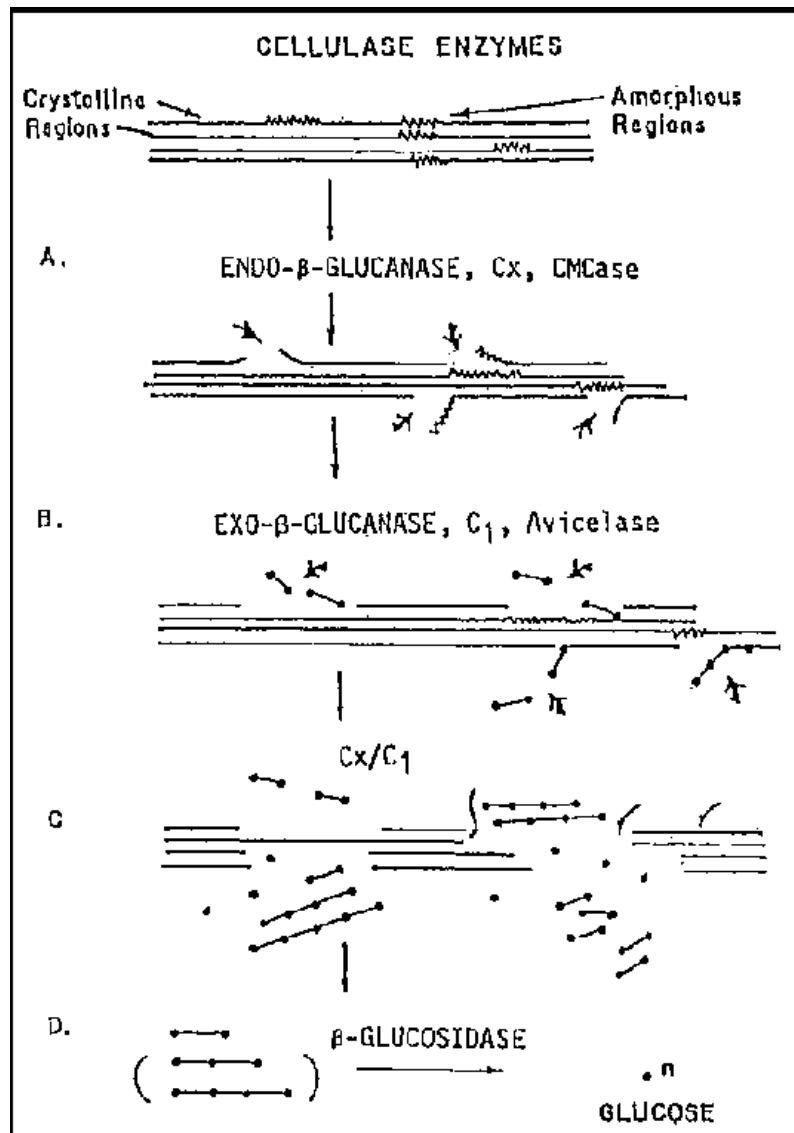
เนื่องจากเซลลูโลสจัดได้ว่าเป็นคาร์โบไฮเดรตชนิดหนึ่ง เมื่อจุลินทรีย์มาย่อยสลาย จะได้แนวทางดังนี้



รูปที่ 7 Cellulose degradation pathway

(1) endo $\beta$ 1,4 glucanase; (2) Exo $\beta$ 1,4 glucanase ( $\beta$ 1,4 glucanase glucohydrolase); (3) exo $\beta$ 1,4 glucanase ( $\beta$ 1,4 glucan cellobiohydrolase); (4) glucosidase (Cellobiase)

ที่มา : (ดัดแปลงจาก) T.K. Ghose and P. Ghosh, 1978



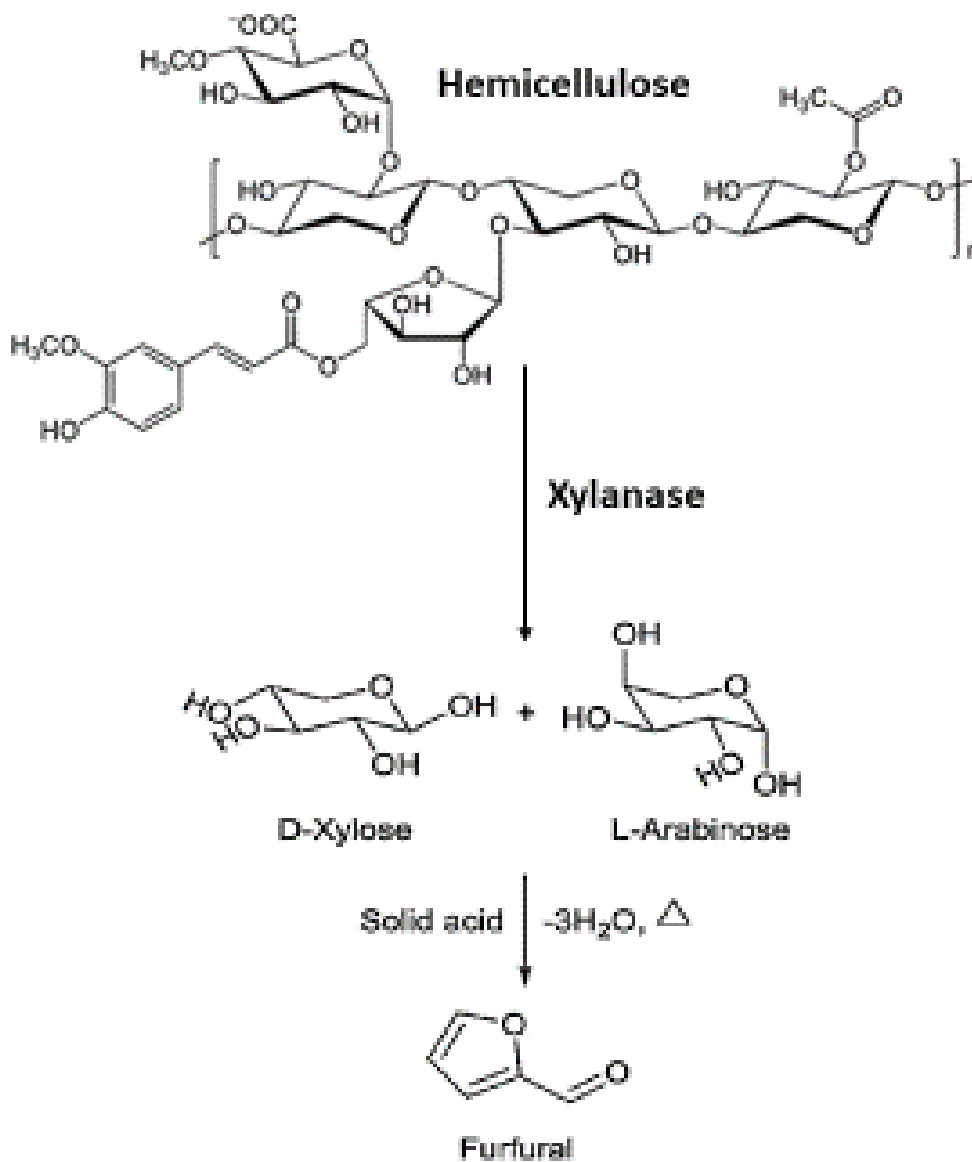
รูปที่ 8 กลไกการทำงานของเอนไซม์ เซลลูเลส

ที่มา: Reese et al.,1950

จากรูป 8 เป็นการแสดงกลไกการทำงานของเอนไซม์ เซลลูเลสโดยจากภาพที่จุด A เอนไซม์ endo- $\beta$ -glucanase เข้ามาตัดสายพันธะที่ตำแหน่ง 1,4 ภายในสายของเซลลูโลส ที่จุด B เอนไซม์ Exo- $\beta$ -glucanase เข้ามาตัดสายพันธะที่ตำแหน่ง 1,4 จากปลายสุดของสายพันธะเข้ามาเรื่อยๆ โดยทำงานร่วมกันกับเอนไซม์ endo- $\beta$ -glucanase แสดงดังจุด C และเมื่อย่อยสลายพันธะจนเหลือ Cellulobiose ดังจุด D เอนไซม์  $\beta$ -glucosidase (Cellobiase) จะย่อยสลายพันธะจนเหลือเพียงน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวหรือน้ำตาลกลูโคส

#### 4.9 การบำบัดเฮมิเซลลูโลสในน้ำเสีย

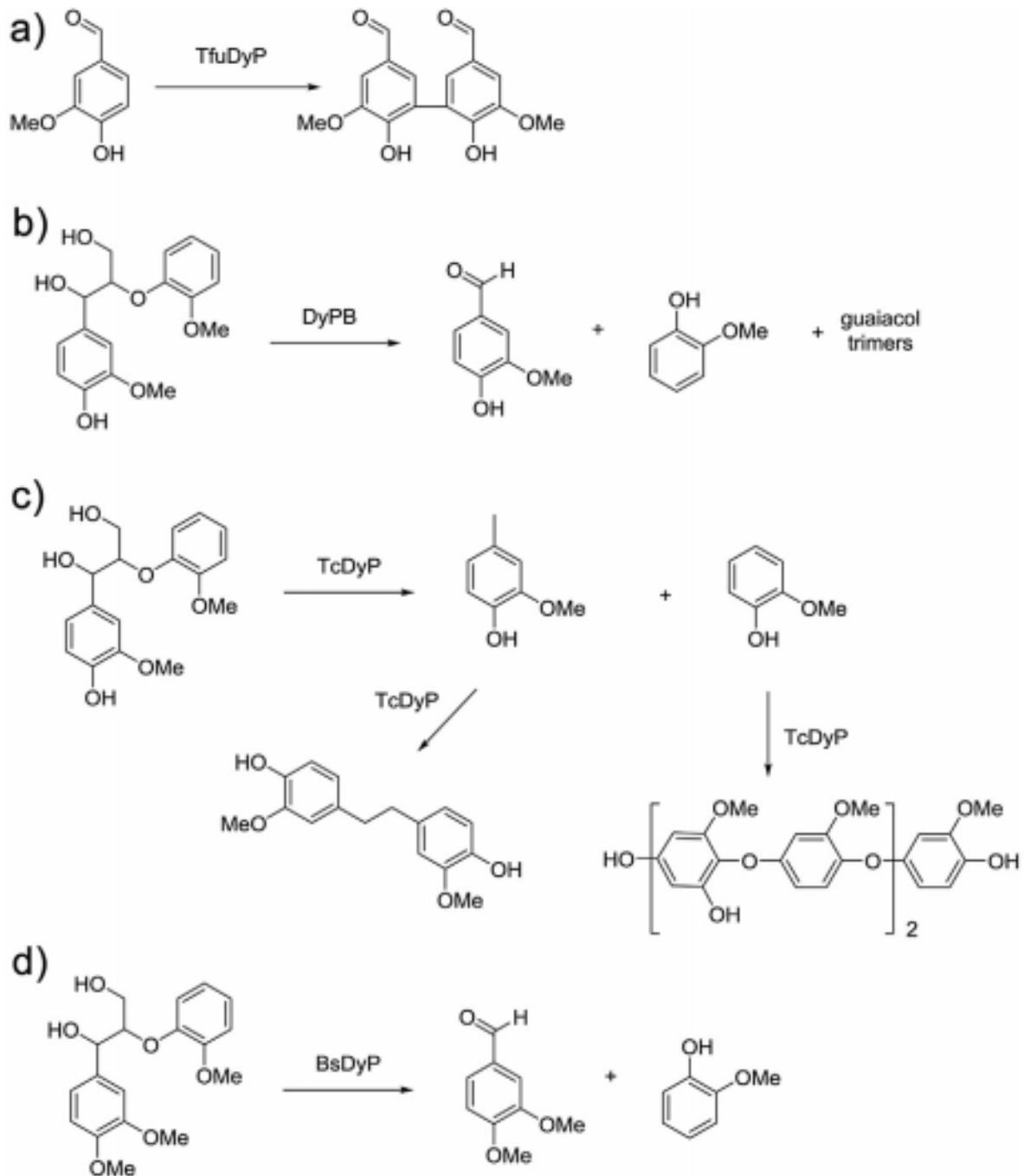
เฮมิเซลลูโลสเป็นสารกึ่งคาร์โบไฮเดรตซึ่งโครงมีรูปร่างโครงสร้างเดียวกับ Xylan เมื่อจุลินทรีย์ทำการย่อยสลาย จะได้แนวทางดังนี้



รูปที่ 9 Hemicellulose degradation pathway  
ที่มา : (ดัดแปลงจาก) Bhaumik and Dhepe.,2014

#### 4.10 การบำบัดลิกนินในน้ำเสีย

ลิกนินจัดได้ว่าเป็นสารอินทรีย์ที่พบได้ทุกส่วนของต้นไม้ และทำให้พืชแข็งแรงและมีหลากหลายฟังก์ชันในโครงสร้าง ทำให้อย่อยสลายยาก เมื่อจุลินทรีย์ทำการย่อยสลายจะได้แนวทางดังนี้

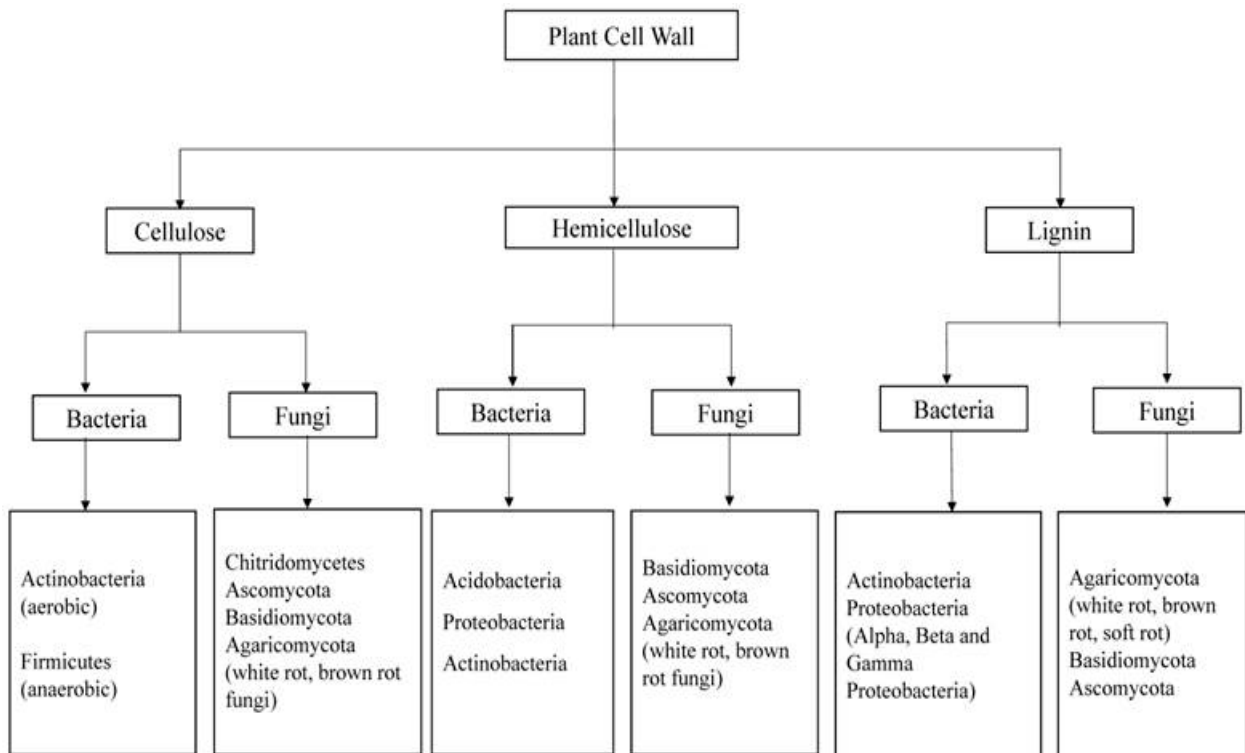


รูปที่ 10 Lignin degradation pathway (Some functional)

ที่มา : Gonzalo et al.,2016



#### 4.11 ลักษณะของจุลินทรีย์ในการย่อยสลาย เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และ ลิกนิน



รูปที่ 11 ประเภทและลักษณะของจุลินทรีย์  
ที่มา : Ayyappa kumar Sista Kameshwar.,2016

#### 4.12 จุลินทรีย์ย่อยสลายสารประเภทลิกโนเซลลูโลสในธรรมชาติ

จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประเภทลิกโนเซลลูโลสได้อย่างมีประสิทธิภาพสามารถพบเจอได้ในธรรมชาติ ซึ่งอยู่ในกลุ่มของเชื้อราแสดงดังรูปที่ 12 โดยสามารถแบ่งได้ 4 ชนิดดังนี้

##### 1. ราสีขาว (White rot fungi)

ราสีขาวมีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบของเซลล์ในเนื้อไม้ทั้งลิกนิน เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส มีคุณสมบัติในการฟอกสีจึงสามารถพบเจอว่าไม้ที่ถูกทำลายจะมีสีขาวและเป็นหย่อมๆ โดยจะมีเชื้อราบางประเภทที่ทำลายทั้ง เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนินในเวลาเดียวกัน บางชนิดก็ทำลายเฉพาะลิกนิน บางชนิดทำลายลิกนินก่อนในระยะแรกแล้วจึงทำลายเซลลูโลสและลิกนินพร้อมกันในภายหลัง ตัวอย่างของเชื้อราชนิดนี้ได้แก่ *Pycnoporus sanguineus*, *Trametes lactinae*, *Phanerochete chrysosporium* เป็นต้น

## 2. ราสีน้ำตาล (Brown rot fungi)

เป็นเชื้อราที่มีขอบอยู่บริเวณที่มีเซลลูโลสอยู่มาก หากชิ้นไม้ถูกเชื้อราชนิดนี้เข้ามาอาศัยจะเข้าไปทำลายแกนกลางของไม้ซึ่งเป็นที่อยู่ของเซลลูโลส จึงทำให้ตัวเนื้อไม้บวมลงไปเกิดรอยแตกเป็นรูปลิ่มเหลี่ยมขนาดไม่สม่ำเสมอและมีสีน้ำตาลเข้มกว่าปกติ ตัวอย่างของเชื้อราชนิดนี้ได้แก่ *G. subferrugineum* *Trametes cervino-gilvus* เป็นต้น

## 3. ราอ่อน (Soft rot fungi)

เป็นเชื้อราที่อยู่ในคลาส Ascomycetes ซึ่งเป็นราที่อยู่ในชั้นเดียวกับกับราที่ขึ้นบนผิวไม้ เป็นราที่มีการทำลายที่รุนแรงเพราะจะเข้าจู่โจมที่แกนกลางไม้และทำให้อ่อนนุ่มและเป็นผุยผง โดยพบมากที่สุดคือ *Chaetomium globosum* และ *Trichoderma reesei* ด้วยคุณสมบัติที่ทำลายไม้อย่างรุนแรงจึงใช้เป็นเชื้อรามาตรฐานในการทดสอบการใช้สารเคมีป้องกันการรักษาเนื้อไม้ เพราะราอ่อน ทนต่อสภาพแวดล้อมได้หลายรูปแบบ สามารถขึ้นได้ที่อุณหภูมิสูงกว่าเชื้อราชนิดอื่นๆได้ และทนความเป็นกรดเป็นด่างสูงกว่าเชื้อราชนิดอื่นๆ

## 4. ราผิวไม้ (Mold)

เป็นเชื้อราที่ขึ้นบนผิวไม้เท่านั้นไม่เจริญเข้าไปในเนื้อไม้ ทำให้เห็นเป็นสีหลากหลายชนิด ซึ่งเกิดจากสปอร์และเส้นใยของเชื้อรา เช่น *Trichoderma sp.*, *Aspergillus spp.*, *penicillium spp.* *Rhizopus sp.* เป็นต้น ซึ่งเชื้อรเหล่านี้เติบโตได้ในสภาวะที่มีอากาศชื้น



รูปที่ 12 แสดงเชื้อราประเภทของเชื้อราดังนี้ A (Soft rot fungi) , B (Brown rot fungi) C,D (White rot fungi and E (Mold) (ดัดแปลงจาก(Sigoillot et al., 2012) และ (กรมป่าไม้, 2006) )

#### 4.13 การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทำการทดลอง

จากงานวิจัยของ (Dionisi, Anderson, Aulenta, McCue, & Paton, 2015) ได้แสดงถึงจุลินทรีย์ประเภทต่างๆที่มีคุณสมบัติในการย่อยสลายสารประเภทลิกโนเซลลูโลส โดยจำแนกเป็นจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายนิน เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ตารางจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายลิกนิน

ชนิดของจุลินทรีย์	สารตั้งต้น	ร้อยละการย่อยสลาย	เวลา(วัน)
<b>แบคทีเรีย</b>			
<i>Pseudomonas spp.</i>	Kraft lignin	39	52
<i>Acinetobactor spp.</i>	Poplar wood	47-57	30
<i>Pseudomonas spp.</i>	Poplar wood	40-52	30
<i>Xanthomonas spp.</i>	Poplar wood	39-48	30
Mixed culture	Wood flour	80	40-60
<i>Pseudomonas spp.</i>	Wood flour	20	40-60
<i>Streptomyces badius</i>	Indulin lignin	3-4	35
<i>Streptomyces viridosporous</i>	Indulin lignin	3-4	35
<i>Streptomyces cyaneus</i>	Barley straw	29-52	21
<i>Thermomonospora mesophila</i>	Barley straw	36-48	21
<b>ฟังไจ</b>			
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Cotton stalks	40	30
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Cotton stalks	60	30
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Cotton stalks	28	14
<i>Echinodontium taxodii 2538</i>	Bamboo culms	24	28
<i>Trametes versicolor spp.</i>	Bamboo culms	9-24	28
<i>Ganoderma spp.</i>	Bamboo culms	5-16	
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Synthetic lignin	38	35
<i>Ceriporia lacerata</i>	Red pine	13	56
<i>Stereum hirsutum</i>	Red pine	15	56
<i>Polyporus brumalis</i>	Red pine	12	56

จากตารางที่ 4 จะสังเกตได้ว่า มีทั้งแบคทีเรียและฟังไจมากมายในการย่อยสลายลิกนินจากวัสดุธรรมชาติ ซึ่งจะสังเกตได้ว่าฟังไจมีการใช้ *Phanerochaete chrysosporium* มากถึง 3 การทดลองซึ่งใช้งานได้ทั้งการย่อยสลายลิกนินจากธรรมชาติและสังเคราะห์ขึ้น อีกทั้งยังมีอัตราการย่อยสลายที่ดีกว่าฟังไจชนิดอื่น

ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 อัตราการย่อยสลายลิกนินในจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

ชนิดของจุลินทรีย์	สารตั้งต้น	อัตราการย่อยสลาย (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
<i>Irpex lacteus</i>	Wood chips of <i>Pinus strobes</i>	0.007
<i>Irpex lacteus</i>	Wood chips of <i>Liriodendron tulipifera</i>	0.014
<i>Trametes versicolor</i> MrP 1	Wood chips of <i>Pinus strobes</i>	0.004
<i>Trametes versicolor</i> MrP 1	Wood chips of <i>Liriodendron tulipifera</i>	0.020
<i>Streptomyces cyaneus.</i>	Barley straw	0.0045
<i>Thermonosporamesophila</i>	Barley straw	0.004
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Cotton stalks	0.05
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Cotton stalks	0.1
<i>Echinodontium taxodii</i> 2538	Bamboo culms	0.04
<i>Trametes versicolor</i> G20	Bamboo culms	0.04
<i>Ganoderma</i> sp En3	Bamboo culms	0.03
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Cotton stalks	0.04-0.06
<i>Acinetobacter</i> spp.	Poplar wood	0.0001-0.0002

สำหรับการเลือกจุลินทรีย์สำหรับการย่อยสลายเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสได้ทำการคัดเลือกฟังไจ *Trichoderma reesei* เป็นตัวแทนจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆเนื่องจากมีอัตราการย่อยสลายที่สูงดังตารางที่ 6 และ ตารางที่ 7 เมื่อเทียบกับจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ อีกทั้งยังสามารถทำการย่อยสลายและอาศัยร่วมกับ *Phanerochaete chrysosporium* ได้อีกด้วย (Bhavika & Albert, 2014)

ตารางที่ 6 ตารางจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส

ชนิดของจุลินทรีย์	สารตั้งต้น	ร้อยละการย่อยสลาย	เวลา(วัน)
แบคทีเรีย			
<i>Cellulomonas uda</i> JC3	Avicel	15	5
<i>Cellulomonas uda</i> JC3.	Solka-Floc	20	5
<i>Cellulomonas uda</i> JC3	CC31 (Whatman no 1)	30	5

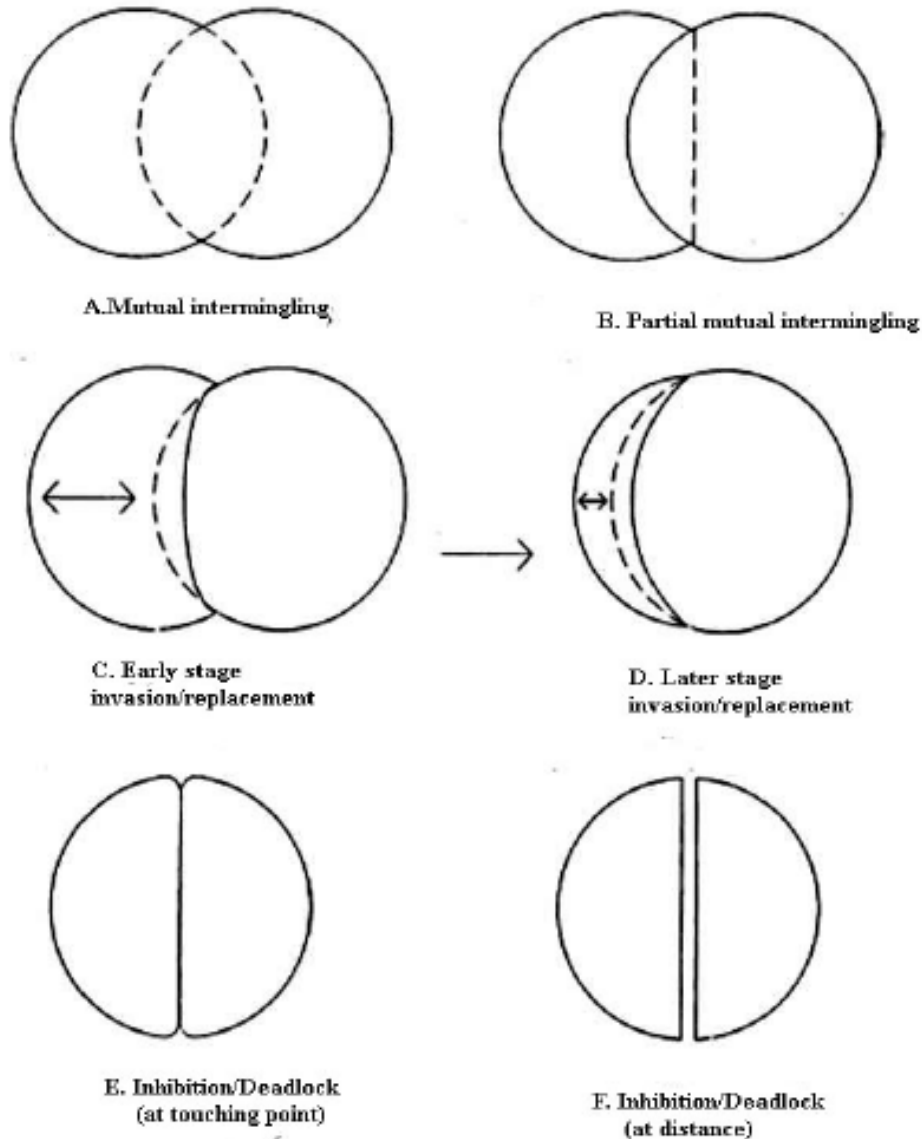
<i>Cellulomonas uda JC3</i>	Filter paper (Whatman no.1)	35	5
<i>Cellulomonas uda JC3</i>	MN300	45	5
<i>Cellulomonas uda JC3</i>	Amorphous cellulose	75	5
<i>Cellulomonas uda JC3</i>	Chromatography paper	70	5
<i>Cellulomonas fermentans</i>	MN300	60	28
<i>Cytophaga sp. LX-7</i>	Whitman CF11	100	4
<b>พึงใจ</b>			
<i>Trichoderma viride</i>	BW 200	50-75	0.5-0.12
<i>Trichoderma reesei</i>	Solka Floc 200	100	7

ตารางที่ 7 อัตราการย่อยสลายเซลลูโลสในจุลินทรีย์ชนิดต่างๆในสภาวะใช้อากาศ

ชนิดของจุลินทรีย์	สารตั้งต้น	อัตราการย่อยสลาย (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
<i>Trichoderma reesei</i>	Solka Floc 200	0.30
<i>Trichoderma viride</i>	BW 200	0.12-0.3
<i>Cellulomonas uda JC3</i>	Chromatography paper	0.25
	Avicel	0.04
	Solka-Floc	0.044
	CC31 (Whatman no 1)	0.05
	Filter paper (Whatman no.1)	0.055
	MN300	0.105

#### 4.14 การใช้จุลินทรีย์ร่วมกันสองชนิดในการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลส

จากงานวิจัยของ (Bhavika & Albert, 2014) ได้ทำการทดลองโดยการเลี้ยงจุลินทรีย์สองชนิดในอาหารเลี้ยงเชื้อเดียวกันเพื่อศึกษาว่าจุลินทรีย์ชนิดใดสามารถอยู่ร่วมกันได้ โดยศึกษาจากแผนภาพดังนี้



รูปที่ 13 แสดงประเภทของการอยู่ร่วมกันของจุลินทรีย์ โดยภาพ A คือการอยู่ร่วมกันแบบผสมอยู่ด้วยกันได้ B เป็นการอาศัยเข้าไปอยู่ด้วยกันเพียงส่วนหนึ่ง C การแทนที่กันไม่สามารถอยู่ด้วยกันได้ระยะต้น D การแทนที่กันไม่สามารถอยู่ด้วยกันได้ระยะสุดท้าย E เป็นการอยู่ร่วมกันได้แบบแยกชนิดกันและ F สามารถอยู่ด้วยกันได้แต่สร้างเอนไซม์แบ่งพื้นที่ของกันและกัน

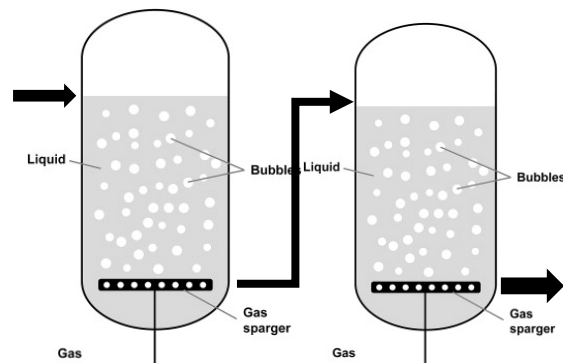
ในงานวิจัยของ (Bhavika & Albert, 2014) จุลินทรีย์ *Phanerochaete chrysosporium* สามารถอยู่ร่วมกันได้กับ *Trichoderma reesei* ซึ่งตรงกับลักษณะแบบ A โดยแสดงดังรูปที่ 13



รูปที่ 14 การอยู่ร่วมกันของ *Phanerochaete chrysosporium* (ขี้าย) กับ *Trichoderma reesei* (ขวา)

#### 4.15 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเติมอากาศไหลต่อเนื่อง (Continuous Air mixed flow bioreactor)

การทดลองบำบัดน้ำเสียโดยใช้อากาศเป่าหมุนวนแบบต่อเนื่องเลียนแบบจากระบบ CSTR เนื่องจากมีข้อดีอย่างมากมายโดยสามารถเติมอากาศให้กับจุลินทรีย์เพื่อใช้ในการเจริญเติบโตแล้วสามารถทำให้เกิดการผสมอย่างทั่วถึง (well mixed) โดยไม่ต้องใช้ใบพัดอีกทั้ง จุลินทรีย์สัมผัสกับสารอินทรีย์ได้อย่างทั่วถึงส่งผลให้จุลินทรีย์สามารถย่อยสลายได้อย่างมีประสิทธิภาพแต่ต้องมีการกรองอากาศด้วยแผ่นกรองอากาศเนื่องจากอากาศที่เติมเข้าไปอาจมีจุลินทรีย์ชนิดอื่นปะปนเข้ามาในถังปฏิกรณ์ได้



รูปที่ 15 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเติมอากาศไหลต่อเนื่อง (Continuous Air mixed flow Bioreactor)

ที่มา : ดัดแปลงจาก Holland D.J, 2015



## 5. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 5.1 สามารถย่อยสลายสารอินทรีย์ประเภท เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดน้ำเน่าเสียได้
- 5.2 เพื่อเป็นทางเลือกของการใช้จุลินทรีย์ร่วมกันในการย่อยสลายสารอินทรีย์ที่มีหลายองค์ประกอบในน้ำเสียได้
- 5.3 สามารถนำไปประยุกต์ใช้งานในโรงงานอุตสาหกรรมให้มีประสิทธิภาพที่ดียิ่งขึ้น

## 6. วิธีการทดลอง

### 6.1 อุปกรณ์การทดลอง

1. ตู้เพาะเชื้อ
2. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อแรงดันสูง (Auto Clave)
3. ตู้เขี่ยเชื้อ
4. เครื่องเขย่าสาร
5. เครื่องซั่ง 4 ตำแหน่ง
6. บั้มสุญญากาศ (Vacuum pump)
7. ปิเปตและปิเปตขนาดจุลภาค (Micro pipette)
8. หลอดเก็บสารขนาดเล็ก Micro tube
9. เทอร์โมมิเตอร์
10. ท่อยาง
11. ปีกเกอร์
12. ขวดปรับปริมาตร
13. แ่งแก้วคนสาร
14. ซ้อนตักสาร
15. ตะเกียงแอลกอฮอล์
16. เพลตเลี้ยงเชื้อ
17. ใบบิดผ้าตัด
18. แ่งแก้วสามเหลี่ยม

19. เซ็มฉีดยา
20. กระจกครอบ GF/C
21. ตะแกรงใส่หลอดทดลอง
22. เครื่อง Water bath
23. เครื่องปั่นเหวี่ยง
24. ขวดพลาสติก
25. เครื่องเขย่า
26. เต้าอบอุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส
27. เครื่องวัดค่า pH (pH meter)
28. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)
29. แผ่น Thin-layer chromatography

## 6.2 สารเคมี

1. DI Water
2. Alcohol
3. Lignocellulose จากต้นยางพารา
4. Acetone
5. Calcium chloride
6. Tryptone
7. Sodium nitrate
8. Dipotassium phosphate
9. Potassium chloride
10. Magnesium sulphate
11. Ferrous sulphate
12. Yeast extract
13. Agar
14. Methanol
15. Acetic acid

16. Sodium potassium tartrate
17. Sodium hydroxide
18. Sodium citrate buffer
19. Acetonitrile
20. Phenolphthalein
21. Digestion reagent
22. Sulfuric acid reagent
23. Ferrous ammonium sulfate (FAS)
24. Ferroin อินดิเคเตอร์
25. Chloroform
26. Acetic acid
27. Acid detergent reagent

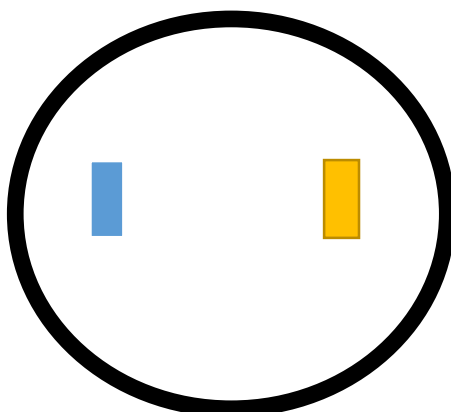
### 6.3 จุลินทรีย์

1. *Phanerocheate chysosporium*
2. *Trichoderma reesei*

## 6.4 ขั้นตอนการทดลอง

การเพาะจุลินทรีย์และการอาศัยอยู่ร่วมกันของจุลินทรีย์

เนื่องจากงานวิจัยของ Bhavika et al.,2014 ได้ทำงานวิจัยเกี่ยวกับการอาศัยอยู่ร่วมกันของจุลินทรีย์ โดยหนึ่งในการทดลองนั้นคือการทดลองให้ *Phanerocheate chysosporium* ซึ่งเป็นราขาวมีคุณสมบัติในการย่อยสลายลิกนิน อาศัยอยู่ร่วมกันกับ *Trichoderma reesei* ที่มีคุณสมบัติในการย่อยสลายเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสในอาหาร Potato dextrose agar เพื่อพิสูจน์ว่าเป็นไปตามงานวิจัยของ Bhavika จึงทำการทดลองเลี้ยงจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดให้อยู่ร่วมกันบนอาหารเลี้ยงเชื้อเดียวกัน โดยใช้มีดผ่าตัดตัดชิ้นส่วนจุลินทรีย์จากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้มาจาก สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติและศูนย์ชีววัสดุขนาด 0.5x1 เซนติเมตรแล้วนำมาวางในอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar ในลักษณะแบ่งครึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อกันดังรูปต่อไปนี้



รูปที่ 16 ลักษณะการเลี้ยงจุลินทรีย์ร่วมกัน

การเพาะจุลินทรีย์ในอาหารเหลว

หลังจากทำการทดลองดังรูปที่ 16 แล้วนำชิ้นส่วนจุลินทรีย์ *Phanerocheate chysosporium* และ *Trichoderma reesei* ใช้มีดผ่าตัด ตัดชิ้นส่วนจุลินทรีย์จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ และศูนย์ชีววัสดุให้ได้ขนาด 0.5x1 เซนติเมตร ชนิดละ 1 ชิ้นนำไปใส่ ขวดลูกผสมฟู่ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารเหลว Potato dextrose broth จำนวน 150 มิลลิลิตร 2 ขวด ปิดจุกด้วยสำลีพันผ้าก๊อซ จากนั้นนำเข้าเครื่อง incubator shaker เพื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์สำหรับนำไปใช้ในเครื่องปฏิกรณ์แบบเติมอากาศหมุนวน โดย

จุลินทรีย์ *Phanerocheate chysoporium* ใช้เวลาในการเพาะเลี้ยง 90 ชั่วโมงก่อนนำไปใช้งาน ส่วน  
จุลินทรีย์ *Trichoderma reesei* ใช้เวลาในการเพาะเลี้ยง 60 ชั่วโมงก่อนนำไปใช้งาน

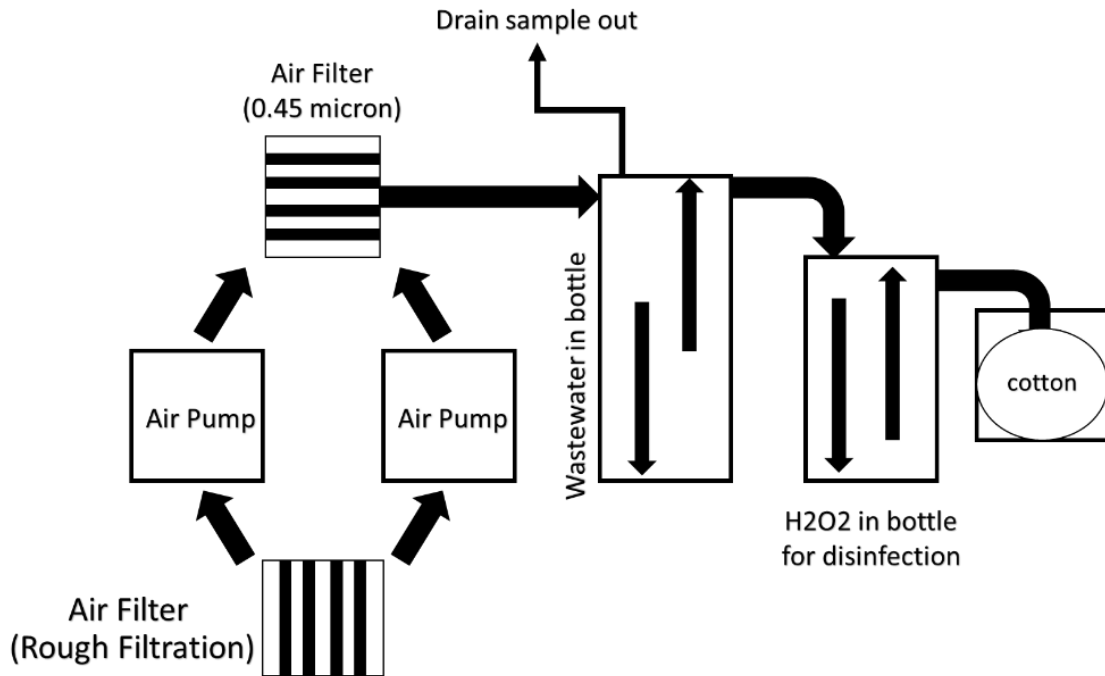
#### 6.5 การเตรียมน้ำเสียสังเคราะห์ (Yang et al.,2014)

1. ไม้ยางพาราอบแห้งบดละเอียด 6 กรัมต่อลิตร
2. Ammonium sulfate 2 กรัมต่อลิตร
3. Potassium hydrogen phosphate 1.5 กรัมต่อลิตร
4. Magnesium sulfate 0.4 กรัมต่อลิตร
5. Calcium chloride 0.5 กรัมต่อลิตร
6. Ferrous sulfate 0.01 กรัมต่อลิตร
7. Manganese sulfate 0.0032 กรัมต่อลิตร
8. Tween-80 2 มิลลิลิตรต่อลิตร

ผสมสารเคมีกับไม้ยางพาราอบแห้งบดละเอียดทั้งหมดกับน้ำกลั่นนำไปให้ความร้อนบน hot plate ก่อนเติมสาร Tween-80 เพื่อป้องกันสารจับตัวเป็นก้อนและไม่ละลายเข้ากัน ปรับปริมาณให้ได้ 1 ลิตร จากนั้นปรับ pH ด้วย citrate buffer 0.5 โมลาร์ จนมีค่า pH อยู่ที่ 5 แล้วนำเข้าหม้อนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ตั้งทิ้งไว้จนอุณหภูมิลดลงมาเท่าอุณหภูมิห้องก่อนนำไปใช้งานในถังปฏิกรณ์

## 6.6 วิธีการดำเนินการเลี้ยงจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์แบบกะ

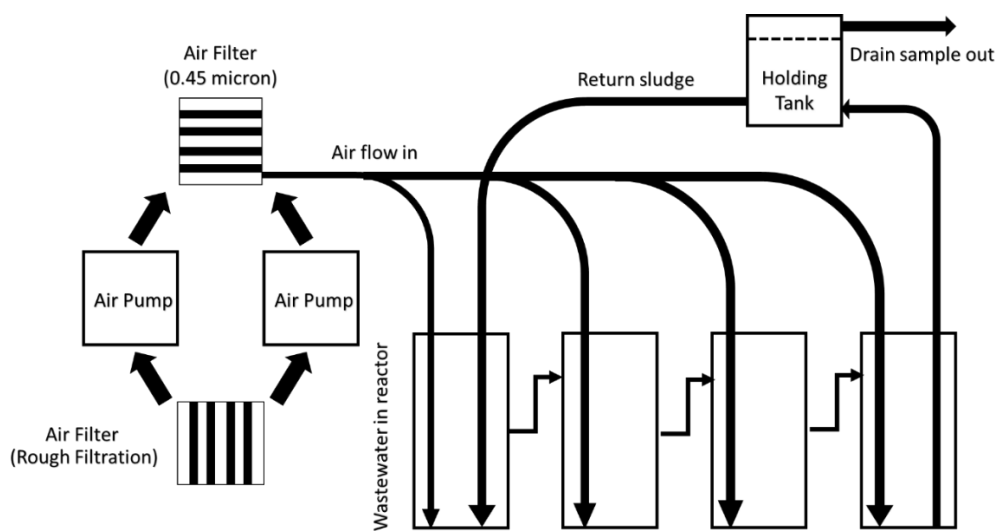
ทำการต่ออุปกรณ์ดังภาพและแผนผังต่อไปนี้



รูปที่ 17 แสดงแผนผังและการต่ออุปกรณ์สำหรับถังปฏิกรณ์แบบกะ

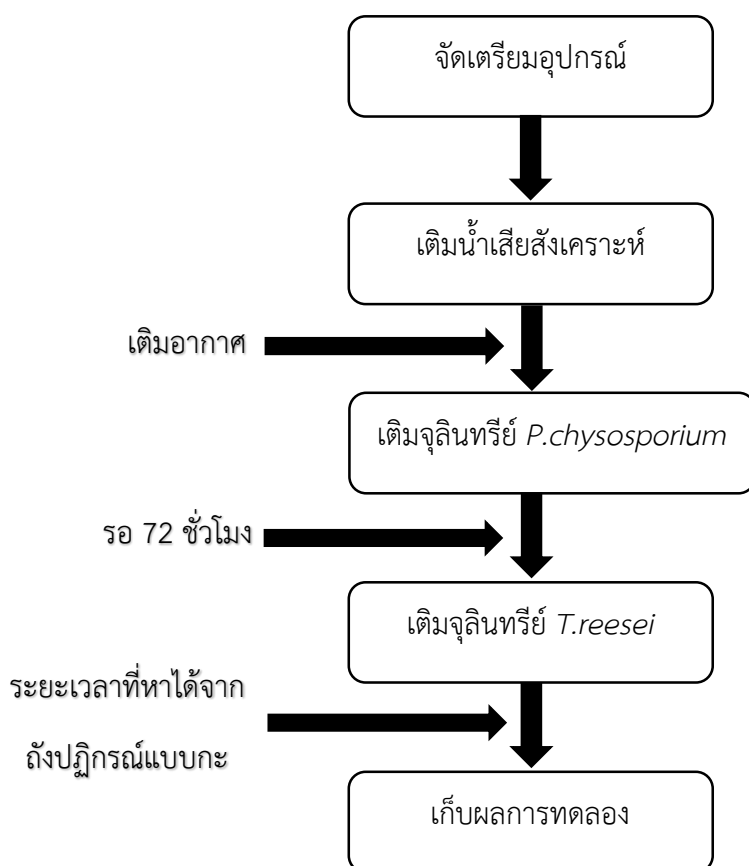
ต่ออุปกรณ์ดังภาพที่ 17 แล้ว เติมน้ำเสียสังเคราะห์ 500 มิลลิลิตร จากนั้นเติมจุลินทรีย์ *Phanerocheate chysosporium* 5 มิลลิลิตร ( $5 \times 10^5$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร) แล้วปิดฝา เปิดปั๊มให้อากาศ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้น ถึงเติมเชื้อ *Trichoderma reesei* ลงไป เนื่องจากเป็นเวลาที่เหมาะสมในการใช้ จุลินทรีย์ร่วมกัน จากนั้นปล่อยให้ระบบเดินต่อไปเรื่อยๆ แล้วหาระยะเวลาที่จุลินทรีย์สามารถทำงานร่วมกัน แล้วสามารถย่อยสลายสารอินทรีย์ได้มากที่สุดเพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการกำหนดอัตราไหลในถัง ปฏิกรณ์แบบ เติมน้ำอากาศไหลต่อเนื่อง

### 6.7 วิธีการดำเนินการเลี้ยงจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์แบบเติมน้ำอากาศไหลต่อเนื่อง



รูปที่ 18 แสดงแผนผังและการต่ออุปกรณ์สำหรับถังปฏิกรณ์แบบเติมน้ำอากาศไหลต่อเนื่อง

ทำการต่ออุปกรณ์ดังภาพที่ 18 จากนั้นเติมน้ำเสียสังเคราะห์ลงในถังปฏิกรณ์ถังละ 250 มิลลิลิตร จากนั้นเติมจุลินทรีย์ *Phanerocheate chysosporium* ถังละ 5 มิลลิลิตร ( $5 \times 10^5$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร) เปิดปั๊มให้อากาศ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นเติมจุลินทรีย์ *Trichoderma reesei* ถังละ 5 มิลลิลิตร ( $1 \times 10^6$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร) ลงไป เก็บผลการทดลองบริเวณถังพัก ตามระยะเวลาที่เหมาะสมจากถังปฏิกรณ์แบบกะ จำนวน 6 ครั้ง ดังนี้



รูปที่ 19 แผนผังการดำเนินการเลี้ยงจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเติมอากาศไหลต่อเนื่อง

## 6.8 การหาสัดส่วนของ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนินในเนื้อไม้

เนื่องจากสารลิกโนเซลลูโลสที่ใช้เป็นไม้ต้นยางพารา จึงต้องทำการหาสัดส่วนให้ได้ก่อนจะทำการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์โดยมีขั้นตอนดังนี้



### 6.8.1 การหาปริมาณ เฮมิเซลลูโลส

1. เตรียม Sodium hydroxide ความเข้มข้น 0.5 mol/L
2. ชั่งไม้ยางพาราที่อบและบดละเอียด 5 กรัม ต่อ อะซิโตน 120 ml
3. ทำการสกัดด้วยวิธีการ Soxhlet ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที
4. หลังสกัดเสร็จแล้วล้างด้วยอะซิโตนเล็กน้อยแล้ว ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที
5. ชั่งตัวอย่างไม้ยางพาราบดละเอียด 0.3 กรัม (W1) ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 15 ml. เติม NaOH ที่เตรียมในข้อ 1 ปริมาณ 3 ml จากนั้นนำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศา 3 ชั่วโมง
6. หลังจากอบ นำตัวอย่างมากรองด้วยปั๊มสุญญากาศ ล้างด้วยน้ำกลั่นจนมีค่าเป็นกลาง นำไปอบแห้ง จากนั้นใส่โถดูดความชื้นแล้วนำมาชั่งน้ำหนัก (W2) แล้วคำนวณดังสูตรต่อไปนี้

$$\% \text{Hemicellulose} = \frac{W1 - W2}{W1} \times 100$$

โดยที่ W1 คือน้ำหนักเริ่มต้น (กรัม)

W2 คือน้ำหนักตัวอย่างหลังการอบ (กรัม)

### 6.8.2 การหาปริมาณลิกนินและเซลลูโลส

1. ชั่งตัวอย่างบดละเอียดประมาณ 1 กรัม ลงใน ปีกเกอร์ขนาด 500 มิลลิลิตร
2. เติมสารละลาย Acid detergent 100 มิลลิลิตร และ Decahydronaphthalene 2 มิลลิลิตร
3. ให้ความร้อนจนน้ำเริ่มเดือดเป็นเวลา 10 นาทีแล้วลดอุณหภูมิลงปล่อยให้เย็น 60 นาที
4. นำไปกรองใน crucible ที่กรองและชั่งน้ำหนักแล้ว (w1) แล้วล้างตัวอย่างด้วยน้ำร้อนใน crucible จากนั้นนำ crucible พร้อมตัวอย่างไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากอบนำเข้าโถดูดความชื้นแล้วชั่งจذبหนักไว้ (w2)
5. นำ crucible ที่มีตัวอย่าง อยู่ประมาณครึ่งถ้วย ใช้แท่งแก้วกวานวนไปวนมาหากน้ำเริ่มแห้งให้เติมเรื่อยๆเป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยน้ำร้อนจนกว่ากรดจะหมด

6. นำ crucible ที่ล้างด้วยน้ำร้อนแล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 8 ชั่วโมง หลังจากอบเสร็จนำเข้า โถดูดความชื้นแล้วชั่งน้ำหนักแล้วบันทึกไว้ (w3)

7. นำตัวอย่างที่อยู่ใน crucible เข้าเตาเผา muffle ที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง

8 นำออกจากเตาเผาใส่โถดูดความชื้นแล้วชั่งน้ำหนักบันทึกไว้ จากนั้นคำนวณดังสูตรต่อไปนี้

$$ADF = \frac{w2-w1}{S} \times 100$$

$$L = \frac{w3-w4}{S} \times 100$$

$$C = ADF - L$$

โดยกำหนดให้

ADF = Acid detergent fiber (%)

L = ปริมาณของลิกนิน (%)

C = ปริมาณเซลลูโลส (%)

W1 = น้ำหนักเริ่มต้นของ crucible เปล่า (กรัม)

W2 = น้ำหนัก crucible + น้ำหนักตัวอย่างหลัง acid detergent (กรัม)

W3 = น้ำหนัก crucible + น้ำหนักตัวอย่างหลังการอบ (กรัม)

W4 = น้ำหนัก crucible + น้ำหนักตัวอย่างหลังการเผา (กรัม)

S = น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น (กรัม)

## 6.9 การศึกษาการย่อยสลายเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสโดยใช้วิธี Thin-layer chromatography (TLC)

นำน้ำเสียจากข้อ 6.7 มาทำการวิเคราะห์หาอัตราการย่อยสลายเซลลูโลสโดยขั้นตอนการวิเคราะห์มีดังนี้ (Karima Srih Belghitha, 2011)

1. นำตัวอย่างน้ำเสียที่หลังจากการใส่จุลินทรีย์ *Trichoderma reesei* 72 ชั่วโมงไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9100 G เวลา 5 นาที เพื่อแยกเอาส่วนที่เป็นเอนไซม์มาวิเคราะห์
2. หาความเข้มข้นของกลูโคส ฟรุคโตส โซโลส เพื่อใช้เป็นตัว Standard โดยการเปลี่ยนแปลงปริมาณกลูโคสเพื่อให้ได้ Standard ที่เหมาะสม
3. นำเอนไซม์ที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงมาหยดจุดละ 2 ไมโครลิตรและเป่าให้แห้ง ทำเช่นนี้ให้ครบ 5 ครั้ง และนำไปแช่ในสารละลายสำหรับวิเคราะห์ TLC โดยแข่งขันกว่าสารละลายจะเคลื่อนที่ไปสุดแผ่นที่ใช้วิเคราะห์
4. เมื่อแช่สารละลายเสร็จให้ใช้สารเคลือบสำหรับวิเคราะห์ TLC พ่นลงบนแผ่นวิเคราะห์ จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
5. ทำการเปรียบเทียบตัวอย่างกับ Standard จะทำให้ทราบการย่อยสลายเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสของจุลินทรีย์

## 6.10 การศึกษาการวัดค่า Kinetic

ค่า Kinetic ที่ทำการวัดคือค่า COD ซึ่งค่า COD สามารถบ่งบอกถึงการย่อยสลายของสารอินทรีย์ได้ โดยจะทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 72 ชั่วโมง เป็นเวลาทั้งหมด 432 ชั่วโมง ซึ่งการวัดค่า Kinetic จะทำทั้งหมด 2 ชุดเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบ จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาค่า COD ด้วยใช้วิธีการรีฟลักซ์แบบปิด/การไทดเรท (Closed Reflux, Titrimetric Method) ดังนี้ (ไพฑูรย์ หมายมั่นสมสุข)

1. ล้างหลอดทดลอง (Digestion Tubes) และฝาจุกด้วยกรดซัลฟิวริกร้อยละ 20 ก่อนนำไปใช้ เพื่อป้องกันการปนเปื้อนด้วยสารอินทรีย์
2. เลือกใช้ปริมาตรของตัวอย่างน้ำและสารเคมีที่เหมาะสม ตามตารางที่ 3.1
3. นำตัวอย่างน้ำมาใส่หลอดทดลองที่เตรียมไว้ เติมสารละลาย digestion reagent
4. ค่อยๆเทกรดซัลฟิวริกเอเจนต์ลงไปหลอดโดยให้กรดซัลฟิวริกเอเจนต์ไหลลงก้นหลอดแก้ว เพื่อให้ชั้นของกรดอยู่ใต้ชั้นตัวอย่างน้ำและ digestion reagent
5. ปิดจุกหลอดแก้วให้แน่นแล้วคว่ำหลอดแก้วไปมาหลาย ๆ ครั้งอย่างทั่วถึงก่อนจะนำตัวอย่างไปรีฟลักซ์ เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดความร้อนสะสมอยู่ที่ก้นหลอด ซึ่งอาจแตกได้ในขณะทำการรีฟลักซ์

6. ให้ทำ blank โดยใช้น้ำกลั่นแทนน้ำตัวอย่างด้วยวิธีการทดลองเช่นเดียวกันกับการวิเคราะห์น้ำตัวอย่าง ประมาณ 1-2 หลอด
7. นำหลอดแก้วทั้งหมดที่ใส่น้ำตัวอย่างและ Blank วางบนที่ตั้งหลอดทดลอง แล้วเข้าเตาอบที่ทำให้อุณหภูมิสูงถึง  $150 \pm 2$  องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลา 2 ชั่วโมง ให้นำตัวอย่างออกมาทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งเย็น
8. เทตัวอย่างจากหลอดใส่ลงในขวดรูปชมพู่แล้วไทเทรตกับสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต (FAS) เข้มข้น 0.1 N จนกระทั่งถึงจุดยุติ จะเห็นการเปลี่ยนแปลงจากสีเหลืองเป็นสีฟ้าอมเขียว และเป็นสีน้ำตาลแดงที่จุดยุติ อ่านปริมาตรที่ไทเทรตตอนเริ่มเปลี่ยนสีเป็นสีน้ำตาลแดงทันที

ตารางที่ 8 ปริมาณตัวอย่างและรีเอเจนต์ที่ใช้สำหรับขนาดต่างๆของภาชนะที่ใช้ในการย่อยสลาย

Digestion Tubes	Sample (ml)	Digestion reagent (ml)	Sulfuric acid reagent (ml)	Total (ml)
16x100 mm	2.5	1.5	3.5	7.5
20x150 mm	5.0	3.0	7.0	15.0
25x150 mm	10.0	6.0	14.0	30.0
Standard 10 mL ampule	2.5	1.5	3.5	7.5

### 6.11 การวัดการย่อยสลายของลิกนิน

ทำการศึกษการย่อยสลายของลิกนินโดยการนำตัวอย่างที่เก็บทุกๆ 72 ชั่วโมง เปรียบเทียบ กับ blank จากนั้นนำไปวัดกับเครื่อง spectrophotometer ที่ช่วงความยาวคลื่นที่ 350 นาโนเมตร จำนวน 6 ครั้ง จากนั้นทำ standard curve เพื่อเทียบการย่อยสลายลิกนิน ทั้งนี้ต้องทราบร้อยละของลิกนินในเนื้อไม้จากการทดสอบในหัวข้อที่ 6.7

### 6.12 การวัดค่าสารแขวนลอย

ทำการวัดค่าสารแขวนลอยเพื่อบ่งบอกลักษณะของน้ำเสียโดยคำนวณดังสูตรต่อไปนี้

$$\text{ของแขวนลอยทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อลิตร)} = \frac{\square - \square}{\square \square \square \square \square \square (\square \square)} \times 10^6$$

เมื่อ A เป็นน้ำหนักของกระดาษกรองผสมกับของแขวนลอย (กรัม)

B เป็นน้ำหนักของกระดาษกรอง (กรัม)

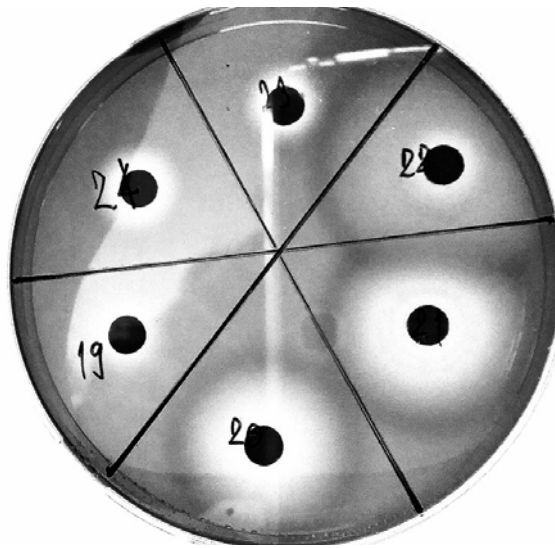
## 7. ผลการทดลองและอภิปรายผล

### 7.1 การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถที่ดีที่สุดในการย่อยสลายเซลลูโลสโดยใช้วิธี Congo red

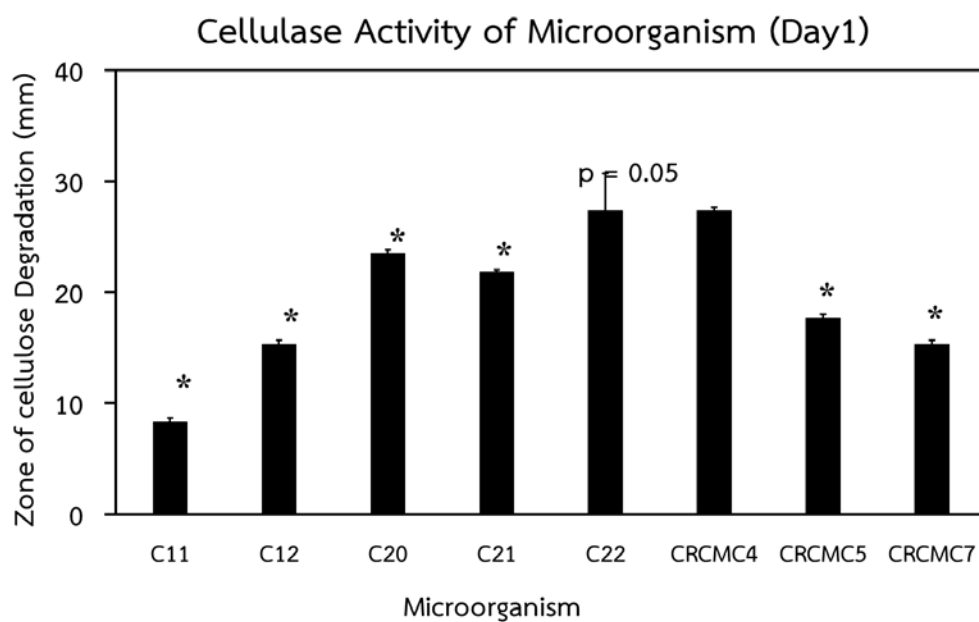
นำจุลินทรีย์ที่อยู่ในบ่อบำบัดน้ำเสียของโรงงานผลิตกระดาษมาทำการคัดเลือกโดยใช้วิธี Spread plate บนอาหารแข็ง CMC เพื่อเป็นการคัดเลือกจุลินทรีย์เบื้องต้น จากนั้นนำเชื้อจุลินทรีย์ที่เติบโตบนอาหารแข็ง CMC มาทำการคัดเลือกโดยใช้วิธี Streak plate นำมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง Congo red CMC เพื่อให้ง่ายต่อการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส จากการทดลองเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์บนอาหารแข็ง Congo red CMC ทั้งหมด 30 ตัว พบว่ามีจุลินทรีย์ทั้งหมด 8 ตัว ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ ซึ่งได้แก่ ตัวที่ C11, C12, C20, C21, C22, CRCMC4, CRCMC5, และCRCMC7 โดยจะสังเกตขนาดของวงใสที่เกิดขึ้นรอบจุดที่หยดเชื้อซึ่งเรียกว่า “Clear zone” ซึ่ง Clear zone เกิดจากการที่จุลินทรีย์เจริญแล้วปล่อยเอนไซม์เซลลูเลสไปทำปฏิกิริยากับสารอาหารที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วเกิดเป็นวงใสขึ้นซึ่งวงใสนั้นอาจมองเห็นได้โดยตรงในอาหารหรืออาจต้องเติมสารไปทำปฏิกิริยาบนอาหารจึงจะเห็นเป็นวงใส clear zone ทำการวัดขนาดวงใสโดยใช้เวอร์เนียร์คาลิปเปอร์คัดเลือกโคโลนีเชื้อจุลินทรีย์ที่มีขนาดวงใสกว้างกว่าโคโลนีอื่น แสดงว่ามีแนวโน้มที่จะมีประสิทธิภาพสูงในการย่อยเซลลูโลส ซึ่งทำการวัดขนาดวงใสของจุลินทรีย์ทั้ง 8 ตัว หลังจากเลี้ยงเชื้อภายใน 24 ชั่วโมง พบว่ามีขนาดเท่ากับ 8.33, 15.33, 23.50, 21.83, 27.33, 27.33, 17.57, และ 15.33 มิลลิเมตร ตามลำดับ และเมื่อทำการเลี้ยงจนครบ 48 ชั่วโมงพบว่าขนาดของวงใสของจุลินทรีย์ทั้ง 8 ตัว มีขนาดเท่ากับ 34.00, 38.33, 54.00, 51.67, 56.67, 61.33, 49.67 และ 48.67 ตามลำดับ

จากงานวิจัยของ Juntakorn et al (2015) ได้ทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยวิธี Congo red พบว่าสามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสได้ทั้งหมด 21 ไอโซเลต วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (clear Zone) ต่อโคโลนีของจุลินทรีย์คัดเลือกโคโลนีที่มีขนาดวงใสกว้าง 18 มิลลิเมตรขึ้นไป ซึ่งมีทั้งหมด 8 ไอโซเลต ที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสได้ดีที่สุด จากการศึกษาการคัดแยกเชื้อราจากตัวอย่างลูกแป้งข้าวหมากและก้อนเชื้อเห็ดของ Wittanalai, S. และคณะ (2015) สามารถคัดแยกจุลินทรีย์ได้ทั้งหมด 13 ไอโซเลต เมื่อนำเชื้อราที่คัดแยกได้มาทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสโดยสังเกตการเกิดวงใสบนอาหาร CMC agar หลังจากการบ่มเชื้อเป็นเวลา 3 วันแล้วเททับด้วย Congo red ผลการทดสอบพบว่าเชื้อราที่มีความสามารถสร้างวงใสได้นั้นมีทั้งหมด 9 ไอโซเลต (Figure 1) ซึ่งเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณวงใสเฉลี่ยของไอโซเลต S1-3 มีขนาดมากที่สุด (57.00 มิลลิเมตร) รองลงมา คือ ไอโซเลต M1-4 (31.17 มิลลิเมตร) และไอโซเลต S2-1 (18.33 มิลลิเมตร) ตามลำดับ

เมื่อทำการเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่ศึกษาการคัดเลือกจุลินทรีย์โดยวัดจากขนาดวงใสที่เกิดขึ้นพบว่าจากการทดลองได้ขนาดใกล้เคียงกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้มีความแตกต่างกันเนื่องจากความสามารถของจุลินทรีย์ในการใช้สารอาหารโดยเฉพาะแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตจึงส่งผลให้จุลินทรีย์แต่ละตัวเกิดการย่อยสลายเซลลูโลสที่ต่างกันไปด้วย



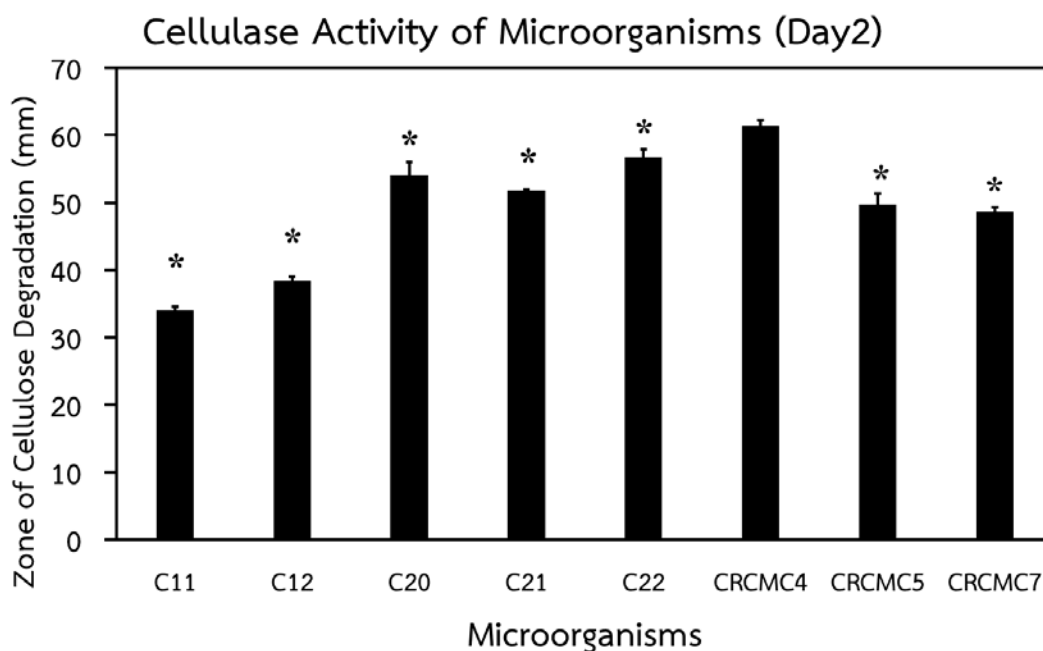
รูปที่ 20 ตัวอย่างวงใสที่เกิดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์



รูปที่ 21 กราฟแสดงความกว้างของวงใสที่เกิดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ ณ วันที่ 1

หมายเหตุ \* คือแสดงระยะห่างที่ความเชื่อมั่น  $p < 0.05$  โดยการเทียบ t-test

จากรูปที่ 20 พบว่าจุลินทรีย์ C22 และ CRCMC4 มีขนาดวงใสกว้างที่สุด ซึ่งแสดงถึงการเกิดกิจกรรมของจุลินทรีย์ในการย่อยสลายเซลลูโลส เมื่อเทียบกับจุลินทรีย์ตัวอื่นๆ จากกราฟจะแสดงให้เห็นความแตกต่างของขนาดวงใสของจุลินทรีย์แต่ละตัว อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาผลการทดลองพบว่าจุลินทรีย์ C22 และ CRCMC4 มีขนาดวงใสใกล้เคียงกันมากจึงทำการเปรียบเทียบอย่างมีนัยสำคัญด้วยวิธีทางสถิติโดยใช้การเทียบ T-test ที่ความเชื่อมั่น  $p < 0.05$  พบว่าจุลินทรีย์ทั้งสองตัวมีขนาดวงใสที่เท่ากันทำให้ไม่สามารถคัดจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสได้ดีที่สุด



รูปที่ 22 กราฟแสดงความกว้างของวงใสที่เกิดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ ณ วันที่ 2

หมายเหตุ \* คือแสดงระยะห่างที่ความเชื่อมั่น  $p < 0.05$  โดยการเทียบ t-test

จากรูปที่ 22 พบว่าเมื่อทำการเลี้ยงจุลินทรีย์ต่อจนครบ 48 ชั่วโมง พบว่าขนาดของวงใสของจุลินทรีย์ CRCMC4 มีขนาดวงใสที่กว้างที่สุดเท่ากับ 61.33 มิลลิเมตร เมื่อเทียบกับจุลินทรีย์ C22 และจุลินทรีย์ตัวอื่นๆ จะเห็นได้ว่าขนาดของวงใสมีขนาดที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยการใช้การเปรียบเทียบด้วยวิธี T-test ที่ความเชื่อมั่น  $p < 0.05$  อย่างไรก็ตามการทดสอบด้วยวิธี Congo red เป็นเพียงแนวทางในการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสเพื่อไปใช้ในขั้นตอนถัดไปเท่านั้น

## 7.2 วิเคราะห์ปริมาณกลูโคสที่เกิดจากการย่อยสลายเซลลูโลสโดยวิธี DNS เพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสได้ดีที่สุด และการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์

### 7.2.1 การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสโดยวิธี DNS

การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสด้วยวิธี DNS เป็นการวัดหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้นจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ ขั้นตอนนี้เป็น การคัดเลือกหาจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสได้ดีที่สุดอีกวิธีหนึ่ง โดยการนำจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ทั้งหมด 8 ตัว โดยให้แต่ละตัวชื่อว่า CDB1, CDB2, CDB3, CDB4, CDB5, CDB6, CDB7 และCDB8 มาทำการวัดปริมาณกลูโคสโดยวิธี DNS ซึ่งกระบวนการวัด DNS จะแบ่งออกเป็น 2 ตอนหลักๆ โดยตอนที่ 1 เป็นการวัดปริมาณกลูโคสโดยวิธี DNS ซึ่ง Blank ที่ใช้จะเป็น สารละลาย DNS 3 มิลลิลิตร ผสมกับอาหารเหลว CMC จำนวน 0.5 มิลลิลิตร และ 2% CMC ใน Sodium citrate เข้มข้น 0.05 M จำนวน 0.5 มิลลิลิตร ซึ่งการวิเคราะห์ในตอนที่ 1 จะเป็นการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อทั้ง 8 ตัว ว่าจุลินทรีย์เหล่านี้มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสและอนุพันธ์ของเซลลูโลสได้มากน้อยเพียงใด ซึ่งการทดลองในตอนที่ 1 นี้เอนไซม์จะย่อยอนุพันธ์ของเซลลูโลสนั้นก็คือ CMC จากการทดลองพบว่า CDB1, CDB2, CBD3, CDB4, CDB5,CDB6, CDB7 และCBD8 มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสได้ดังตารางที่

ตารางที่ 9 แสดงค่าปริมาณน้ำตาลที่วัดได้โดยวิธี DNS ตอนที่ 1

ชื่อจุลินทรีย์	ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์ (IU/ml)
CDB1	0.0615
CDB2	0.0453
CDB3	0.0494
CDB4	0.0533
CDB5	0.0607
CDB6	0.0560
CDB7	0.0538
CDB8	0.0489



จากตารางที่ 9 เป็นค่าที่ได้จากการวัดปริมาณน้ำตาลของจุลินทรีย์ทั้ง 8 ตัว ในหน่วยของ IU/ml ซึ่ง IU หรือ International unit เป็นการบอกถึงเอนไซม์ 1 หน่วย ซึ่งเป็นปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาให้เกิดผลผลิต 1 ไมโครโมล/นาที่ ได้ภาวะที่กำหนด ดังนั้นจากการทดลองพบว่าจุลินทรีย์ CDB1 มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสหรืออนุพันธ์ของเซลลูโลสได้ดีที่สุดซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.0615 IU/ml รองลงมาคือ จุลินทรีย์ CDB5 เท่ากับ 0.0607 IU/ml และจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสได้น้อยที่สุดคือ CDB2 เท่ากับ 0.0453 IU/ml

ส่วนการวัดปริมาณกลูโคสโดยวิธี DNS ในตอนที่ 2 ซึ่ง Blank ที่ใช้จะเป็น สารละลาย DNS 3 มิลลิลิตร ผสมกับอาหารเหลว CMC จำนวน 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับ Sodium citrate เข้มข้น 0.05 M จำนวน 0.5 มิลลิลิตร ซึ่งการวิเคราะห์ในตอนที่ 2 จะต่างจากตอนที่ 1 คือจะมีการใส่กระดาษ Whatman No.1 จำนวน 50 มิลลิกรัม แทนการใส่สารละลายเซลลูโลสหรืออนุพันธ์ของเซลลูโลส ซึ่งการทดลองตอนที่ 2 นี้จะเป็นการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 8 ตัว ว่าจุลินทรีย์เหล่านี้มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสและอนุพันธ์ของเซลลูโลสได้มากน้อยเพียงใด ซึ่งเอนไซม์จะทำการย่อยเซลลูโลสที่อยู่ในเนื้อกระดาษให้เป็นน้ำตาลกลูโคสนั่นเอง จากการทดลองพบว่า CDB1, CDB2, CBD3, CDB4, CDB5, CDB6, CDB7 และCBD8 มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสได้ดังตารางที่

ตารางที่ 10 แสดงค่าปริมาณน้ำตาลที่วัดได้โดยวิธี DNS ตอนที่ 2

ชื่อจุลินทรีย์	ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์ (IU/ml)
CDB1	0.0319
CDB2	0.0366
CDB3	0.0449
CDB4	0.0456
CDB5	0.0305
CDB6	0.0356
CDB7	0.0282
CDB8	0.0179

จากตารางที่ 10 พบว่าจุลินทรีย์ CDB4 มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสหรืออนุพันธ์ของเซลลูโลสได้ดีที่สุดซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.0456 IU/ml รองลงมาคือ จุลินทรีย์ CDB3 เท่ากับ 0.0449 IU/ml และจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสได้น้อยที่สุดคือ CDB8 เท่ากับ 0.0179 IU/ml

จากงานวิจัยของ Pratima Gupta และคณะ(2011) ได้ทำการวิจัยเกี่ยวกับการแยกแบคทีเรียที่ย่อยสลายเซลลูโลสจากธรรมชาติและหาค่าศักยภาพของเซลล์ไลติก ซึ่งในการวิจัยได้ทำการวัดกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสทั้งหมด 8 ตัว โดยการทดลองแบ่งเป็น 2 ตอน การทดลองตอนที่ 1 เป็นการย่อยสลายเซลลูโลสโดยใช้สารละลาย CMC พบว่ามีจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสและอนุพันธ์ของเซลลูโลสได้มากที่สุดอยู่ที่ 0.400 IU/ml และจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสน้อยที่สุดอยู่ที่ 0.1622 IU/ml ในตอนที่ 2 เป็นการย่อยสลายเซลลูโลสโดยใช้กระดาษ Whatman No.1 พบว่ามีจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสและอนุพันธ์ของเซลลูโลสได้มากที่สุดอยู่ที่ 0.196 IU/ml และจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสน้อยที่สุดอยู่ที่ 0.012 IU/ml ซึ่งเมื่อนำค่าจากการทดลองมาเปรียบเทียบกับงานวิจัย พบว่าค่าปริมาณการย่อยสลายเซลลูโลสหรือปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้นมีค่าน้อยกว่าเมื่อเทียบกับงานวิจัย ทั้งนี้เป็นเพราะความแข็งแรงและความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสเนื่องจากการในการทดลองได้คัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์มาจากบ่อบำบัดน้ำเสียของโรงงานผลิตกระดาษจึงทำให้เชื้อจุลินทรีย์ไม่แข็งแรงเท่ากับจุลินทรีย์ที่อยู่ตามธรรมชาติ

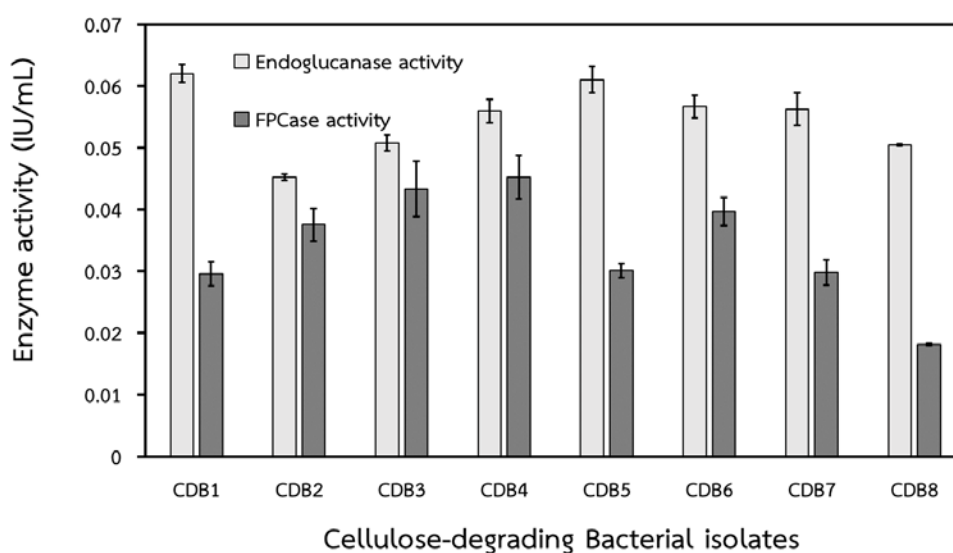
อย่างไรก็ตามเพื่อให้ทราบว่าปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่วัดได้นั้นเกิดจากความสามารถของจุลินทรีย์ในการย่อยสลายเซลลูโลสและอนุพันธ์ของเซลลูโลส ในการทดลองจึงมีการวัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสของเอนไซม์โดยนำเอนไซม์ของจุลินทรีย์ชนิดละ 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับ Citrate buffer 0.5 มิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี DNS พบว่าค่าที่วัดได้นั้นมีค่าน้อยมากเมื่อเทียบกับการทดลองในตอนที่ 1 และตอนที่ 2 ดังนั้นจากการทดลองพบว่าค่าปริมาณน้ำตาลที่วัดได้ในตอนที่ 1 และตอนที่ 2 เป็นปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เกิดจากการย่อยสลายเซลลูโลสจริงซึ่งตารางที่ 11

ตารางที่ 11 ปริมาณน้ำตาลที่เกิดขึ้น

ชื่อจุลินทรีย์	ใส่สารละลาย CMC (IU/ml)	ไม่ใส่สารละลาย CMC (IU/ml)	ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ เกิดขึ้น (IU/ml)
CDB1	0.0615	0.0277	0.0338
CDB2	0.0453	0.0404	0.0046

CDB3	0.0494	0.0370	0.0124
CDB4	0.0533	0.0224	0.0309
CDB5	0.0607	0.0401	0.0206
CDB6	0.0560	0.0293	0.0267
CDB7	0.0538	0.0254	0.0284
CDB8	0.0489	0.0229	0.0260

Cellulase Activity of Microorganisms from CMC culture



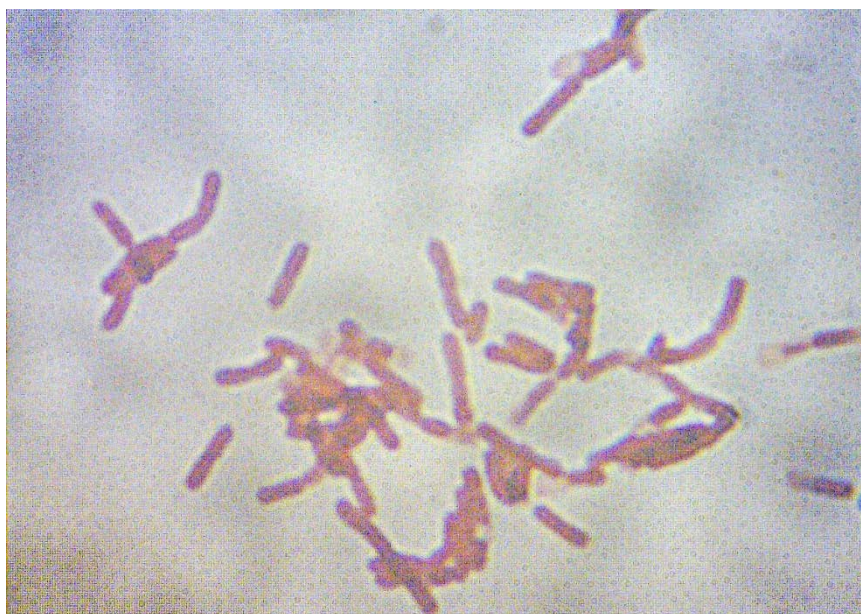
รูปที่ 23 กราฟเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เกิดจากย่อยสลายเซลลูโลสที่มาจาก CMC และ กระดาษ Whatman No.1

จากรูปที่ 23 เมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างการทดลองตอนที่ 1 และการทดลองตอนที่ 2 พบว่า จุลินทรีย์ CDB4 มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสได้ดีที่สุด เท่ากับ 0.0533 IU/ml และ 0.0456 IU/ml ทั้งสองการทดลอง เมื่อเทียบกับจุลินทรีย์ CDB 3 มีค่าเท่ากับ 0.0494 IU/ml และ 0.0449 IU/ml และ CDB2 มีค่าเท่ากับ 0.0453 IU/ml และ 0.0366 IU/ml ซึ่งความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสก็ใกล้เคียงกัน เช่นเดียวกับจุลินทรีย์ CDB4 แต่จากกราฟสังเกตได้ว่าจุลินทรีย์ CDB4 มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสและอนุพันธ์ของเซลลูโลสได้ดีกว่าจุลินทรีย์ CDB3 และ CDB2 ดังนั้นจากการทดลองวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคสด้วยวิธี DNS พบว่าจุลินทรีย์ CDB4 เป็นตัวที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ดีที่สุดในทั้งการ

ทดลองตอนที่ 1 และ 2 ซึ่งในการทดลองนี้ได้นำสถิติเข้ามาช่วยในการตัดสินใจ โดยการใช้วิธีการเทียบ T-test ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้นของ จุลินทรีย์แต่ละตัวนั่นเอง

### 7.2.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์ CDB4 ด้วยกล้องจุลทรรศน์

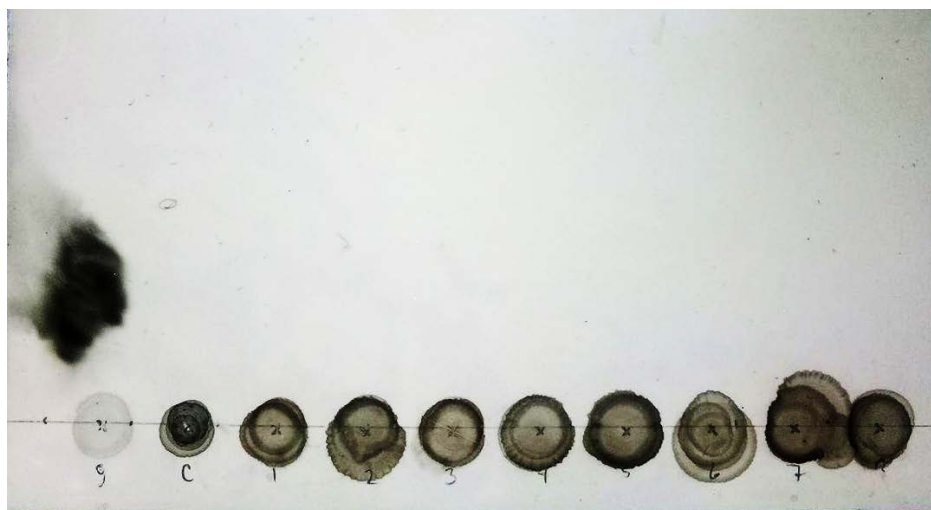
ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ แสดงดังรูปที่ 24 ซึ่งเป็นการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์ CBD4 ซึ่งจากการศึกษาพบว่าลักษณะภายนอกของจุลินทรีย์ CBD4 มีสีเขียวอมเหลือง โปร่งแสง ผิวเป็นร่อนย่น ไม่สามารถระบุรูปร่างได้ เมื่อทำการย้อมแกรมแล้วนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่ามีลักษณะเป็นท่อนต่อกันเรียกว่า “Streptobacilli” มีสีแดงซึ่งแสดงให้เห็นทราบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบ จากงานวิจัยของ ทิพย์นภา วงษ์คุณและคณะ (2556) ได้ทำการศึกษาการคัดแยกจุลินทรีย์ย่อยสลายเซลลูโลสเพื่อกระตุ้นการงอกของเมล็ดพันธุ์ข้าวและข้าวโพดหวาน จากการทดลองพบแบคทีเรียจำนวน 26 ไอโซเลท แต่มีเพียง 4 ไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลสได้ดี ได้แก่ ACSI, BDS31, BFC8 และ FFC2 จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่าจุลินทรีย์ BDS31 และBFC8 มีลักษณะของจุลินทรีย์ รูปร่างท่อนต่อกัน แต่ BDS31 ย้อมแกรมติดสีม่วงซึ่งมีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Bacillus licheniformis* ส่วน BFC8 ย้อมติดสีแดง มีความใกล้เคียงกับ *Cronobacter sakazakii* ดังนั้นเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์ CDB 4 พบว่ามีลักษณะคล้ายกับจุลินทรีย์ BFC8



รูปที่ 24 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์ CDB4 ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100X

### 7.2.3 การวิเคราะห์ลักษณะการย่อยสลายเซลลูโลสของจุลินทรีย์ CDB 4 ที่ระยะเวลาต่างๆ

จากการวิเคราะห์การผลิตปริมาณน้ำตาลกลูโคสของจุลินทรีย์ทั้ง 8 ตัว พบว่าจุลินทรีย์ทั้ง 8 ตัวมีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสได้ ซึ่งในขั้นตอนการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคสด้วยวิธี DNS ไม่ทำให้ทราบว่าจุลินทรีย์มีการย่อยสลายเซลลูโลสได้ดีที่เวลาเท่าไร จึงทำการวัดอัตราการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยวิธี Thin-layer chromatography (TLC) ซึ่งการวิเคราะห์ด้วยวิธี TLC จำเป็นจะต้องทำ Standard นั่นคือการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของกลูโคส เพื่อใช้สำหรับเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่วิเคราะห์ ซึ่งในการทดลองได้เลือกใช้ Standard ที่ความเข้มข้น 1% 2% 3% และ 4% เป็นตัวเปรียบเทียบ การวิเคราะห์นี้จะทำให้ทราบอัตราการย่อยสลายเซลลูโลสของจุลินทรีย์ทั้ง 8 ตัว จากการทดลองพบว่าจุลินทรีย์ทั้ง 8 ตัว ไม่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสหรือย่อยสลายได้น้อยทำให้เมื่อทดสอบด้วยวิธี TLC ไม่พบปริมาณกลูโคสที่เกิดขึ้น ดังนั้นการวิเคราะห์หาอัตราการย่อยสลายด้วยวิธี TLC ไม่ทำให้ทราบถึงอัตราการย่อยสลายของเซลลูโลสที่แท้จริง ทั้งนี้ อาจเป็นเพราะความเข้มข้นของเอนไซม์ที่มีความเข้มข้นน้อย จึงทำให้การทดสอบไม่พบปริมาณน้ำตาลกลูโคส



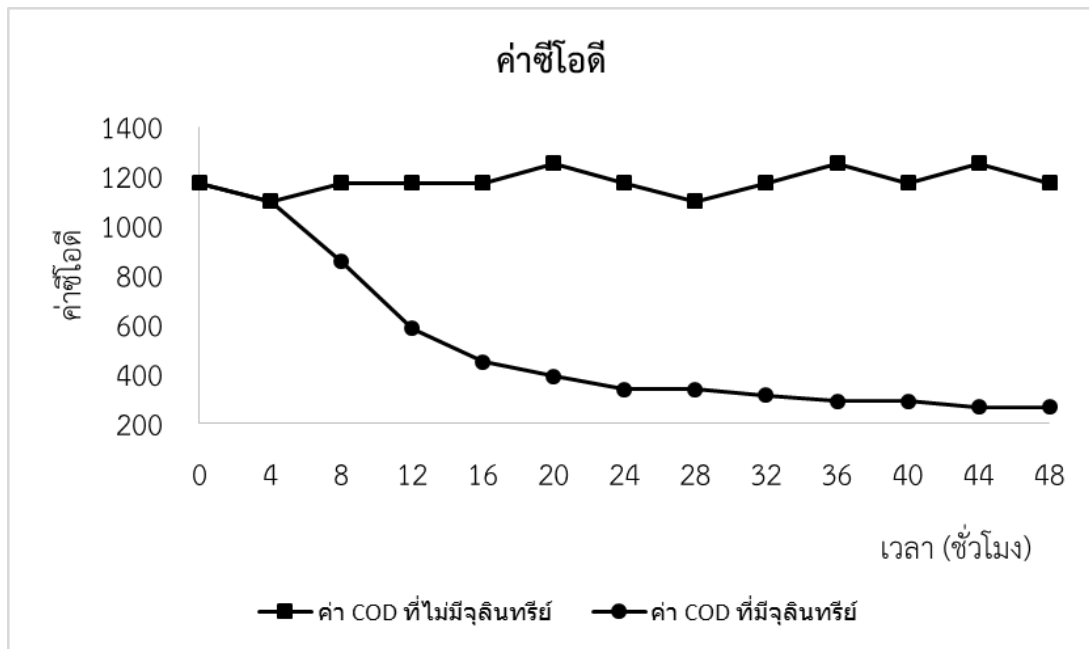
รูปที่ 25 การวิเคราะห์อัตราการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยวิธี TLC

จากงานวิจัยของ Kyeong Hwan Kang และคณะ(2015) ได้ทำการวิจัยเกี่ยวกับการย่อยสลายเอนไซม์ของ *Bacillus licheniformis* สายพันธุ์ TK3-Y สำหรับบำบัดน้ำเสียที่มีส่วนผสมของสาหร่ายสีเขียว พบว่าในการทดลองได้ใช้วิธีการวิเคราะห์ TLC มาวิเคราะห์ลักษณะการย่อยสลายของเอนไซม์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสหรืออนุพันธ์ของเซลลูโลส ในการทดลองใช้เอนไซม์ของ *Bacillus licheniformis* สายพันธุ์ TK3-Y ไปปั่นเหวี่ยงแล้วนำมาหยดทุกๆ 1 ชั่วโมง พบว่าที่เวลา 3-4 ชั่วโมง ปรากฏจุดการย่อยสลายเซลลูโลสหรือปริมาณน้ำตาลกลูโคส เมื่อนำไปเทียบกับผลทดลอง รูปที่ 25 พบว่าจุลินทรีย์ CDB4 เมื่อนำไป

วิเคราะห์ด้วยวิธี TLC ไม่ปรากฏจุดของน้ำตาลกลูโคสที่เวลา 1-4 ชั่วโมง ทั้งนี้อาจเป็นเพราะความแข็งแรงของเชื้อจุลินทรีย์และชนิดของจุลินทรีย์ที่นำมาเป็นต้นแบบในการวิเคราะห์

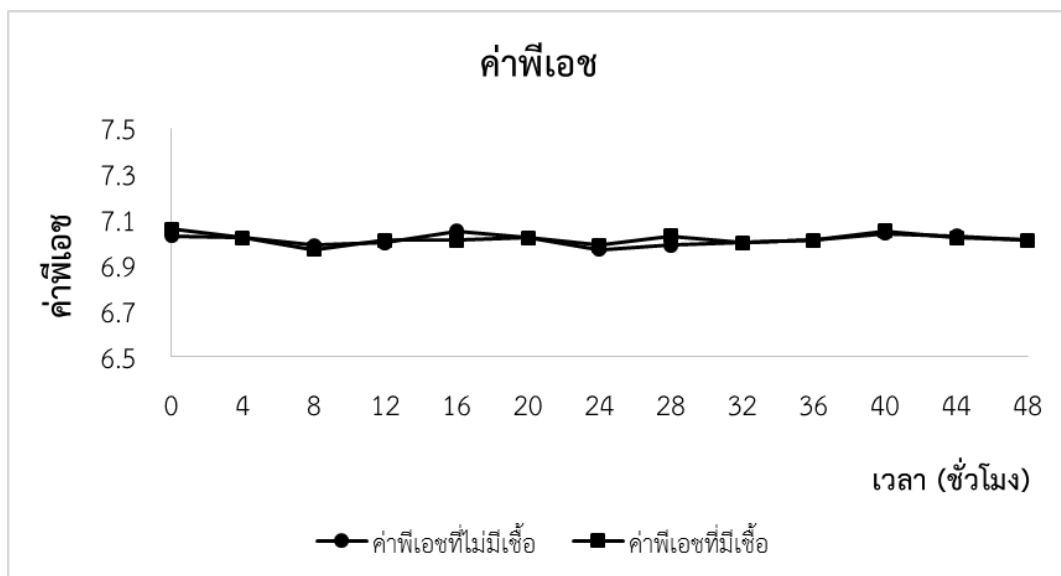
### 7.3 การวิเคราะห์ค่าซีโอดีของน้ำเสีย

จากการวิเคราะห์ในขั้นตอนที่ผ่านมาพบว่าจุลินทรีย์ CDB4 ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสได้ดีที่สุด จึงได้นำจุลินทรีย์ CDB4 มาทำการตรึงบนเม็ดตรึงอัลจิเนตในคอลัมน์แพคเบด ซึ่งหลักการทำงานของคอลัมน์แพคเบดจะมีการปั้มน้ำเป็นระบบวนน้ำโดยน้ำจะถูกปั้มาจากถังน้ำเสียเข้าไปยังคอลัมน์แพคเบดซึ่งภายในคอลัมน์แพคเบดมีเม็ดตรึงบรรจุอยู่เมื่อน้ำเสียสัมผัสกับเม็ดตรึงก็จะเกิดกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่อยู่ภายในเม็ดตรึงจากนั้นน้ำที่ผ่านการบำบัดก็จะไหลไปยังถังน้ำที่ผ่านการบำบัด ซึ่งน้ำที่ผ่านการบำบัดจะมีค่า COD ลดลง กระบวนการนี้เป็นการบำบัดน้ำเสียอีกกระบวนการหนึ่ง ในการทดลองได้ทำการตรึงเม็ดตรึงอัลจิเนตโดยผสมเชื้อจุลินทรีย์ CDB4ลงไปกับอัลจิเนตด้วย จากนั้นนำไปใส่ในคอลัมน์แพคเบดโดยการทดลองนี้จะเก็บตัวอย่างน้ำที่ผ่านกิจกรรมของจุลินทรีย์ในเม็ดตรึงอัลจิเนตแล้ว โดยการเก็บจะเก็บทุกๆ 4 ชั่วโมง เป็นเวลาทั้งหมด 48 ชั่วโมง จากรูปที่ 26 จะเห็นได้ว่าค่าซีโอดีที่มีเชื้อผสมอยู่จะค่อยๆลดลงอย่างต่อเนื่อง โดยค่า COD เริ่มต้นอยู่ที่ 1171 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อผ่านการบำบัดจนครบเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าสามารถลดค่า COD ได้เท่ากับ 267 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ในขณะเดียวกันก็ต้องทำการเก็บตัวอย่างน้ำที่ผ่านกิจกรรมของเม็ดตรึงอัลจิเนตที่ไม่มีเชื้อจุลินทรีย์ CDB4 ผสมอยู่เช่นกัน เพื่อใช้สำหรับเปรียบเทียบค่าซีโอดีของแบบจำลองทั้งสอง โดยค่าซีโอดีของน้ำตัวอย่างที่ผ่านเม็ดตรึงอัลจิเนตที่ไม่มีจุลินทรีย์ CDB4 ผสมอยู่มีค่าซีโอดีขึ้นลงอย่างไม่สม่ำเสมอเฉลี่ยอยู่ที่ 1178 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเมื่อเทียบกับค่าซีโอดีของการทดลองแบบเม็ดตรึงที่มีเชื้อแล้วจะแสดงให้เห็นว่าค่าซีโอดีที่ลดลงนั้นเกิดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ในเม็ดตรึงจึงส่งผลให้ค่า COD ของน้ำตัวอย่างลดลงอย่างต่อเนื่องและเมื่อทำการนำค่า COD ที่วัดได้ไปเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานของโรงงานอุตสาหกรรมพบว่าโรงงานอุตสาหกรรมกำหนดค่า COD ของน้ำเสียที่สามารถปล่อยสู่ธรรมชาติได้อยู่ที่ไม่เกิน 400 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการทดลองสามารถลดค่า COD ได้อยู่ที่ 267 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งไม่เกินค่ามาตรฐานที่โรงงานอุตสาหกรรมกำหนดไว้สามารถปล่อยสู่ธรรมชาติหรือนำกลับไปใช้ในกระบวนการผลิตต่อไป



รูปที่ 26 ค่าซีไอดีของการบำบัดแบบไม่มีจุลินทรีย์ CDB4 และมีจุลินทรีย์ CDB4

ทั้งนี้ในการบำบัดน้ำจำเป็นจะต้องวัดค่าพีเอชก่อนการบำบัดและหลังจากการบำบัดเพื่อให้ทราบถึงความเหมาะสมแก่การปล่อยออกธรรมชาติ ซึ่งค่าพีเอชที่ได้จากการวัดพบว่ามีช่วงของพีเอช อยู่ที่ 6.5-7 ซึ่งค่าพีเอชที่วัดได้นั้นสอดคล้องกับมาตรฐานของโรงงานอุตสาหกรรมดังแสดงในรูป 27



รูปที่ 27 ค่าพีเอชก่อน-หลังบำบัด

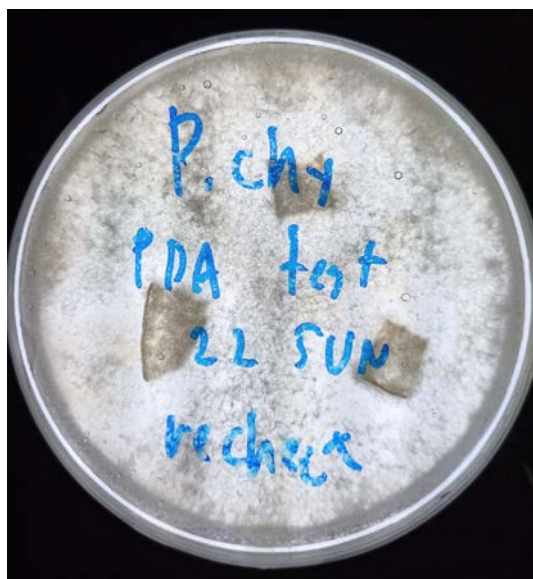
จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าจุลินทรีย์ CBD4 มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสซึ่งส่งผลให้ค่า COD ลดลง เทียบได้จากรูปที่ 26 ซึ่ง เปรียบเทียบค่า COD ระหว่างมีจุลินทรีย์ในเม็ดตรงอัลจิเนตกับไม่มีจุลินทรีย์ในเม็ดตรงอัลจิเนต และคุณสมบัติการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่โดดเด่นกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆเมื่อทดสอบด้วยวิธี DNS แต่ทว่าในน้ำเสียนั้นไม่ได้มีแค่สารเซลลูโลสเพียงชนิดเดียว แต่ยังมีสารอื่นๆ อีกเช่น เฮมิเซลลูโลส ลิกนินเป็นต้น ซึ่งสารอินทรีย์ 3 ชนิดนี้เมื่ออยู่รวมกันจะเรียกว่า สารลิกโนเซลลูโลส ซึ่งเป็นสารที่สามารถพบได้ทั่วไปในน้ำเสียที่มีสารอินทรีย์จากพืช เนื่องจากสารลิกโนเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบที่มีอยู่ในพืชทุกชนิด อีกทั้ง ในการทดลองใช้จุลินทรีย์จากบ่อบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพของโรงงานผลิตกระดาษมาใช้ในการกำจัดเซลลูโลสในน้ำเสียไม่เพียงพอต่อการกำจัดของเสียในน้ำหากมีปริมาณที่มากขึ้น ด้วยคุณสมบัติเฉพาะตัว ความคงทนของเซลล์ และจำนวนเอนไซม์ที่ไม่สามารถปลดปล่อยเอนไซม์เซลลูเลสออกมาเพียงพอที่จะย่อยสลายเซลลูโลสสำหรับการทดสอบด้วยวิธีทาง TLC ได้

ในงานวิจัยนี้ทางผู้วิจัยจึงได้เปลี่ยนจากจุลินทรีย์เดิมที่มีเป็นแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายได้เพียงเซลลูโลส มาเป็นจุลินทรีย์จากเชื้อรา โดยใช้จุลินทรีย์ *Phanerocheate chysosporium* ที่มีคุณสมบัติ ในการย่อยสลายลิกนินซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับคุณสมบัติจากตารางที่ 4 และตารางที่ 5 พบว่า จุลินทรีย์ *Phanerocheate chysosporium* มีคุณสมบัติโดดเด่นกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่น ร้อยละการย่อยสลายลิกนินและอัตราการย่อยสลายลิกนินที่มีประสิทธิภาพกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆที่สามารถย่อยสลายลิกนินได้เช่นกัน อีกทั้ง การใช้ จุลินทรีย์ *Trichoderma ressei* ที่มีคุณสมบัติในการย่อยสลายได้ทั้ง เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส โดยเทียบจากตาราง 6 และ 7 แม้ว่า ประสิทธิภาพอาจไม่เทียบเท่า *Trichoderma viride* ที่สามารถย่อยสลายได้รวดเร็วกว่า แต่มีจุลินทรีย์ *Phanerocheate chysosporium* และ *Trichoderma ressei* สามารถอยู่ร่วมกันได้ตามงานวิจัยของ (Bhavika & Albert, 2014) ซึ่งเป็นผลดีในการนำจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดมาร่วมมือในการกำจัดสารอินทรีย์ทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน เพื่อบำบัดให้น้ำเสียนั้นมีคุณภาพที่ดีกว่าการใช้จุลินทรีย์เพียงชนิดเดียว

#### 7.4 การทดสอบการเลี้ยงจุลินทรีย์ร่วมกัน 2 ชนิด

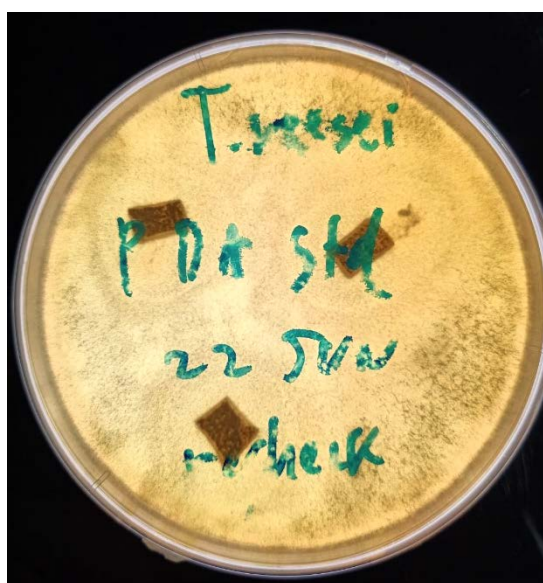
จากการทดลองการเลี้ยงจุลินทรีย์ *Phanerocheate chysosporium* *Trichoderma ressei* และเลี้ยงร่วมกันในอาหารเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar สามารถอธิบายลักษณะการเติบโตของจุลินทรีย์ดังรูปต่อไปนี้





รูปที่ 28 ลักษณะของจุลินทรีย์ *Phanerochaete chrysosporium*

จากรูปที่ 28 แสดงให้เห็นลักษณะของจุลินทรีย์ *Phanerochaete chrysosporium* ที่มีลักษณะเป็นราเส้นใยสีขาวกระจายตัวทั่วอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วน จุลินทรีย์ *Trichoderma reesei* มีลักษณะดังรูปที่ 29



รูปที่ 29 ลักษณะของจุลินทรีย์ *Trichoderma reesei*

จากรูปที่ 29 แสดงให้เห็นลักษณะของจุลินทรีย์ *Trichoderma reesei* ที่มีลักษณะเป็นราอ่อนสีเขียวกระจายอยู่ทั่วอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นทำการทดลองเลี้ยงจุลินทรีย์สองชนิดระหว่าง *Phanerochaete chrysosporium* กับ *Trichoderma reesei* ร่วมกันปรากฏว่าสามารถอยู่ร่วมกันได้ และไม่เป็นปฏิปักษ์ต่อกัน ซึ่งสามารถแสดงการอยู่ร่วมกันดังรูปที่ 30



รูปที่ 30 แสดงการอยู่ร่วมกันของจุลินทรีย์ทั้งสองชนิด

จากรูปที่ 30 แสดงถึงลักษณะการอยู่ร่วมกันของจุลินทรีย์ *Phanerocheate chysosporium* กับ *Trichoderma ressei* ซึ่งสามารถอยู่ร่วมกันได้ ทั้งนี้ในรูปที่ จุลินทรีย์ *Trichoderma ressei* มีการเจริญเติบโตที่เร็วกว่าจุลินทรีย์ *Phanerocheate chysosporium* จึงทำให้บริเวณของเชื้อมากกว่า ดังนั้นการทดลองเลี้ยงจุลินทรีย์ร่วมกันระหว่างจุลินทรีย์ *Phanerocheate chysosporium* กับ *Trichoderma ressei* เป็นไปตามงานวิจัยของ (Bhavika & Albert, 2014) ซึ่งสามารถใช้อาศัยอยู่ร่วมกันได้

#### 7.5 การวิเคราะห์องค์ประกอบร้อยละของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน

เนื่องจากสารที่ลิกโนเซลลูโลสที่นำมาใช้น้ำเสียสังเคราะห์นั้นเป็นวัสดุธรรมชาติในประเทศไทยจึงต้องทำการหาร้อยละขององค์ประกอบของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ซึ่ง เฮมิเซลลูโลส ใช้วิธีการสกัดแบบ soxhlet extraction ร่วมกับการใช้ Sodium hydroxide ในการวัดปริมาณซึ่งได้ค่าดังนี้

น้ำหนักเริ่มต้น 0.3000 กรัม

น้ำหนักหลังการอบ 0.2063 , 0.2061 , 0.2062 เฉลี่ย  $\frac{0.2063+0.2061+0.2062}{3} = 0.2062$  กรัม

$$\text{จากสูตร \%Hemicellulose} = \frac{\square 1 - \square 2}{\square 1} \times 100$$

โดยที่ W1 คือน้ำหนักเริ่มต้น (กรัม)

W2 คือน้ำหนักตัวอย่างหลังการอบ (กรัม)

$$\% \text{Hemicellulose} = \frac{0.3000 - 0.2062}{0.3000} \times 100 = 31.27\%$$

การคำนวณหาร้อยละของลิกนินและเซลลูโลสในเนื้อไม้

$$\text{จากสูตร } \% \text{ADF} = \frac{w_2 - w_1}{S} \times 100$$

$$\% \text{L} = \frac{w_3 - w_4}{S} \times 100$$

$$C = \text{ADF} - \text{L}$$

น้ำหนักของ  $w_1 = 10.5240$  กรัม

น้ำหนักของ  $w_2 = 11.1333$  กรัม

น้ำหนักของ  $w_3 = 10.4989$  กรัม

น้ำหนักของ  $w_4 = 10.2864$  กรัม

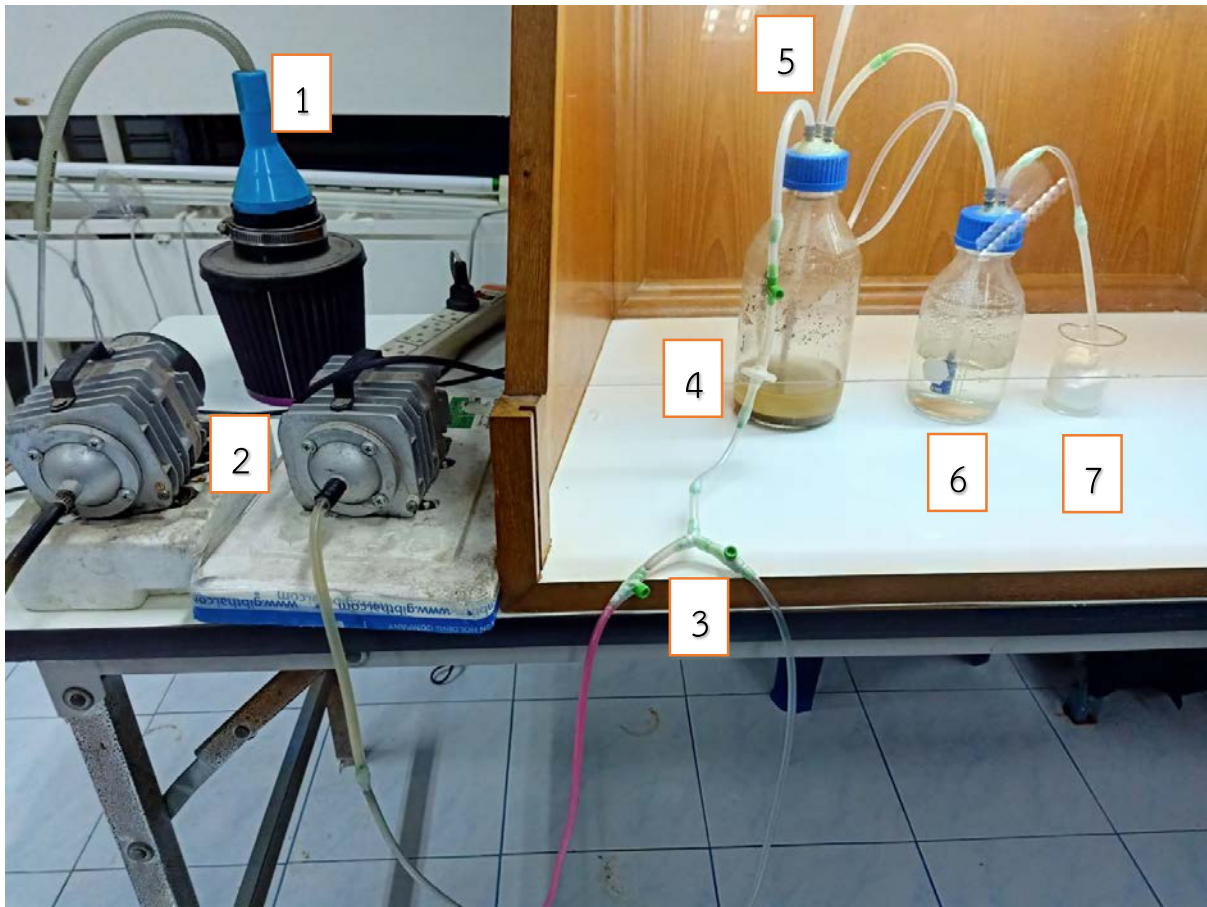
$$\% \text{ADF} = \frac{11.1333 - 10.5240}{1} \times 100 = 60.93\%$$

$$\% \text{L} = \frac{10.4989 - 10.2864}{1} \times 100 = 21.25\%$$

$$C = \text{ADF} - \text{L} = 60.93 - 21.25 = 39.68\%$$

สัดส่วนของ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนินของเนื้อไม้ยางพารา พบว่ามี ปริมาณตามลำดับดังนี้ 39.68% 31.27% 21.25% ส่วนที่เหลือเป็นเถ้าถ่านและสารประกอบอื่นๆ ซึ่งเมื่อทราบร้อยละของสารอินทรีย์ในเนื้อไม้ จะสามารถนำค่าร้อยละของสารอินทรีย์นำไปคำนวณในการย่อยสลายได้

## 7.6 การวิเคราะห์การทำงานของถังปฏิกรณ์เติมอากาศแบบกะ



รูปที่ 31 แสดงรายละเอียดถังปฏิกรณ์แบบกะ

การทำงานของถังปฏิกรณ์ เริ่มจากอากาศเข้าที่กรองแบบหยาบ (1) ซึ่งต่อเข้ากับปั๊มสองตัว (2) โดยปั๊มสองตัวจะมีวาล์วควบคุมการปล่อยแรงลมซึ่งจะต่อรวมเป็นเส้นเดียว (3) สลับการเปิดใช้งานทุก 24 ชั่วโมง เพื่อป้องกันการปั๊มลมชำรุดจากการทำงานหนัก ซึ่งหากปั๊มตัวใดหยุดการทำงานจะทำการปิดวาล์วตัวนั้นเพื่อให้อากาศสามารถเข้าไปเติมอากาศในถังปฏิกรณ์ได้ โดยหลังจากต่อท่อรวมเป็นเส้นเดียวกันแล้วจะทำการกรองอากาศผ่านที่กรองแบบละเอียด (4) ที่สามารถกรองได้ถึง 0.45 ไมครอน ซึ่งสามารถกรองแบคทีเรียและเชื้อราในอากาศได้ ก่อนจะต่อเข้าถังปฏิกรณ์ (5) ซึ่งใช้ขวดที่ทนแรงดันได้เนื่องจากการทดลองนี้อยู่ในระดับห้องปฏิบัติการจึงใช้ขนาดของขวดที่ 1 ลิตร ซึ่งภายในขวดจะมีการต่อสายยางลงถึงก้นขวดเพื่อให้อากาศผสมสารที่ไม่ละลายน้ำ (ไม่ยวบพาราอบแห้ง) กับทำให้จุลินทรีย์ไม่นอนกันดังรูปที่ เพื่อให้จุลินทรีย์ได้รับอากาศสำหรับการเจริญเติบโตและสามารถสัมผัสกับสารอินทรีย์ได้อย่างเต็มประสิทธิภาพ ทั้งนี้การตั้งถังปฏิกรณ์ไว้ในตู้สำหรับเชื้อเชื้อเพื่อลดโอกาสสัมผัสเชื้อโรคและแบคทีเรียทางอากาศโดยตรงที่อาจเป็นอันตรายต่อจุลินทรีย์ที่ใช้การทดลองได้และยังควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ เนื่องจากบริเวณห้องทดลองนั้นอยู่ในห้องปฏิบัติการแบบปิดซึ่งบางช่วงเวลามีการเปิดเครื่องปรับอากาศ ทำให้อุณหภูมิไม่คงที่หากไม่ทำการทดลองในตู้เชื้อเชื้อ เมื่อมีการเติม

อากาศเข้าก็ต้องมีช่องทางสำหรับระบายอากาศออกนอกจากเป็นระบบปิด โดยสายยางจากถังปฏิกรณ์จะต่อเข้ากับขวดขนาดเล็กด้านข้าง (6) ซึ่งมีสายยางจุ่มลงไปใน Hydrogen peroxide เพื่อเป็นการฆ่าสปอร์ที่อาจหลุดลอยออกมาจากถังปฏิกรณ์ได้ จากนั้นทำการกรองซ้ำอีกครั้งเพื่อความปลอดภัยและเพิ่มความมั่นใจว่าสปอร์และสิ่งแปลกปลอมจะไม่ออกมาสู่สิ่งแวดล้อมภายนอกและไม่เป็นอันตรายต่อผู้วิจัยจึงนำสายยางระบายอากาศจากขวดที่บรรจุ Hydrogen peroxide พันด้วยสำลี(7) เพื่อเป็นการกรองขั้นสุดท้าย ก่อนอากาศจะระบายสู่สิ่งแวดล้อม

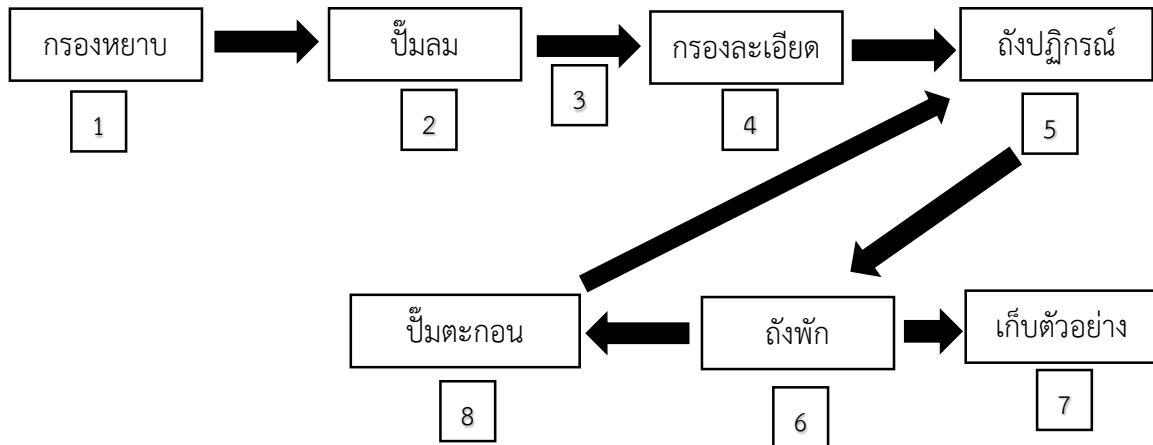
### 7.7 การวิเคราะห์การทำงานของถังปฏิกรณ์เติมอากาศแบบเติมอากาศไหลต่อเนื่อง



รูปที่ 32 แสดงถังปฏิกรณ์แบบเติมอากาศไหลต่อเนื่อง

การทำงานของถังปฏิกรณ์ เริ่มจากอากาศเข้าที่กรองแบบหยาบ (1) ซึ่งต่อเข้ากับปั๊มสองตัว (2) โดยปั๊มสองตัวจะมีวาล์วควบคุมการปล่อยแรงลมซึ่งจะต่อรวมเป็นเส้นเดียว (3) สลับการเปิดใช้งานทุก 24 ชั่วโมง ต่อต่อรวมเป็นเส้นเดียวกันแล้วจะทำการกรองอากาศผ่านที่กรองแบบละเอียด (4) ที่ความละเอียด 0.45 ไมครอน ต่อเข้าถังปฏิกรณ์ (5) ซึ่งภายในแต่ละขวดจะมีการต่อสายยางลงถึงก้นขวดเพื่อให้อากาศผสมสารที่ไม่ละลายน้ำ (ไม่ยางพาราอบแห้ง) กับทำให้จุลินทรีย์ไม่นอนก้นดังรูปที่ เพื่อให้จุลินทรีย์ได้รับอากาศสำหรับการเจริญเติบโตและสามารถสัมผัสกับสารอินทรีย์ได้อย่างเต็มประสิทธิภาพ และด้านล่างของขวดแต่ละขวดจะมีก๊อกสำหรับควบคุมอัตราการไหลเข้าสู่แต่ละถัง ในขณะที่ขวดสุดท้ายจะปล่อยน้ำเสียหลังจากผ่านการบำบัดลง

ในขวดพัก (6) ซึ่งมีสายยางจุ่มลงไปในช่วงเพื่อทำการดึงตัวอย่าง(7) ไปวิเคราะห์ ส่วนตะกอนก่อนขวดตั้งรูปที่ จะทำการปั๊ม(8) กลับเข้าสู่ถังปฏิกรณ์ขวดแรกเพื่อเป็นการนำจุลินทรีย์กลับเข้าสู่ระบบเพื่อรองรับการบำบัดน้ำเสียชุดใหม่ต่อไป



รูปที่ 33 แผนผังการทำงานของถังปฏิกรณ์แบบเติมอากาศไหลต่อเนื่อง



รูปที่ 34 ลักษณะของจุลินทรีย์นอนก้นระหว่างอยู่ในถังพัก

## 7.8 การวัดการย่อยสลายของสารเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสโดยวิธีการแยกสารแบบ Thin-layer chromatography



รูปที่ 35 แสดงชนิดของคาร์โบไฮเดรตโดยวิธีการแยกสารโดยใช้ Thin-layer chromatography

จากรูปที่ 35 แสดงการแยกสารคาร์โบไฮเดรตโดยวิธี TLC ซึ่งสามารถเรียงลำดับสารที่ใช้ในการแยกได้ ดังนี้ (จากซ้ายไปขวา) Galactose(Gal), Glucose(Glu), Fructose(Fru), Arabinose(Ara), Xylose(Xy), Sucrose(Su), ตัวอย่างน้ำเสียที่ย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์ *Phanerocheate chysosporium* (P.para), ตัวอย่างน้ำเสียที่ย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์ *Trichoderma reesei* (T.para) และ ตัวอย่างน้ำเสียที่ย่อยสลายด้วย จุลินทรีย์ *Phanerocheate chysosporium* และ *Trichoderma reesei* (P+T para) โดยตั้งแต่น้ำตาล galactose ถึง น้ำตาล sucrose ใช้เป็นสารตัวอย่างมาตรฐานในการตรวจวัดชนิดของน้ำตาลที่ผ่านการย่อยสลาย ของการใช้จุลินทรีย์ในการบำบัดน้ำเสีย ปรากฏว่า ตัวอย่างน้ำเสียที่ย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์ *Phanerocheate chysosporium* สามารถย่อยสลายสารได้เล็กน้อยโดยพบน้ำตาล Sucrose อยู่บ้างซึ่ง จุลินทรีย์ *Phanerocheate chysosporium* นอกจากจะย่อยสลายลิกนินได้แล้วยังมีคุณสมบัติปล่อยเอนไซม์ เซลลูเลสเล็กน้อยตามงานวิจัยของ (Kerem, Friesem, & Hadar, 1992) ส่วนตัวอย่างน้ำเสียที่ย่อยสลายด้วย จุลินทรีย์ *Trichoderma reesei* สามารถย่อยสลายน้ำตาลได้บ้างแม้ไม่มีจุลินทรีย์ *Phanerocheate chysosporium* ในการกำจัดลิกนินออกจากโครงสร้างก่อนแต่ก็สามารถย่อยสลายส่วนที่ถูกบดทางกลจนได้

น้ำตาล Sucrose และ น้ำตาล Glucose ผสมกับ Fructose เล็กน้อย ตัวอย่างน้ำเสียที่ย่อยสลายด้วย จุลินทรีย์ *Phanerocheate chysosporium* และ *Trichoderma reesei* สามารถย่อยสารเซลลูโลสและเอสมิเซลลูโลสได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุดเนื่องจากสามารถผลิตน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวจากสารโพลีแซคคาไรด์ได้ โดยปรากฏน้ำตาล Sucrose Glucose Fructose และ Xylose ซึ่งแสดงถึงประสิทธิภาพของการใช้จุลินทรีย์ร่วมกันสองชนิดมีประสิทธิภาพที่ดีกว่าการใช้จุลินทรีย์เพียงชนิดเดียว อีกทั้ง ตัวอย่างที่นำมาทดสอบด้วยวิธี TLC เก็บตัวอย่างที่ชั่วโมงที่ 288 หรือประมาณ วันที่ 12 นับจากวันที่เริ่มเติมจุลินทรีย์ *Trichoderma reesei* ซึ่ง หากนำตัวอย่างหลังจากนี้มาทดสอบ ปรากฏว่าไม่พบน้ำตาลบางชนิดหรือพบน้อยมากจนไม่สามารถตรวจวัดน้ำตาลได้ ทดลองนำจุลินทรีย์ชนิดเดียวทำการทดลองโดยวิธี TLC ในชั่วโมงต่างๆปรากฏว่าไม่พบน้ำตาลขึ้นในแผ่นกระดาษสำหรับวัด TLC คาดว่าเมื่อน้ำตาลถูกปลดปล่อยออกมาในน้ำเสียจากสารลิกโนเซลลูโลสแล้ว จุลินทรีย์ทำการดึงน้ำตาลไปเผาผลาญเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตของเซลล์ต่อไป

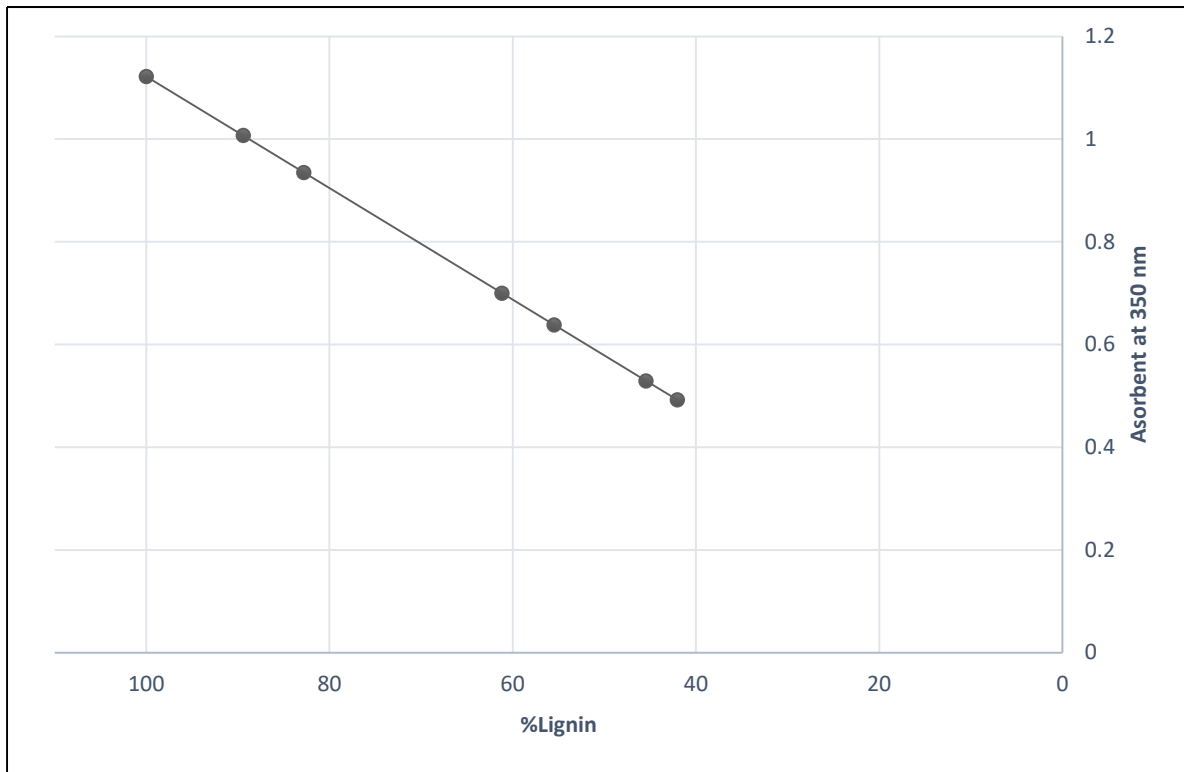
## 7.9 การวัดการย่อยสลายสารลิกนิน

การวัดการย่อยสลายลิกนินทำการเปรียบเทียบ 3 ตัวอย่าง คือ ตัวอย่างน้ำเสียที่ย่อยสลายด้วย จุลินทรีย์ *Phanerocheate chysosporium* (P.para) ตัวอย่างน้ำเสียที่ย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์ *Trichoderma reesei* (T.para) และ จุลินทรีย์ *Phanerocheate chysosporium* และ *Trichoderma reesei* (P+T para) ซึ่งจะทำการเปรียบเทียบโดยอิงค่าร้อยละของลิกนินที่ได้จากการทดลอง เทียบกับกราฟมาตรฐานในภาคผนวก ก โดยค่า ดังนั้นจึงศึกษาการย่อยสลายของสารลิกนินโดยใช้เครื่อง spectrophotpmeter ที่ความยาวคลื่น 350 นาโนเมตร ร้อยละของลิกนินอยู่ที่ 21.25% เก็บผลทุก 72 ชั่วโมง เป็นจำนวน 6 ครั้ง โดยค่าที่ได้จากการทดลองมีดังนี้

ตารางที่ 12 ตัวอย่างน้ำเสียที่ย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์ *Phanerocheate chysosporium* (P.para)

Abs. P. para	X	%Lignin
1.122	6.1377753	100
1.007	5.4884246	89.420423
0.935	5.0818746	82.796688
0.7	3.7549407	61.177553
0.638	3.404856	55.473781
0.529	2.7893845	45.446182
0.492	2.580463	42.042318



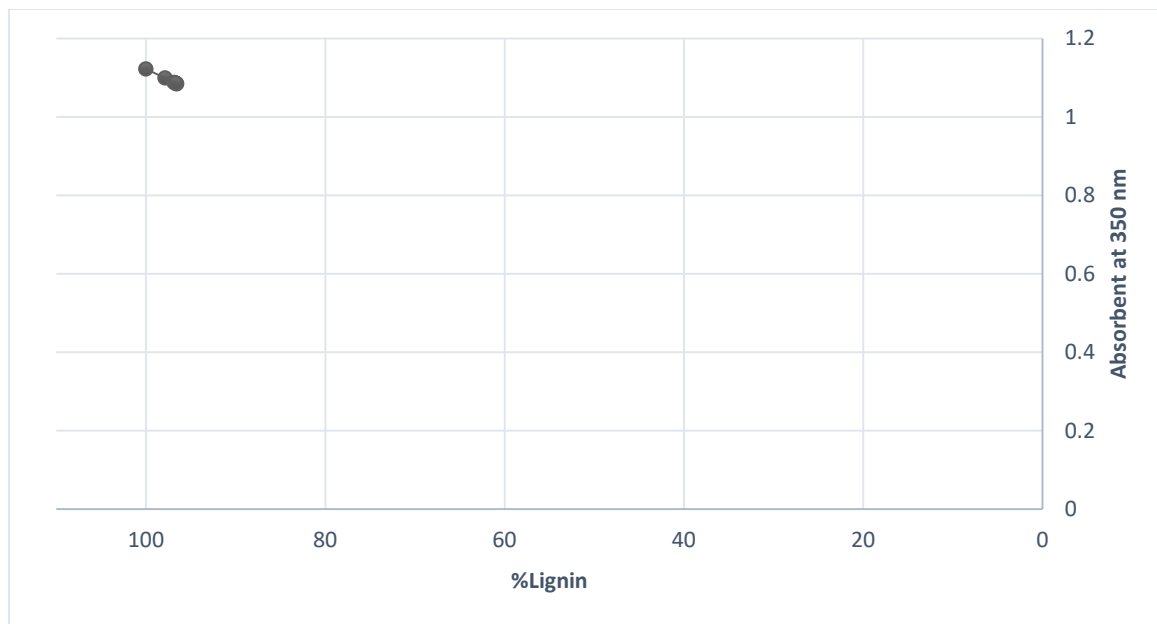


รูปที่ 36 กราฟแสดงการย่อยสลายลิกนินโดยจุลินทรีย์ *Phanerocheate chysosporium*

จากรูปที่ 36 แสดงการย่อยสลายลิกนินโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานสามารถลดค่าลิกนินลงได้ 57.9577% หรือ 3.5573 กรัมจากตัวอย่างน้ำเสียที่มีสารลิกโนเซลลูโลส 6 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 13 ตัวอย่างน้ำเสียที่ย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์ *Trichoderma reesei* (T.para)

Abs. T.para	X	%Lignin
1.122	6.1377753	100
1.099	6.0079051	97.884085
1.087	5.9401468	96.780129
1.085	5.9288538	96.596136
1.088	5.9457933	96.872125
1.085	5.9288538	96.596136
1.086	5.9345003	96.688132

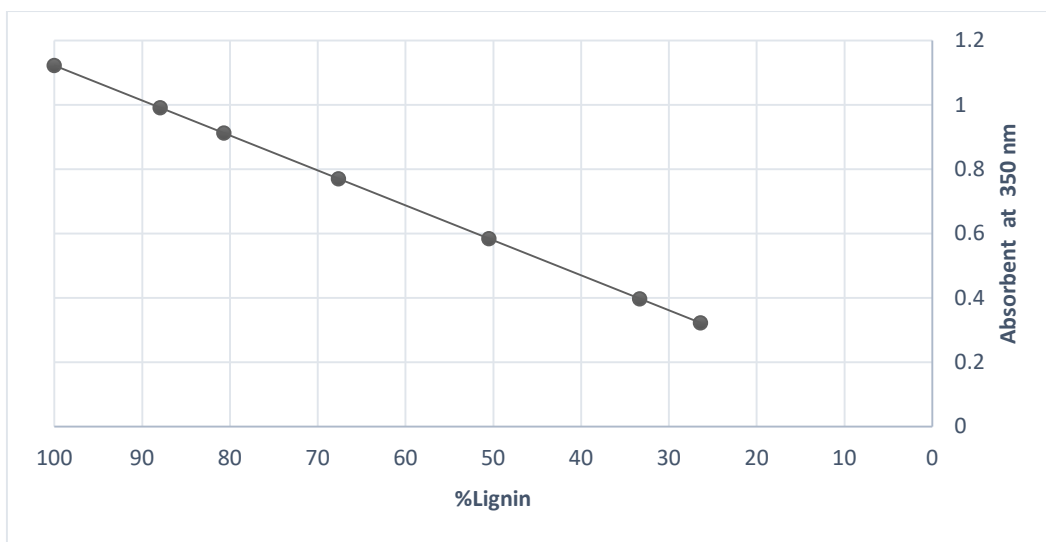


รูปที่ 37 กราฟแสดงการย่อยสลายลิกนินโดยจุลินทรีย์ *Trichoderma reesei*

จากรูปที่ 37 แสดงการย่อยสลายลิกนินโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานสามารถลดค่าลิกนินลงได้ 3.3119% หรือ 0.2037 กรัมจากตัวอย่างน้ำเสียที่มีสารลิกโนเซลลูโลส 6 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 14 ตัวอย่างน้ำเสียที่ย่อยสลายลิกนินด้วยจุลินทรีย์ *Phanerocheate chysosporium* และ *Trichoderma reesei* (P+T para)

Abs. P+T para at 350 nm	X(กรัม)	%Lignin
1.122	6.137775268	100
0.991	5.398080181	87.948482
0.912	4.952004517	80.680773
0.77	4.150197628	67.617295
0.584	3.099943535	50.50598
0.397	2.044042914	33.302668
0.322	1.62055336	26.402944



รูปที่ 38 กราฟแสดงการย่อยสลายลิกนินโดยจุลินทรีย์ร่วมกันสองชนิด

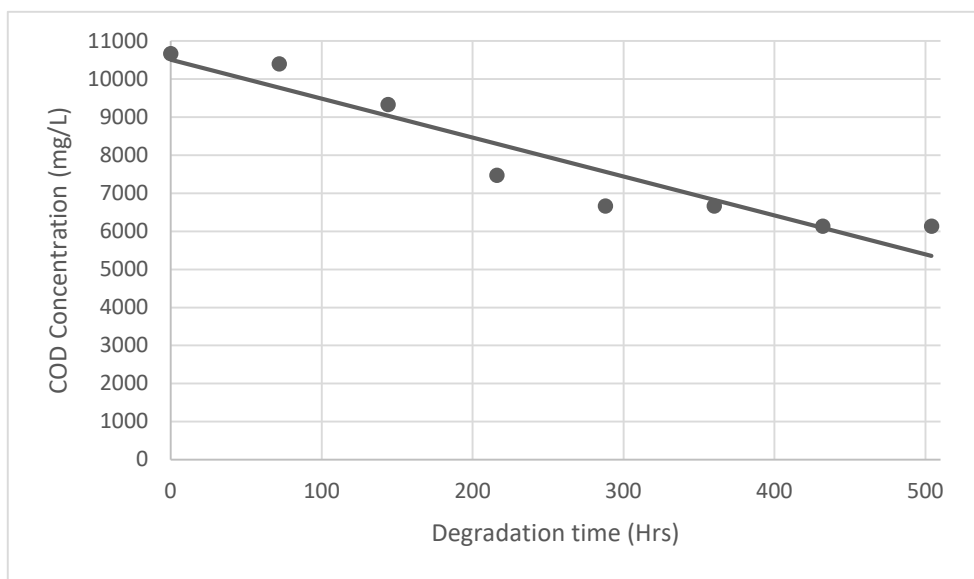
จากรูปที่ 38 จะเห็นได้ว่าทุกๆ 72 ชั่วโมงนั้นมีการลดลงของลิกนิน แสดงการย่อยสลายลิกนินโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานสามารถลดค่าลิกนินลงได้ 73.5971% หรือ 4.5172 กรัมจากตัวอย่างน้ำเสียที่มีสารลิกโนเซลลูโลส 6 กรัมต่อลิตร ซึ่งการใช้จุลินทรีย์ร่วมกันสองชนิดให้ผลการทดลองที่สามารถย่อยสลายสารลิกนินได้ดีกว่าการใช้จุลินทรีย์ชนิดเดียว

#### 7.10 การหาค่าซีโอดีของน้ำเสีย

การวิเคราะห์ค่า COD สามารถบ่งบอกถึงประสิทธิภาพในการกำจัดสารอินทรีย์ได้ ซึ่งได้ทำการทดลอง 3 ชุด โดยแบ่งเป็น การใช้จุลินทรีย์ *Phanerocheate chysosporium* , *Trichoderma reesei* และใช้จุลินทรีย์ทั้งสองชนิดร่วมกันในถังปฏิกรณ์แบบเติมอากาศไหลต่อเนื่องซึ่งได้ผลการทดลองดังนี้

ตารางที่ 15 การวิเคราะห์ค่าซีโอดีของน้ำเสีย ของการใช้จุลินทรีย์ *Phanerocheate chysosporium*

Time (Hr.)	Average (ml)	Blank (ml)	Molarlity (FAS)	COD (mg/L)
0	1.833333	2.5	0.1	10666.67
72	1.85	2.5	0.1	10400
144	1.916667	2.5	0.1	9333.333
216	2.033333	2.5	0.1	7466.667
288	2.083333	2.5	0.1	6666.667
360	2.083333	2.5	0.1	6666.667
432	2.116667	2.5	0.1	6133.333
504	2.116667	2.5	0.1	6133.333

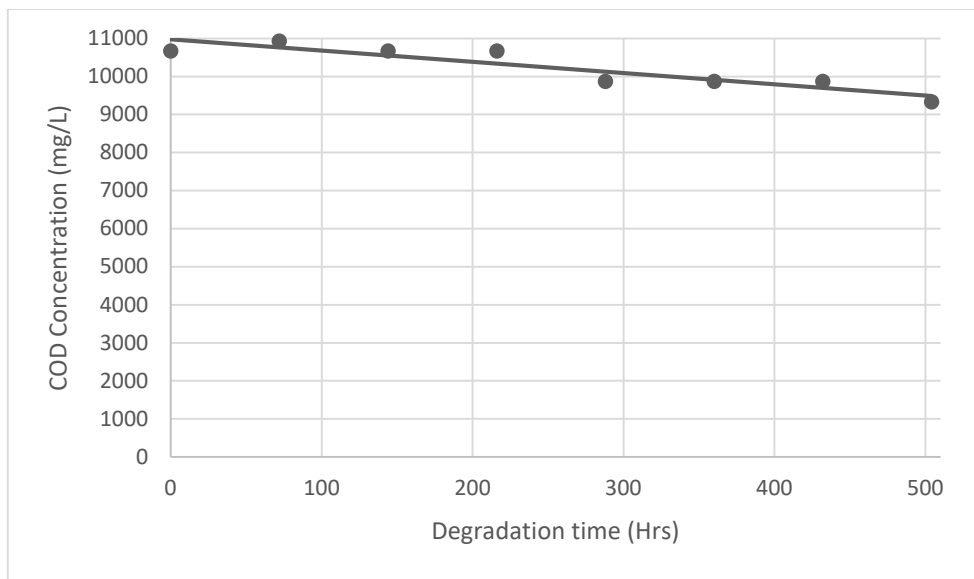


รูปที่ 39 แสดงค่า COD จากการเก็บผลทุก 72 ชั่วโมงของการใช้จุลินทรีย์ *Phanerocheate chysosporium*

จากรูปที่ 39 สังเกตได้ว่าค่า COD ของการใช้จุลินทรีย์ *Phanerocheate chysosporium* สามารถลดค่า COD ลงมาได้จาก 10666.67 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงมาเหลือ 6133.33 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งถือว่ามีประสิทธิภาพในการกำจัดสารอินทรีย์ได้พอสมควร

ตารางที่ 16 การวิเคราะห์ค่าซีไอโอดีของน้ำเสีย ของการใช้จุลินทรีย์ *Trichoderma reesei*

Time (Hr.)	Average (ml)	Blank (ml)	Molarlity (FAS)	COD (mg/L)
0	1.833333	2.5	0.1	10666.67
72	1.816667	2.5	0.1	10933.33
144	1.833333	2.5	0.1	10666.67
216	1.833333	2.5	0.1	10666.67
288	1.883333	2.5	0.1	9866.667
360	1.883333	2.5	0.1	9866.667
432	1.883333	2.5	0.1	9866.667
504	1.916667	2.5	0.1	9333.333

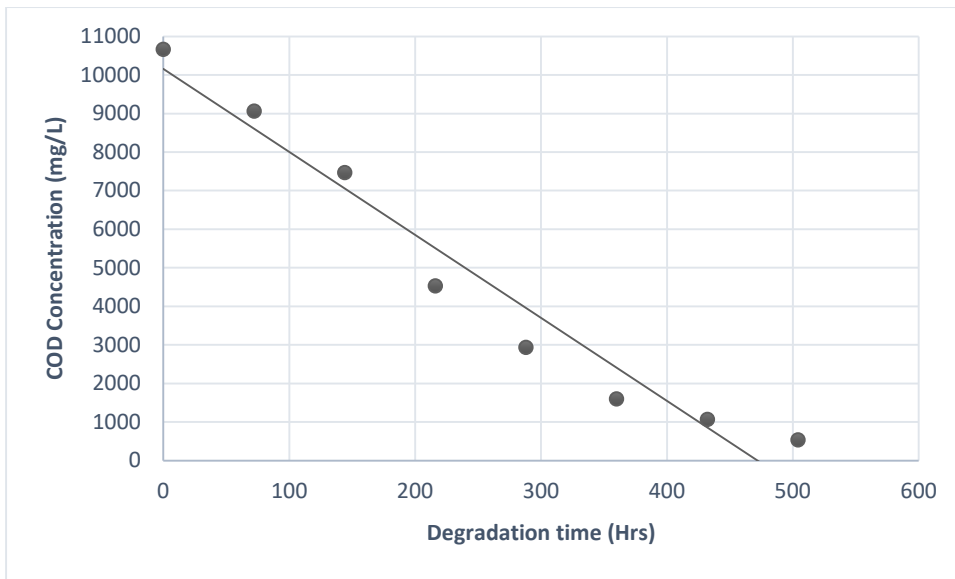


รูปที่ 40 แสดงค่า COD จากการเก็บผลทุก 72 ชั่วโมงของการใช้จุลินทรีย์ *Trichoderma reesei*

จากรูปที่ 40 สังเกตได้ว่าค่า COD ของการใช้จุลินทรีย์ *Trichoderma reesei* สามารถลดค่า COD ลงมาได้จาก 10666.67 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงมาเหลือ 9333.33 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งถือว่ามีประสิทธิภาพในการกำจัดสารอินทรีย์ได้ค่อนข้างต่ำ

ตารางที่ 17 การวิเคราะห์ค่าซีโอดีของน้ำเสีย ของการใช้จุลินทรีย์ร่วมกันสองชนิด

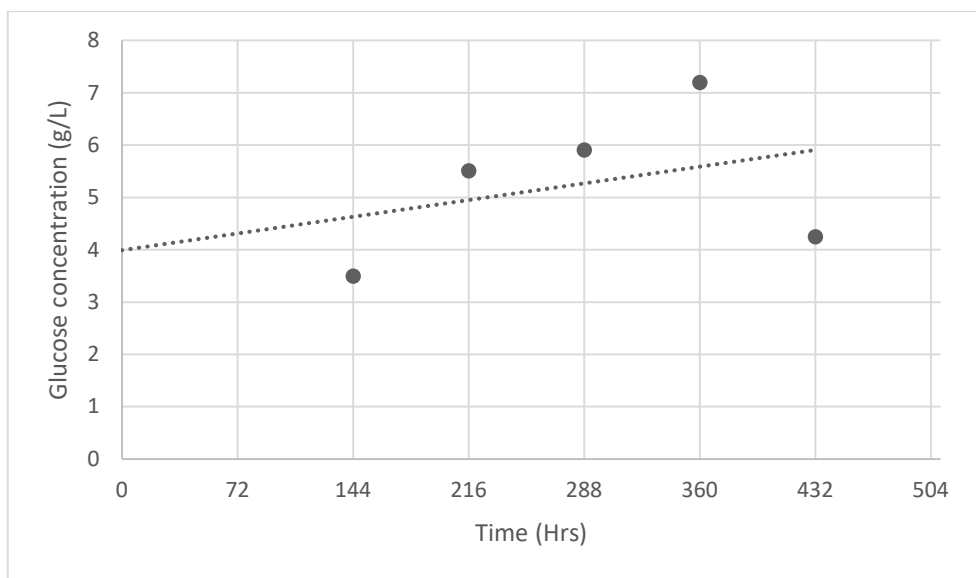
Time (Hr.)	Average (ml)	Blank (ml)	Molarity (FAS)	COD (mg/L)
0	1.8333	2.5	0.1	10666.6667
72	1.9333	2.5	0.1	9066.6667
144	2.0333	2.5	0.1	7466.6667
216	2.2167	2.5	0.1	4533.3333
288	2.3167	2.5	0.1	2933.3333
360	2.400	2.5	0.1	1600
432	2.4333	2.5	0.1	1066.6667
504	2.4667	2.5	0.1	533.33333



รูปที่ 41 แสดงค่า COD จากการเก็บผลทุก 72 ชั่วโมง ของการใช้จุลินทรีย์ร่วมกันสองชนิด

จากรูปที่ 41 แสดงค่า COD ของการใช้จุลินทรีย์ร่วมกันระหว่าง *Phanerocheate chysosporium* และ *Trichoderma reesei* ซึ่งสามารถลดค่า COD จาก 10,666.6667 มิลลิกรัมต่อลิตร เหลือ 533.3333 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งถือว่าสามารถลดค่า COD ได้อย่างมีประสิทธิภาพอย่างมากดังนั้นแสดงว่าการใช้จุลินทรีย์ร่วมกันสองชนิด สามารถย่อยสลายสารอินทรีย์ได้เป็นอย่างดี

#### 7.11 การวิเคราะห์หาค่าปริมาณน้ำตาลกลูโคสโดยเครื่องมือ High performance liquid chromatography



รูปที่ 42 กราฟแสดงความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสของของการใช้จุลินทรีย์ร่วมกันสองชนิด

จากรูปที่ 42 แสดงปริมาณของความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสจากการย่อยสลายของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสจากสารลิกโนเซลลูโลสที่เวลาต่างๆ โดยใช้จุลินทรีย์ร่วมกันสองชนิด สามารถบ่งบอกถึงประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารอินทรีย์ได้ โดยได้ค่าความเข้มข้นสูงสุด 7.196 กรัมต่อลิตรที่เวลา 360 ชั่วโมง

## 8. สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองการย่อยสลายสารอินทรีย์ประเภทเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน พบว่าสามารถย่อยสลายสารอินทรีย์ได้ทั้ง 3 ชนิด จากน้ำเสียสังเคราะห์ที่เลียนแบบจากโรงงาน โดยพบว่ามีค่าของแข็งแขวนลอยเท่ากับ 2751 มิลลิกรัมต่อลิตรซึ่งสูงมากเมื่อเทียบกับเกณฑ์มาตรฐานน้ำทิ้งของกรมควบคุมมลพิษที่สามารถปล่อยได้ไม่เกิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนค่า pH วัดได้ที่ 6.7 ซึ่งยังอยู่ในเกณฑ์ปกติของน้ำทิ้ง การวัดการย่อยสลายโดยวิธี TLC นั้นเป็นวิธีขั้นต้นที่ไว้วิเคราะห์ว่าจุลินทรีย์สามารถย่อยสลายสารอินทรีย์ให้มีโมเลกุลหรืออนุพันธ์เล็กได้หรือไม่โดยอาศัย หลักการของโครมาโทกราฟี ในการทดสอบ ซึ่งปรากฏว่ามีน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเกิดขึ้น ย่อมแสดงว่า เกิดการย่อยสลายของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส เนื่องจาก เซลลูโลสเมื่อย่อยสลายแล้วจะได้น้ำตาลกลูโคส ส่วนเฮมิเซลลูโลสเมื่อย่อยสลายแล้วจะได้น้ำตาล ไซโลส อะราบินอส หรือแมนโนส ซึ่งขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของพืชที่นำมาใช้ในการทดสอบ ทั้งนี้ นอกจากจะย่อยสลายเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสแล้วยังสามารถย่อยสลาย ลิกนินซึ่งเป็นคาร์โบไฮเดรตวงแหวนที่ย่อยสลายยากและเป็นสาเหตุหลักของน้ำเน่าเสีย โดยจุลินทรีย์ได้ย่อยสลายลิกนินลงได้โดยใช้ความถี่ 350 นาโนเมตร ซึ่งหากมองด้วยสายตาเปล่าอาจมองถึงความแตกต่างได้อย่างไม่ชัดเจนเท่าการใช้เครื่องมือวัด อีกทั้งการย่อยสลายของลิกนินเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสนั้นส่งผลต่อค่า COD โดยตรงเนื่องจากเป็นสารอินทรีย์ที่อยู่ในน้ำ ทำให้ค่า COD ลดลงตามลงไปด้วยโดยค่า COD ในวันแรกนั้นมีค่า 10667 มิลลิกรัมต่อลิตรและสามารถลดค่า COD ลงได้ในวันเก็บผลครั้งสุดท้ายคือ 533 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ก็ยังไม่สามารถลดได้ถึงเกณฑ์น้ำทิ้งของกรมควบคุมมลพิษ

อย่างไรก็ตามการพัฒนาจากโครงการเดิมที่ใช้แบคทีเรียในการย่อยสลายเซลลูโลสมาใช้เชื้อราในการย่อยสลายสารเพิ่มเติมอย่างเฮมิเซลลูโลสและลิกนินย่อมมีข้อดีข้อเสียที่แตกต่างกันไป และการทดลองยังอยู่ในขั้นห้องปฏิบัติการ อาจจะยังนำไปใช้ไม่ได้จริง ในระดับโรงงานอุตสาหกรรมแต่เป็นทางเลือกในการนำไปประยุกต์ใช้ให้เหมาะกับประเภทของน้ำเสียในอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้อง

## 9. ข้อเสนอแนะ

1. ระยะเวลาที่เหมาะสมในใส่เชื้อ *Trichoderma reesei* ค่อนข้างคาดเดายากเนื่องจากถึงปฏิกรณ์เมื่อดำเนินการเดินระบบแล้วในวันแรกๆเมื่อใส่เชื้อเข้าไปพบว่าเชื้อตายอันเนื่องมาจากความเข้มข้นของ

ลิกนินและไม่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสที่ถูกปกคลุมโดยลิกนินได้ จึงต้องรอให้เชื้อ *Phanerochaete chrysosporium* ย่อยสลายลิกนินออกจากตัวสารลิกโนเซลลูโลสเสียก่อน

2. ในการทดลองย่อยสลายสารอินทรีย์หากอยากให้เห็นผลที่ชัดเจนกว่านี้ควรขยายขนาดของถังปฏิกรณ์เพื่อให้เทียบเคียงกับระบบจริงของโรงงานอุตสาหกรรมที่จะนำไปประยุกต์ใช้

3. เนื่องจากจุลินทรีย์เป็นเชื้อราซึ่งปัญหาที่ตามมาคือการทำฟุ้งของสปอร์ทำให้ต้องทำการทดลองในระบบปิดหากจะนำไปใช้จริงอาจมีความยากลำบากในการดักกรองสปอร์ของจุลินทรีย์

4. สืบเนื่องจากแบคทีเรียที่ได้ทำการค้นหาในบ่อบำบัดทางชีวภาพของระบบแอกติเวเต็ดสลัดจ์ ไม่แข็งแรงและมีประสิทธิภาพพอที่จะทำการย่อยสลายสารอินทรีย์ทั้ง 3 ชนิด จึงใช้จุลินทรีย์จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย และศูนย์ชีววัสดุแทน



### ผลผลิต (Output)

- รายงานฉบับสมบูรณ์
- อยู่ในระหว่างการตีพิมพ์ลงวารสารวิชาการระดับชาติ

## บรรณานุกรม

- บูรณาการรูป จากัด. 2552. องค์ประกอบทางเคมีของไม้ (ออนไลน์). สืบค้นจาก :  
[http://www.buranapagroup.com/knowledge\\_chemical.php](http://www.buranapagroup.com/knowledge_chemical.php) (15 ตุลาคม 2552)
- ศิริรัตน์ ศิริพรวิศาล, 2010 เทคโนโลยีเอนไซม์ในอุตสาหกรรมกระดาษ วารสารส่งเสริมเทคโนโลยี ฉบับที่ 213  
 ประจำเดือน ตุลาคม-พฤศจิกายน 2553
- สินีนานู ทิพย์ดนตรี, การบำบัดน้ำเสียจากโรงงานพิมพ์กล่องกระดาษ, วิทยานิพนธ์ (วท.ม.(การจัดการสิ่งแวดล้อม))-มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, 2543
- Adnan A., Khan M. and Ahmad T., Optimized antimicrobial peptide (Bacitracin) production by immobilized and free cells and of Bacillus Spp GU215 using Wood chips and silicon polymer beads Pak. J. Pharm. Sci., Vol.26, No.6, November 2013, pp.1077-1082
- Bajpai, P. (2016). *Pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuel production*: Springer.
- Bhavika, P., & Albert, S. (2014). Evaluation of Trichoderma reesei as a compatible partner with some white rot fungi for potential bio-bleaching in paper industry. *Annals of Biological Research*, 5(4), 43-51.
- Cheng J. and Sun Y., 2001. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology* 83 (2002) 1–11
- Dionisi, D., Anderson, J. A., Aulenta, F., McCue, A., & Paton, G. (2015). The potential of microbial processes for lignocellulosic biomass conversion to ethanol: a review. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 90(3), 366-383.  
 doi:10.1002/jctb.4544
- Eduardo et al., Suiting Dynamic Models of Fixed-Bed Catalytic Reactors for Computer-Based Applications, *Engineering*, 2011, 3, 778-785
- Gardner, K.H. and Blackwell, J. 1974. Structure of native cellulose. *Biopolymers* 13: 1975-2001
- Ghose, T.K., Cellulase biosynthesis and hydrolysis of cellulosic substances, in *Advances in Biochemical Engineering*, 6, 25, 1977.
- Helmenstine, A.M. 2013. On this day in science-January 6 (Online). Available <http://chemistry.about.com/b/2013/01/05/on-this-day-in-science-january-6-anselme-payen-and-cellulose.htm>. (24 February 2013)
- Kadla, J.F. and Gilbert, R. 2000. Cellulose Structure: A Review. *Cell Chem Technol.* 34:197-216

### บรรณานุกรม (ต่อ)

- Kucharska, K., Rybarczyk, P., Hołowacz, I., Łukajtis, R., Glinka, M., & Kamiński, M. (2018). Pretreatment of lignocellulosic materials as substrates for fermentation processes. *Molecules*, 23(11), 2937.
- Lewin, M. and Goldstein, I.S. 1991. Wood structure and composition. Marcel Dekker, Inc. New York. 488 p.
- Phillips, G.O. and Williams, P.A., 2000, "Handbook of hydrocolloids", New York, CRC press, pp. 87-213
- Pokhrel, D & Viraraghavan, T. (2004). Treatment of pulp and paper mill wastewater – a review. *Sci. Tot. Env.*, Vol. 333, pp. 37-58.
- Reese et, Siu Rgh, Levinson HS. The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis. *J Bacteriol.* 1950 Apr;59(4):485–497.
- Sjöström, E. 1993. Wood chemistry: Fundamentals and applications. Academic Press, Inc. Toronto. 293 p
- Smook, G.A. 1986. Handbook for pulp and paper technologists. Joint textbook committee of the paper industry of the United States and Canada. 395 p.
- Somogyi, M. (1952). Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* 195:19-23.
- Serge Pérez and William Mackie, Structure and morphology of cellulose, CERMAV-CNRS, 2001.
- Yang, R., Meng, D., Hu, X., Ni, Y., & Li, Q. (2013). Saccharification of pumpkin residues by coculturing of *Trichoderma reesei* RUT-C30 and *Phanerochaete chrysosporium* Burdsall with delayed inoculation timing. *J Agric Food Chem*, 61(38), 9192-9199. doi:10.1021/jf402199j
- Tachaapaikoon, C., Ratanakhanokchai, K., & Kyu, K. L. (2003). Cellulase-free Xylanase from Alkaliphilic Thermotolerant *Bacillus halodurans* Strain C-1 for Hydrolysis of Agricultural Residues and Kraft Pulps. *KMUTT Research and Development Journal*, 26(2), 201-218.

## ภาคผนวก

## ภาคผนวก ก วิธีการคำนวณและกราฟ

## การคำนวณหาค่าสารแขวนลอย



รูปที่ 1ก แสดงน้ำหนักหลังอบของสารแขวนลอยทั้งหมด

$$\text{ของแขวนลอยทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อลิตร)} = \frac{\square - \square}{\square\square\square\square\square\square(\square\square)} \times 10^6$$

กระดาษเปล่าหนัก 0.0893 กรัม

$$\text{ของแขวนลอยทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อลิตร)} = \frac{0.3644 - 0.0893}{100} \times 10^6 = 2751 \text{ mg/L}$$

## วิธีเตรียมสารสำหรับวัดค่าซีโอดี

1. สารละลาย digestion reagent ละลาย  $K_2Cr_2O_7$  4.913 กรัมซึ่งอบแห้งที่  $103^\circ C$  เป็นเวลา 2 ชม. ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร. ค่อยๆเติม conc.  $H_2SO_4$  167 มิลลิลิตร เติม  $HgSO_4$  ลงไป 33.3 กรัม คนให้ละลายตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น
2. กรด Sulfuric เข้มข้นที่ผสม  $AgSO_4$  (Sulfuric Acid reagent) ละลาย  $AgSO_4$  22 กรัมใน Conc.  $H_2SO_4$  ซึ่งมีน้ำหนัก 4.1 กิโลกรัม (2.5 ลิตร) แล้วตั้งทิ้งไว้ 1-2 วันเพื่อให้ละลาย
3. เตรียมสารละลาย FAS

### วิธีการเตรียม

ละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตเฮกซะไฮเดรต  $[\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$  39.2 กรัม ใน น้ำกลั่นประมาณ 500 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 20 มิลลิลิตร คนให้ละลาย ทิ้งให้เย็น แล้ว เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร สารละลายนี้ต้องเทียบมาตรฐานกับสารละลาย มาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมตที่ใช้ในการย่อยสลายทุกครั้งที่น่ามาใช้

### วิธีการหาความเข้มข้นของเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต (Ferrous Ammonium Sulfate)

เติมสารเคมีตามตารางดังกล่าวข้างบนนี้ในภาชนะย่อยสลาย แต่ใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง น้ำ ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วไทเทรตด้วยเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต (Ferrous Ammonium Sulfate ) ใช้เฟอร์โรอินเป็นอินดิเคเตอร์ 0.05 - 0.1 มิลลิลิตร ทำประมาณ 1 - 2 หลอด ไทเทรต จนถึงจุดยุติสี จะเปลี่ยนจากฟ้าอมเขียวเป็นสีน้ำตาลแดง

### การคำนวณ

ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต (FAS) คำนวณได้จาก

$$\text{สมการ } M_f = (6V_p M_p) / V_f$$

เมื่อ  $M_f$  = ความเข้มข้นของสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต เป็นโมลาร์

$V_f$  = ปริมาตรของสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ เป็นมิลลิลิตร

$V_p$  = ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมตที่ใช้ เป็นมิลลิลิตร

$M_p$  = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมต เป็นโมลาร์

### 4. สารละลาย ferroin อินดิเคเตอร์

สามารถหาซื้อได้โดยทั่วไปหรืออาจจะเตรียมขึ้นเองโดยละลาย 1,10 - Phenanthroline Monohydrate ( $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) หนัก 1.48 กรัม และ Ferrous Sulfate Heptahydrate ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) หนัก 0.7 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วทำให้เจือจางเป็น 100 มิลลิลิตร

### วิธีการคำนวณค่าซีโอดี

$$\text{จากสูตร } \text{COD} = (A-B) (8000M) / C$$

โดย

$$\text{COD} = \text{ค่าซีโอดี หน่วยเป็นมิลลิกรัมออกซิเจนต่อลิตร}$$

A = ปริมาตรของสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในการไตเตรทBlank  
หน่วยเป็นมิลลิลิตร

B = ปริมาตรของสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในการไตเตรทตัวอย่าง  
หน่วยเป็นมิลลิลิตร

M = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต  
หน่วยเป็นโมลาร์

C = ปริมาตรตัวอย่างที่ใช้ หน่วยเป็นมิลลิลิตร

#### การคำนวณ

ยกตัวอย่างตัวอย่างน้ำเริ่มต้น ใช้ปริมาณ FAS ในการไตเตรท 1.3 มิลลิลิตร

ปริมาณน้ำตัวอย่าง 5 มิลลิลิตร

ปริมาตรของ FAS ที่ใช้ในการไตเตรทBlank 2.3 มิลลิลิตร

ปริมาณ Digestion reagent 3 มิลลิลิตร

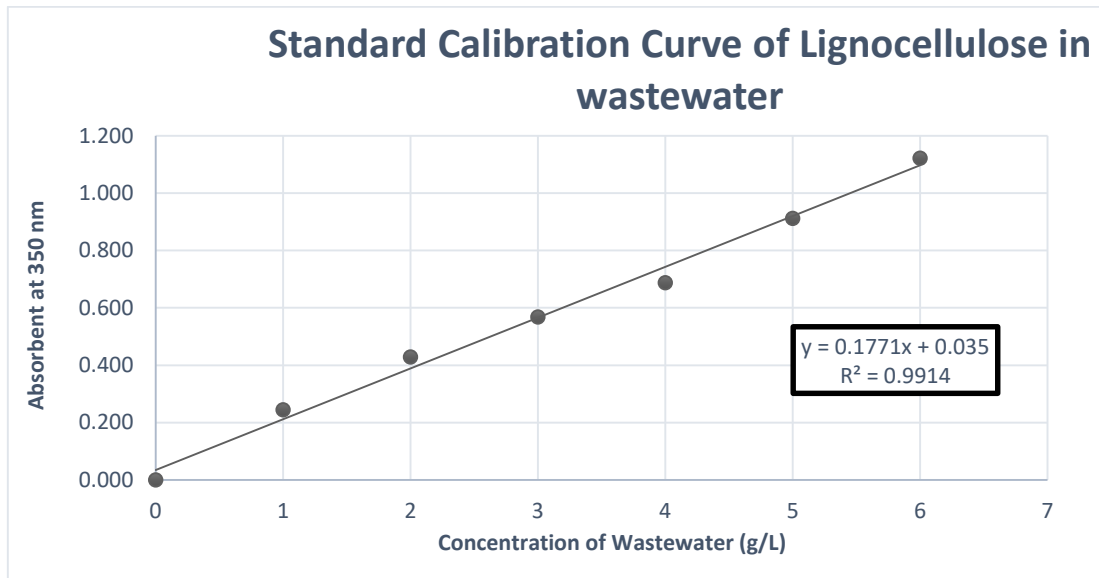
$$\text{COD} = (2.3 - 1.3) \left( \frac{3 \times 0.0167}{1.3} \times 8000 \right) / 5 = 1171.569 \text{ มิลลิกรัมต่อลิตร}$$

#### การคำนวณร้อยละของลิกนิน

#### กราฟมาตรฐานในการคำนวณค่าลิกนิน

ตารางที่ 1ก แสดงความเข้มข้นของสารลิกโนเซลลูโลส

Std. Calibration of Total Lignocellulose	
Conc. (g/ L)	Abs. @ 350 nm
0	0.000
1	0.245
2	0.429
3	0.568
4	0.688
5	0.912
6	1.122

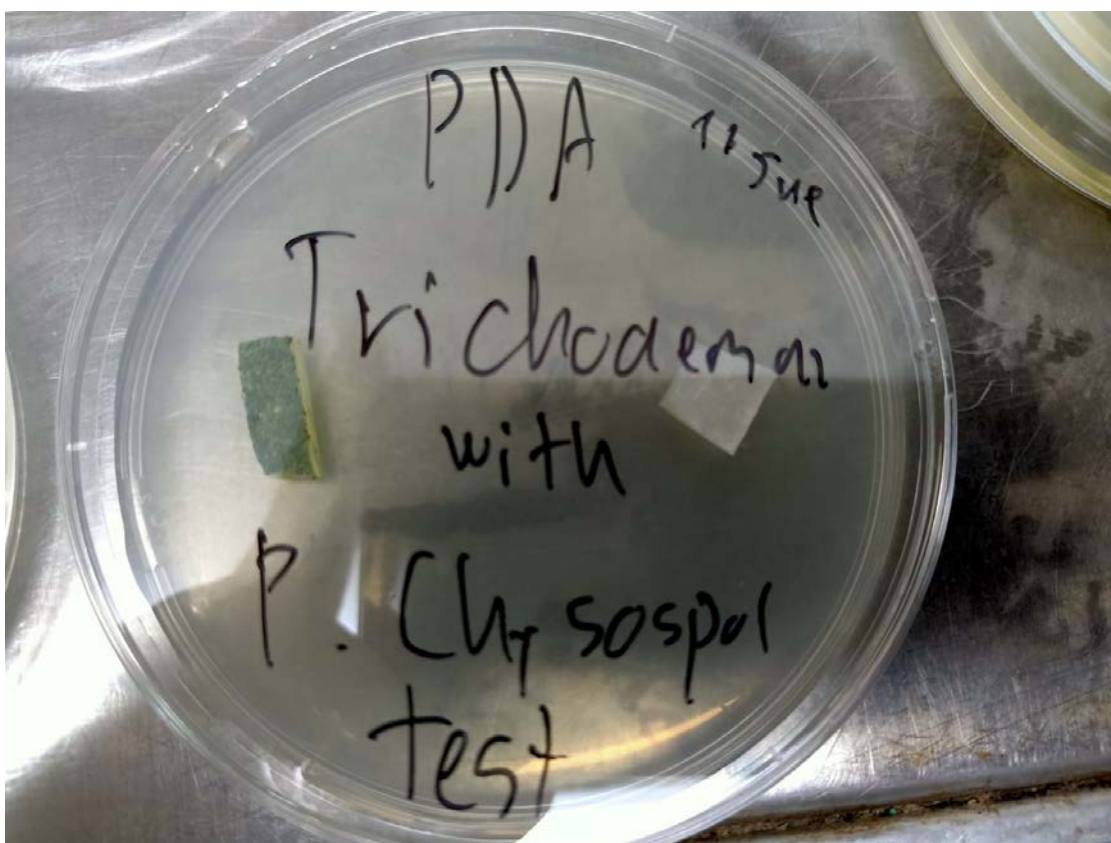


รูปที่ 2ก แสดงกราฟมาตรฐานในการคำนวณปริมาณลิกนิน

## ภาคผนวก ข รูปภาพการทดลอง

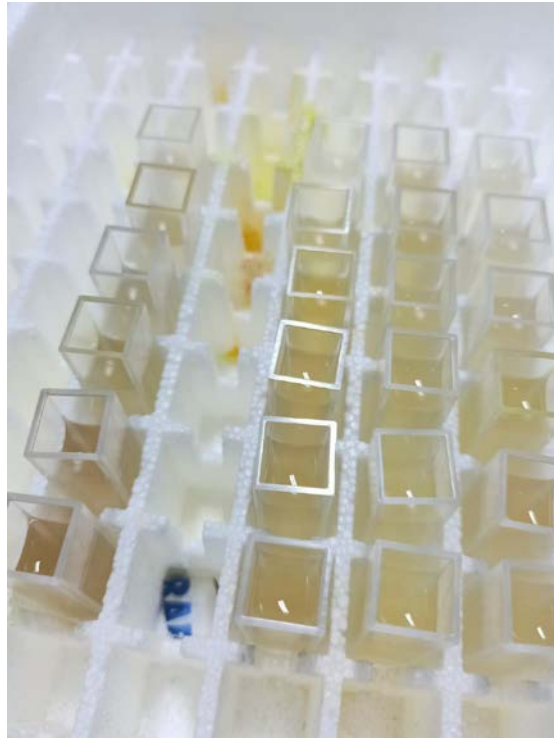


รูปที่ 1ข การเตรียมไม้สำหรับทำน้ำเสียสังเคราะห์

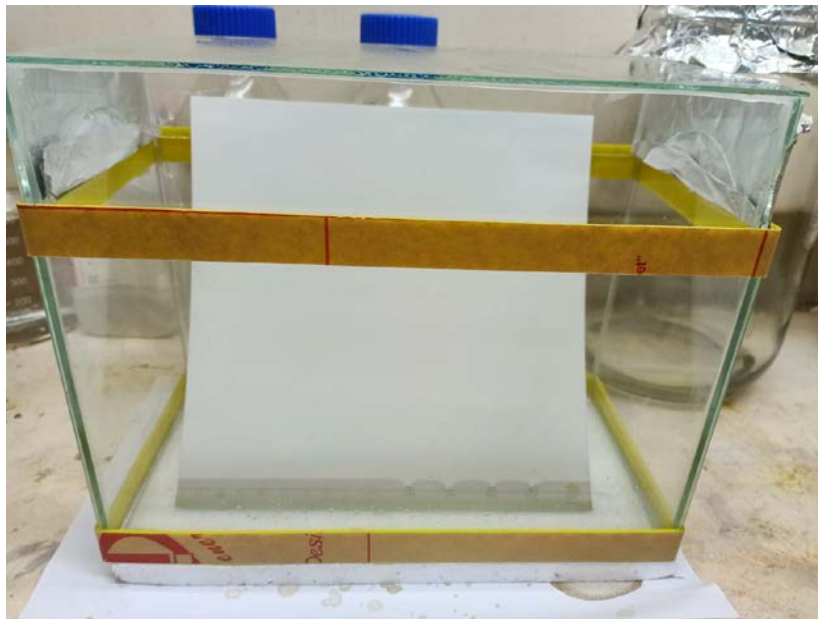


รูปที่ 2ข ลักษณะการเลี้ยงจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดด้วยกันเพื่อทดสอบการอาศัยอยู่ร่วมกัน





รูปที่ 3 ข ทดสอบปริมาณลิกลินด้วยเครื่อง Spectrophotometer



รูปที่ 4 ข การทดสอบหาชนิดน้ำตาลโดยวิธีแยกสารแบบ Thin-layer chromatography



รูปที่ 5 ข การสกัดสารแทรกเพื่อหำรย่อยละของเฮมิเซลลูโลสในเนื้อไม้ยงพารา



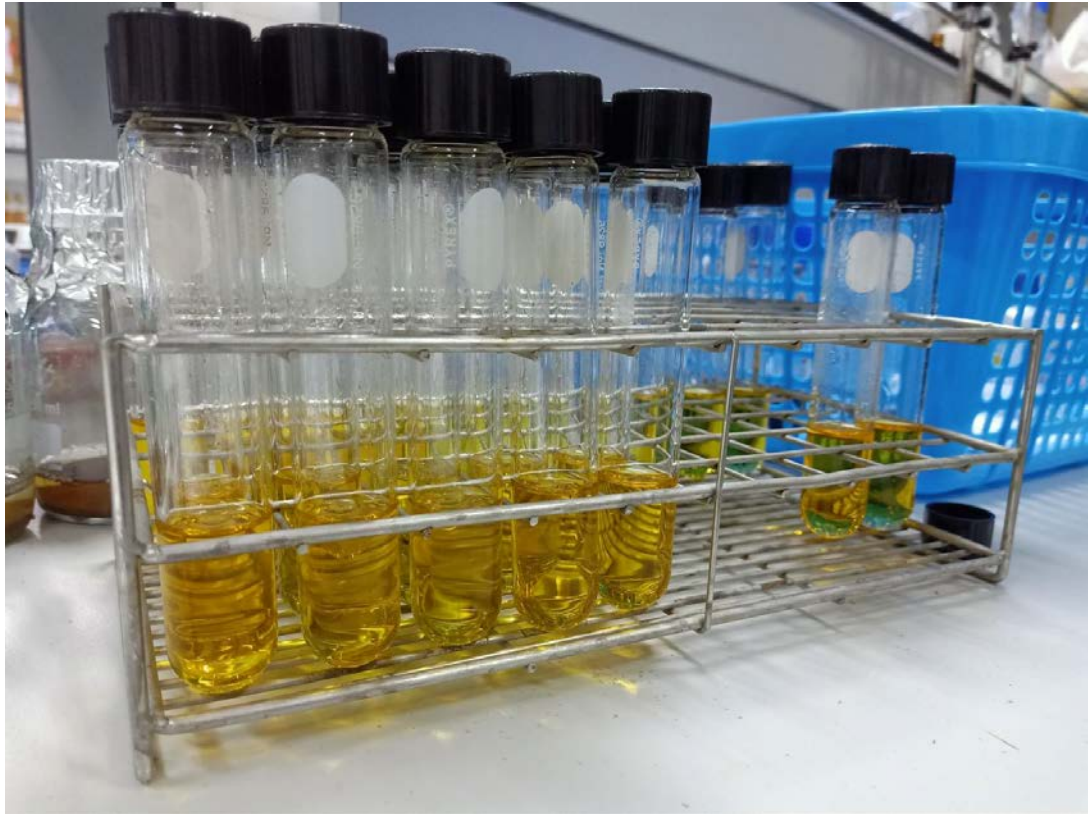
รูปที่ 6 ข การเตรียมอาหาร potato dextrose agar สำหรับเลี้ยงจุลินทรีย์



รูปที่ 7ข ลักษณะของจุลินทรีย์ *Phanerocheate cryosporium* ขณะเลี้ยงในอาหารเหลว



รูปที่ 8ข ลักษณะของจุลินทรีย์ *Trichoderma reesei* ขณะเลี้ยงในอาหารเหลว



รูปที่ 9ข การเตรียมตัวอย่างสำหรับการวัดค่า COD

## ประวัตินักวิจัยและคณะ พร้อมหน่วยงานสังกัด

### 1. ผู้รับผิดชอบ ประกอบด้วย

1.1 หัวหน้าโครงการ (ภาษาไทย) นายวิวัฒน์ แจ่มเอียด  
(ภาษาอังกฤษ) Mr.Witawat Jangiam

หน่วยงานหลัก ภาควิชาวิศวกรรมเคมี  
คณะวิศวกรรมศาสตร์  
มหาวิทยาลัยบูรพา

โทรศัพท์ : 038-102222 (ต่อ 3350)

แฟกซ์ : 038-102222 (ต่อ 3351)