การกำจัดสีและการย่อยสลายทางชีวภาพของสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยราไวท์รอทที่ตรึงบนวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน

Decolorization and Biodegradation of Phenolics in Palm Oil Mill Effluent by White Rot Fungi Immobilized on Oil Palm Residues

อนุกูล เกียรติขวัญบุตร

Anukool Kietkwanboot

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการจัดการสิ่งแวดล้อม
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Environmental Management
Prince of Songkla University
2556

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การกำจัดสีและการย่อยสลายทางชีวภาพของสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยราไวท์รอทที่ตรึงบนวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน

ผู้เขียน นายอนุกูล เกียรติขวัญบุตร

สาขาวิชา การจัดการสิ่งแวดล้อม

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

.....

(ดร.อรมาศ สุทธินุ่น)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....

(Dr.Tran Thi My Hanh)

คณะกรรมการสอบ

…..……..……ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิไลรัตน์ ชีวะเศรษฐธรรม)

……..……..กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธันวดี สุขสาโรจน์)

...……..……...……..…..กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.มณฑล เลิศคณาวนิชกุล)

…..……..……..……..กรรมการ
(ดร.อรมาศ สุทธินุ่น)

…..……..……..……..กรรมการ
(Dr.Tran Thi My Hanh)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการจัดการสิ่งแวดล้อม

.....……..……..……..…….....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ธีระพล ศรีชนะ)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้เป็นผลมาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ.....
(ดร.อรมาศ สุทธินุ่น)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ.....
(นายอนุกูล เกียรติขวัญบุตร)
นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....

(นายอนุกูล เกียรติขวัญบุตร)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์ การกำจัดสีและการย่อยสลายทางชีวภาพของสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยราไวท์รอทที่ตรึงบนวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน

ผู้เขียน นายอนุกูล เกียรติขวัญบุตร

สาขาวิชา การจัดการสิ่งแวดล้อม

ปีการศึกษา 2556

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นการคัดเลือกราไวท์รอทที่มีศักยภาพในการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้งของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ผ่านการบำบัดแล้ว และพัฒนาหัวเชื้อราไวท์รอทที่ถูกตรึงด้วยวัสดุเศษเหลือจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม เพื่อให้ราตรึงมีความทนทานต่อสารประกอบฟีนอลิคและเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดสีออกจากน้ำทิ้ง จากผลการคัดเลือกราไวท์รอท 10 สายพันธุ์พบว่าราไวท์รอทสายพันธุ์ unknown04 (*Trametes hirsuta* AK4) มีอัตราการเจริญสูงที่สุด และราก้อนกลมสามารถกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลิคความเข้มข้น 261 มก./ล.ในน้ำทิ้งที่เจือจาง 2 เท่า ได้สูงสุดถึง 64.7% และ 66.5% ตามลำดับหลังจากวันที่ 7 ของการทดลอง จึงคัดเลือกราสายพันธุ์นี้มาตรึงบนวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน ได้แก่ ทะลายปาล์มเปล่า (empty fruit bunch: EFB) และเส้นใยปาล์มน้ำมัน (pericarp fiber: PF) เพื่อคัดเลือกวัสดุและระยะเวลาการตรึงที่เหมาะสม พบว่าราไวท์รอทที่ถูกตรึงบน PF เป็นเวลา 6 วันสามารถกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้งที่เจือจาง 2 เท่าได้สูงสุดเท่ากับ 94% และ 80.6% ตามลำดับหลังจากวันที่ 8 ของการศึกษา ในระหว่างการบำบัดน้ำทิ้งด้วยราตรึงบน PF ยังสามารถตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์ในกลุ่มลิกนิโนไลติก 2 ชนิด ได้แก่ Laccase และ Manganese peroxidase โดยพบว่าการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ทั้งสองชนิดมีความสอดคล้องกับการลดลงของสีและสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้ง ดังนั้นราตรึงด้วย PF เป็นระยะเวลา 6 วันจึงถูกนำไปใช้ในการทดลองต่อไป จากการศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้งด้วยวิธีการ 1) การเจือจางน้ำทิ้ง 2) การเติมแหล่งอาหารร่วม 3) การบำบัดแบบสองขั้นตอน และ4) การปรับตัวของเซลล์ตรึง พบว่าการบำบัดแบบสองขั้นตอนโดยใช้น้ำทิ้งที่ถูกบำบัดขั้นต้นเป็นเวลา 8 ชั่วโมงด้วยแบคทีเรีย *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 ที่ถูกตรึงบน EFB และบำบัดต่อขั้นที่สองด้วยราไวท์รอทที่ถูกตรึงบน PF สามารถกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลิคความเข้มข้น 461 มก./ล.ในน้ำทิ้งที่ไม่เจือจางได้สูงสุดถึง 87.1% และ 82.2% ตามลำดับ หลังจากการบ่มเป็นระยะเวลา 8 วัน

Thesis Title	Decolorization and Biodegradation of Phenolics in Palm Oil Mill Effluent by White Rot Fungi Immobilized on Oil Palm Residues
Author	Mr. Anukool Kietkwanboot
Major Program	Environmental Management
Academic Year	2013

ABSTRACT

This research aimed to screen for a potential white rot fungus capable of decolorizing and removing phenolic compounds in the treated palm oil mil effluent (POME) and to develop an inoculum of a selected white rot fungus immobilized on oil palm residues for enhancing their tolerance to phenolic compounds and their color removal efficiency. Among ten fungal isolates, unknown 04 (identified as *Trametes hirsuta* AK4) showed the highest growth rate with the removal efficiency of 64.7% color and 66.5% phenolic compounds (an initial concentration of phenolic compounds was 261 mg/L) after incubating with 50% diluted POME for 7 days. This isolate was then chosen for the immobilization study. The two oil palm residues, namely empty fruit bunch (EFB) and pericarp fiber (PF) were utilized as immobilizing matrices. To obtain the best immobilizing material and its suitable immobilization period, the different immobilized mycelia ages of isolate AK4 were tested for their abilities to remove color and phenolic compounds in the 50% diluted POME. The results showed that a 6-day-old culture immobilized on PF could provide the highest removal efficiencies of 94% color and 80.6% phenolic compounds after 8 days of incubation. During the biodegradation experiment, the activities of two ligninolytic enzymes i.e. laccase and manganese peroxidase were detected and were found to be correlated with the reduction of color and phenolic compounds in the 50% diluted POME. Based on these results, a 6-day-old culture immobilized on PF was used for further experiment. In addition, to enhance the efficiency of immobilized fungus, four approaches were evaluated: 1) dilution of treated POME; 2) addition of nutrients (as co-substrate); 3) two-stage treatment system; and 4) adaptation of immobilized fungus. The highest removal efficiencies of 87.1% color and 82.2% phenolic compounds (an initial concentration of phenolic compounds was 461 mg/L) were obtained when the two-stage treatment was applied. This was performed by pretreatment of the undiluted POME for 8 hours with phenol-degrading bacteria*; Methylobacterium* sp. NP3 and *Acinetobacter* sp. PK1 immobilized on EFB and subsequently removed the remaining phenolic compounds and color from pretreated POME using fungus immobilized on PF for another 8 days.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความอนุเคราะห์ช่วยเหลือเป็นอย่างดียิ่งจากหลายฝ่าย โดยเฉพาะ ดร.อรมาศ สุทธินุ่น อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก และ Dr. Tran Thi My Hanh อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ถ่ายทอดความรู้ คำแนะนำ และปรึกษาวิทยาการต่างๆ เพิ่มเติม ตลอดจนช่วยตรวจทานแก้ไขข้อบกพร่องปัญหา และอุปสรรคต่างๆ ด้วยความเอาใจใส่ ห่วงใย เป็นกำลังใจตลอดมา นอกจากนั้นยังต้องขอขอบพระคุณคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิไลรัตน์ ชีวะเศรษฐธรรม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธันวดี สุขสาโรจน์ และรองศาสตราจารย์ ดร. มณฑล เลิศคณาวนิชกุล ที่กรุณาเสียสละเวลา มาเป็นคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สำหรับทุนวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์และขอขอบคุณบริษัท ลาภทวีปาล์ม จำกัด ที่อำนวยความสะดวกในการเก็บตัวอย่างน้ำเสียเป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณนักวิทยาศาสตร์ คณะการจัดการสิ่งแวดล้อม ที่ให้คำแนะนำในการใช้เครื่องมือ และอุปกรณ์วิทยาศาสตร์ในห้องปฏิบัติการด้วยดีมาตลอด และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในทุกส่วนของหน่วยงาน คณะการจัดการสิ่งแวดล้อม ที่อำนวยความสะดวกในการดำเนินงาน ตั้งแต่เริ่มจนสำเร็จลุล่วงด้วยดีเสมอมา

ขอขอบพระคุณสมาชิกทุกคนในครอบครัว เกียรติขวัญบุตร ที่เป็นกำลังใจสนับสนุนการศึกษาในระดับปริญญาโท และการจัดทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

อนุกูล เกียรติขวัญบุตร

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(5)
Abstract	(6)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(11)
รายการรูป	(12)
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ	1
1.2 การตรวจเอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
1.2.1 ของเสียจากอุตสาหกรรมสกัดน้ำมันปาล์ม	3
1.2.2 สีและสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	7
1.2.3 ราไวท์รอทและเอนไซม์ในกลุ่มลิกนิโนไลติก (Ligninolytic enzyme)	10
1.2.4 การตรึงราไวท์รอทเพื่อย่อยสลายสารมลพิษ	17
1.3 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	20
1.4 ขอบเขตของการวิจัย	21
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	21
บทที่ 2 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการ	22
2.1 สารเคมี วัสดุ เละอุปกรณ์	22
2.1.1 สารเคมี	22
2.1.2 เครื่องมือ และอุปกรณ์	22
2.2 น้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	23
2.3 วิธีดำเนินงานวิจัย	24
2.4 ราไวท์รอทและการเตรียมหัวเชื้อรา	25
2.5 การคัดเลือกราไวท์รอทที่มีศักยภาพในการลดสีและสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้งของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	25
2.5.1 ศึกษาผลของสารประกอบฟีนอลิคที่มีต่อการเจริญของราไวท์รอทบนอาหารแข็ง	25
2.5.2 ศึกษาความสามารถในการลดสีและสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้ง	26

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.6 การตรึงราไวท์รอทบนวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน 27
2.6.1 การเตรียมวัสดุตรึงราไวท์รอท 27
2.6.2 การตรึงราไวท์รอทบนวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน 28
2.6.3 การคัดเลือกวัสดุตรึงราไวท์รอท 28
2.7 การเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มของราไวท์รอทที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมัน 29
2.7.1 การแปรผันความเข้มข้นของน้ำทิ้ง 29
2.7.2 การเติมแหล่งอาหารร่วม 29
2.7.3 การบำบัดแบบสองขั้นตอน 30
2.7.4 การปรับตัวของเซลล์ตรึง 30
2.8 วิธีการวิเคราะห์ 30
2.8.1 วิเคราะห์ลักษณะของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม 30
2.8.2 การศึกษาลักษณะพื้นผิววัสดุตรึง และราตรึง โดย SEM 31
2.8.3 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ในกลุ่มลิกนิโนไลติก 31
2.8.4 การวิเคราะห์น้ำหนักแห้งของราร่วมกับวัสดุตรึง 33
2.8.5 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิครวม 33
2.8.6 การวิเคราะห์สี 34
บทที่ 3 ผลการทดลอง และวิจารณ์ผลการทดลอง 35
3.1 ลักษณะทางกายภาพของราไวท์รอท 35
3.2 การคัดเลือกราไวท์รอทที่มีศักยภาพในการลดสีและสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม 37
3.2.1 ผลความเข้มข้นของน้ำทิ้งต่อการเจริญของราไวท์รอทบนอาหารแข็ง 37
3.2.2 ศักยภาพในการลดสีและสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้งของราไวท์รอท 40
3.3 การตรึงราไวท์รอทบนวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน 45
3.3.1 คุณสมบัติของวัสดุตรึง 45
3.3.2 การตรึงราไวท์รอทบนทะลายปาล์มเปล่า 46
3.3.3 การตรึงราไวท์รอทบนเส้นใยปาล์มน้ำมัน 54

สารบัญ (ต่อ)

		หน้า
3.4 การเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้ง		61
3.4.1 การแปรผันความเข้มข้นน้ำทิ้ง		61
3.4.2 การเติมแหล่งอาหารร่วม		66
3.4.3 การบำบัดน้ำทิ้งแบบสองขั้นตอน		70
3.4.4 การปรับตัวของเซลล์ตรึง		75
บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ		83
4.1 สรุปผลการทดลอง		83
4.1.1 การคัดเลือกราไวท์รอทที่มีศักยภาพในการลดสีและสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม		83
4.1.2 การตรึงราไวท์รอทบนวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน		83
4.1.3 การเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้ง		84
4.2 ข้อเสนอแนะ		84
บรรณานุกรม		85
ภาคผนวก		95
ภาคผนวก ก	สูตร และวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ	96
ภาคผนวก ข	กราฟมาตรฐานเพื่อการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดและสี	99
ภาคผนวก ค	การวิเคราะห์ทางด้านชีววิทยาโมเลกุลเพื่อจำแนกสายพันธุ์ราไวท์รอท Unknown04	103
ประวัติผู้เขียน		107

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1.1	ลักษณะของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มและค่ามาตรฐานคุณภาพน้ำทิ้ง	6
1.2	งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการใช้ราไวท์รอทในการย่อยสลายสารมลพิษ	12
1.3	งานวิจัยที่ศึกษาการตรึงราไวท์รอทบนวัสดุต่างๆ เพื่อกำจัดสีย้อม	19
2.1	วิธีวิเคราะห์คุณลักษณะของวัสดุ	27
2.2	วิธีวิเคราะห์คุณลักษณะน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	31
3.1	ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของราไวท์รอทจำนวน 10 สายพันธุ์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้	35
3.1	ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของราไวท์รอทจำนวน 10 สายพันธุ์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ (ต่อ)	36
3.2	ประสิทธิภาพการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ความเข้มข้น 50%โดยราไวท์รอทในรูปแบบก้อนกลม 10 สายพันธุ์ ที่ระยะเวลา 8 วัน	44
3.3	องค์ประกอบของวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน	46
3.4	ประสิทธิภาพการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม โดยราไวท์รอท *Trametes hirsuta* AK4 ที่ตรึงบนทะลายปาล์มน้ำมันและเส้นใยปาล์มน้ำมันในระยะเวลาการตรึงต่างๆ	60
3.5	ประสิทธิภาพการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ด้วยราไวท์รอท *Trametes hirsuta* AK4 ที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมันด้วยวิธีต่างๆ	79
3.5	ประสิทธิภาพการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ด้วยราไวท์รอท *Trametes hirsuta* AK4 ที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมันด้วยวิธีต่างๆ (ต่อ)	80
3.6	คุณลักษณะของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มก่อนและหลังบำบัดแบบสองขั้นตอน ด้วยแบคทีเรียตรึงและราไวท์รอท *Trametes hirsuta* AK4 ที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมัน	81
ข.1	การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดGallic ความเข้มข้น 20-200 mg/L	100
ข.2	การเตรียมสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 50-500 หน่วยสี	102

รายการรูป

รูปที่		หน้า
1.1	กระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม	4
1.2	วัสดุเศษเหลือจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม ทะลายปาล์มเปล่า (A), เส้นใยปาล์ม (B) และกะลาผลปาล์ม (C)	5
1.3	ระบบบำบัดน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม บ่อผึ่ง (A) และ ระบบบ่อหมักไร้อากาศ (B)	6
1.4	โครงสร้าง monocyclic phenols เช่น *p* – hydroxybenzoic acid, Tyrosol และ Gallic acid	8
1.5	ตัวอย่างโครงสร้าง polycyclic phenols หรือ polyphenols เช่น Tannin	8
1.6	ปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ (enzymatic browning reaction)	9
1.7	ตัวอย่างราไวท์รอท *Pleurotus ostreatus* (A), *Garnoderma lucidum* (B), *Trametes* sp. (C), *Lentinus edodes* (D), *Bjerkandera adusta* (E) และ *Trametes versicolor* (F)	11
1.8	กลไกการทำงานของเอนไซม์ lignin peroxidase	13
1.9	กลไกของเอนไซม์ Laccase ในการออกซิไดซ์ phenolic aromatic compound และ Non-phenolic aromatic compound	14
1.10	กลไกการทำงานของเอนไซม์ Manganese peroxidase	15
1.11	การตรึงเซลล์	18
2.1	ลักษณะบ่อบำบัดน้ำเสีย (A) และลักษณะน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม (B)	23
2.2	ภาพรวมของการดำเนินวิจัย	24
2.3	อาหารแข็ง SDA (A), SDA + 25% POME (B), SDA + 50% POME (C), SDA + 100% POME (D) และ 100% POME Agar (E)	26
2.4	วัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมันที่ถูกตัดจนได้ขนาดตามต้องการ (A) ทะลายปาล์มน้ำมัน (EFB) (B) เส้นใยปาล์มน้ำมัน (PF)	28
3.1	เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของราไวท์รอท 10 สายพันธุ์ บนอาหารแข็ง SDA, SDA+25%POME, SDA+50%POME, SDA+100%POME และ 100%POME Agar บ่มที่ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน	38

รายการรูป(ต่อ)

รูปที่		หน้า
3.2	อาหารแข็ง SDA ที่เติมน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม 25% (A), 50% (B) และ100% (C) และการเจริญของราไวท์รอทสายพันธุ์Unknown 04 บนอาหารแข็งSDA ที่เติมน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม 25% (D), 50% (E) และ100% (F) เมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 7 วัน	39
3.3	การย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้งโรงงานงานสกัดน้ำมันปาล์ม ความเข้มข้น 50% ของราไวท์รอท 10 สายพันธุ์ ที่บ่มในอุณหภูมิห้อง เขย่า 120 รอบต่อนาที(A) Unknown 01, Unknown 02, Unknown 03 และ Unknown 04 (B) *Lentinus edodes, Garnoderma lucidum, Pleurotus ostretus, Pycnoporus sanguineus, Trametes* sp. และ*Coriolus versicolor*	41
3.4	การกำจัดสีน้ำทิ้งโรงงานงานสกัดน้ำมันปาล์มความเข้มข้น 50% ของราไวท์รอท 10 สายพันธุ์ ที่บ่มในอุณหภูมิห้อง เขย่า 120 รอบต่อนาที (A) Unknown 01, Unknown 02, Unknown 03 และ Unknown 04 (B) *Lentinus edodes, Garnoderma lucidum, Pleurotus ostretus, Pycnoporus sanguineus, Trametes sp.* และ*Coriolus versicolor*	42
3.5	ลักษณะการเปลี่ยนแปลงสีของน้ำทิ้งเมื่อเติมราก้อนกลม สายพันธุ์ Unknown 04 ในน้ำทิ้งความเข้มข้น 50% ในวันที่ 0 (A) และวันที่ 7 (B) ของการบ่มที่อุณหภูมิห้อง เขย่า 120 รอบต่อนาที	43
3.6	ลักษณะพื้นผิวของวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมันส่องโดย SEM กำลังขยาย 200x; ทะลายเปล่าปาล์มน้ำมัน (A) และเส้นใยปาล์มน้ำมัน (B)	45
3.7	ราไวท์รอท *Trametes hirsuta* AK4 ที่ตรึงบนทะลายปาล์มเปล่าระยะเวลา 0 วัน (A), 2 วัน (B), 4 วัน (C), 6 วัน (D), 8 วัน (E) และ 10 วัน (F) เมื่อบ่มในอุณหภูมิห้อง สภาวะคงที่	48
3.8	ลักษะการยึดเกาะของราไวท์รอท *Trametes hirsuta* AK4 ที่ตรึงบนทะลายเปล่าปาล์มน้ำมัน หลังจากการตรึงเซลล์ 2 วัน (A), 4 วัน (B) และการเกาะติดของเส้นใยระหว่างช่องว่างรูพรุนของทะลายปาล์มน้ำมัน (C) เมื่อส่องโดยSEM กำลังขยาย 600X	49

รายการรูป(ต่อ)

รูปที่		หน้า
3.9	ประสิทธิภาพการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิคและสีในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มความเข้มข้น 50% ของราไวท์รอทสายพันธุ์ *Trametes hirsuta* AK4 ที่ตรึงบนทะลายเปล่าปาล์มน้ำมันระยะเวลา 2-10 วัน บ่มในอุณหภูมิห้อง เขย่า 120 รอบต่อนาที	51
3.10	กิจกรรมเอนไซม์ Laccase (A), Manganese Peroxidase (B) ในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มความเข้มข้น 50% ของราไวท์รอทสายพันธุ์ *Trametes hirsuta* AK4 ที่ตรึงบนทะลายเปล่าปาล์มน้ำมันระยะเวลา 2-10 วัน บ่มในอุณหภูมิห้อง เขย่า 120 รอบต่อนาที	52
3.11	น้ำหนักแห้งของราไวท์รอทสายพันธุ์ *Trametes hirsuta* AK4 ที่ถูกตรึงรวมกับน้ำหนักแห้งของทะลายปาล์มเปล่าที่ระยะเวลาการตรึง 2-10 วัน ก่อนและหลังนำไปบำบัดน้ำทิ้งโรงงานงานสกัดน้ำมันปาล์มความเข้มข้น 50%	53
3.12	รูปราไวท์รอท *Trametes hirsuta* AK4 ที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมันระยะเวลา 0 วัน (A), 2 วัน (B), 4 วัน (C), 6 วัน (D), 8 วัน (E) และ 10 วัน (F) เมื่อบ่มในอุณหภูมิห้อง สภาวะคงที่	55
3.13	ลักษะการยึดเกาะของราไวท์รอท *Trametes hirsuta* AK4 ที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมัน หลังจากการตรึงเซลล์ 6 วัน (A) และการยึดเกาะในช่องว่างของวัสดุตรึง (B) เมื่อส่องโดยSEM กำลังขยาย 600X-1,200X	55
3.14	ประสิทธิภาพการกำจัดสารประกอบฟีนอลิค (A) และสี (B) ในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มความเข้มข้น 50% ของราไวท์รอทสายพันธุ์ *Trametes hirsuta* AK4 ที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมันระยะเวลา 2-10 วัน บ่มในอุณหภูมิห้อง เขย่า 120 รอบต่อนาที	57
3.15	กิจกรรมเอนไซม์ Laccase (A), Manganese Peroxidase (B) ในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มความเข้มข้น 50% ของราไวท์รอทสายพันธุ์ *Trametes hirsuta* AK4 ที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมันระยะเวลา 2-10 วัน บ่มในอุณหภูมิห้อง เขย่า 120 รอบต่อนาที	58

รายการรูป(ต่อ)

รูปที่		หน้า
3.16	น้ำหนักแห้งของราไวท์รอทสายพันธุ์ *Trametes hirsuta* AK4 ที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมันระยะเวลา 2-10 วัน ก่อนและหลังนำไปบำบัดน้ำทิ้งโรงงานงานสกัดน้ำมันปาล์มความเข้มข้น 50%	59
3.17	การย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิค (A) การกำจัดสี (B) และการเปลี่ยนแปลงpH (C)ในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มความเข้มข้น25%- 100% ของราไวท์รอทสายพันธุ์ *Trametes hirsuta* AK4 ที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมัน บ่มในอุณหภูมิห้อง เขย่า 120 รอบต่อนาที	64
3.18	การเปลี่ยนแปลงสีของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มความเข้มข้น25% (A), 50% (B), 75% (C) และ100% (D) ที่ผ่านการบำบัดด้วยราไวท์รอทสายพันธุ์ *Trametes hirsuta* AK4 ที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมัน บ่มเป็นระยะเวลา 0-8 วัน	65
3.19	การย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิค (A) การกำจัดสี (B) และการเปลี่ยนแปลงpH (C) ในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่มีการเติมแหล่งอาหารร่วม C และ N ต่างๆ ของราไวท์รอท *Trametes hirsuta* AK4 ที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมัน บ่มในอุณหภูมิห้อง เขย่า 120 รอบต่อนาที	68
3.20	การเปลี่ยนแปลงสีของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม (A), น้ำทิ้งที่เติมน้ำตาลกลูโคส 1% w/v (B) ,น้ำทิ้งที่เติมแอมโมเนียมคลอไรด์ 1% w/v (C) และน้ำทิ้งที่เติมน้ำตาลกลูโคส 1% w/v ร่วมกับแอมโมเนียมคลอไรด์ 1% w/v (D) ที่ผ่านการบำบัดด้วยราไวท์รอทสายพันธุ์ *Trametes hirsuta* AK4 ที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมัน	69
3.21	การย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิค (A) การกำจัดสี (B) และการเปลี่ยนแปลง pH (C) ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นด้วยแบคทีเรียย่อยสลายฟีนอลที่ระยะเวลา 4- 72 ชม. และบำบัดต่อโดยใช้ราไวท์รอทสายพันธุ์ *Trametes hirsuta* AK4 ที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมัน บ่มในอุณหภูมิห้อง เขย่า 120 รอบต่อนาที	73
3.22	การเปลี่ยนแปลงสีของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นด้วยแบคทีเรียย่อยสลายฟีนอลที่ระยะเวลา 4 ชม. (A), 8 ชม. (B) , 24 ชม. (C), 48 ชม. (D), 72 ชม. (E) และบำบัดต่อด้วยราไวท์รอทสายพันธุ์ *Trametes hirsuta* AK4 ที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมัน เปรียบเทียบกับน้ำทิ้งที่ไม่ผ่านการบำบัด (F) เมื่อบ่มเป็นระยะเวลา 0-8 วัน	75

รายการรูป(ต่อ)

รูปที่		หน้า
3.23	การย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิค (A) การกำจัดสี (B) และการเปลี่ยนแปลง pH (C) ในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่บำบัดด้วยราไวท์รอทสายพันธุ์ *Trametes hirsuta* AK4 ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมันที่ผ่านและไม่ผ่านการปรับตัวบ่มในอุณหภูมิห้อง เขย่า 120 รอบต่อนาที	77
3.24	การเปลี่ยนแปลงสีของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ผ่านการบำบัดด้วยราไวท์รอทสายพันธุ์ *Trametes hirsuta* AK4 ที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมันแบบไม่ปรับตัว (A) และแบบปรับตัว (B)	78
ข.1	กราฟมาตรฐานของกรดGallic	101
ข.2	กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานแพลทตินัมโคบอลต์	102
ง.1	ลำดับนิวคลีโอไทด์ ITS1-4 บน 18S rDNA ของราไวท์รอท Unknown04	106

คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อ

EFB	= empty fruit bunch
PF	= pericarp fiber
POME	= palm oil mill effluent
N	= nitrogen
P	= phosphorus
K	= potassium
SEM	= scanning electron microscope
LiP	= Lignin Peroxidase
MnP	= Manganese Peroxidase

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

อุตสาหกรรมสกัดน้ำมันปาล์มเป็นหนึ่งในอุตสาหกรรมหลักที่สำคัญของภาคใต้ ปัจจุบันมีความต้องการใช้น้ำมันปาล์มในอุตสาหกรรมต่าง ๆ มีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น ผลจากการขยายตัวของการผลิตที่เพิ่มขึ้น ก่อให้เกิดมลพิษและของเสียออกสู่สิ่งแวดล้อมทั้งวัสดุเศษเหลือในรูปของแข็ง ได้แก่ ทะลายปาล์มเปล่า (empty fruit bunch) เส้นใยปาล์ม (pericarp fiber) และกะลาผลปาล์ม (palm shell) ออกมาเป็นจำนวนมาก หากมีการจัดการที่เหมาะสมและสามารถนำวัสดุเหล่านี้ไปใช้ประโยชน์ จะช่วยเพิ่มมูลค่าให้แก่วัสดุเศษเหลือและช่วยในการจัดการของเสียได้อีกทางหนึ่งด้วย นอกจากนี้กระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มแบบใช้น้ำ (แบบมาตรฐาน) ยังผลิตน้ำเสียออกมาปริมาณมาก มีรายงานว่าในการผลิตน้ำมันปาล์มดิบ 1 ตัน ต้องใช้น้ำประมาณ 5-5.7 ตัน และน้ำที่ใช้ในการผลิตมากกว่า 50% กลายมาเป็นน้ำทิ้ง (Ahmad *et al*., 2003) น้ำเสียส่วนใหญ่เกิดจากกระบวนการผลิตในขั้นตอนการอบทะลายปาล์มในรูปน้ำเสียจากหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ และน้ำเสียจากเครื่องเหวี่ยงแยกน้ำมันจากน้ำสลัดจ์ (sludge) ซึ่งมีปริมาณสารอินทรีย์สูง มีสีคล้ำ ยากแก่การกำจัด (พูนสุข ประเสริฐสรรพ์และคณะ, 2544)

โรงงานสกัดน้ำมันปาล์มส่วนใหญ่ใช้วิธีบำบัดน้ำเสียแบบระบบชุดบ่อไร้อากาศร่วมกับบ่อเติมอากาศและบ่อผึ่งต่อเนื่องกัน (สำนักงานเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อม, 2540) อย่างไรก็ตามน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดแล้วก็ยังไม่สามารถปล่อยทิ้งลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติได้ เนื่องจากน้ำทิ้งดังกล่าวยังคงมีสีน้ำตาลคล้ำ อันเป็นที่พึงรังเกียจ ซึ่งเกิดจากสารประกอบจำพวกแอนโทไซยานิน แคโรทีน เมลานอยดิน ลิกนิน แทนนิน และโพลีฟีนอล (Hartley, 1977; Hwang *et al*., 1978; Barker and Worgan, 1981) สีคล้ำของน้ำเสียมีผลในการลดการทะลุผ่านของแสงแดดลงสู่ใต้น้ำ ทำให้พืชที่อยู่ในน้ำเกิดการสังเคราะห์แสงลดน้อยลงขัดขวางการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตในน้ำที่มีการใช้ออกซิเจน รวมทั้งก่อให้เกิดทัศนียภาพที่ไม่ดีอีกด้วย (Park *et al*., 2007; Wang, 2008) นอกจากนี้ยังพบว่าในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มมีการปนเปื้อนของสารประกอบฟีนอลิคซึ่งเป็นสารอินทรีย์ที่พบในผลปาล์ม และจะถูกปลดปล่อยออกมาระหว่างกระบวนการนึ่งฆ่าเชื้อในการสกัดน้ำมันปาล์มแบบมาตรฐาน ในขั้นตอนนี้จะมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส (polyphenol oxidases) เป็นสาเหตุให้สารประกอบฟีนอลิคไม่ถูกย่อยสลาย (Sundram *et al*., 2003)

และตกค้างมายังน้ำทิ้ง นอกจากนี้สารประกอบฟีนอลิคยังเป็นสารตัวกลางที่เกิดจากการย่อยสลายลิกนินผ่านกระบวนการ wet oxidation อีกด้วย (Kongjan *et al*., 2010) จากรายงานที่ผ่านมาตรวจพบปริมาณของสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้งของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มตั้งแต่ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ถึงสูงกว่า 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร (Alam *et al*., 2009; Limkhunsuwan and Chaiprasert, 2010; พนิดา โต๊ะสู, 2555) สารประกอบฟีนอลิคมีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญและการทำงานของจุลินทรีย์ ส่งผลให้การย่อยสลายทางชีวภาพเกิดขึ้นได้น้อยอีกทั้งสารประกอบฟีนอลิคบางชนิดมีความเป็นพิษต่อมนุษย์ และสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศ (Torrecilla, 2010) ซึ่งค่ามาตรฐานคุณภาพน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมกำหนดให้มีสารประกอบฟีนอลได้ไม่เกิน 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (กรมควบคุมมลพิษ, 2539) และสีต้องไม่เป็นที่พึงรังเกียจ ที่ผ่านมาโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มแก้ไขปัญหาด้วยการนำน้ำทิ้งไปรดสวนปาล์มน้ำมัน และปล่อยให้เกิดการระเหยเองตามธรรมชาติแต่วิธีดังกล่าวไม่สามารถใช้แก้ไขปัญหาได้อย่างยั่งยืน ดังนั้นจึงมีความจำเป็นจะต้องบำบัดน้ำทิ้งให้ได้ตามที่มาตรฐานกำหนดไว้ เพื่อให้โรงงานสามารถปล่อยน้ำทิ้งออกสู่สิ่งแวดล้อมได้

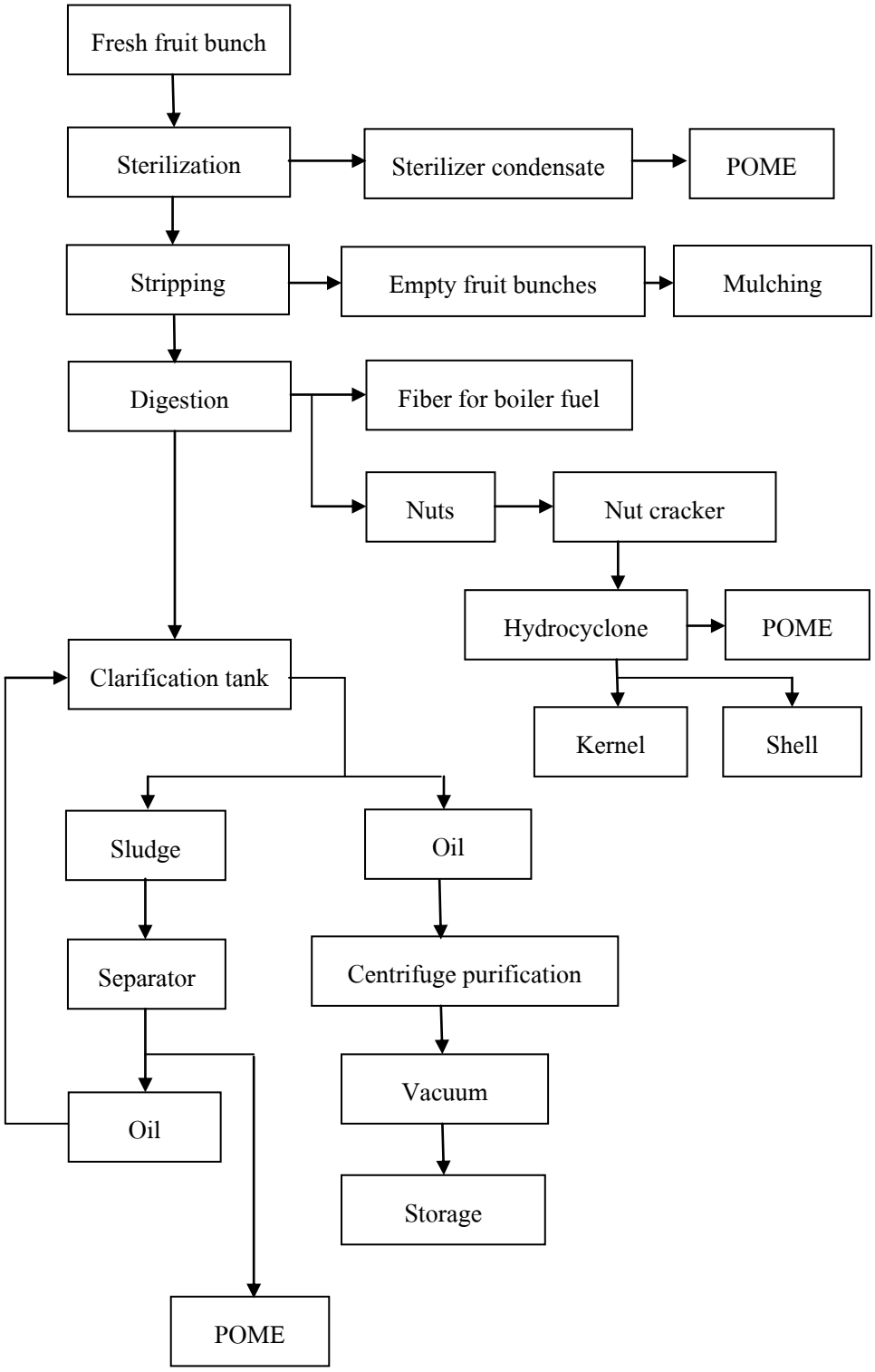
การกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้งด้วยกระบวนการทางชีวภาพ ถือเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสามารถย่อยสลายสารมลพิษได้อย่างสมบูรณ์ ต้นทุนไม่สูง และไม่ก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม จากรายงานที่ผ่านมาพบว่าราไวท์รอท (white rot fungi) ซึ่งเป็นราที่มีคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์ในกลุ่มลิกนิโนไลติก (ligninolytic enzyme) เพื่อย่อยสลายลิกนินในเนื้อไม้ มีศักยภาพในการบำบัดสีและสารประกอบฟีนอลิคในน้ำเสียได้ดี (Gao *et al*., 2010) นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้จุลินทรีย์ตรึง (immobilized cells) ช่วยเพิ่มความทนทานต่อความเข้มข้นของสารพิษต่าง ๆ ที่ปนเปื้อนในน้ำเสีย และทำให้จุลินทรีย์สามารถอยู่รอดได้ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม (Obuekwe *et al*., 2001) งานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาการตรึงราไวท์รอทบนวัสดุเศษเหลือจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม 2 ชนิด ได้แก่ ทะลายปาล์มเปล่า และเส้นใยปาล์มน้ำมัน ในระดับห้องปฏิบัติการ เพื่อศึกษาข้อมูลเบื้องต้นในการบำบัดสีและสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้งของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม อีกทั้งยังเป็นทางเลือกหนึ่งในการนำของเสียจากกระบวนการผลิตมาใช้ประโยชน์ และเป็นการกำจัดของเสียอีกทางหนึ่งด้วย

1.2 การตรวจเอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1.2.1 ของเสียจากอุตสาหกรรมสกัดน้ำมันปาล์ม

อุตสาหกรรมการสกัดน้ำมันปาล์มมีการแบ่งกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มตามการผลิตได้ 2 แบบ คือ 1) การผลิตแบบไม่ใช้น้ำหรือแบบแห้ง และ 2) การผลิตแบบมาตรฐานหรือแบบใช้น้ำ ซึ่งกระบวนการสกัดแบบมาตรฐานสามารถรองรับวัตถุดิบได้ในปริมาณมากและได้น้ำมันปาล์มดิบที่มีคุณภาพ กระบวนการสกัดแบบใช้น้ำแบ่งย่อยเป็น 2 ลักษณะ คือ เครื่องสกัดแยกน้ำมันแบบสกรู (decanter) และเครื่องสกัดแยกน้ำมันแบบหมุนเหวี่ยง (seperator) โดยทั่วไปขั้นตอนในการสกัดน้ำมันปาล์มแบบใช้น้ำจะเริ่มจากการอบทะลายปาล์มสดด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 120-130 องศาเซลเซียส ความดัน 40-50 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 40-60 นาที ดังแสดงในรูปที่ 1.1 ซึ่งการอบผลปาล์มจะช่วยยับยั้งปฏิกิริยาไลโปไลซิส (lipolysis) ที่ส่งผลให้เกิดกรดไขมันอิสระและเกิดกลิ่นหืน และนอกจากนี้จะทำให้ทะลายปาล์มเกิดความอ่อนนุ่ม ขั้วของผลปาล์มหลุดออกจากทะลายได้อย่างสะดวกง่ายต่อการย่อยและการหีบอัด ทะลายปาล์มที่ผ่านการนึ่งจะถูกป้อนเข้าเครื่องแยกผลปาล์ม ส่วนของทะลายปาล์มจะถูกลำเลียงออก ส่วนผลปาล์มที่ที่แยกได้จะเข้าสู่เครื่องย่อยผลปาล์ม โดยทำการกวนผลปาล์มให้เส้นใยแยกจากเมล็ดและให้เซลล์น้ำมันเกิดการแตกตัว จากนั้นจะถูกป้อนเข้าเครื่องหีบอัดแบบเกลียว (screw press) น้ำมันจะถูกแยกออกจากน้ำ เศษเส้นใย และสิ่งสกปรกอื่นๆ โดยการใช้เครื่อง decanter หรือเครื่อง separator แต่น้ำมันดินที่ได้โดยส่วนใหญ่ยังคงมีสิ่งเจือปนอยู่โดยเฉพาะอนุภาคของแข็ง จึงต้องผ่านเข้าเครื่องแยกเหวี่ยงความเร็วสูง แล้วจึงผ่านไปยังเครื่องดูดสุญญากาศเพื่อกำจัดความชื้น และจะถูกลำเลียงไปเก็บในถังเก็บน้ำมันขนาดใหญ่ เพื่อรอเข้าสู่กระบวนการทำบริสุทธิ์หรือเตรียมจำหน่าย (พูนสุข ประเสริฐสรรพ์ และคณะ, 2533)

จากกระบวนการเหล่านี้ก่อให้เกิดวัสดุเศษเหลือจำนวนมาก ได้แก่ ทะลายปาล์มเปล่า กะลา ผลปาล์ม เส้นใยปาล์ม และกากเนื้อปาล์ม (palm kernel cake) ดังแสดงในรูปที่ 1.2 โดยเฉพาะทะลายปาล์มเปล่า และเส้นใยปาล์มซึ่งมีปริมาณมากถึง $9.0x10^5$ และ $6.0x10^5$ ตันต่อปี (Chavalparit *et al*., 2006) นอกจากนั้นการสกัดน้ำมันปาล์มแบบมาตรฐานยังมีการใช้น้ำในการผลิตมาก มีรายงานว่ากระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มดิบ 1 ตันต้องการใช้น้ำ 5 – 5.7 ตัน และน้ำที่ใช้ในการผลิตมากกว่าร้อยละ 50 กลายเป็นน้ำเสียและถูกบำบัดเป็นน้ำทิ้ง (palm oil mill effluent, POME) (Wu *et al*., 2009) ปริมาณน้ำทิ้งส่วนใหญ่มาจากขั้นตอนการอบทะลายปาล์มในรูปน้ำทิ้งจากหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (sterilizer condensate) และน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ (decanter effluent) โดยน้ำทิ้งจากหม้อนึ่งฆ่าเชื้อมีประมาณ 200 ลิตรต่อ 10 ตันทะลายปาล์ม (พูนสุข ประเสริฐสรรพ์ และคณะ, 2533)



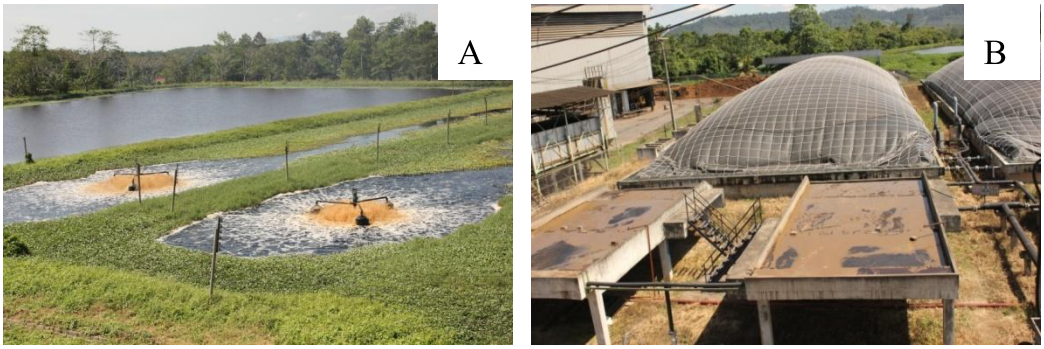
รูปที่ 1.1 กระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม

ที่มา : Lam and Lee (2011)

วัสดุเศษเหลือจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มมีการนำไปเป็นเชื้อเพลิงในหม้อนึ่งไอน้ำ (Alam *et al*., 2007) นอกจากนั้นยังมีการนำไปใช้ประโยชน์ประเภทอื่นด้วย เช่น ใช้เป็นส่วนผสมของวัสดุในการเพาะเห็ด หรือการทำปุ๋ยหมัก เป็นต้น

รูปที่ 1.2 วัสดุเศษเหลือจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม ทะลายปาล์มเปล่า (A), เส้นใยปาล์ม (B) และกะลาผลปาล์ม (C)

น้ำเสียที่เกิดจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มจะถูกรวบรวมและบำบัดด้วยกระบวนการทางชีวภาพ โดยโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มนิยมใช้ชุดบ่อไร้อากาศร่วมกับบ่อเติมอากาศ และบ่อผึ่ง (oxidation pond) ดังแสดงในรูปที่ 1.3 A ซึ่งใช้พื้นที่มาก มักก่อให้เกิดปัญหากลิ่นรุนแรง มีประสิทธิภาพในการกำจัดสารอินทรีย์ต่ำ และยังก่อให้เกิดก๊าซเรือนกระจกส่งผลต่อสภาวะโลกร้อน ทำให้โรงงานสกัดน้ำมันปาล์มมีการพัฒนาระบบในการบำบัดน้ำเสียมาใช้ระบบถังปฏิกรณ์ไร้ออกซิเจนแบบปิด (closed anaerobic tank system) และระบบบ่อหมักไร้อากาศ (รูปที่ 1.3 B) ซึ่งทำให้เกิดการใช้ประโยชน์ของน้ำเสียในรูปแบบของก๊าซชีวภาพ (biogas) ซึ่งสามารถใช้ในการผลิตกระแสไฟฟ้าใช้ในโรงงานและบางส่วนยังขายให้กับภาครัฐ น้ำเสียที่ผ่านกระบวนการบำบัดด้วยวิธีการดังกล่าวจะกลายเป็นทิ้ง



รูปที่ 1.3 ระบบบำบัดน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม บ่อผึ่ง (A) และ ระบบบ่อหมักไร้อากาศ (B)

น้ำทิ้งของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มมีความเข้มข้นของสารอินทรีย์สูงซึ่งมีค่า BOD, COD, ของแข็งแขวนลอย, น้ำมัน และไขมัน (oil and grease) ในปริมาณสูง น้ำทิ้งมีสีคล้ำ มีองค์ประกอบของสารย่อยสลายยาก (พูนสุข ประเสริฐสรรพ์และคณะ, 2544) โดยทั่วไปลักษณะน้ำทิ้งของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มแสดงดังตารางที่ 1 ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับคุณลักษณะของน้ำทิ้งที่ระบายออกจากโรงงาน ตามประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม ฉบับที่ 2 ปีพุทธศักราช 2539 จะพบว่าน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มมีค่าสูงกว่ามาตรฐานกำหนดไว้ ซึ่งมีความจำเป็นที่จะต้องบำบัดให้ได้ตามมารฐานก่อนที่จะปล่อยสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ

ตารางที่ 1.1 ลักษณะของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มและค่ามาตรฐานคุณภาพน้ำทิ้ง

พารามิเตอร์	***น้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม**	****ค่ามาตรฐานคุณภาพน้ำทิ้ง**
pH	3.5-4.8	5.5-9.0
BOD_5 (mg/L)	22,000-25,000	≤60
COD (mg/L)	30,000-55,000	≤400
TKN (mg/L)	660-890	≤200
TSS (mg/L)	36,500–42,600	-
Oil & Grease (mg/L)	1,300–4,700	≤15

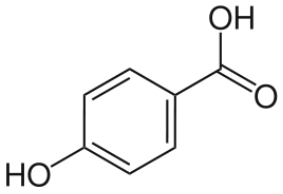
ที่มา : * Ma *et al*. (2000), Bhatia *et al*. (2007)

** ประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม ฉบับที่ 2 (พ.ศ. 2539) ลงวันที่ 14 มิถุนายน 2539 เรื่อง กำหนดคุณลักษณะของน้ำทิ้งที่ระบายออกจากโรงงาน ตีพิมพ์ในราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 113 ตอนที่ 52 ง ลงวันที่ 27 มิถุนายน 2539

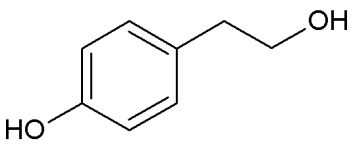
1.2.2 สีและสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

น้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มมีสีน้ำตาลคล้ำเป็นสีจริงซึ่งละลายเป็นเนื้อเดียวกับน้ำ เกิดจากสารประกอบจำพวกแอนโทไซยานิน แคโรทีน เมลานอยดิน ลิกนิน แทนนิน และโพลีฟีนอล (Hartley, 1977; Hwang *et al*., 1978; Barker and Worgan, 1981) ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่พบในพืช รวมถึงปาล์มปาล์มน้ำมันซึ่งถูกสกัดออกมาพร้อมกับกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มดิบ ฟีนอลและอนุพันธ์ของฟีนอล หรือสารประกอบฟีนอลิค (phenols, phenolics, phenolic compounds) เป็นสารที่พบเป็นองค์ประกอบอยู่ในผลปาล์มปริมาณ 0.006 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อกรัมผลปาล์ม หรือมี total phenolic content เท่ากับ 83.97 กรัมต่อลิตร gallic acid equivalent (GAE) ต่อกรัมสารสกัดจากผลปาล์ม (Sundram *et al*., 2003) โดยพบการปนเปื้อนของสารประกอบฟีนอลิคในน้ำเสียและน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดแล้วของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ตั้งแต่ 1 ถึงมากกว่า 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร (จินตนา แก้วบริสุทธิ์, 2541; ธรรมศักดิ์ ศรีสุกใส, 2547; Alam *et al*., 2009) และจากการศึกษาของ Chantho *et al*. (2013) พบว่าน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มมีการปนปื้อนของสารประกอบฟีนอลิครวมถึง 1,206 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเมื่อนำน้ำเสียดังกล่าวมาศึกษาชนิดของสารประกอบฟีนอลิคด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) สามารถตรวจพบสารประกอบฟีนอลิคถึง 8 ชนิด ได้แก่ gallic acid, p-hydroxybenzoic acid, protocatechuic acid, caffeic acid, syringic acid, vanillic acid, p-coumaric acid และ ferulic acid โดยแต่ละชนิดมีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 8.4-134 มิลลิกรัมต่อลิตร และพบว่า p-hydroxybenzoic acid เป็นสารประกอบฟีนอลิคที่พบมากที่สุดในน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

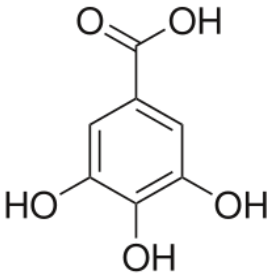
สารประกอบฟีนอลิคมีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวนที่เป็นอนุพันธ์ของเบนซิน มีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH-group) ต่ออยู่เป็นหลัก และอาจมีหมู่แทนที่ต่างๆ แทนที่ในตำแหน่ง ออโท (*ortho*) เมตา (*meta*) หรือพารา (*para*) ได้อีก สารประกอบฟีนอลิคพื้นฐาน คือ ฟีนอล (phenol) ประกอบด้วยวงแหวนเบนซิน 1 วง และหมู่ไฮดรอกซิล 1 หมู่ สารประกอบฟีนอลิคสามารถพบได้ในผักและผลไม้หลายชนิด และสามารถแบ่งประเภทตามจำนวนวงแหวนฟีนอลได้ 3 ชนิด คือ (i) monocyclic phenols มีวงแหวนฟีนอลอยู่ 1 วง สามารถพบทั่วไปในพืช เช่น tyrosol, gallic acid และ *p* – hydroxybenzoic acid เป็นต้น ดังแสดงในรูปที่ 1.4 (ii) dicyclic phenols มีวงแหวนฟีนอล 2 วง เช่น flavonoids และ lignans เป็นต้น (iii) polycyclic phenols หรือ polyphenols เป็นสารประกอบฟีนอลิคที่มีวงแหวน ฟีนอลมากกว่า 2 วง เช่น lignins และ tannin (รูปที่ 1.5) เป็นต้น



p – hydroxybenzoic acid

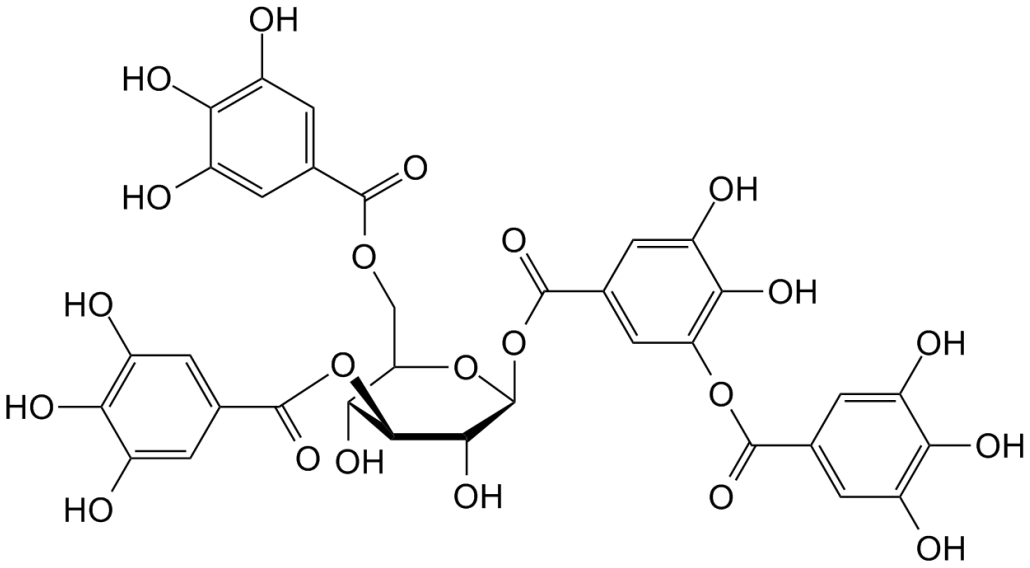


Tyrosol



Gallic acid

รูปที่ 1.4 โครงสร้าง monocyclic phenols เช่น *p* – hydroxybenzoic acid, Tyrosol และ Gallic acid

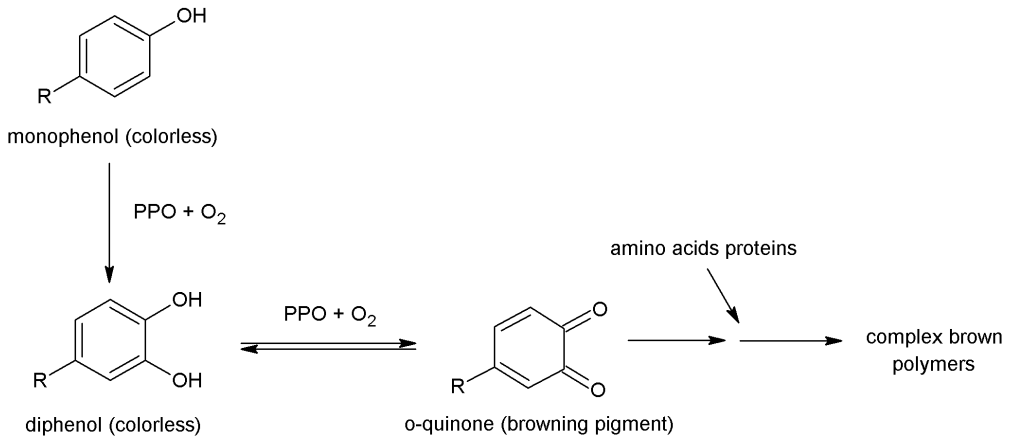


Tannin

รูปที่ 1.5 ตัวอย่างโครงสร้าง polycyclic phenols หรือ polyphenols เช่น Tannin

สารประกอบฟีนอลิคที่มีการตกค้างในน้ำทิ้งของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มนี้ เกิดจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม เมื่อเซลล์ผลปาล์มถูกทำลายจากการให้ความร้อนในขั้นตอนของการนึ่งด้วยไอน้ำ เกิดการแตกตัวขององค์ประกอบสารอินทรีย์จากขั้นตอนการหีบอัด ทำให้สารประกอบฟีนอลิคที่อยู่ในผลปาล์มถูกสกัดออกมาพร้อมกับน้ำมันและไอน้ำ ซึ่งสารประกอบฟีนอลิคจะละลายอยู่ในเฟสของน้ำได้ดีกว่าเฟสของน้ำมัน ทำให้สารประกอบฟีนอลิคปนเปื้อนมากับน้ำเสียจากกระบวนการผลิต และยังส่งผลต่อการเกิดสีของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม โดยสารประกอบฟีนอลลิคที่ถูกสกัดออกมาสัมผัสกับออกซิเจนในอากาศทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส(polyphenol oxidase, PPO) เกิดเป็นสารออร์โท-ไดฟีนอล (*o*-diphenol) ซึ่งจะถูกออกซิไดซ์ต่อไปเป็น ออร์โท- ควิโนน (*o*-quinones) ซึ่งมีสีน้ำตาล และจะรวมตัว

กันเป็นสารโมเลกุลใหญ่มีสีน้ำตาล ที่เรียกว่า เมลานิน (melanin) ซึ่งมีโครงสร้างซับซ้อน ยากต่อการคืนตัว ปฏิกิริยานี้เรียกว่า ปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ (enzymatic browning reaction) ดังแสดงในรูปที่ 1.6 ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้น้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มมีสีน้ำตาลคล้ำ



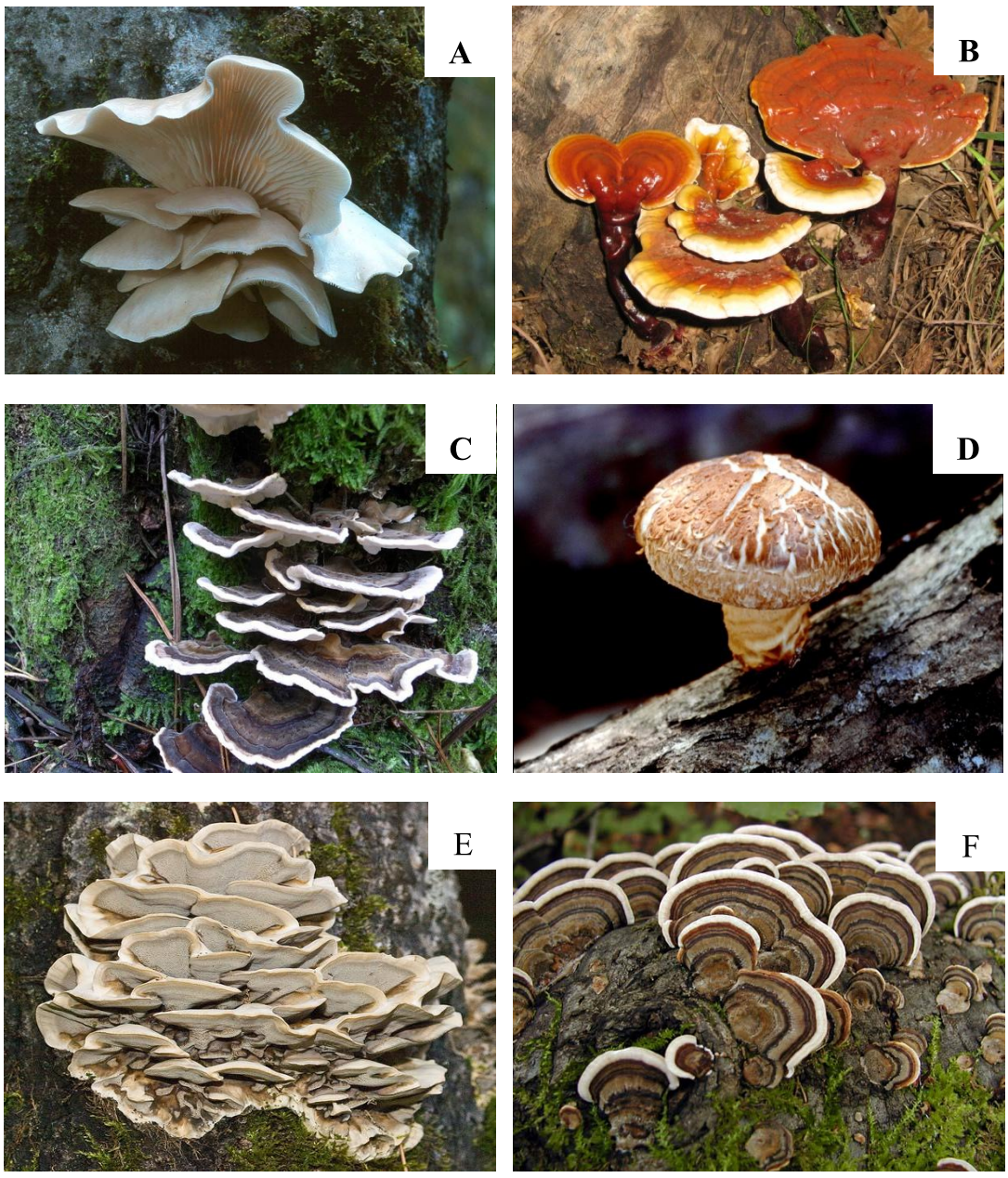
รูปที่ 1.6 ปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ (enzymatic browning reaction)
ที่มา : Sapers and Milller (1993)

มีรายงานว่าสารประกอบฟีนอลิคที่ปนเปื้อนในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มบางชนิด มีคุณสมบัติต่อต้านการเจริญและการทำงานของจุลินทรีย์ (antimicrobial activity) มีความเป็นพิษต่อพืช (phytotoxicity) และต่อต้านกระบวนการออกซิเดชัน (antioxidation) ส่งผลให้การย่อยสลายทางชีวภาพเกิดขึ้นได้น้อย และจะยิ่งลดน้อยมากขึ้นหากมีความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิคที่มากขึ้น (Torrecilla, 2010) ส่วนสีของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม มีผลทำให้ออกซิเจนที่สัมผัสผิวหน้าของน้ำลดลง ขัดขวางการเจริญของสิ่งมีชีวิตในน้ำที่มีการใช้ออกซิเจน ลดการทะลุผ่านของแสงแดดลงสู่ใต้น้ำ ทำให้พืชที่อยู่ในน้ำเกิดการสังเคราะห์แสงลดน้อยลง และนอกจากนี้สีของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มยังก่อให้เกิดทัศนียภาพที่ไม่ดีอีกด้วย (Park *et al*., 2007; Wang, 2008) และจากข้อกำหนดคุณลักษณะของน้ำทิ้งที่ระบายออกจากโรงงาน ตามประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม ฉบับที่ 2 ปีพุทธศักราช 2539 ระบุลักษณะของน้ำทิ้งว่าจะต้องมีสารประกอบฟีนอลิค ไม่มากกว่า 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีสีที่ต้องไม่เป็นที่พึงรังเกียจ อย่างไรก็ตามหลังผ่านการบำบัดน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มด้วยกระบวนการต่างๆ แล้วในบ่อน้ำทิ้งก็ยังคงพบการปนเปื้อนของฟีนอลสูงกว่าเกณฑ์มาตรฐาน รวมทั้งสีที่ยังไม่ได้ตามเกณฑ์มาตรฐานจึงมีความจำเป็นที่จะต้องพัฒนาระบบการบำบัดน้ำเสียของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม เพื่อให้น้ำทิ้งมีค่าตามมาตรฐานและสามารถปล่อยสู่แหล่งน้ำธรรมชาติได้

การกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลิคในน้ำเสียและน้ำทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรม สามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ วิธีการทางกายภาพ เช่น การกรองด้วยเมมเบรน (Ahmand *et al*., 2006) การดูดซับด้วยถ่านกัมมันต์ (Santhy and Selvapathy, 2005) วิธีการทางเคมี เช่น การตกตะกอนด้วยสารเคมี (Kim *et al*., 2003) การออกซิเดชันทางเคมี ซึ่งวิธีเหล่านี้มีความยุ่งยากในการใช้งานและดูแลรักษา ค่าใช้จ่ายในการดำเนินงานค่อนข้างสูง ทั้งยังเป็นการเพิ่มสารเคมีเข้าสู่ระบบสิ่งแวดล้อม ดังนั้นวิธีการทางชีวภาพโดยอาศัยกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย และเชื้อรา โดยเฉพาะกลุ่มราไวท์รอท ซึ่งสามารถกำจัดสารที่ย่อยสลายยากได้อย่างสมบูรณ์ จึงเป็นวิธีการที่ได้รับความนิยม เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพ ต้นทุนไม่สูงมาก และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม

1.2.4 ราไวท์รอทและเอนไซม์ในกลุ่มลิกนิโนไลติก (Ligninolytic enzyme)

ราไวท์รอทเป็นกลุ่มของราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ในกลุ่มลิกนิโนไลติก (ligninolytic enzyme) ที่สามารถย่อยสลายได้ทั้งเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนินที่เป็นองค์ประกอบในพืช โดยสามารถย่อยสลายลิกนินและเฮมิเซลลูโลสได้เร็วกว่าเซลลูโลส นอกจากนี้รากลุ่มนี้บางชนิดยังย่อยสลายลิกนินได้อย่างสมบูรณ์ได้ผลผลิตเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ ราไวท์รอทจัดเป็นราใน Class Basidiomycetes ลักษณะทั่วไปของรากลุ่มนี้ คือเป็นราที่ไม่มีคลอโรฟิลล์จึงไม่สามารถสร้างอาหารเองได้ ต้องอาศัยอาหารจากสิ่งมีชีวิตหรือพืช มีรูปร่างแบบเส้นใย (Filament) และลักษณะเซลล์เป็นแบบหลายเซลล์ (multicellular) โดยการเจริญจะไปเพิ่มความยาวออกที่ส่วนปลาย (apical growth) แต่ละส่วนของเส้นใยสามารถเจริญเป็นหน่วยใหม่ได้ ภายในเส้นใยถูกแบ่งออกเป็นส่วนๆ ด้วยผนังกั้น (septum) ราไวท์รอทเป็นราที่มีความสำคัญในการย่อยสลายไม้ให้เป็นสีขาวได้ ซึ่งเกิดจากการย่อยสลายลิกนินและเฮมิเซลลูโลสที่มีสีน้ำตาล ทำให้เหลือส่วนที่เป็นเซลลูโลสเห็นเป็นลักษณะของชั้นเส้นใยที่มีสีอ่อนจางลงกว่าเดิมคล้ายถูกฟอกสี นอกจากเซลลูโลสแล้วราไวท์รอทยังสามารถย่อยสลายสารที่มีโมเลกุลสูงได้ (Akhtar *et al*., 1999) ด้วยเหตุนี้จึงมีการนำราไวท์รอทมาใช้ในการเปลี่ยนสภาพสารประกอบบางชนิดที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับลิกนิน เพื่อลดความเป็นพิษไม่ให้เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม เช่น ยาฆ่าแมลง (pesticides), สีสังเคราะห์ (synthetic dye), polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs), polychlorinated biphynyls (PCBs), carbontetrachloride และ pentachlorophenol (PCP) เป็นต้น (Gao *et al*., 2010) ดังแสดงในตารางที่ 1.2 ราในกลุ่มนี้ได้แก่ *Coriolus versiscolor*, *Trametes* sp., *Phanerochaete chrysosporium, Phlebia radiate, Bjerkandera adusta, Pleurotus ostreatus* และ *Lentinus edodes* เป็นต้น ดังแสดงในรูปที่ 1.7



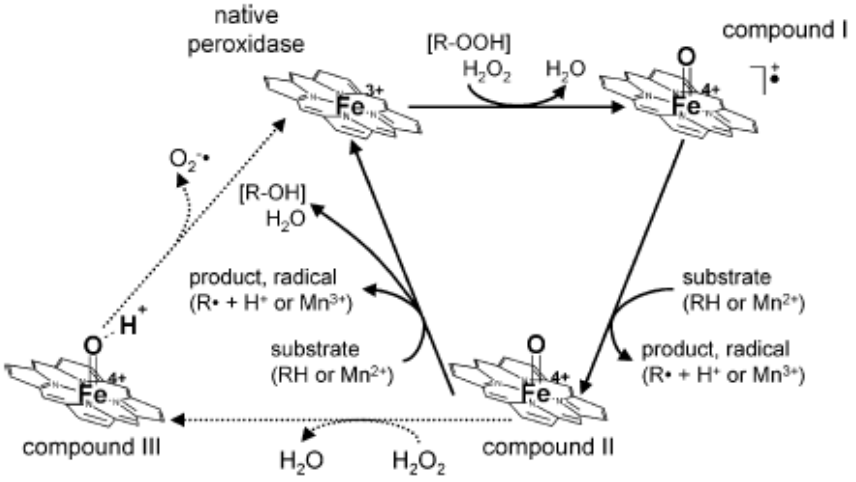
รูปที่ 1.7 ตัวอย่างราไวท์รอท *Pleurotus ostreatus* (A), *Ganoderma lucidum* (B), *Trametes* sp. (C), *Lentinus edodes* (D), *Bjerkandera adusta* (E) และ*Trametes versicolor* (F)

ตารางที่ 1.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการใช้ราไวท์รอทในการย่อยสลายสารมลพิษ

ราไวท์รอท	สารมลพิษ	อ้างอิง
Bjerkandera adusta	PAHs	Valentin *et al*. (2007)
	TNT	Eilers *et al*. (1999)
	Daunomycin producing waste	Kornillowicz *et al*. (2006)
Irpex lacteus	PAHs	Baborova *et al*. (2006)
	Synthetic dyes	Svobodova *et al*. (2008)
Lentinus tigrinus	PAHs	Valentin *et at*. (2006)
Trametes versicolor	Trichloroethylene (TCE)	Marcro-Urrea *et al*. (2008)
	Synthetic dyes	Gavril and Hodson (2007)
	Polysaccharide	Zhu *et al*. (2005)
Phlebia radiata	TNT	Aken *et al*. (1999)
Pleurotus ostreatus	Phenolics in wastewater	Aggelis *et al*. (2003)
Phanerochaete chrysosporium	PAHs (anthracene)	Mohammadi *et al*. (2009)
	Molasses wastewater	Vahabzadeh *et al*. (2004)
	Textile wastewater	Gomaa *et al*. (2008)

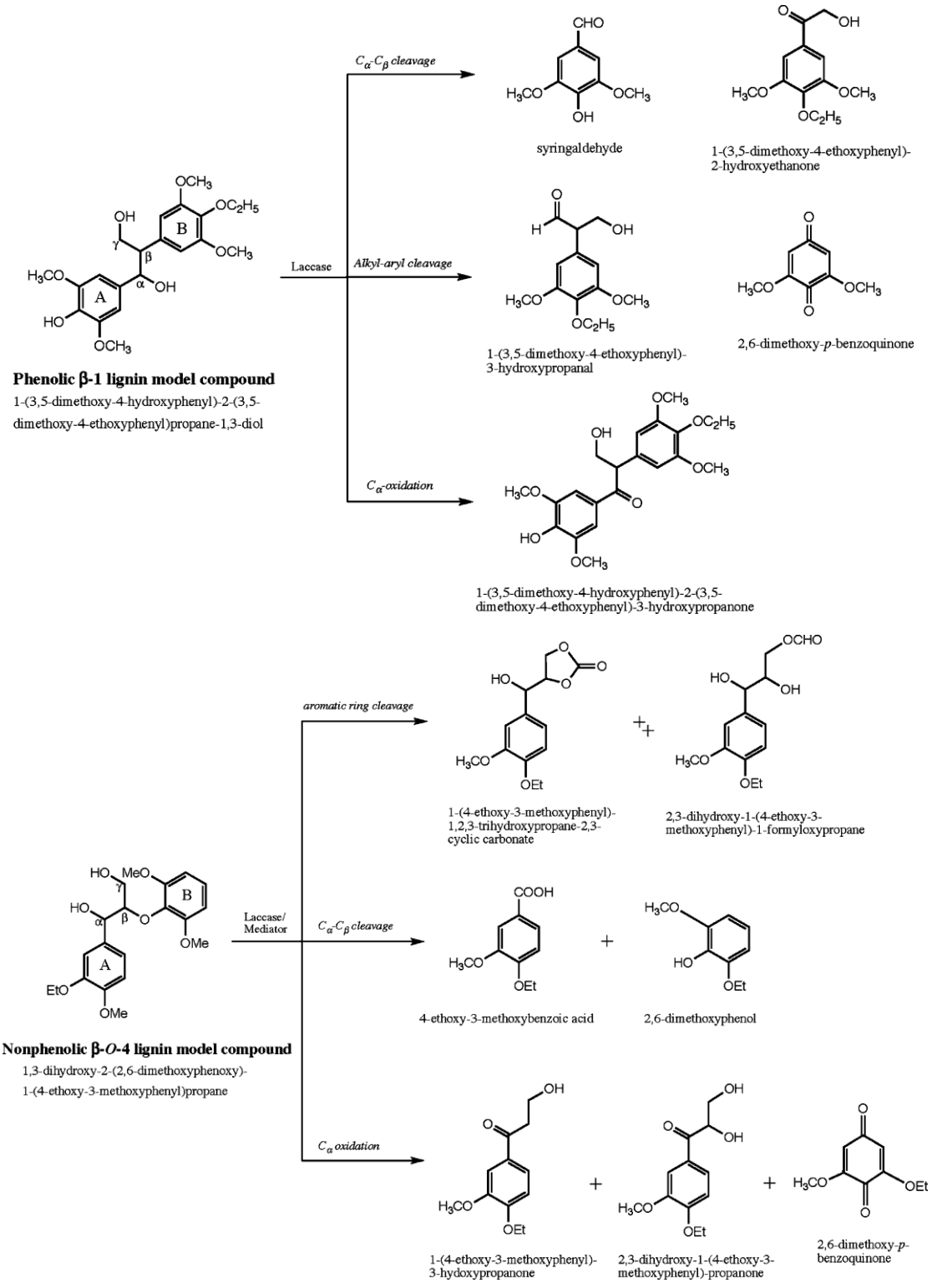
เอนไซม์กลุ่มลิกนิโนไลติก เป็นเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายลิกนิน ประกอบด้วยเอนไซม์ประเภทเปอร์ออกซิเดส (peroxidases) และออกซิเดส (oxidases) หลายชนิด เอนไซม์ที่สำคัญได้แก่ เอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (lignin peroxidases) แลคเคส (laccases,p-diphenol oxidase) แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (manganese peroxidases) และเอนไซม์ออกซิเดสที่ให้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซม์ (H_2O_2-producing oxidases) เอนไซม์ในกลุ่มนี้แต่ละตัวจะมีกลไกในการเกิดปฏิกิริยาที่แตกต่างกัน จัดเป็นเอนไซม์ที่ผลิตและหลั่งออกมาภายนอกเซลล์ (extracellular enzyme) แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ ได้แก่ lignin modifying enzymes, auxiliary enzymes และ feedback type enzyme ซึ่งราไวท์รอทแต่ละสายพันธุ์จะสร้างเอนไซม์แต่ละชนิดที่แตกต่างกัน (Leonowicz *et al*., 1999) การย่อยสลายลิกนินโดยเอนไซม์จากรากลุ่มนี้อาจเกิดกลไกหลายๆ แบบรวมกัน เช่น การทำให้วงแหวนอะโรมาติกแตกออกโดยการเติมออกซิเจน (oxidative fission) หรือเกิดออกซิเดชันที่หมู่แอลฟาไฮดรอกซิล (α-hydroxyl) การเติมน้ำที่ส่วนแอลฟาคาร์บอนิล (α-carbonyl) และการตัดพันธะแอริลอีเทอร์ (aryl ether) เป็นต้น

Lignin peroxidase (LiP) (EC 1.11.10.14)เป็น Ligninolytic enzyme ตัวแรกที่มีการค้นพบ และพบบ่อยใน *Phanerochaete chrysosporium, Trametes versicolor* และ *Bjerkandera* sp. จัดเป็นเอนไซม์ที่มี Ferric heme เป็นตัวให้อิเล็กตรอน สามารถ reduce โมเลกุลของออกซิเจนได้สาร hydrogen peroxidase และ superoxide (Baciocchi *et al*., 2002) กระบวนการทำงานของ LiP เริ่มจาก LiP ถูกออกซิไดส์โดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ทำให้ LiP ขาดอิเล็คตรอนอยู่ในสภาวะที่ไม่เสถียร จึงต้องดึงอิเล็คตรอนจากสับสเตรท เพื่อให้ตัวเองอยู่ในสภาวะที่เสถียร (Aurora and Gill, 2001) ดังแสดงในรูปที่ 1.8 LiP เป็นเอนไซม์ที่เป็นตัว oxidant ที่แรงและไม่มีความจำเพาะต่อสับสเตรทตัวใดตัวหนึ่ง แต่เป็นเอนไซม์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายโครงสร้างทั้ง phenolic aromatic compound และ non-phenolic aromatic compound (Tekre *et al*., 2001)



รูปที่ 1.8 กลไกการทำงานของเอนไซม์ lignin peroxidase
ที่มา : Wesenberg, (2003)

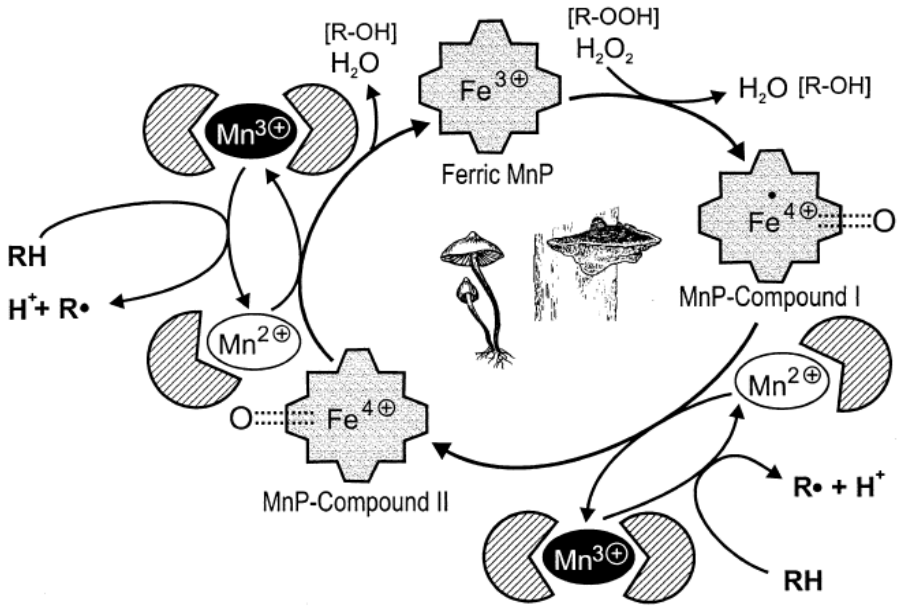
Laccases หรือ p-diphenol oxidase (EC 1.10.3.2) เป็นเอนไซม์ blue copper oxidase ที่สามารถเกิดปฏิกิริยา oxidation ของสาร phenolic และสับสเตรทอื่นๆ ที่มีปริมาณอิเล็คตรอนมาก และเป็นเอนไซม์ที่มี copper หลายอะตอมในโมเลกุลที่ทำหน้าที่เป็นตัวออกซิไดซ์สับสเตรท มีกลไกการทำงานที่แตกต่างจาก peroxidase ตัวอื่นๆ คือไม่ต้องการ H_2O_2ในการออกซิไดซ์สับสเตรท เอนไซม์ laccase สามารถออกซิไดซ์ phenolic aromatic compound อย่าง lignin model dimer เช่น methylated phenol, aromatic amine นอกจากนี้แล้วยังสามารถออกซิไดซ์พวก non-phenolic aromatic compound (รูปที่ 1.9)เช่น veratryl alcohol (Li *et al*., 1998)



รูปที่ 1.9 กลไกของเอนไซม์ Laccase ในการออกซิไดซ์ phenolic aromatic compound และ non-phenolic aromatic compound

ที่มา : Wong (2008)

Manganese peroxidase (MnP) (EC 1.11.1.13) เป็นเอนไซม์ที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยาโดยตรงกับโครงสร้างของลิกนิน แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ (1) Manganese dependent peroxidase เป็น extracellular enzyme ที่นอกจากต้องการ H_2O_2 ในการเกิดปฏิกิริยาออกซิไดส์ลิกนิน แล้วยังต้องการ Mn^{2+} เป็น co-factor ด้วย (2) Manganese independent peroxidase เป็น extracellular enzyme ที่ต้องการ H_2O_2 ในการเกิดปฏิกิริยาออกซิไดส์ลิกนิน แต่ไม่ต้องการ Mn^{2+} สับสเตรทหลักของ Manganese peroxidase เป็นสารที่มีมวลโมเลกุลต่ำและส่วนใหญ่เป็นพวกกรดอินทรีย์ ในกลไกการย่อยสลายลิกนินจะมี Mn(II) ทำหน้าที่เป็นตัวให้อิเล็คตรอน โดยปฏิกิริยาจะเริ่มจาก MnP ถูกออกซิไดซ์โดย H_2O_2 ต่อมา MnP ที่ขาดอิเล็คตรอนจะอยู่ในสภาวะไม่เสถียรจึงรับอิเล็คตรอนจาก Mn(II) เกิดเป็น Mn(III) ที่เข้าไปร่วมกับ organic acid chelator เช่น oxalate, malonate, lactate เกิดเป็น chelated-Mn(III) ไปออกซิไดซ์ลิกนิน (Crecchio *et al*., 1995) ดังแสดงในรูปที่ 1.10



รูปที่ 1.10 กลไกการทำงานของเอนไซม์ Manganese peroxidase
ที่มา : Hofrichter (2002)

จากการศึกษาที่ผ่านมามีการนำราไวท์รอทมาใช้ในการลดสีและสารประกอบฟีนอลิคในน้ำเสียจากอุตสาหกรรมอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะการประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำเสียของโรงงานสกัดน้ำมันมะกอก ซึ่งเป็นปัญหาสิ่งแวดล้อมหลักของประเทศแถบทะเลเมดิเตอเนียน ที่มีโรงงานสกัดน้ำมันมะกอกกระจายอยู่ทั่วไป (Fountoulakis *et al*., 2002) ทั้งนี้มีรายงานว่าลักษณะน้ำเสียและน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดแล้วของโรงงานดังกล่าวมีลักษณะคล้ายกับน้ำเสียและน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดแล้วจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ตัวอย่างงานวิจัยที่เกี่ยวข้องมีดังนี้

Annibale *et al*. (2004) ได้ศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดสารประกอบฟีนอลิค, สี และซีโอดี ของน้ำเสียโรงงานน้ำมันมะกอกของรา *Panus tigrinus* โดยศึกษาเปรียบเทียบระหว่างน้ำเสียโรงงานน้ำมันมะกอกที่มีความเข้มข้นสูงและความเข้มข้นต่ำ ซึ่งมีความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิคเท่ากับ 5.5 กรัมต่อลิตรและ 2.9 กรัมต่อลิตร ตามลำดับและมีความเข้มของสีเท่ากับ 27,000 หน่วยสีและ 25,00 ตามลำดับ หลังจากการบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 180 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 13 วัน พบว่าในน้ำเสียโรงงานน้ำมันมะกอกที่มีความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิคและซีโอดีสูงทำให้เชื้อรา *P. tigrinus* ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ ทำให้ไม่เกิดการลดลงของสารประกอบฟีนอล, สี และซีโอดี แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิคที่สูงจะยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราไวท์รอท แต่ถ้ามีการกำจัดของแข็งแขวนลอยในน้ำเสียรวมทั้งเติมแหล่งอาหารร่วมคือ 0.5% sucrose และ 0.1% yeast extract จะทำให้เกิดการลดลงของสารประกอบฟีนอลและสีเท่ากับ 88% และ 33% ซึ่งต่างจากน้ำเสียโรงงานน้ำมันมะกอกที่ความเข้มข้นต่ำที่มีการเจริญเติบโตของ *P. tigrinus* และสามารถลดสารประกอบฟีนอลได้มากกว่า 89% รวมทั้งลดสีได้ถึง 72.4% ในน้ำเสียความเข้มข้นต่ำที่มีการเติมแหล่งอาหารร่วม

Ergul *et al*. (2009) ศึกษาความเป็นไปได้ในการลดสารประกอบฟีนอลิคในน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันมะกอกที่ไม่ผ่านการเจือจาง ไม่เติมสารอาหาร และไม่มีการปรับปรุงมาก่อนโดยการใช้ราไวท์รอทสายพันธุ์ *Trametes versicolor* FPRL 28A INI ที่ผ่านกระบวนการปรับสภาพ พบว่าสามารถลดสารประกอบฟีนอลิคได้ถึง 78% จากการทดลองแบบเขย่าในขวดรูปชมพู่ และลดสารดังกล่าวได้ 39% ในการเลี้ยงแบบคงที่โดยใช้น้ำทิ้งที่ไม่เจือจาง ส่วนการเลี้ยงในสภาวะของถังหมักแบบให้อากาศอย่างต่อเนื่องพบว่าสารประกอบฟีนอลิคถูกลดลง 70% และสามารถลดสีได้ 18% ในวันที่ 8 ของการเลี้ยง โดยมีอัตราการให้อากาศที่ 0.25 vvm ทำการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิคชนิดต่างๆ ด้วยเครื่อง GC-MS และตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์ที่ย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิค คือ laccase และ manganese peroxidase (MnP) จากสภาวะดังกล่าว คือ 762.14 ± 42.11 และ 97.80± 8.11 U/L ตามลำดับ

Lakhatar *et al*. (2010) ได้ศึกษาการคัดเลือกราไวท์รอท *Lentinus edodes* ทั้งในอาหารแข็งและอาหารเหลวเพื่อย่อยสลายสารโพลีฟีนอล (Polyphenols) ในน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันมะกอก พบว่าราไวท์รอท *Lentinus edodes* สายพันธุ์ Le119, Le212, Le122 และLe118 เป็นสายพันธุ์ที่มีการเจริญสูงสุดในอาหารแข็ง potato dextrose agar (PDA) ที่มีการเติม 10% และ 20% ของน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันมะกอก ตามลำดับ และเมื่อนำเชื้อราไวท์รอททั้ง 4 สายพันธุ์ไปศึกษาการลดสีและสารประกอบฟีนอลิคของน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันมะกอก พบว่า *L.edodes* Le119 เป็นสาย

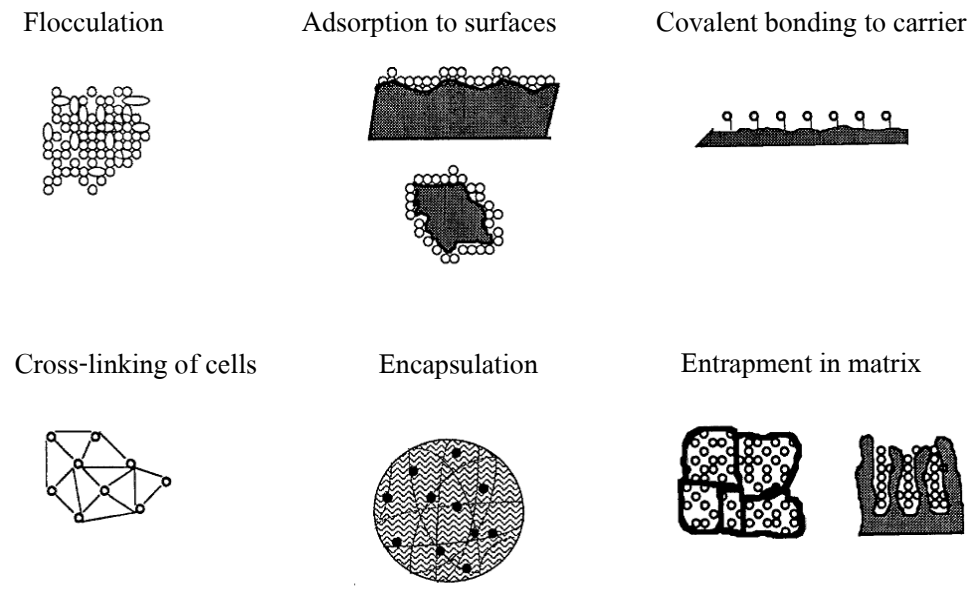
พันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุด โดยสามารถลดสีและสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดภายในระยะเวลา 30 วัน ได้ 65% และ 75 % ตามลำดับ และให้กิจกรรมของเอนไซม์ laccase สูงสุดที่ 1.5 U/ml ในวันที่ 15 นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถลด monomeric phenols ได้ถึง 75% โดยคิดจากค่าเฉลี่ยการลดลดของ monomeric phenols แต่ละตัวที่ศึกษา

นอกจากการศึกษาการใช้ราไวท์รอทในการลดสีและสารประกอบฟีนอลิคในน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันมะกอกแล้ว ยังพบว่ามีการศึกษาในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มอีกด้วย โดยที่ Rakamthong and Prasertsan (2011) ได้ศึกษาการลดลงของสีและฟีนอลจากตัวอย่างน้ำทิ้งบ่อสุดท้ายของระบบบำบัดน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มแบบบ่อหมักไร้อากาศโดยเชื้อ *Phanerochaete chrysosporium* ATCC24725 โดยแบ่งการทดลองเป็น 3 กลุ่ม คือ (1) เติมเชื้อลงในน้ำทิ้ง (2) เติมเชื้อลงไปในน้ำทิ้งที่ผสมกับน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ในอัตราส่วน 1:1 และ (3) ชุดควบคุม คือ น้ำทิ้งเพียงอย่างเดียว พบว่าเชื้อที่เติมลงไปในน้ำทิ้งที่ผสมกับน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ สามารถบำบัดสีและฟีนอลได้ดีกว่าน้ำทิ้งที่มีการเติมเชื้อเพียงอย่างเดียว โดยสามารถลดสีและฟีนอลในน้ำทิ้งได้ถึง 83.4 % และ 61.2 % ตามลำดับ

1.2.5 การตรึงราไวท์รอทเพื่อย่อยสลายสารมลพิษ

การตรึง (immobilization) หมายถึง เทคนิคที่ใช้ตรึงเซลล์ ออร์กาเนล เอนไซม์ หรือโปรตีนอื่นๆ ซึ่งอาจเป็นการตรึงทางกายภาพหรือเคมีไว้บนวัสดุช่วยพยุงที่เป็นของแข็ง หรือตรึงภายในเนื้อสารที่เป็นของแข็ง หรือถูกกักไว้โดยแผ่นเยื่อ เพื่อเพิ่มความคงตัวและทำให้สามารถนำกลับมาใช้ใหม่หรือใช้อย่างต่อเนื่องได้ กระบวนการตรึงเซลล์จุลินทรีย์สามารถแบ่งเป็น 2 ประเภท คือ (1) การเกาะติด/ดูดซับของเซลล์บนวัสดุด้วยวิธีธรรมชาติ (self-attachment immobilization) (2) การตรึงแบบสังเคราะห์ (artificial immobilization) เช่น การกักขังเซลล์ในพอลิเมอร์ (entrapment within polymers) การสร้างพันธะโควาเลนท์ระหว่างเซลล์กับวัสดุตรึง (covalent bonding) เป็นต้น (Cohen *et al*., 2001) ดังแสดงในรูปที่ 1.11 อย่างไรก็ตามเทคนิคการเกาะติดของเซลล์ด้วยวิธีธรรมชาติเป็นวิธีการตรึงเซลล์ที่ง่าย มีประสิทธิภาพ และสามารถขยายขนาดเพิ่มจำนวนเซลล์ตรึงได้ง่ายกว่าการตรึงแบบสังเคราะห์ นอกจากนั้นการตรึงเซลล์แบบกักขังยังมีข้อจำกัดเรื่องการแพร่ผ่านของสารอีกด้วย (Lee and Palsson, 1994) ปัจจัยที่สำคัญอีกประการหนึ่งที่ต้องคำนึงถึงในการตรึงเซลล์จุลินทรีย์ คือ การคัดเลือกวัสดุตรึงเซลล์ ซึ่งต้องเป็นวัสดุที่มีความเป็นรูพรุนสูง มีพื้นที่ผิวมากเพื่อใช้ในการยึดจับ ไม่ละลายน้ำ มีความแข็งแรง ทนทานต่อสภาพแวดล้อมทางกายภาพ-เคมี เช่น แรงกระทบกระเทือน การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ พีเอช และการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ เนื่องจาการตรึงเซลล์ต้องทำในภาวะปลอดเชื้อ จึงต้องทนต่อความร้อน ความดันได้สูง นอกจากนั้น

วัสดุที่ใช้ไม่ควรเป็นอันตรายต่อเซลล์และสิ่งแวดล้อม และสามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้ (Kourkoutas *et al*., 2004)



รูปที่ 1.11 การตรึงเซลล์
ที่มา : Cassidy *et al*. (1996)

แนวโน้มการนำเซลล์ตรึงมาใช้ประโยชน์ด้านสิ่งแวดล้อมได้เพิ่มจำนวนมากขึ้น สำหรับการตรึงราไวท์รอทมีข้อดี คือ ง่ายต่อการแยกระหว่างเซลล์ตรึงที่มีลักษณะเป็นของแข็ง และน้ำเสียซึ่งเป็นของเหลว สามารถนำเซลล์กลับมาใช้ใหม่ได้ง่าย ลดการอุดตันในระบบที่มีการไหลอย่างต่อเนื่อง (continuous-flow systems) (Tieng and Sun, 2000) นอกจากนี้การตรึงเซลล์ราไวท์รอทยังช่วยเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ และมีความคงทนต่อสภาวะแวดล้อม เช่น พีเอช และความเข้มข้นของสารที่เป็นพิษ (Shin *et al*., 2002) โดยทั่วไปการตรึงราไวท์รอทนิยมใช้การตรึงทั้ง 2 แบบ คือ การเกาะติด และการกักขัง ซึ่งจะมีการเลือกใช้วัสดุตรึงที่แตกต่างกันไปทั้งวัสดุธรรมชาติและวัสดุสังเคราะห์ การตรึงแบบกักขัง นิยมใช้ natural polymeric gels เช่น agar, carrageenan, alginate chitosan เป็นต้น และ synthetic polymers เช่น polyacrylamine, polyurethane, polyvinyl alcohol เป็นต้น (Katzbauer *et al*., 1995) สำหรับการตรึงแบบการเกาะติดนิยมใช้วัสดุตรึงในรูปของ synthetic foams เช่น polyurethane foam และ nylon sponge นอกจากนี้วัสดุจากธรรมชาติจำพวก organic material เช่น เปลือกเมล็ดทานตะวัน(Rodriguez *et al*., 2008) แกลบ(Li and Jia, 2008) และซังข้าวโพด (Tychanowicz *et al*., 2004) สามารถนำมาใช้ในการตรึงราไวท์รอทแบบเกาะติด ซึ่งวัสดุดังกล่าวสามารถเป็นแหล่งอาหารให้แก่รา และช่วยกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ในกลุ่มลิกนิโนไล

ติกอีกด้วย เนื่องจากวัสดุเหล่านี้มีคุณสมบัติที่ใกล้เคียงกับสภาวะในธรรมชาติที่ราเจริญได้ดี (Rodriguez *et al*., 2004) นอกจากนี้การนำวัสดุเศษเหลือจากการเกษตรหรืออุตสาหกรรมเกษตรมาเป็นวัสดุตรึงรา นับเป็นวิธีหนึ่งในการกำจัดของเสียและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

การนำราไวท์รอทที่ถูกตรึงมาใช้เพื่อบำบัดสารมลพิษโดยเฉพาะในการกำจัดสีย้อม ซึ่งเป็นสารมลพิษที่เกิดจากอุตสาหกรรมสิ่งทอ หากไม่มีการจัดการที่เหมาะสม อาจส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมใกล้เคียงได้ จึงมีการประยุกต์ใช้เซลล์ตรึงของราไวท์รอทในการกำจัดสีดังกล่าว ดังแสดงในตารางที่ 1.3

ตารางที่ 1.3 งานวิจัยที่ศึกษาการตรึงราไวท์รอทบนวัสดุต่างๆ เพื่อกำจัดสีย้อม

วัสดุตรึง	**ราไวท์รอท**	**สีย้อม**	**อ้างอิง**
Nylon sponge	*Pycnoporus cinnabarinus*	Remazol Brilliant Blue R	Schliephake and Lonergan (1996)
Corncob	*P. chrysosporium*	RBBR, Methyl Violet Congo Red	Tychanowicz *et al*. (2004)
Alginate beads	*P. chrysosporium*	Acid orange, Acid red 114, Vat Magenta	Radha *et al*. (2005)
Na- alginate beads	*F. trogii*	Acid Black 52	Park *et al*. (2006)
Stainless steel Sponges	*T. pubescens*	Reactive Black 5	Enayatzamir *et al*. (2008)
Sunflower seed shells	*T. pubescens*	Reactive Black 5	Rodriguez *et al*. (2009)

นอกจากการศึกษาใช้เซลล์ตรึงของราไวท์รอทในการกำจัดสีย้อมแล้ว ยังพบว่ามีการประยุกต์ใช้เซลล์ตรึงของราไวท์รอทในการบำบัดน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมประเภทอื่น ๆ อีกด้วย Kim and Shoda (1999) ได้ศึกษาการกำจัดสีกากน้ำตาลโดยใช้เส้นใยอิสระ และเส้นใยที่ถูกตรึงบน polyurethane foam ของ *Geotrichum candidum* Dec 1 ในการกำจัดสีแบบกึ่งกะ (semi-bath culture) มีการกำจัดสีร้อยละ 80 และเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสมีความคงตัวตลอด 4 สัปดาห์ ส่วนการใช้เส้นใยที่ถูกตรึงยังมีความคงตัวในการกำจัดสีและกิจกรรมเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสตลอด 8 สัปดาห์ และ Annibale *et al*. (1998) ทดลองใช้เส้นใยของ *Lentinus edodes* ที่ถูกตรึงบนฟองน้ำเพื่อบำบัดสีของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันมะกอก พบว่าสารอินทรีย์ทั้งหมด (TOC) ลดลงจากในรอบที่ 1, 2 และ 3

(รอบละ 8 วัน) ถึง 73%, 88% และ 75% ตามลำดับ ลดสารประกอบฟีนอลิคได้ 83.5%, 88.5% และ 78% ในขณะที่สีของน้ำทิ้งลดลง 75%, 72% และ 34% จากการศึกษาของ Bajpai *et al*. (1993) พบว่าการเติมกลูโคสเป็นแหล่งสับสเตรทร่วมลงในน้ำทิ้งโรงงานฟอกเยื่อไม้ ทำให้ราไวท์รอท *Tremetes virsicolor* สามารถลดสีของน้ำทิ้งได้มากกว่า 80% ภายในเวลา 3 วัน นอกจากนั้นโสภาวรรณ รัตนพันธุ์ (2547) ศึกษาการกำจัดสีของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม โดยใช้เส้นใยของ *Lentinus* spp. ที่ตรึงบนฟองน้ำ พบว่าสามารถลด COD ได้อยู่ในช่วง 30%-50% ลดสีได้ 17%-58% ลดฟีนอลได้ 4%-75% และลดของแข็งทั้งหมดได้ 6%-56% จากนั้นยังศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนและความเข้มข้นที่เหมาะสม พบว่าการเติมยูเรีย 0.05% มีความเหมาะสมทำให้ประสิทธิภาพของ *Lentinus strigogus* ST-S-3 สูงสุด โดยค่า COD ลดลง 64.17% และกำจัดสีได้ 43.03% และยังพบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ laccase และ manganese peroxidase (MnP) สูงที่สุดอีกด้วย

จะเห็นได้ว่าการตรึงเซลล์มีข้อดี คือ ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของราไวท์รอทในการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลิคได้ดีขึ้น และสามารถนำไปใช้งานได้ง่าย งานวิจัยนี้จึงสนใจใช้เทคนิคการตรึงเชื้อราไวท์รอทบนวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน เพื่อให้เซลล์ตรึงมีความทนทานต่อสารอินทรีย์ต่าง ๆ และความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิคที่ปนเปื้อนอยู่ในน้ำทิ้ง รวมทั้งช่วยจำลองสภาพแวดล้อมที่เชื้อราเจริญได้ดีในธรรมชาติ และกระตุ้นการสร้างเอนไซม์เพื่อย่อยสลายสีและสารประกอบฟีนอลิค การใช้วัสดุดังกล่าวซึ่งเป็นวัสดุเศษเหลือจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม จึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการใช้ประโยชน์และกำจัดของเสียนอกจากนั้นราตรึงที่ผ่านการใช้งานแล้วยังถือเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้จากการบำบัดน้ำทิ้ง โดยอาจนำราตรึงไปทำปุ๋ย หรือสกัดสารที่มีมูลค่า เช่น เอนไซม์หรือสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นการกำจัดของเสียอีกทางหนึ่งด้วย

1.3 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.3.1 เพื่อคัดเลือกราไวท์รอทที่มีศักยภาพในการกำจัดสีออกจากน้ำทิ้งของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

1.3.2 เพื่อศึกษาวิธีการตรึงราไวท์รอทบนวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน ได้แก่ ทะลายปาล์มเปล่าและเส้นใยปาล์มน้ำมัน

1.3.3 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของราไวท์รอทที่ตรึงบนวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมันในการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้งของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยนี้สนใจคัดเลือกราไวท์รอทที่มีศักยภาพในการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิคและกำจัดสีออกจากน้ำทิ้งของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มได้ดีที่สุดจากราไวท์รอททั้งหมด 10 สายพันธุ์ โดยวิธีการทดสอบบนอาหารแข็งที่มีการเติมน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในสัดส่วนต่าง ๆ และทดสอบในน้ำทิ้งที่มีการเจือจาง 2 เท่า นำราไวท์รอทที่คัดเลือกได้มาศึกษาการตรึงบนวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน ได้แก่ ทะลายเปล่าปาล์มน้ำมัน และเส้นใยปาล์มน้ำมัน ศึกษาลักษณะพื้นผิวของวัสดุและการเกาะติดของราไวท์รอทบนและภายในช่องว่างของวัสดุตรึงด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope: SEM) รวมทั้งศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในเกาะติดของราไวท์รอทบนวัสดุตรึง ด้วยประสิทธิภาพในการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่เจือจาง 2 เท่า รวมทั้งวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ในกลุ่มลิกนิโนไลติก ทำการคัดเลือกราบนวัสดุตรึงที่เหมาะสม นำราตรึงที่คัดเลือกมาศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม โดยการแปรผันความเข้มข้นน้ำทิ้ง การปรับตัวของเซลล์ตรึง การบำบัดแบบ 2 ขั้นตอน และการเติมแหล่งอาหารร่วม เปรียบเทียบคุณลักษณะของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มก่อนและหลังบำบัดตามค่ามาตรฐานน้ำทิ้ง

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 สามารถคัดเลือกสายพันธุ์ของราไวท์รอทที่มีศักยภาพในการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลิคได้ดี รวมทั้งทราบวัสดุตรึงเชื้อราที่เหมาะสมจากวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน

1.5.2 ทราบวิธีการตรึง และระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการตรึงราไวท์รอทบนวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน

1.5.3 ทราบประสิทธิภาพในการลดสีและสารประกอบฟีนอลิคของราไวท์รอทที่ตรึงบนวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน เพื่อประโยชน์ในการนำเซลล์ตรึงไปประยุกต์ใช้ในระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการ

2.1 สารเคมี วัสดุ และอุปกรณ์

2.1.1 สารเคมี

- 2, 2'-Azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) ($C_{18}H_{18}N_4O_6S_4$) ของบริษัท Sigma-Aldrich, Inc
- 2, 6-Dimethoxyphenol ($(CH_3O)_2C_6H_3OH$) ของบริษัท Sigma-Aldrich, Inc
- 3, 4-Dimethoxybenzyl alcohol ($C_9H_{12}O_3$) ของบริษัท Sigma-Aldrich, Inc
- Acetic acid (CH_3COOH) ของบริษัท J.T. Baker
- Cobalt (II) chloride ของบริษัท AJAX Finechem, Australia
- D-glucose anhydrous ($C_6H_{12}O_6$) ของบริษัท AJAX Finechem, Australia
- D-tataric acid ของบริษัท AJAX Finechem, Australia
- Ethanol 95%
- Folin -Ciocalteu's phenol reagent ของบริษัท Merck, Germany
- Gallic acid monohydrate ($(HO)_3C_6H_2CO_2H.H_2O$) ของบริษัท Sigma-Aldrich, Inc
- Hydrogen peroxide 30% (H_2O_2) ของบริษัท Merck, Germany
- Manganese Sulfate monohydrate ($MnSO_4.H_2O$) ของบริษัท AJAX Finechem, Australia
- Mercury (II) chloride ของบริษัท Sigma-Aldrich, Inc
- Potassium chloroplatinate ของบริษัท Sigma-Aldrich, Inc
- Sodium Acetate hydrated ($CH_3OONa.H_2O$) ของบริษัท AJAX Finechem, Australia
- Sodium Carbonate anhydrous (Na_2CO_3) ของบริษัท Rankem

2.1.2 เครื่องมือ และอุปกรณ์

- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น RL 150 ของบริษัท Russell
- เครื่องชั่งความละเอียด 2 ตำแหน่ง รุ่น PB-1502 ของบริษัท Mettler Toledo, Switzerland
- เครื่องชั่งความละเอียด 4 ตำแหน่ง รุ่น AB 204 ของบริษัท Mettler Toledo, Switzerland
- เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น SS-325 ของบริษัท Tomy, Japan
- ตู้เขี่ย laminar flow รุ่น 120 BSD ของบริษัท Super clean
- เครื่องเขย่าแบบหมุน (Shaker) รุ่น NB-101M/MS ของบริษัท N-Bio TEK

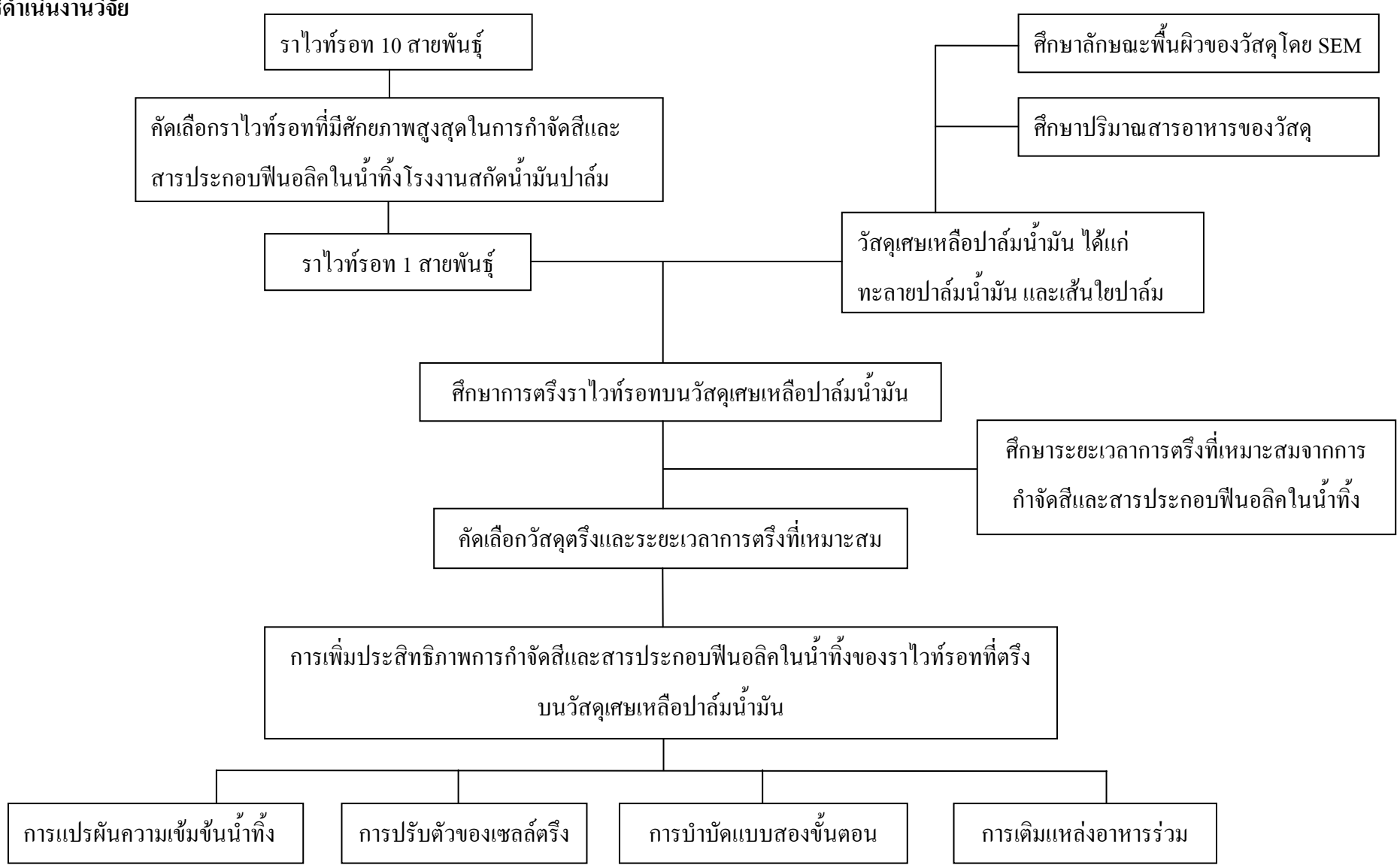
- เครื่องเขย่าแบบหมุน (Shaker) รุ่น OS-2 ของบริษัท Green SSerikerII
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น UV 1601 ของบริษัท Shimadzu, Japan
- ตู้อบเครื่องแก้ว (Oven) ของบริษัท Cotherm, Newzealand
- ตู้อบสารเคมี (Oven) ของบริษัท Cotherm, Newzealand
- ตู้อบ (Incubator) รุ่นBM700 ของบริษัท Memmert
- เครื่องปั่นผสม (vortex mixer) รุ่น vibramax 110 ของบริษัท Heldoiph
- ไมโครปิเปต ของบริษัท Denville Scientific, Inc
- ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (Deep freezer) อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.2 น้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

เก็บตัวอย่างน้ำทิ้งจากบ่อบำบัดน้ำเสียบ่อสุดท้ายของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มแห่งหนึ่งในจังหวัดสตูล (รูปที่ 2.1) ซึ่งระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานเป็นแบบบ่อปรับเสถียร (บ่อดิน) มีจำนวน 4 บ่อ โดยนำตัวอย่างน้ำทิ้งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และกรองด้วยผ้าขาวบางก่อนนำมาทดลอง

รูปที่ 2.1 ลักษณะบ่อบำบัดน้ำเสีย (A) และลักษณะน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม (B)

2.3 วิธีดำเนินงานวิจัย



รูปที่ 2.2 ภาพรวมของการดำเนินวิจัย

2.4 ราไวท์รอทและการเตรียมหัวเชื้อรา

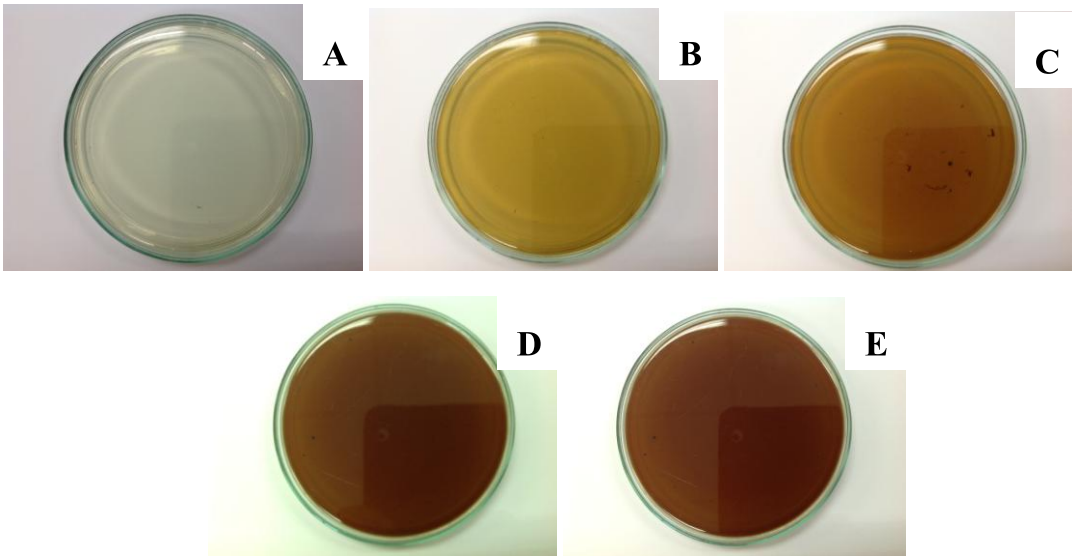
การศึกษานี้ใช้ราไวท์รอทรวมทั้งสิ้นจำนวน 10 สายพันธุ์ ซึ่งได้จากห้องปฏิบัติการของหน่วยงานต่าง ๆ จำนวน 6 สายพันธุ์ และได้จากการคัดแยกโดยผู้วิจัยจำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ 1) *Coriolus versicolor* 2) *Trametes* sp. 3) *Pleurotus ostreatus* 4) *Pycnoporus sanguineus* (ห้องปฏิบัติการเก็บรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC)) 5) *Lentinus edodes* 6) *Garnoderma lucidum* (ศูนย์เพาะเชื้อเห็ด กรมวิชาการเกษตร) และราไวท์รอทอีก 4 สายพันธุ์ทำการคัดแยกจากเห็ดตามธรรมชาติที่เจริญบนเนื้อไม้ในท้องถิ่น จ. สงขลา ได้แก่ Unknown 01, Unknown 02, Unknown 03 และUnknown 04 คัดแยกเชื้อราโดยทำการตัดเนื้อเยื่อเห็ดให้เป็นชิ้นเล็กพอประมาณใช้มีดและคีมคีบ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วคีบเนื้อเยื่อเห็ดแช่ใน $HgCl_2$ 0.05 % เป็นเวลาประมาณ 5 นาทีจากนั้นย้ายเนื้อเยื่อเห็ดมาแช่ในแอลกอฮอล์ 70 % เป็นเวลาประมาณ 5 นาที ล้างเนื้อเยื่อเห็ดด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ทำการตัดเอาเนื้อเยื่อภายในเห็ดด้วยวิธี Aseptic technique ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วอีกครั้ง วางชิ้นเนื้อเยื่อเห็ดบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) (ภาคผนวก ก) และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5-7 วันพร้อมทั้งสังเกตและทำการตัดชิ้นวุ้นที่มีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆที่ไม่ต้องการออกไป เพื่อให้ได้โคโลนีของราที่บริสุทธิ์ นำเส้นใยของราไวท์รอททั้ง 10 สายพันธุ์มาเพาะเลี้ยงลงบนอาหารแข็ง PDA บ่มที่อุณหภูมิห้องจนเส้นใยของราไวท์รอทเจริญเต็มผิวหน้าของอาหารแข็งเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในการทดลองต่อไป

2.5 การคัดเลือกราไวท์รอทที่มีศักยภาพในการลดสีและสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้งของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยใช้ราไวท์รอทเซลล์อิสระ

2.5.1 ศึกษาผลความเข้มข้นของน้ำทิ้งที่มีต่อการเจริญของราไวท์รอทบนอาหารแข็ง

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของความความเข้มข้นของน้ำทิ้งหรือผลของสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้งและการเติมสับสเตรทร่วมที่มีต่อการเจริญของราไวท์รอทเซลล์อิสระในรูปแบบของราก้อนกลม (fungal pellet) โดยการแปรผันความเข้มข้นของน้ำทิ้งที่ 25% 50% และ 100% ซึ่งใช้วิธีการเจือจางน้ำทิ้งด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และเติมลงในอาหาร Sabouraud Dextrose Agar (SDA) ซึ่งเป็นอาหารที่มีองค์ประกอบของ Dextrose, Yeast extract และ Peptone (ภาคผนวก ก) เนื่องจากอาหารแข็งSDA เป็นอาหารเลี้ยงราที่ทราบแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่แน่นอน รวมทั้งเป็นอาหารแข็งที่มีความใส ไม่มีสี (รูปที่ 2.3A) จึงเลือกใช้ในการทดลองนี้ ซึ่งทดลองโดยการตัดเส้นใยของราที่เจริญบน PDA ด้วย cork borer เบอร์ 4 (Ø 0.8 cm) ที่ผ่านการฆ่า

เชื้อด้วยเทคนิคปลอดเชื้อแล้วเลี้ยงบนอาหารแข็ง ตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Lakhatar *et al*. (2010) ดังนี้ 1) SDA 2) SDA + 25% POME 3) SDA + 50% POME 4) SDA + 100% POME และ 5) 100% POME (รูปที่ 2.3)ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้อง และตรวจวัดการเจริญของราไวท์รอท โดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีบนอาหารแข็งทุก ๆ 24 ชั่วโมง



รูปที่ 2.3 ลักษณะสีของอาหารแข็ง SDA (A), SDA + 25% POME (B), SDA + 50% POME (C), SDA + 100% POME (D) และ 100% POME Agar (E)

2.5.2 ศึกษาความสามารถของราไวท์รอทในการลดสีและสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้ง

เตรียมราไวท์รอททั้ง 10 สายพันธุ์ ในรูปแบบราก้อนกลม โดยตัดเส้นใยของราไวท์รอทที่ถูกเลี้ยงในอาหารแข็ง PDA ด้วย cork borer เบอร์ 4 (Ø 0.8 cm) นำชิ้นส่วนที่ตัดใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Glucose Yeast Extract Broth (GYEB) ซึ่งมีองค์ประกอบของ Glucose และ Yeast extract เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน โดยผ่านการฆ่าเชื้อแล้วที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที บ่มอุณหภูมิห้อง เขย่าที่ 80 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5-7 วัน กรองแยกราก้อนกลมออกจากอาหารเหลว ชั่งราก้อนกลม 5 กรัม ใส่ในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่เจือจาง 2 เท่า (50% POME) และผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เขย่า 80 รอบต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างของเหลวทุกๆ 24 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์สีและสารประกอบฟีนอลิค คัดเลือกราไวท์รอทที่มีศักยภาพสูงสุดในการกำจัดสีและประกอบฟีนอลิคเพื่อใช้ในการศึกษาการตรึงเซลล์ต่อไป

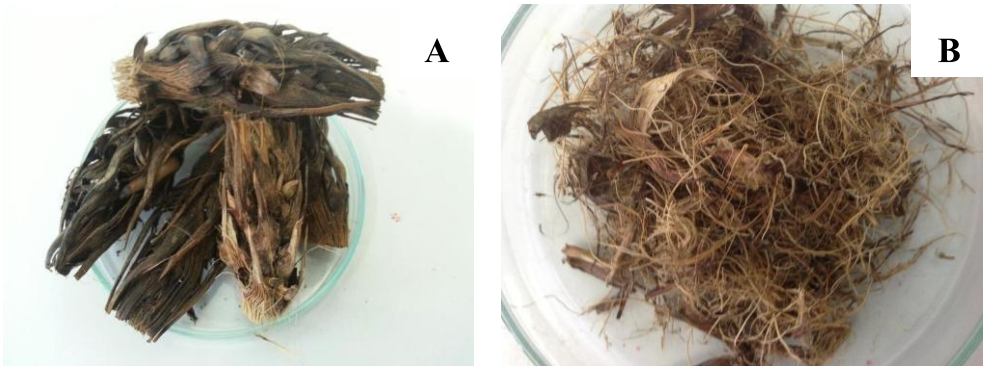
2.6 การตรึงราไวท์รอทบนวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน

2.6.1 การเตรียมวัสดุตรึงราไวท์รอท

นำวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน 2 ชนิด ได้แก่ เส้นใยปาล์มน้ำมัน(pericarp fiber: PF)และทะลายปาล์มน้ำมัน (empty fruit bunch : EFB) (รูปที่ 2.4) มาใช้ในการตรึงราไวท์รอทที่คัดเลือกจากข้อ 2.5.2 ได้แก่ Unknown 04 (*Trametes hirsuta* AK4) โดยนำวัสดุมาตากให้แห้ง นำทะลายปาล์มน้ำมันมาตัดให้ได้ขนาดประมาณ 2.5 x 2.5 x2 เซนติเมตร หลังจากนั้นนำเส้นใยปาล์มน้ำมันและทะลายปาล์มน้ำมันที่ตัดแล้วมาล้างทำความสะอาด และฆ่าเชื้อแบบเปียก (wet sterilization) โดยการนำวัสดุตรึงใส่ในภาชนะที่มีฝาปิด เติมน้ำให้ท่วมวัสดุ แล้วให้ความร้อนด้วยเครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ซึ่งช่วยกำจัดสีที่ตกค้างอยู่ในวัสดุตรึงให้ชะออกมาในน้ำก่อนนำไปใช้งาน จากนั้นทิ้งไว้ข้ามคืน แล้วนำมาผ่านการฆ่าเชื้อ ซ้ำอีกครั้ง ล้างทำความสะอาดแล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนแห้งวัสดุที่เตรียมได้ในขั้นตอนนี้จะนำไปใช้ในขั้นตอนการตรึงเซลล์ต่อไป นอกจากนี้วัสดุตรึงทั้ง 2 ชนิดถูกนำมาศึกษาคุณลักษณะต่างๆของวัสดุดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 วิธีวิเคราะห์คุณลักษณะของวัสดุ

พารามิเตอร์	**วิธีการวิเคราะห์**
Nitrogen	อ้างอิงจาก Attanun and Juncharoensuk (1999)
Phosphorus	อ้างอิงจาก Attanun and Juncharoensuk (1999)
Total Organic Compound (TOC)	TOC analyzer (Solid sample module-SSM-5000A, Shimadzu)/NCE-EHWM, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Scanning electron microscopy (SEM)	WI-RES-SEM-Quanta-001 และ WI-RES-SEM-001 ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์



รูปที่ 2.4 วัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมันที่ถูกตัดจนได้ขนาดตามต้องการ (A) ทะลายปาล์มน้ำมัน (EFB) (B) เส้นใยปาล์มน้ำมัน (PF)

2.6.2 การตรึงราไวท์รอทบนวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน

เตรียมอาหารเหลว GYEB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งไอน้ำ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที ตั้งไว้ให้เย็น นำทะลายปาล์มเปล่าที่เตรียมไว้ไปชั่งน้ำหนัก ฆ่าเชื้อ แล้วใส่ลงไปในขวดอาหารเหลว 15 กรัมต่อขวด ส่วนเส้นใยปาล์มที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจะใส่เส้นใยปาล์ม 10 กรัมต่อขวด จากนั้นตัดเส้นใยของราไวท์รอทที่เจริญบน PDA ด้วย cork borer เบอร์ 4 (Ø 0.8 ซม.) แล้วเขี่ยเส้นใยของราไวท์รอทไปวางบนชิ้นส่วนของทะลายปาล์มและเส้นใยปาล์มในขวดอาหารเหลว ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ บ่มในสภาวะคงที่ อุณหภูมิห้อง โดยแปรผันระยะเวลาการตรึงที่ 2, 4, 6, 8 และ 10วัน เพื่อศึกษาระยะเวลาการตรึงที่เหมาะสมของแต่ละวัสดุ ก่อนนำไปบำบัดน้ำทิ้ง

2.6.3 การคัดเลือกวัสดุตรึงราไวท์รอท

นำเซลล์ตรึงของราไวท์รอทบนวัสดุตรึงทั้ง 2 ชนิดจากข้อ2.6.2 มาเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ผ่านการกรองด้วยผ้าขาวบาง และเจือจาง 2 เท่า (50% POME) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ซึ่งผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งไอน้ำ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที และตั้งไว้ให้เย็น บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 120 รอบต่อนาที ในอุณหภูมิห้อง ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่างน้ำทิ้งทุก ๆ 24 ชั่วโมง วิเคราะห์สี ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด (Total phenolics) กิจกรรมเอนไซม์ในกลุ่มลิกนิโนไลติกที่เกี่ยวข้องกับการลดสีและสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้ง ได้แก่ แลคเคส หรือ p-diphenol oxidase แมงกานีสเปอร์ออกซิเดซ และลิกนินเปอร์ออกซิเดส นอกจากนั้นวิเคราะห์น้ำหนักแห้งก่อนและหลังจากบำบัดน้ำทิ้งของราที่ถูกตรึงรวมกับวัสดุตรึง นำข้อมูลที่ได้มาคัดเลือกวัสดุที่เหมาะสมกับการตรึงรา

ซึ่งสามารถลดสีและสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มได้สูงสุด กำหนดให้มีชุดควบคุมการทดลอง 2 ชุดการทดลอง โดยชุดแรกใช้วัสดุตรึงแต่ละชนิดที่ผ่านการฆ่าเชื้อใส่ในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่เจือจาง 2 เท่า ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ส่วนชุดที่ 2 ใช้ราไวท์รอทที่ตรึงบนวัสดุตรึงแต่ละชนิดเป็นระยะเวลา 10 วัน ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งไอน้ำ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที แล้วใส่น้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่เจือจาง 2 เท่า ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ทำการบ่มในสภาวะและเก็บตัวอย่างเช่นเดียวกับชุดทดลองตัวอย่าง วิเคราะห์สีและปริมาณสารประกอบฟีนอลิค เพื่อศึกษาผลของปัจจัยทางกายภาพ-เคมีต่อการลดลงของสีและสารประกอบฟีนอลิคของวัสดุทั้ง 2 ชนิด เช่น การดูดซับโดยวัสดุตรึงและการดูดซับของวัสดุตรึงร่วมกับเส้นใยของราไวท์รอท จากนั้นเซลล์ตรึงบนวัสดุที่เหมาะสมจะถูกนำไปใช้ในการทดลองต่อไป จากผลการศึกษาพบว่าเส้นใยปาล์มน้ำมันเป็นวัสดุตรึงที่เหมาะสมและระยะเวลาการตรึงที่ 6 วัน สามารถลดสารสีและสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้งได้ดีที่สุด จึงเลือกมาใช้ในการศึกษาต่อไป

2.7 การเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มของราไวท์รอทที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมัน

2.7.1 การแปรผันความเข้มข้นน้ำทิ้ง

นำราตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมันตามวิธีการในข้อ 2.6.2 มาเติมในน้ำทิ้งที่มีการเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นเป็น 25%, 50% และ 100% (น้ำทิ้งที่ไม่เจือจาง) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มในอุณหภูมิห้องเขย่า 120 รอบต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างของเหลวทุกๆ 24 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์สี สารประกอบฟีนอลิครวม และ pH

2.7.2 การเติมแหล่งอาหารร่วม

นำราตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมันตามวิธีการในข้อ 2.6.2 มาเติมน้ำทิ้งปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่มีการเติมกลูโคส เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนร่วม และแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) เพื่อใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนร่วม (Gomathi *et al*., 2012) โดยแบ่งชุดการทดลองดังนี้ 1) POME+กลูโคส 1% w/v 2) POME+แอมโมเนียมคลอไรด์ 1% w/v 3) POME+กลูโคส 1% w/v+แอมโมเนียมคลอไรด์ 1% w/v บ่มตัวอย่างในอุณหภูมิห้อง เขย่า 120 รอบต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างของเหลวทุกๆ 24 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์สี สารประกอบฟีนอลิครวม และpH เปรียบเทียบกับน้ำทิ้งที่ไม่เติมแหล่งอาหารร่วม

2.7.3 การบำบัดแบบสองขั้นตอน

นำราตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมันตามวิธีการในข้อ 2.6.2 มาเติมน้ำทิ้งปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอลิคขั้นต้นด้วยแบคทีเรียผสมระหว่าง *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 ที่ถูกตรึงบนทะลายปาล์มเปล่า ตามวิธีการของพนิดา โต๊ะสู (2555) โดยแปรผันระยะเวลาการบำบัดขั้นต้นที่ 4, 8, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง บ่มตัวอย่างในอุณหภูมิห้อง เขย่า 120 รอบต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างของเหลวทุกๆ 24 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์สี สารประกอบฟีนอลิครวม และ pH เปรียบเทียบผลการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิคและบำบัดสีกับน้ำทิ้งที่ไม่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอลิคขั้นต้น

2.7.4 การปรับตัวของเซลล์ตรึงตรึง

เตรียมราตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมันตามวิธีการในข้อ 2.6.2 จากนั้นเทอาหารเหลวออกและเติมน้ำทิ้งที่ผ่านการเจือจางด้วยน้ำกลั่นจนมีความเข้มข้น 25% ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มในอุณหภูมิห้องเขย่า 120 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 3วัน เทน้ำทิ้งออกและทำซ้ำวิธีการเดิมด้วยการเติมน้ำทิ้งที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเป็น 50% และ 100% ตามลำดับ ทำการเก็บตัวอย่างของเหลวทุกๆ 24 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์สี สารประกอบฟีนอลิครวมและ pH เปรียบเทียบกับเซลล์ตรึงที่ไม่ผ่านการปรับตัว

2.8 วิธีการวิเคราะห์

2.8.1 วิเคราะห์ลักษณะของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

ตัวอย่างน้ำทิ้งของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มถูกนำมาวิเคราะห์คุณลักษณะของน้ำทิ้งด้วยวิธีการมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์น้ำและน้ำเสียใน Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (APHA, AWWA and WEF, 2005) ตามพารามิเตอร์ ดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 วิธีวิเคราะห์คุณลักษณะน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

พารามิเตอร์	วิธีการวิเคราะห์
Temperature (^{o}C)	Thermometer
pH	pH meter
BOD_5 (mg/L)	Azide modification method
COD (mg/L)	Closed reflux titration
DO (mg/L)	Azide modification method
TP (mg/L)	Persulfate digestion/ Ascorbic Acid Method
TKN (mg/L)	Macro Kjeldahl Method
TSS (mg/L)	Dried at 103-105 ^{o}C
Oil & Grease (mg/L)	Partition – Gravimetric Method

2.8.2 การศึกษาลักษณะพื้นผิววัสดุตรึง และราตรึง โดย SEM

ในการศึกษาลักษณะพื้นผิววัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน ทำโดยนำชิ้นส่วนเศษเหลือปาล์มน้ำมันมาติดบนแท่นวางตัวอย่าง (stub) แล้วนำตัวอย่างไปฉาบทองด้วยเครื่อง sputter coater และส่องดูด้วยด้วยเครื่อง SEM (Scanning Electron Microscope) สำหรับการศึกษาลักษณะราที่ถูกตรึง (ก่อน และหลังทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้งโรงงานสกัดปาล์มน้ำมัน) ต้องเตรียมตัวอย่างก่อนฉาบทองเพื่อรักษาสภาพตัวอย่างด้วย 2.5% glutaraldehyde ($C_5H_8O_2$) ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ หรือ 4% formaldehyde เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง ล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 2-3 ครั้ง นำตัวอย่างมา Fix ครั้งที่ 2 ด้วย 1% OsO_4 เป็นเวลา 2 ชั่วโมงแล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง ขจัดน้ำออกด้วยเอทานอลเป็นเวลา 10 นาที นำไปทำให้แห้งด้วยวิธี critical point drying (การวิเคราะห์ในขั้นตอนนี้ดำเนินการโดยศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์)

2.8.3 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ในกลุ่มลิกนิโนไลติก

เอนไซม์กลุ่มลิกนิโนไลติก (ligninolytic enzyme) เป็นเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายลิกนิน ประกอบด้วยเอนไซม์ประเภทเปอร์ออกซิเดส (peroxidases) และออกซิเดส (oxidases) หลายชนิด เอนไซม์ที่สำคัญได้แก่ เอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (lignin peroxidases) แลคเคส (laccases หรือ p-diphenol oxidase) แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (manganese peroxidases) ราไวท์รอทแต่ละ

สายพันธุ์จะสร้างเอนไซม์แต่ละชนิดที่แตกต่างกัน (Leonowicz *et al*., 1999) การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์สามารถทำได้ดังนี้

1) การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ของ laccase (Lac) หรือ p-diphenol oxidase (ดัดแปลงจาก Rodriguez, 1999) โดยเติมสารเคมีดังต่อไปนี้ลงใน cuvette

- H_2O	1000 µl
- 0.2 mM ABTS	500 µl (เตรียม 1 mM)
- 20 mM NaOAc buffer pH 5	500 µl (เตรียม 0.1 M)

จากนั้นใช้ Micropipette ดูด crude enzyme 500 µl ใส่ลงใน cuvette ผสมให้เข้ากันโดยกลับ cuvette ไปมา 2-3 ครั้ง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 436 nm ทันที โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 0 และ 60 วินาที แล้วจึงนำค่าการดูดกลืนแสงไปคำนวณหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ โดย 1 Unit ของ laccase คือ ปริมาณเอนไซม์ laccase ที่ใช้ในการเปลี่ยนสารตั้งต้น (ABTS) 1 µM ภายในเวลา 1 นาที

2) การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ของ manganese peroxidase (MnP) (ดัดแปลงจาก Heinfling, 1998) โดยเติมสารเคมีดังต่อไปนี้ลงใน cuvette

- H_2O	750 µl
- 1 mM 2, 6-dimethoxyphenol	500 µl (เตรียม 5 mM)
- 0.1 M NaOAc buffer pH 4.5	250 µl (เตรียม 1 M)
- 0.1 mM H_2O_2	250 µl (เตรียมใหม่ทุกครั้ง)
- 1 mM $MnSO_4$	250 µl

จากนั้นใช้ micropipette ดูด crude enzyme 500 µl ใส่ลงใน cuvette ผสมให้เข้ากันโดยกลับ cuvette ไปมา 2-3 ครั้ง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 469 nm ทันที โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 0 วินาที และ 60 วินาที แล้วจึงนำค่าการดูดกลืนแสงไปคำนวณหาค่ากิจกรรมเอนไซม์ โดย 1 Unit ของ manganese peroxidase คือ ปริมาณเอนไซม์ manganese peroxidase ที่ใช้ในการเปลี่ยนสารตั้งต้น(2,6-dimethoxyphenol) 1 µM ภายในเวลา 1 นาที

3) การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ของ lignin peroxidase (ดัดแปลงจาก Levin *et al*., 2005) โดยเติมสารเคมีดังต่อไปนี้ลงใน cuvette

- H_2O	750 µl
- 10 mM veratryl alcohol	500 µl
- 0.25 M d-tartaric acid pH 2.5	500 µl
- 4 mM $MnSO_4$	250 µl

จากนั้นใช้ micropipette ดูด crude enzyme 500 µl ใส่ลงใน cuvette ผสมให้เข้ากันโดยกลับ cuvette ไปมา 2-3 ครั้ง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 310 nm ทันที โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 0 วินาที และ 60 วินาที แล้วจึงนำค่าการดูดกลืนแสงไปคำนวณหาค่ากิจกรรมเอนไซม์ โดย 1 Unit ของ lignin peroxidase คือ ปริมาณเอนไซม์ lignin peroxidase ที่ใช้ในการเปลี่ยนสารตั้งต้น (veratryl alcohol) 1 µM ภายในเวลา 1 นาที

การคำนวณหากิจกรมของเอนไซม์ในกลุ่ม ligninolytic ตามสูตรดังนี้

$$\text{Enzyme activity} = \frac{(\triangle \text{Abs/min}) \times \text{total volume (2.5 ml)} \times 10^6}{\varepsilon \times \text{sample volume (0.5 ml)}}$$

เมื่อ $\triangle$ Abs/min คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นภายในเวลา 1 นาที

ε คือ Extinction co-efficient

- Lac = 29,300 $M^{-1}cm^{-1}$
- MnP = 27,500 $M^{-1}cm^{-1}$
- LiP = 9,300 $M^{-1}cm^{-1}$

2.8.4 การวิเคราะห์น้ำหนักแห้งของราร่วมกับวัสดุตรึง

วิเคราะห์น้ำหนักแห้งของวัสดุตรึงและรา (ดัดแปลงจาก AOAC, 1995) โดยอบถ้วยฟรอยด์ที่อุณหภูมิ 103-105 องศาเซลเซียส ข้ามคืนจนน้ำหนักคงที่ หลังจากนั้นปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้นแล้วนำมาชั่งน้ำหนักของถ้วยฟรอยด์ นำราที่ตรึงบนวัสดุตรึงทั้งสองชนิดใส่ลงในถ้วยฟรอยด์ นำไปอบที่อุณหภูมิ 103-105 องศาเซลเซียส ข้ามคืนจนน้ำหนักคงที่ หลังจากนั้นปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้นแล้วนำมาชั่งน้ำหนักแห้ง นำน้ำหนักวัสดุตรึงและราที่ได้มาหาส่วนต่างระหว่างน้ำหนักของวัสดุตรึงและราก่อนอบและหลังอบ ซึ่งจะได้เป็นปริมาณน้ำหนักแห้งของวัสดุตรึงและราทั้งหมด

2.8.5 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิครวม

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดใช้วิธี Modification of the Folin-Ciocalteau method (Ergul *et al*., 2011) โดยนำตัวอย่างน้ำทิ้งมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 นาที เพื่อกำจัดตะกอน ทำการเจือจาง 5 เท่าด้วยน้ำกลั่น เติมตัวอย่างน้ำทิ้งที่เจือจางแล้ว 200 ไมโครลิตร ลงใน Folin–Ciocalteau phenol reagents ที่เจือจาง 4 เท่า ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นจึงเติมสารละลาย sodium carbonate ความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร

ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 725 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐานของ Gallic acid ที่ความเข้มข้น 0- 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ภาคผนวก ข) ใช้น้ำกลั่นที่ทำปฏิกิริยา Folin–Ciocalteau phenol reagents และสารละลาย sodium carbonate เช่นเดียวกับตัวอย่างเป็น blank

2.8.6 การวิเคราะห์สี (APHA, AWWA and WEF, 2005)

การวิเคราะห์สีของตัวอย่างน้ำทิ้งสามารถทำได้โดยการนำตัวอย่างน้ำทิ้งมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็น เวลา 7 นาที เพื่อกำจัดตะกอน จากนั้นทำการเจือจางตัวอย่างน้ำทิ้ง 20 เท่าด้วยน้ำกลั่นแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็น Blank และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานแพลตตินัมโคบอลต์ในช่วง 0-500 หน่วยสี (ภาคผนวก ข) เพื่อคำนวณเป็นหน่วยสีของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

บทที่ 3

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

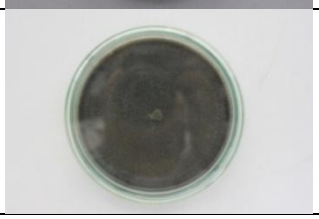
3.1 ลักษณะทางกายภาพของราไวท์รอท

ในงานวิจัยนี้ใช้จุลินทรีย์ในกลุ่มราไวท์รอท 10 สายพันธุ์ ซึ่งมาจากการคัดแยกจากเห็ดตามธรรมชาติในพื้นที่จังหวัดสงขลา โดยผู้วิจัยคัดแยกด้วยตนเองจำนวน 4 สายพันธุ์ ให้รหัสเป็น Unknown 01, Unknown 02, Unknown 03 และ Unknown 04 ส่วนราไวท์รอทอีก 6 สายพันธุ์เป็นราไวท์รอทที่มีรายงานถึงประสิทธิภาพการกำจัดสารประกอบฟีนอลิคและสีของน้ำทิ้งโรงงานน้ำมันมะกอกซึ่งมีคุณลักษณะใกล้เคียงกับน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มได้แก่ *Coriolus versicolor, Trametes* sp., *Pleurotus ostreatus* และ*Pycnoporus sanguineus* ได้รับจากห้องปฏิบัติการเก็บรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ส่วนราไวท์รอทอีก 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Lentinus edodes* และ *Garnoderma lucidum* ได้รับจากศูนย์เพาะเชื้อเห็ด กรมวิชาการเกษตร โดยราไวท์รอททั้ง 10 สายพันธุ์ มีลักษณะของโคโลนีและเส้นใยที่แตกต่างกันดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของราไวท์รอทจำนวน 10 สายพันธุ์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้

ราไวท์รอท	ลักษณะโคโลนี	ภาพแสดงลักษณะโคโลนี
Unknown 01	โคโลนีมีลักษณะเส้นใยบาง ฟู สีขาว ใต้โคโลนีมีสีส้ม ขอบโคโลนีกลม	
Unknown 02	โคโลนีมีลักษณะเส้นใยหนา ไม่ฟู สีขาว โคโลนีเรียบติดผิวหน้าอาหารแข็ง	
Unknown 03	โคโลนีมีลักษะเส้ยใยหนา สีขาว ฟู ขอบโคโลนีกลม	

ตารางที่ 3.1 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของราไวท์รอทจำนวน 10 สายพันธุ์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ (ต่อ)

ราไวท์รอท	ลักษณะโคโลนี	ภาพแสดงลักษณะโคโลนี
Unknown 04	โคโลนีมีลักษะเส้นใยหนา สีขาว ฟู ขอบโคโลนีกลม	
Lentinus edodes	โคโลนีมีลักษะเส้นใยบาง ฟู สีขาว ขอบโคโลนีกลม	
Garnoderma lucidum	โคโลนีมีลักษณะเส้นใยหนา ไม่ฟู สีขาว โคโลนีเรียบติดผิวหน้าอาหารแข็ง	
Pleurotus ostretus	โคโลนีมีลักษณะเส้นใยหนา ฟู สีขาว ขอบโคโลนีไม่กลม	
Pycnoporus sanguineus	โคโลนีมีลักษณะเส้นใยหนา ไม่ฟู สีขาว ใต้โคโลนีมีสีน้ำตาลเข้ม ขอบโคโลนีเรียบ	
Trametes sp.	โคโลนีมีลักษณะเส้นใยหนา ไม่ฟู สีขาว โคโลนีเรียบติดผิวหน้าอาหารแข็ง	
Coriolus versicolor	โคโลนีมีลักษณะเส้นใยหนา ไม่ฟู สีดำ ขอบโคโลนีกลม	

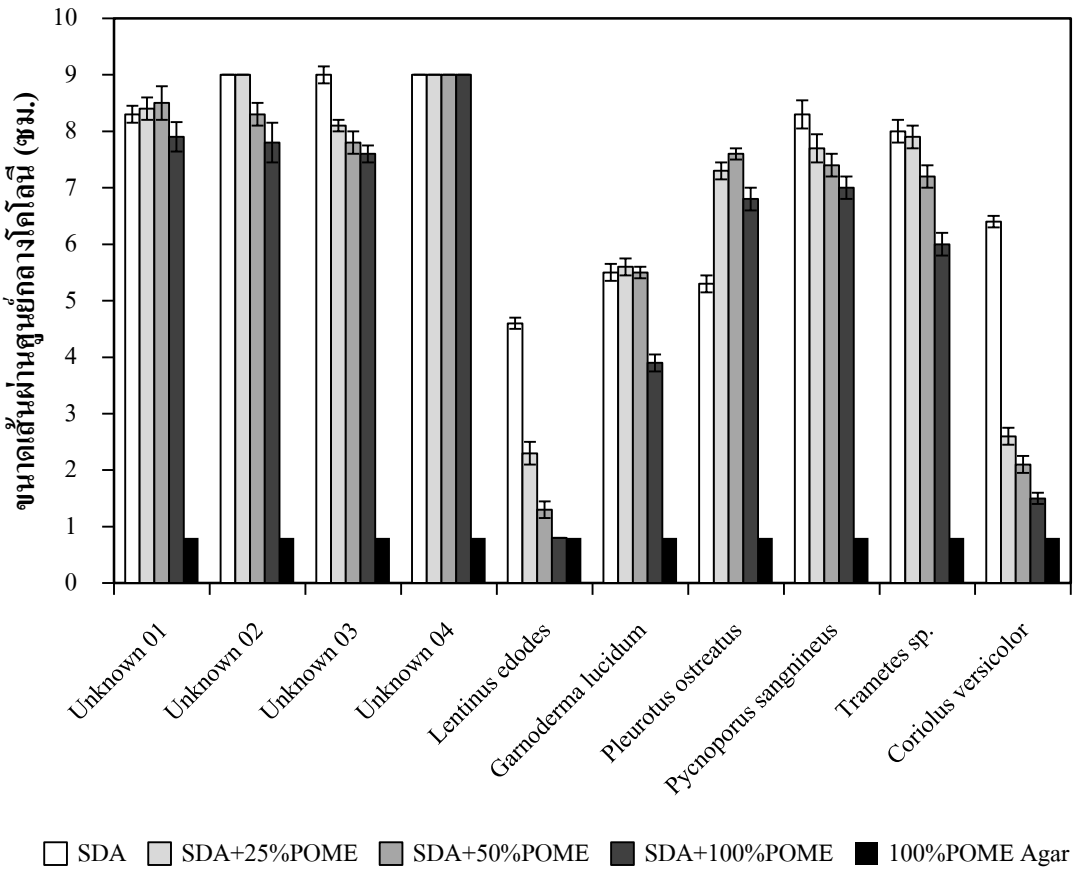
เมื่อนำราไวท์รอททั้ง 10 สายพันธุ์มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง Potato Dextrose Agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิห้อง และวัดอัตราการเจริญจากขนาดของโคโลนีพบว่าราไวท์รอทสายพันธุ์ Unknown 01, Unknown 03, Unknown 04 และ *Pycnoporus sanguineus* เป็นสายพันธุ์ที่มีอัตราการเจริญสูงสุด โดยใช้ระยะเวลา 6 วันในการเจริญเต็มผิวหน้าอาหารแข็งบนจานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 เซนติเมตร และนอกจากนี้ยังพบว่า ราไวท์รอทสายพันธุ์ *Garnoderma lucidum* เป็นสายพันธุ์ที่มีอัตราการเจริญต่ำที่สุดเมื่อเทียบกับราไวท์รอทอีก 9 สายพันธุ์ โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเพียง 5 เซนติเมตร เมื่อบ่มไว้เป็นระยะเวลา 9 วัน ราไวท์รอททั้ง 10 สายพันธุ์ถูกนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป

3.2 การคัดเลือกราไวท์รอทที่มีศักยภาพในการลดสีและสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

3.2.1 ผลความเข้มข้นของน้ำทิ้งที่มีต่อการเจริญของราไวท์รอทบนอาหารแข็ง

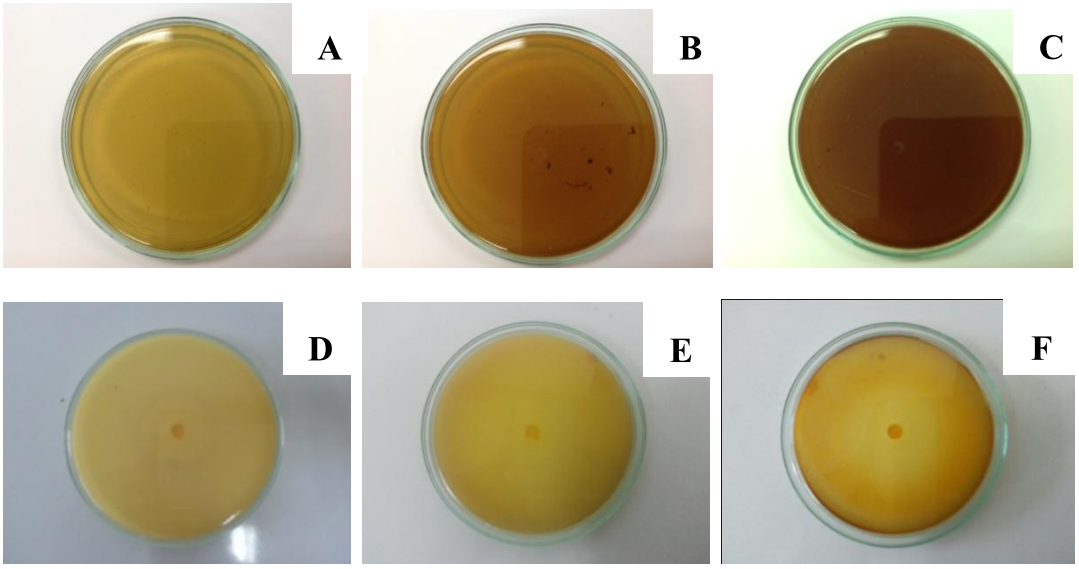
การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของความความเข้มข้นของน้ำทิ้งหรือผลของสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้งและการเติมสับสเตรทร่วมที่มีต่อการเจริญของราไวท์รอทเซลล์อิสระในรูปแบบของราก้อนกลม (Fungal pellet) เนื่องจากการใช้เพียงน้ำทิ้งผสมกับวุ้นที่ใช้เตรียมอาหารแข็งไม่สามารถเป็นแหล่งคาร์บอนให้ราไวท์รอททุกชนิดเจริญได้ การทดลองนี้จึงศึกษาการเจริญของราไวท์รอทบนอาหาร Sabouraud Dextrose Agar (SDA) ซึ่งเป็นอาหารที่มีองค์ประกอบของ Dextrose, Yeast extract และ Peptone (ภาคผนวก ก) และมีการผสมน้ำทิ้งของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มความเข้มข้นแตกต่างกัน ได้แก่ 25%, 50% และ 100% เพื่อศึกษาความทนทานของราไวท์รอทต่อสารประกอบฟีนอลิคที่มีอยู่ในน้ำทิ้ง โดยวัดอัตราการเจริญของเส้นใยราบนอาหารแข็ง พบว่าระดับความเข้มข้นของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มส่งผลต่ออัตราการเจริญของราไวท์รอทบางสายพันธุ์ ได้แก่ Unknown 02, Unknown 03, *Lentinus edodes, Pycnoporus sanguineus, Trametes* sp.และ *Coriolus versicolor* โดยระดับความเข้มข้นของน้ำทิ้งที่สูงขึ้นจะทำให้อัตราการเจริญของราไวท์รอทสายพันธุ์ดังกล่าวลดลง ดังแสดงในรูปที่ 3.1 และที่ความเข้มข้นสูงสุดพบว่าราไวท์รอทสายพันธุ์ *Lentinus edodes* ไม่สามารถเจริญบนอาหารแข็งได้ แต่สามารถเจริญได้ในอาหารแข็งที่มีความเข้มข้นของน้ำทิ้ง 25% และ 50% ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของโสภาวรรณ รัตนพันธุ์ (2547) ที่เลี้ยงราไวท์รอท *Lentinus* sp. บนอาหารแข็งที่เติมน้ำทิ้งดีแคนเตอร์ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม พบว่าความเข้มข้นของน้ำทิ้งดีแคนเตอร์ที่สูงขึ้นจะยังยั้งการเจริญของราไวท์รอท *Lentinus* sp. เนื่องจากปริมาณสารยับยั้งที่มีในน้ำทิ้ง ได้แก่ สารประกอบอะโรมาติกในกลุ่มของโมโนฟีนอล สารประกอบฟีนอลิค ชนิดอื่น ๆ รวมถึงลิกนิน และแทนนิน ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่พบในผลปาล์ม

น้ำมัน และยังมีรายงานพบองค์ประกอบเหล่านี้ในน้ำทิ้งของโรงงานสกัดน้ำมันมะกอกซึ่งมีผลในการยับยั้งการเจริญของราไวท์รอทด้วยเช่นกัน (Annibale *et al.*, 1999; Fadil *et al*., 2003; Dias *et al*., 2004) ในขณะที่ราไวท์รอทสายพันธุ์ Unknown 01 *Garnoderma lucidum* และ *Pleurotus ostretus* สามารถเจริญได้ดีบนอาหารแข็งที่เติมน้ำทิ้งความเข้มข้น 25% และ 50% ได้ใกล้เคียงกับอาหารแข็งที่ไม่เติมน้ำทิ้ง (ในกรณี *Pleurotus ostretus* เจริญได้ดีกว่าไม่เติมน้ำทิ้ง) โดยที่ *Garnoderma lucidum* และ *Pleurotus ostretus* มีอัตราการเจริญช้ากว่า Unknown 01 อย่างไรก็ตาม เมื่อเพิ่มความเข้มข้นน้ำทิ้งเป็น 100% ส่งผลให้อัตราการเจริญลดลง ทั้งนี้เนื่องมาจากสารอินทรีย์ที่อยู่ในน้ำทิ้งสามารถใช้เป็นแหล่งอาหารร่วมให้ราไวท์รอทเจริญได้ แต่เมื่อความเข้มข้นของน้ำทิ้งสูงขึ้นทำให้สารยับยั้งบางชนิด เช่น สารประกอบฟีนอลิคในน้ำเสียมีความเข้มข้นสูงตามไปด้วย จึงมีผลยับยั้งการเจริญของราไวท์รอทบางสายพันธุ์ได้



รูปที่3.1 เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของราไวท์รอท 10 สายพันธุ์ บนอาหารแข็ง SDA, SDA+25%POME, SDA+50%POME, SDA+100%POME และ 100%POME agar บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน

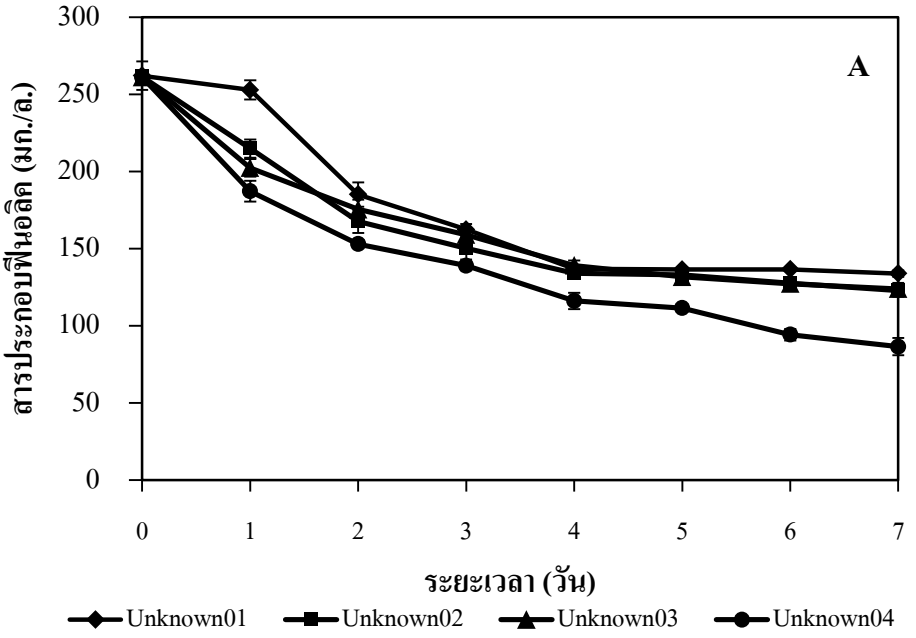
อย่างไรก็ตามราไวท์รอทสายพันธุ์ Unknown 04 เป็นเพียงสายพันธุ์เดียวที่สามารถเจริญเต็มผิวหน้าของอาหารแข็ง SDA ที่มีการเติมน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มทุกความเข้มข้น แสดงให้เห็นว่าราไวท์รอทสายพันธุ์ดังกล่าวมีความทนทานต่อความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิคที่มีในน้ำทิ้ง และไม่มีผลในการยับยั้งการเจริญของราไวท์รอทสายพันธุ์นี้ และเมื่อสังเกตสีของอาหารแข็งที่เติมน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มหลังจากเลี้ยงราไวท์รอทสายพันธุ์ Unknown 04 เป็นเวลา 7 วัน พบว่าราไวท์รอทสายพันธุ์ดังกล่าวเจริญเต็มผิวหน้าของอาหารแข็งและยังพบว่าสีของอาหารแข็งมีความเข้มของสีลดลงโดยเปลี่ยนจากสีน้ำตาลเข้มเป็นสีน้ำตาลอ่อนในทุกความเข้มข้นของน้ำทิ้งเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุมซึ่งเป็นอาหารแข็งที่เติมน้ำทิ้งทุกระดับความเข้มข้นแต่ไม่เติมหัวเชื้อของราไวท์รอท ดังแสดงในรูปที่ 3.2 การเปลี่ยนแปลงของสีเป็นตัวบ่งชี้ถึงปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยเอนไซม์ที่ราไวท์รอทสร้างขึ้นเพื่อย่อยสลายสารสีต่าง ๆ ตลอดการเจริญเติบโตของเส้นใย จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นถึงผลของสารประกอบฟีนอลิคที่มีต่อการเจริญของราไวท์รอทและการลดลงของสีในน้ำทิ้งที่เติมลงไปในอาหารแข็ง แต่ไม่สามารถแสดงถึงการลดลงของสารประกอบฟีนอลิคในอาหารแข็งได้ จึงต้องมีการทดสอบศักยภาพในการกำจัดจัดสีและสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้ง เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีศักยภาพสูงสุดในการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลิคเพื่อนำไปใช้ในการตรึงเซลล์ต่อไป

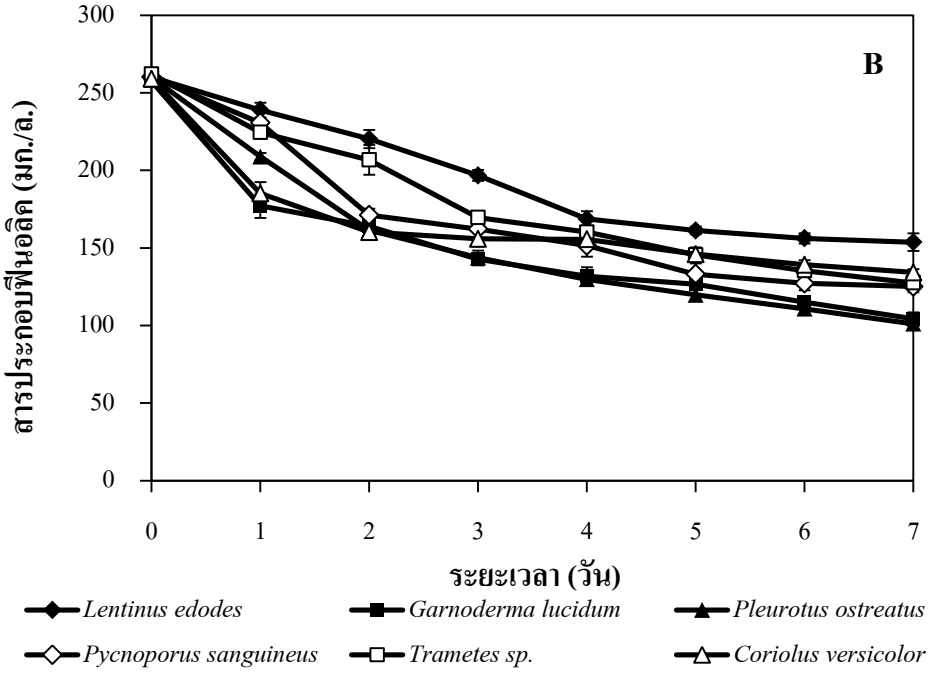


รูปที่ 3.2 อาหารแข็ง SDA ที่เติมน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม 25% (A), 50% (B) และ100% (C) และการเจริญของราไวท์รอทสายพันธุ์Unknown 04 บนอาหารแข็งSDA ที่เติมน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม 25% (D), 50% (E) และ100% (F) เมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 7 วัน

3.2.2 ศักยภาพในการลดสีและสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้งของราไวท์รอท

จากการศึกษาในอาหารแข็ง SDA ที่เติมน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ทำให้ทราบอัตราการเจริญและความความทนทานของราแต่ละสายพันธุ์ภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นของน้ำทิ้งหรือสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้งแตกต่างกัน อย่างไรก็ตามวิธีการข้างต้นยังไม่สามารถใช้คัดเลือกราไวท์รอทที่มีศักยภาพสูงสุดในการลดสีและสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้งได้เนื่องจากข้อจำกัดของการวิเคราะห์สีและสารประกอบฟีนอลิคที่ลดลงในตัวกลางที่เป็นของแข็ง จึงมีความจำเป็นต้องศึกษาในน้ำทิ้งเพิ่มเติม เพื่อให้ได้ผลการคัดเลือกที่ถูกต้องแม่นยำที่สุด โดยทำการเลี้ยงราไวท์รอทเซลล์อิสระในรูปแบบราก้อนกลม (fungal pellet) ทั้ง 10 สายพันธุ์ในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่มีการเจือจาง 2 เท่า (50%POME) เพื่อลดความเป็นพิษของสารประกอบฟีนอลิคที่อาจมีผลยับยั้งการเจริญของราไวท์รอทเซลล์อิสระ (Alaoui *et al.,* 2008) ผลการทดลองพบว่าราไวท์รอททั้ง 10 สายพันธุ์ มีประสิทธิภาพในการกำจัดสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้ง โดยสามารถลดสารประกอบฟีนอลิคได้จากความเข้มข้น 266 มก. /ล. เหลือเพียง 86 - 153 มก. /ล. คิดเป็น 48.1-66.5% ในระยะเวลา 7 วันของการบ่มในอุณหภูมิห้อง และมีการเขย่า 80 รอบต่อนาที (รูปที่ 3.3A และB)



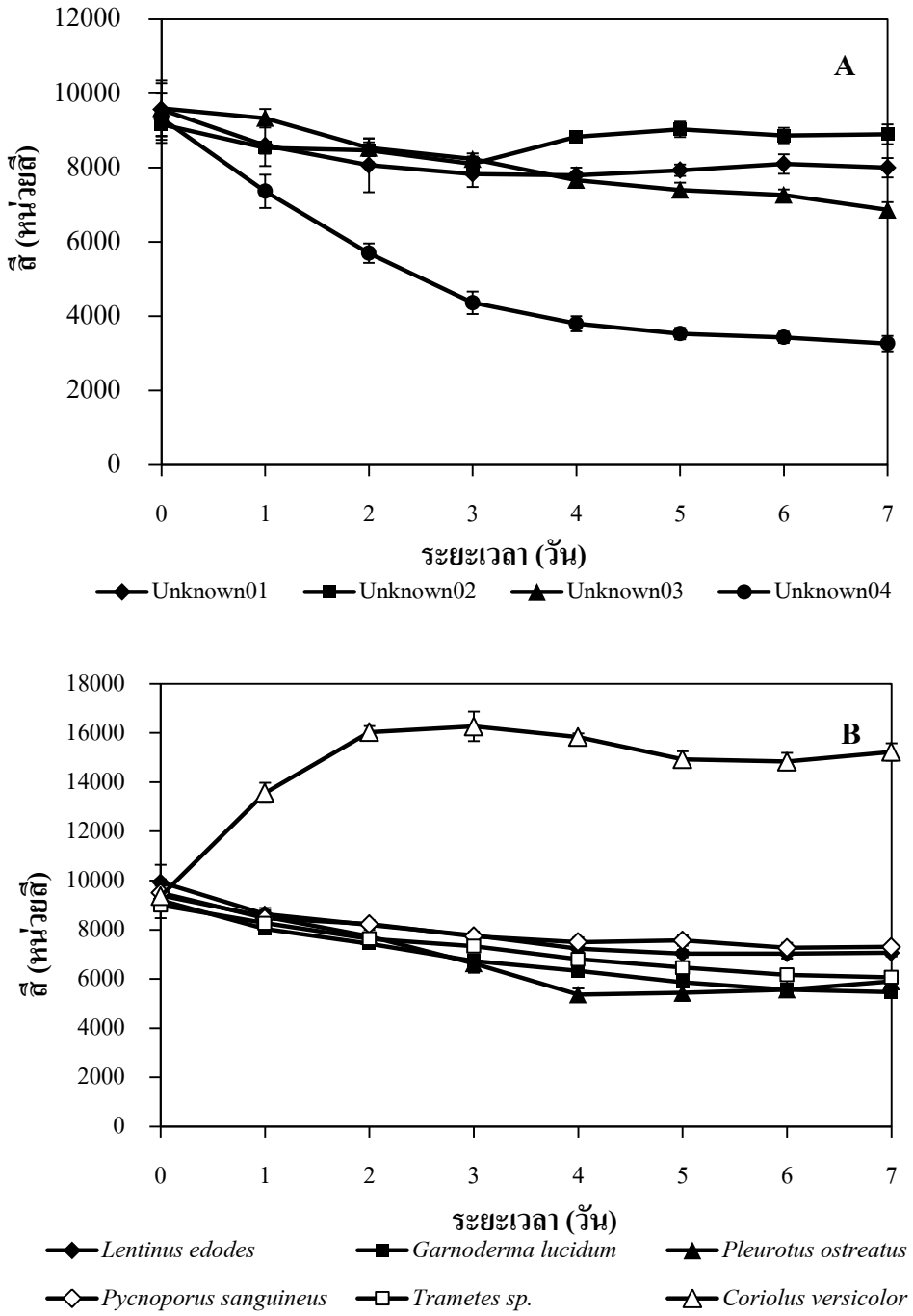


รูปที่ 3.3 การย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มความเข้มข้น 50% ของราไวท์รอท 10 สายพันธุ์ ที่บ่มในอุณหภูมิห้อง เขย่า 80 รอบต่อนาที

(A) Unknown 01, Unknown 02, Unknown 03 และ Unknown 04

(B) *Lentinus edodes, Garnoderma lucidum, Pleurotus ostretus, Pycnoporus sanguineus, Trametes* sp. และ*Coriolus versicolor*

สำหรับประสิทธิภาพในการกำจัดสีของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม พบว่าราไวท์รอท 9 สายพันธุ์ มีประสิทธิภาพในการกำจัดสีออกจาก 50%POME โดยสามารถลดสีได้จาก 9,333 หน่วยสี เหลือ 3,266-8,900 หน่วยสี คิดเป็น 3.1-64.7% ในระยะเวลา 7 วันของการบ่ม ดังแสดงในรูปที่ 3.4A และ B ยกเว้นราไวท์รอทสายพันธุ์ *Coriolus versicolor* เป็นราไวท์รอทสายพันธุ์เดียวที่ทำให้น้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มมีสีเข้มขึ้น เนื่องจากลักษณะเส้นใยของราดังกล่าวมีสีดำซึ่งแตกต่างจากราไวท์รอทอีก 9 สายพันธุ์ และเมื่อทำการเลี้ยงราไวท์รอททั้ง 10 สายพันธุ์ใน 50%POME เป็นระยะเวลามากกว่า 7 วันจะพบว่าไม่สามารถลดสีของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มได้เพิ่มจากเดิม แต่จะเริ่มมีความเข้มของสีเพิ่มขึ้นจากเดิมเล็กน้อย ในขณะที่ราก้อนกลมมีลักษณะสีคล้ำขึ้น เนื่องจากเซลล์ของราไวท์รอทมีการดูดซับสีของน้ำทิ้งไว้ (Lakhtar *et al* ., 2010) เมื่อเลี้ยงไว้ระยะหนึ่งแหล่งอาหารในน้ำทิ้งไม่เพียงพอต่อการเจริญ หรืออาจเกิดจากผลกระทบของสารยับยั้งในน้ำทิ้งซึ่งถูกดูดซับสะสมไว้ในเซลล์ทำให้ราก้อนกลมแตกออกและตายในที่สุด ดังนั้นสีบางส่วนที่ถูกดูดซับไว้ในเซลล์จึงถูกปลดปล่อยออกมาในน้ำทิ้งทำให้น้ำทิ้งมีสีเข้มขึ้น

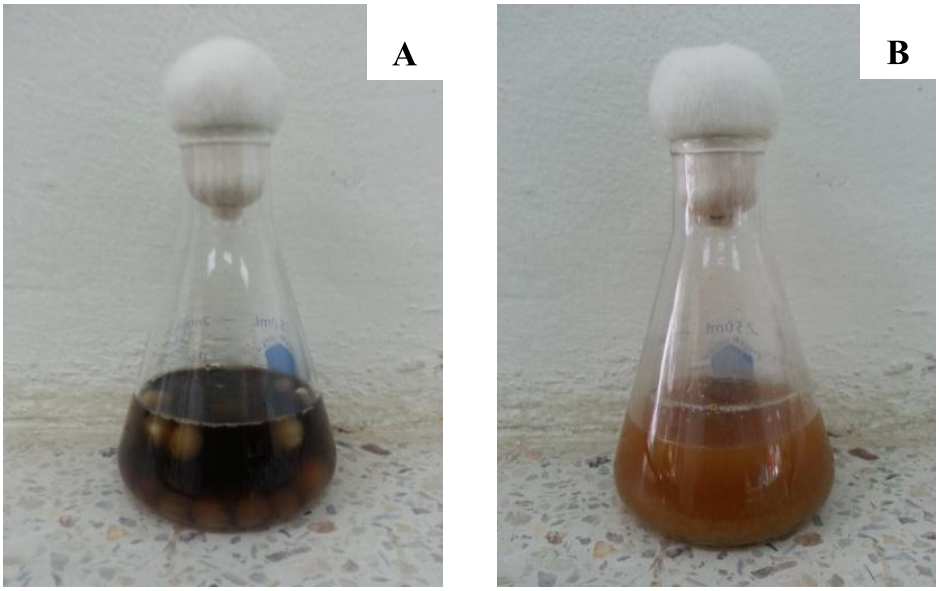


รูปที่ 3.4 การกำจัดสีน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มความเข้มข้น 50% ของราไวท์รอท 10 สายพันธุ์ที่บ่มในอุณหภูมิห้อง เขย่า 120 รอบต่อนาที

(A) Unknown 01, Unknown 02, Unknown 03 และ Unknown 04

(B)*Lentinus edodes, Garnoderma lucidum, Pleurotus ostretus, Pycnoporus sanguineus, Trametes* sp. และ*Coriolus versicolor*

ตัวอย่างลักษณะสีของน้ำทิ้งก่อนและหลังจากการบำบัดด้วยราไวท์รอทสายพันธุ์ Unknown 04 เป็นระยะเวลา 7 วัน ซึ่งสามารถเห็นการเปลี่ยนแปลงของสีในน้ำทิ้งได้อย่างชัดเจน โดยเริ่มต้นการทดลองสีของน้ำทิ้งความเข้มข้น 50% ยังมีสีน้ำตาลคล้ำ แต่เมื่อบำบัดด้วยราไวท์รอทในรูปแบบของราก้อนกลม สีของน้ำทิ้งจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอ่อน (รูปที่ 3.5 A และ B) เนื่องจากราไวท์รอทมีการสร้างเอนไซม์ออกมาเพื่อย่อยสลายสารที่ทำให้เกิดสีในน้ำทิ้งเพื่อใช้เป็นแหล่งอาหารในการเจริญเติบโต และสีบางส่วนถูกดูดซับไว้ในเส้นใยของราไวท์รอทจึงทำให้สีของน้ำทิ้งเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม อย่างไรก็ตามเนื่องจากราก้อนกลมมีการดูดซับสีไว้บางส่วน และเมื่อเลี้ยงราก้อนกลมในน้ำทิ้งระยะหนึ่งเซลล์จะมีการแตกตัว ซึ่งส่งผลต่อประสิทธิภาพในการกำจัดสีน้ำทิ้งจึงเป็นข้อจำกัดของการที่จะนำราไวท์รอทในรูปแบบราก้อนกลมไปใช้ในระบบบำบัดน้ำทิ้งของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม



รูปที่3.5 ลักษณะการเปลี่ยนแปลงสีของน้ำทิ้งเมื่อเติมราก้อนกลม สายพันธุ์ Unknown 04 ในน้ำทิ้งความเข้มข้น 50% ในวันที่ 0 (A) และวันที่ 7 (B) ของการบ่มที่อุณหภูมิห้อง เขย่า 80 รอบต่อนาที

เมื่อนำค่าการลดลงของสารประกอบฟีนอลิคและสีในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ผ่านการบำบัดด้วยราก้อนกลมทั้ง 10 สายพันธุ์ เป็นระยะเวลา 7 วันมาคำนวณประสิทธิภาพการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลิค พบว่าราไวท์รอทสายพันธุ์ Unknown 04 เป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการกำจัดสารประกอบฟีนอลิคและสีในน้ำทิ้งความเข้มข้น 50% ถึง 66.5% และ 64.7% ตามลำดับ เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพในการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลิคของราอีก

9 สายพันธุ์และวิเคราะห์ทางสถิติพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 3.2 ซึ่งผลการทดลองการคัดเลือกราไวท์รอทที่มีศักยภาพในการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ทั้งในแบบอาหารแข็งและในน้ำทิ้ง พบว่าราไวท์รอทสายพันธุ์ Unknown 04 เป็นสายพันธุ์ที่มีอัตราการเจริญอย่างรวดเร็ว มีความทนทานต่อความเข้มข้นฟีนอลิคสูงกว่าสายพันธุ์อื่น และยังมีประสิทธิภาพสูงสุดในการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม จากผลการวิเคราะห์ระบุเอกลักษณ์ของราไวท์รอทสายพันธุ์ Unknown 04 ด้วยวิธีทางด้านชีววิทยาโมเลกุล (ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ) พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Trametes hirsuta* ถึง 99% (ภาคผนวก ค) จึงระบุสายพันธุ์ของราไวท์รอทสายพันธุ์ Unknown 04 เป็น *Trametes hirsuta* AK4 ราสายพันธุ์ดังกล่าวจึงถูกคัดเลือกไปใช้ในการทดลองต่อไป ซึ่งนำเทคนิคการตรึงเซลล์มาประยุกต์ใช้เพื่อให้ราไวท์รอทมีความทนทานต่อสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้งและใช้งานได้นานขึ้น

ตารางที่ 3.2 ประสิทธิภาพการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ความเข้มข้น 50% โดยราไวท์รอทในรูปแบบก้อนกลม 10 สายพันธุ์ ที่ระยะเวลา 8 วัน

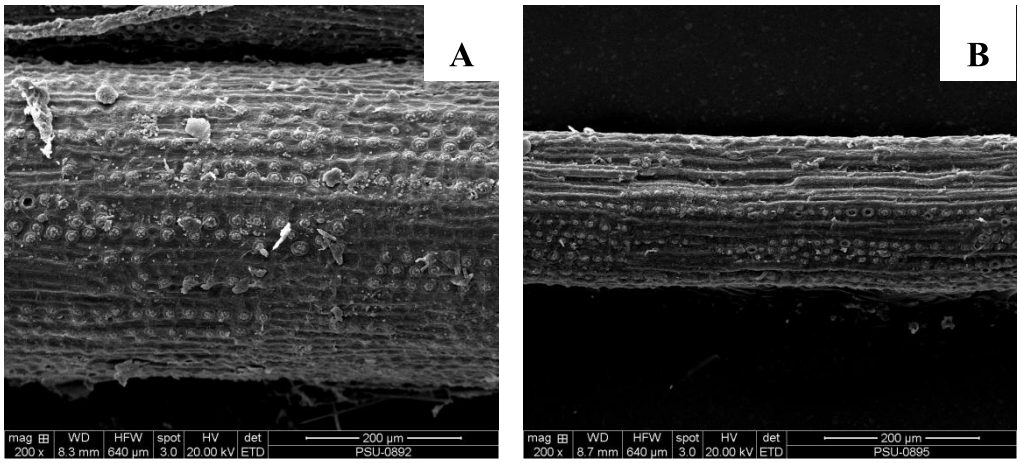
ราไวท์รอท	การลดลงของสารประกอบฟีนอลิค (%)	การลดลงของสี (%)
Unknown 01	48.8 ± 2.4^{d}	16.1 ± 3.5^{d}
Unknown 02	53.2 ± 2.1^{c}	3.1 ± 4.5^{e}
Unknown 03	52.4 ± 1.7^{c}	28.2 ± 4.2^{c}
Unknown 04	66.5 ± 1.5^{a}	64.7 ± 4.7^{a}
Lentinus edodes	40.8 ± 2.2^{e}	28.5 ± 5.5^{c}
Garnoderma lucidum	59.4 ± 1.4^{b}	40.4 ± 3.6^{b}
Pleurotus ostretus	61.6 ± 0.7^{b}	36.9 ± 5.1^{b}
Pycnoporus sanguineus	51.8 ± 1.8^{c}	$22.9 \pm 5.6^{c, d}$
Trametes sp.	$51.3 \pm 0.5^{c, d}$	32.4 ± 3.2^{c}
Coriolus versicolor	48.1 ± 1.1^{d}	0.0 ± 0.0^{e}

หมายเหตุ ตัวอักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

3.3 การตรึงราไวท์รอทบนวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน

3.3.1 คุณสมบัติของวัสดุตรึง

การทดลองนี้ใช้วัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน 2 ชนิด เป็นวัสดุตรึงเซลล์ ได้แก่ ทะลายปาล์มเปล่า (empty fruit bunch: EFB) และเส้นใยปาล์มน้ำมัน (pericarp fiber: PF) ซึ่งเป็นวัสดุเศษเหลือจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม การใช้วัสดุตรึงเซลล์ดังกล่าว เป็นทางเลือกหนึ่งในการนำของเสียมาใช้ประโยชน์ และยังเป็นการกำจัดของเสียอีกทางหนึ่งด้วย นอกจากนี้ยังช่วยลดค่าใช้จ่ายในการสั่งซื้อ หรือสังเคราะห์วัสดุตรึงเซลล์ที่มีราคาแพง รวมทั้งมีวิธีการเตรียมวัสดุ และขั้นตอนการตรึงเซลล์ที่ไม่ยุ่งยาก จากการศึกษาลักษณะพื้นผิวของวัสดุทั้ง 2 ชนิด โดยการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) แสดงให้เห็นดังรูปที่ 3.6 พบว่าลักษณะพื้นผิวของวัสดุทั้งสองชนิดประกอบด้วยโครงสร้างซับซ้อน พื้นผิวค่อนข้างขรุขระ



รูปที่ 3.6 ลักษณะพื้นผิวของวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมันส่องโดย SEM กำลังขยาย 200x; ทะลายเปล่าปาล์มน้ำมัน (A) และเส้นใยปาล์มน้ำมัน (B)

จากการวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพ-เคมีของวัสดุดังกล่าว (ตารางที่ 3.3) พบว่าวัสดุ EFB มีปริมาณสารอาหารไนโตรเจน (0.90%) และฟอสฟอรัส (0.11%) มากกว่า PF เล็กน้อย (0.63% และ 0.04% ตามลำดับ) โดยวัสดุทั้งสองมีปริมาณอินทรีย์คาร์บอนรวมทั้งหมดใกล้เคียงกัน คือ 36.21% ใน EFB และ 39.58% ใน PF และจากการศึกษาของพนิดา โต๊ะสู (2555) พบว่าวัสดุทั้ง 2 ชนิด มีคุณสมบัติทางกายภาพ ได้แก่ เส้นผ่านศูนย์กลางรูพรุนเฉลี่ย (Average pore diameter) และพื้นที่ผิวจำเพาะ (specific surface area) ใกล้เคียงกัน นั่นคือ มีค่าประมาณ 4.24 (EFB) และ 5.01 (PF) nm และ 4.17 (EFB) และ 5.45 (PF) $m^2 g^{-1}$ ตามลำดับ

ตารางที่ 3.3 องค์ประกอบของวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน

องค์ประกอบ	วัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน	
	ทะลายเปล่าปาล์มน้ำมัน (EFB)	เส้นใยปาล์มน้ำมัน (PF)
Nitrogen (%)	0.90	0.63
Phosphorus (%)	0.11	0.04
TOC (%)	36.21	39.58

วัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมันทั้ง 2 ชนิด ยังมีสารจำพวกลิกโนเซลลูโลส ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์พืชประกอบด้วย เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ซึ่งจะมีสัดส่วนที่แตกต่างกันตามชนิดของพืช (Ahmed *et al*., 2001) จากการศึกษาของ Khalil, *et al*. (2007) พบว่าในทะลายปาล์มเปล่ามีองค์ประกอบของเซลลูโลส 49.6% เฮมิเซลลูโลส 18% และลิกนิน 21.2% และการศึกษาของ วีรยุทธ์ จวนซ้าย (2554) ทำการศึกษาองค์ประกอบของเส้นใยปาล์มน้ำมันพบว่ามีองค์ประกอบของเซลลูโลส 28.91% เฮมิเซลลูโลส 21.56% และลิกนิน 23.63% นอกจากนี้ในการศึกษาของ Han and May (2012) พบว่าในทะลายปาล์มเปล่ามีองค์ประกอบของสารประกอบฟีนอลิคประมาณ 6-7 มิลลิกรัมต่อกรัม โดยที่ทะลายปาล์มเปล่าที่แห้งจะมีสารประกอบฟีนอลิคที่สูงกว่าทะลายปาล์มเปล่าสด ซึ่งองค์ประกอบเหล่านี้จะเป็นแหล่งอาหารให้ราไวท์รอทใช้ในการเจริญเติบโต และยังมีคุณสมบัติเป็นสารเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์ในกลุ่มลิกนิโนไลติกให้สูงขึ้น (Xavier, 2001)

3.3.2 การตรึงราไวท์รอทบนทะลายปาล์มเปล่า

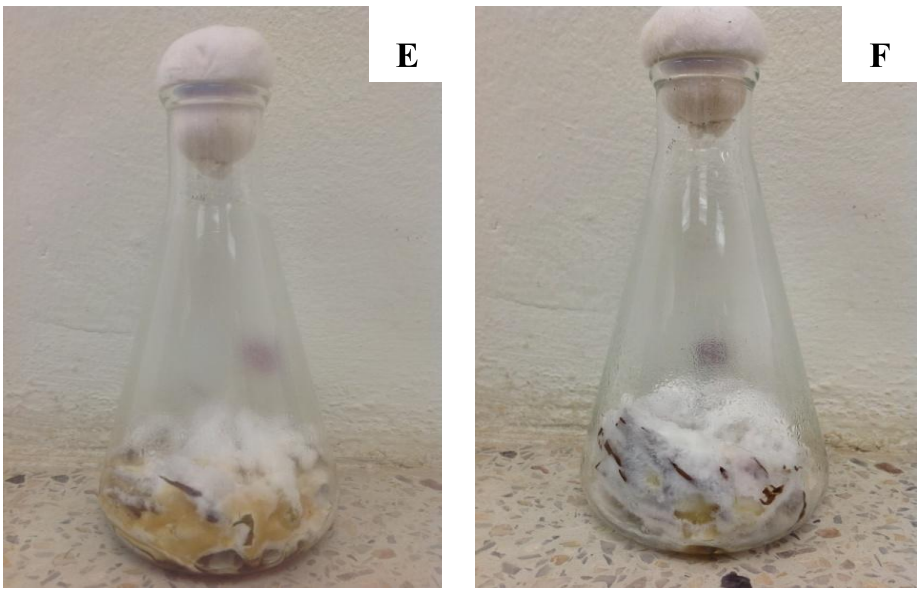
เมื่อนำราไวท์รอทสายพันธุ์ *Trametes hirsuta* AK4 ที่ผ่านการคัดเลือกมาเตรียมเป็นหัวเชื้อโดยการเลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA จนเจริญเต็มผิวหน้า แล้วจึงนำมาตรึงกับทะลายปาล์มเปล่าซึ่งเป็นวัสดุเศษเหลือจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม โดยทะลายปาล์มเปล่านี้จะถูกตัดแต่งเป็นชิ้นเล็กและผ่านการล้างทำความสะอาดรวมถึงการฆ่าเชื้อก่อนที่จะนำมาตรึงเพื่อกำจัดจุลินทรีย์อื่นๆที่อาจตกค้างและปนเปื้อนในวัสดุตรึง โดยมีการแปรผันระยะเวลาในการตรึงเป็น 2, 4, 6, 8 และ 10 วัน เพื่อศึกษาระยะเวลาการตรึงที่เหมาะสม ซึ่งพิจารณาจากประสิทธิภาพการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม จากการทดลองพบว่าราไวท์รอทสายพันธุ์ *Trametes hirsuta* AK4 สามารถเจริญเติบโตบนชิ้นส่วนทะลายปาล์มได้ดี โดยจะเจริญคลุมผิวหน้าของทะลายปาล์มเปล่า ดังแสดงในรูปที่ 3.7

A

B

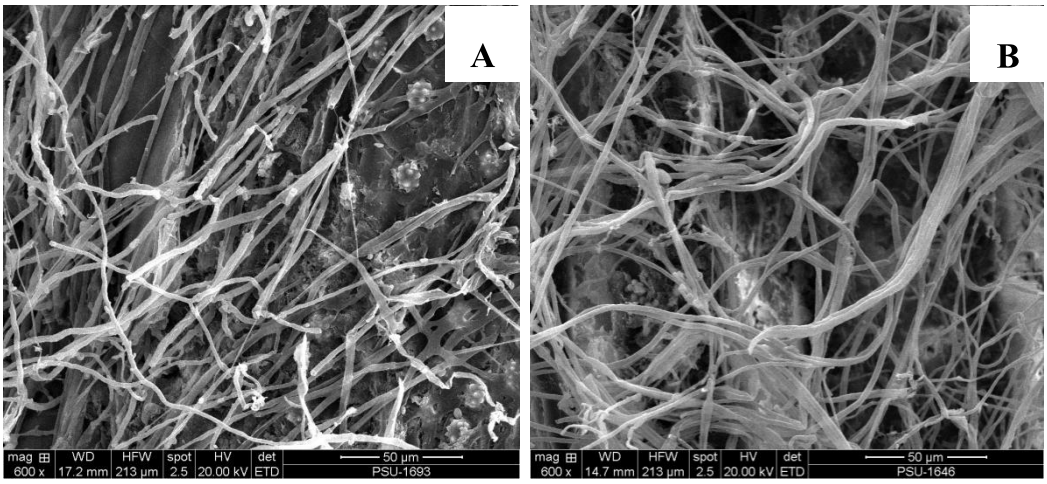
C

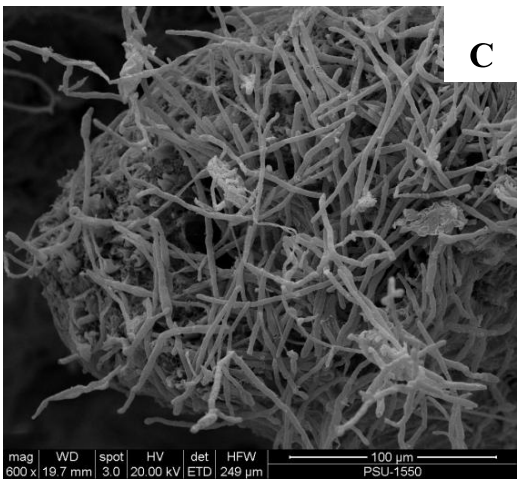
D



รูปที่ 3.7 ราไวท์รอท *Trametes hirsuta* AK4 ที่ตรึงบนทะลายปาล์มเปล่าระยะเวลา 0 วัน (A), 2 วัน (B), 4 วัน (C), 6 วัน (D), 8 วัน (E) และ 10 วัน (F) เมื่อบ่มในอุณหภูมิห้อง สภาวะคงที่

เมื่อนำชิ้นส่วนของ *Trametes hirsuta* AK4 ที่ตรึงบนทะลายปาล์มเปล่ามาส่องด้วย SEM เพื่อดูลักษณะการเกาะติดของเส้นใยราไวท์รอทกับวัสดุตรึง พบว่าเส้นใยของ *Trametes hirsuta* AK4 มีการยึดเกาะบริเวณผิวหน้าของวัสดุตรึงได้ดี และเมื่อใช้ระยะเวลาการตรึงที่มากขึ้นจะทำให้ปริมาณเส้นใยของ *Trametes hirsuta* AK4 มีความหนาแน่นมากยิ่งขึ้น (รูปที่ 3.8A และ B) นอกจากนี้ยังพบว่าราไวท์รอทมีการสร้างเส้นใยเกาะติดวัสดุเข้าไปภายในช่องว่างระหว่างรูพรุนของวัสดุตรึงดังแสดงในรูปที่ 3.8C

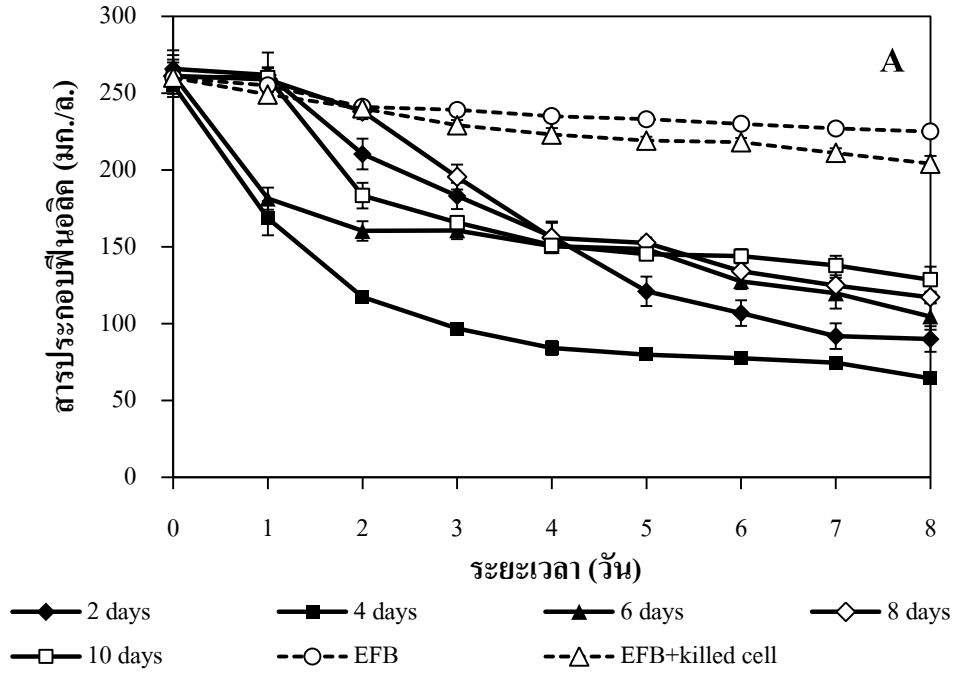


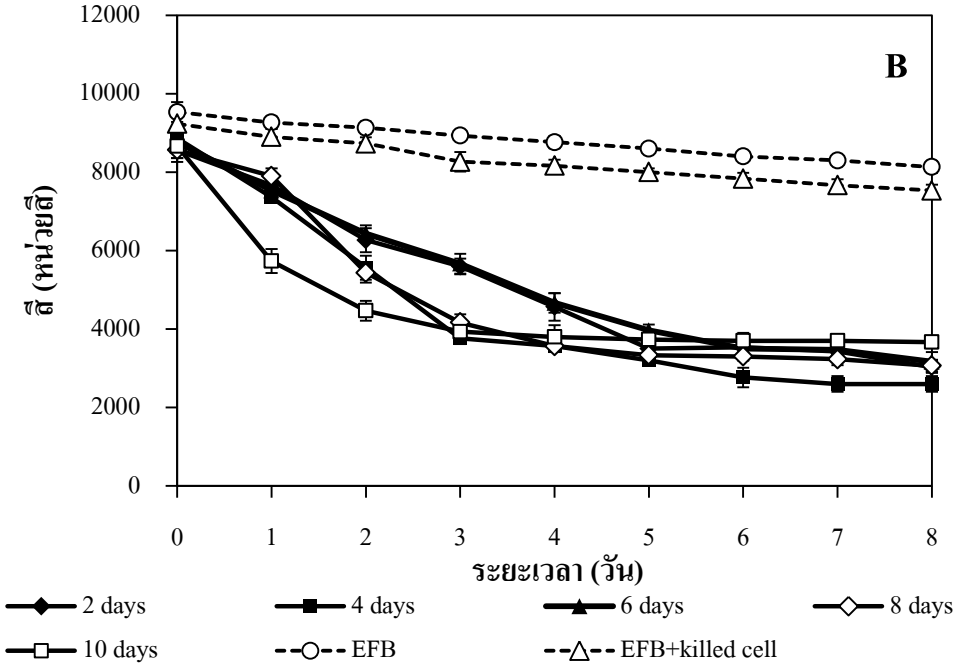


รูปที่ 3.8 ลักษณะการยึดเกาะของราไวท์รอท *Trametes hirsuta* AK4 ที่ตรึงบนทะลายเปล่าปาล์มน้ำมัน หลังจากการตรึงเซลล์ 2 วัน (A), 4 วัน (B) และการเกาะติดของเส้นใยระหว่างช่องว่างรูพรุนของทะลายปาล์มเปล่า (C) เมื่อส่องโดยSEM กำลังขยาย 600X

เมื่อนำเซลล์ตรึงของราไวท์รอทสายพันธุ์ *Trametes hirsuta* AK4 ที่ถูกตรึงเป็นระยะเวลา 2, 4, 6, 8 และ 10 วัน มาทดสอบประสิทธิภาพในการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม โดยการเติม 50%POME ปริมาตร 100 มล. ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงในขวดรูปชมพู่ที่มีเซลล์ตรึง พบว่ามีอัตราการลดลงของสารประกอบฟีนอลิคและสีอย่างต่อเนื่อง โดยเซลล์ที่ถูกตรึงเป็นระยะเวลา 4 วันสามารถลดสารประกอบฟีนอลิคได้สูงสุด โดยสามารถลดสารประกอบฟีนอลิคจากความเข้มข้น 255 มก./ล. เหลือเพียง 64 มก./ล. คิดเป็น 75% ของการลดลง ในขณะที่ราตรึงอายุ 2, 6, 8 และ 10 วัน สามารถลดสารประกอบฟีนอลิคอยู่ในช่วง 50-66% ในวันที่ 8 ของการบ่มราตรึงและน้ำทิ้งร่วมกัน ดังแสดงในรูปที่ 3.9A โดยเซลล์ที่ถูกตรึงเป็นระยะเวลา 4 วัน และ 6 วัน จะมีอัตราการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิคอย่างรวดเร็วในช่วง 2 วันแรกของการบ่มเซลล์ตรึงร่วมกับน้ำทิ้ง และอัตราการย่อยสลายลดลงเล็กน้อยจนถึงวันที่ 8 ของการบ่ม ส่วนเซลล์ตรึงที่ระยะเวลา 2, 8 และ 10 วัน เริ่มย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิคหลังจากบ่มร่วมกับน้ำทิ้งเป็นระยะ 2 วัน และลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึงวันที่ 8 ของการบ่ม ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากความหนาแน่นของเส้นใยราไวท์รอทที่ตรึงอยู่บนทะลายปาล์มเปล่า นั่นคือเมื่อระยะการตรึงน้อยทำให้มีปริมาณเส้นใยน้อย ราจึงใช้เวลาในการบำบัดในช่วงแรกนาน และเมื่อระยะเวลาการตรึงที่มากขึ้นทำให้เส้นใยราไวท์รอทปกคลุมอย่างหนาแน่นก็ส่งผลต่อพื้นที่ผิวสัมผัสและการถ่ายเทมวลสารระหว่างเซลล์ตรึงกับน้ำทิ้งลดน้อยลง ทำให้ประสิทธิภาพการกำจัดสารประกอบฟีนอลิคลดต่ำลง

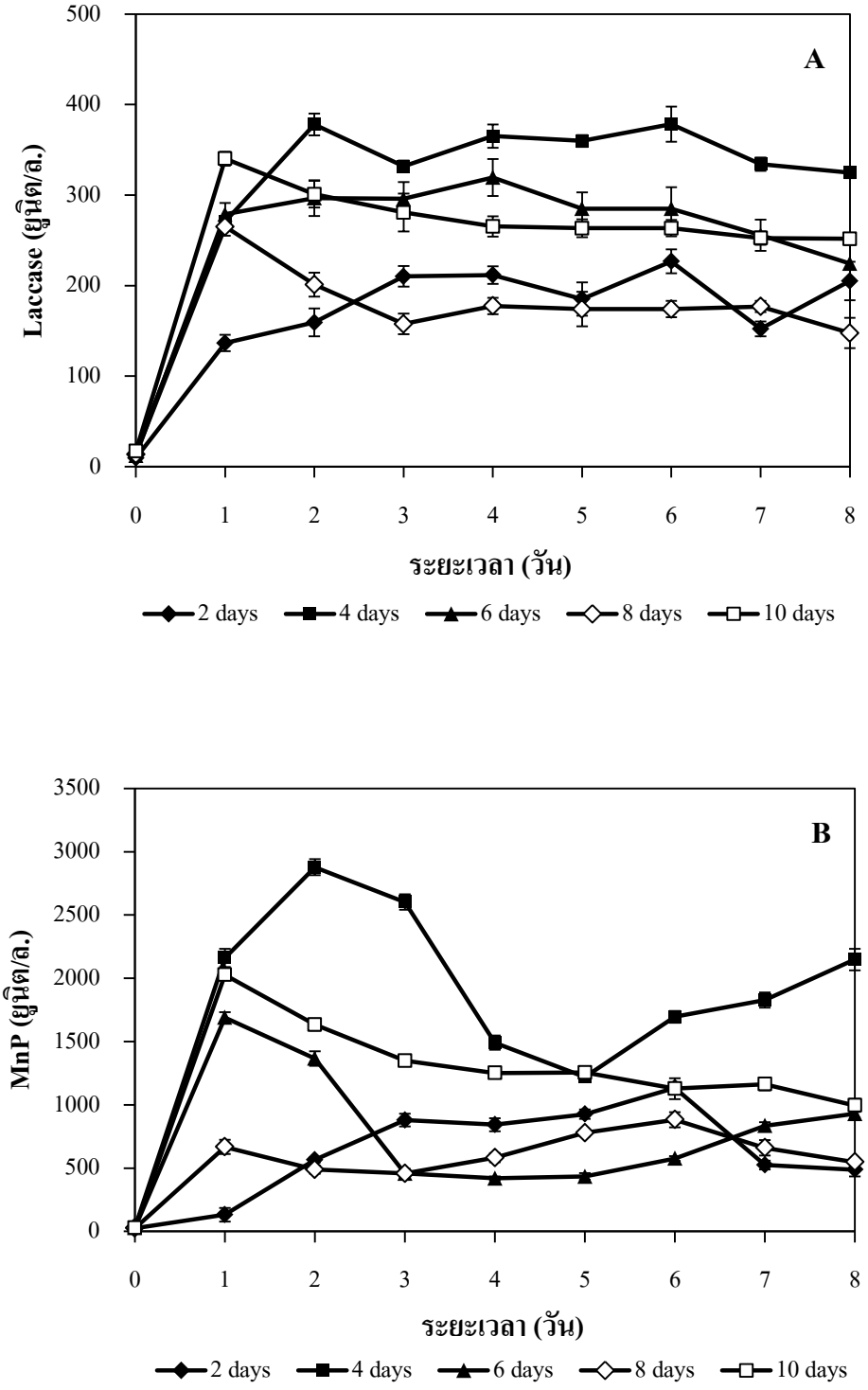
นอกจากนั้นเซลล์ตรึงอายุ 4 วันยังสามารถลดสีได้สูงสุด โดยสามารถลดสีใน 50%POME จาก 8,866 หน่วยสี เหลือเพียง 2,600 หน่วยสี คิดเป็น 70.5% ของการลดลง ในขณะที่ราตรึงอายุ 2, 6, 8 และ 10 วัน สามารถลดสีอยู่ในช่วง 57-64% ในวันที่ 8 ของการบ่มเชื้อและน้ำทิ้งร่วมกัน (รูปที่ 3.9B) นอกจากนี้ชุดควบคุมที่ประกอบด้วยทะลายปาล์มเปล่าที่ปราศจากราตรึง ซึ่งแสดงปริมาณการลดลงของสารประกอบฟีนอลิคและสีโดยปัจจัยทางกายภาพและเคมี (abiotic factor) พบว่าทะลายปาล์มเปล่ามีการดูดซับสารประกอบฟีนอลิคและสีไว้ 13% และ 14.6% ตามลำดับ ในขณะที่ชุดควบคุมที่ประกอบด้วยทะลายปาล์มเปล่าที่มีราตรึงซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อ ซึ่งเป็นตัวแทนปริมาณสารประกอบฟีนอลิคและสีที่ลดลงเป็นผลมาจากการดูดซับโดยทะลายปาล์มเปล่า และ/หรือการดูดซับโดยเส้นใยของรา มีการดูดซับสารประกอบฟีนอลิคและสีไว้ 21.5% และ18.4% ตามลำดับ สอดคล้องกับการทดลองของ Lakhtar *et al.* (2012) ซึ่งใช้เส้นใยของราไวท์รอท *Lentinus edodes* ในการกำจัดสีน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันมะกอก พบว่ามีการสะสมของสารประกอบที่ทำให้เกิดสีในเส้นใยของราไวท์รอทสายพันธุ์ดังกล่าวประมาณ 10% ของสีเริ่มต้น





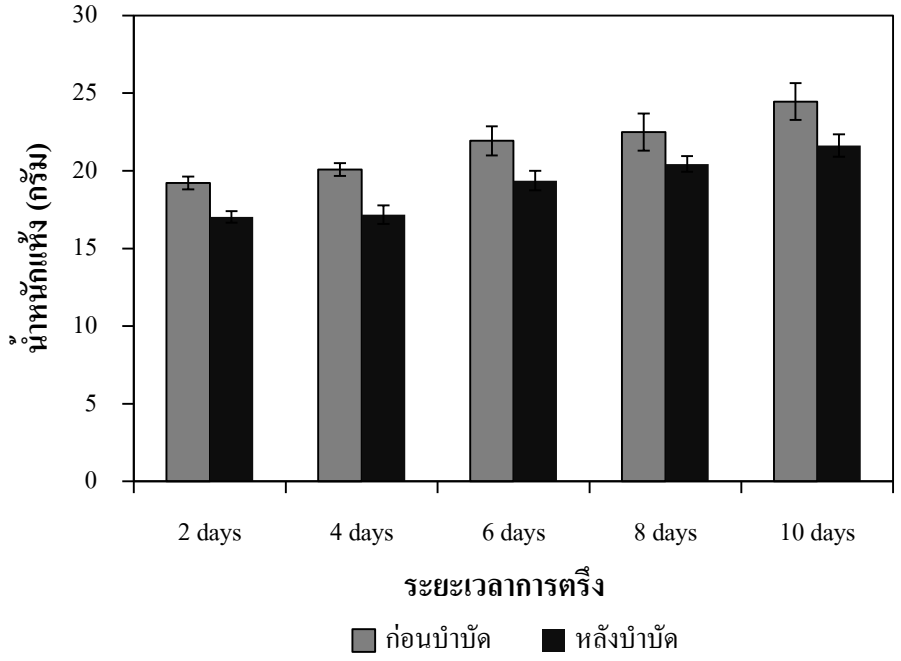
รูปที่ 3.9 ประสิทธิภาพการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิคและสีในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ความเข้มข้น 50% ของราไวท์รอทสายพันธุ์ *Trametes hirsuta* AK4 ที่ตรึงบนทะลายปาล์มเปล่าระยะเวลา 2-10 วัน บ่มในอุณหภูมิห้อง เขย่า 120 รอบต่อนาที

ผลการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ในกลุ่มลิกนิโนไลติก ได้แก่ Laccase, Manganese Peroxides (MnP) และ Lignin Peroxides (LiP) ซึ่งเป็นกลุ่มเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิคและกำจัดสี (Sadayi and Ellouz, 1995) พบว่าสามารถตรวจพบกิจกรรมเอนไซม์ของ Laccase และ Manganese Peroxides เท่านั้น ส่วน Lignin Peroxides ไม่มีการตรวจพบ ทั้งนี้ราไวท์รอทสายพันธุ์ *Trametes hirsuta* AK4 อาจไม่สามารถสร้างเอนไซม์ LiP ได้หรือสร้างได้ในปริมาณน้อยมากจนไม่สามารถตรวจพบได้เมื่อนำมาบ่มร่วมกับน้ำเสีย ซึ่งกิจกรรมของเอนไซม์ที่ตรวจพบมีลักษณะสอดคล้องกับประสิทธิภาพในการกำจัดสารประกอบฟีนอลิคและสี โดยพบกิจกรรมของเอนไซม์ Laccase สูงที่สุดเท่ากับ 378 ยูนิต/ล.และ MnP สูงที่สุดเท่ากับ 2,877 ยูนิต/ล. ในราตรึงที่มีอายุ 4 วัน (รูปที่ 3.10A และ B) อีกทั้งกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสองค่อนข้างสูงในช่วง 1-2 วันแรกของการบ่มตัวอย่าง ดังนั้นในช่วงระยะเวลานี้จึงพบอัตราการลดลงของสารประกอบฟีนอลิคและสีสูงเช่นกันโดยเฉพาะในราที่มีอายุการตรึง 4 วัน



รูปที่ 3.10 กิจกรรมเอนไซม์ Laccase (A), Manganese Peroxidase (B) ในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มความเข้มข้น 50% ของราไวท์รอทสายพันธุ์ *Trametes hirsuta* AK4 ที่ตรึงบนทะลายเปล่าปาล์มน้ำมันระยะเวลา 2-10 วัน บ่มในอุณหภูมิห้อง เขย่า 120 รอบต่อนาที

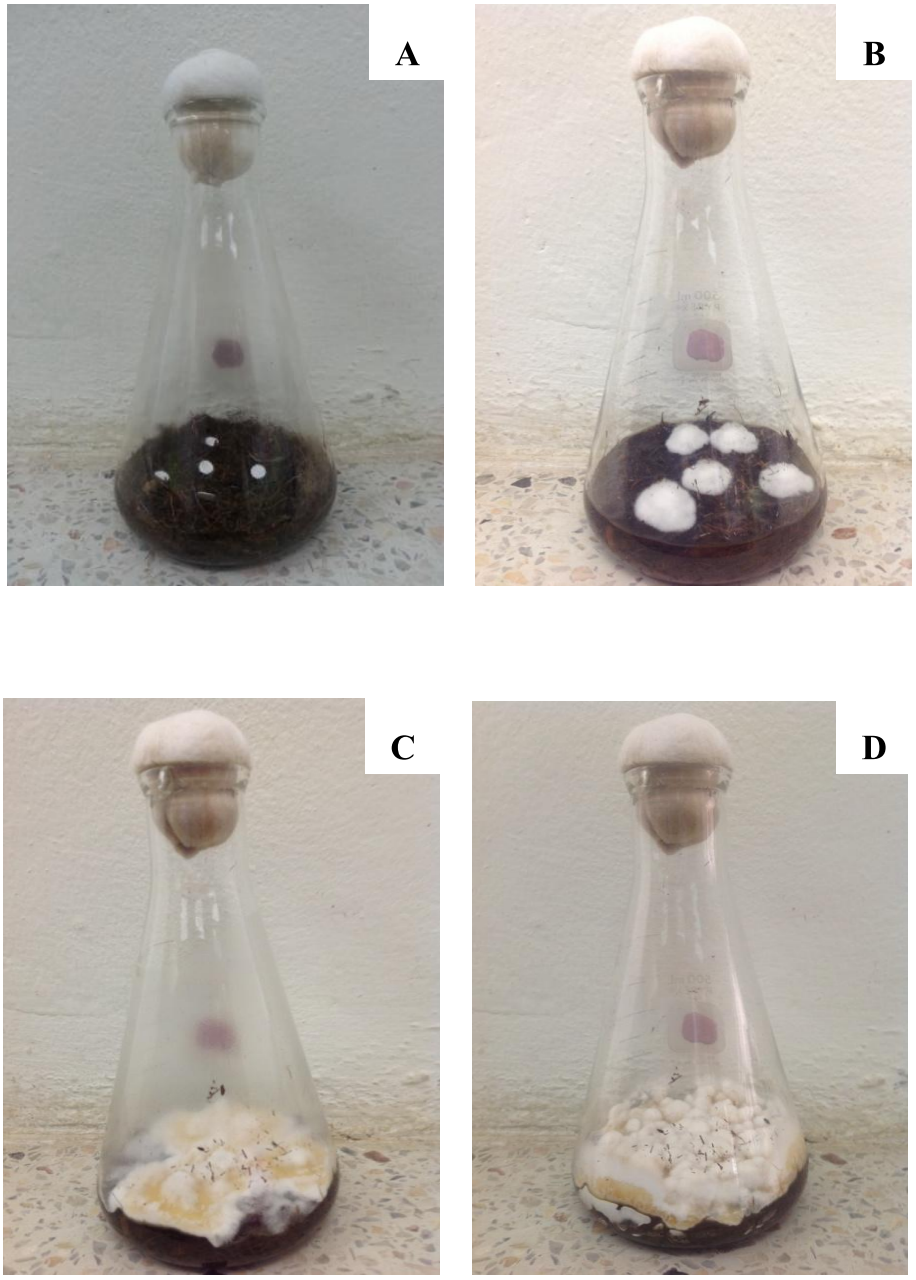
จากการวิเคราะห์น้ำหนักแห้งของเซลล์ตรึง *Trametes hirsuta* AK4 บนทะลายปาล์มเปล่าเพื่อวัดการเจริญของราไวท์รอท ซึ่งพิจารณาจากน้ำหนักแห้งของเส้นใยราไวท์รอทรวมกับทะลายปาล์มน้ำมัน ก่อนนำไปบำบัดน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม พบว่าระยะเวลาการตรึงที่สูงขึ้นจะทำให้เซลล์ตรึงมีน้ำหนักแห้งเพิ่มมากขึ้น โดยเซลล์ตรึงของ *Trametes hirsuta* AK4 บนทะลายปาล์มเปล่าที่ระยะเวลาการตรึง 2-10 วัน มีน้ำหนักแห้งของเส้นใยรวมกับทะลายปาล์มเพิ่มขึ้นถึง 19.21-24.46 กรัม จากเริ่มต้นที่มีน้ำหนักวัสดุตรึงและหัวเชื้อราประมาณ 15 กรัม เนื่องจากราไวท์รอทใช้อาหารเหลว GYEB เป็นแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน และความชื้นสำหรับการเจริญเติบโต กระทั่งราสร้างเส้นใยที่เพิ่มมากขึ้นจนเจริญเต็มวัสดุตรึง แต่เมื่อนำเซลล์ตรึงไปบำบัดน้ำทิ้งความเข้มข้น 50% พบว่าเซลล์ตรึงที่ผ่านการบำบัดกลับมีปริมาณน้ำหนักแห้งลดลงจากเดิมเป็น 17.04-21.62 กรัม ดังแสดงในรูปที่ 3.11 ทั้งนี้อาจมาจากทะลายปาล์มมีองค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลสซึ่งอาจถูกย่อยสลายไปบางส่วนโดยราไวท์รอทเพื่อเป็นแหล่งอาหารทำให้น้ำหนักแห้งของราไวท์รอทร่วมกับทะลายปาล์มเปล่าลดลง

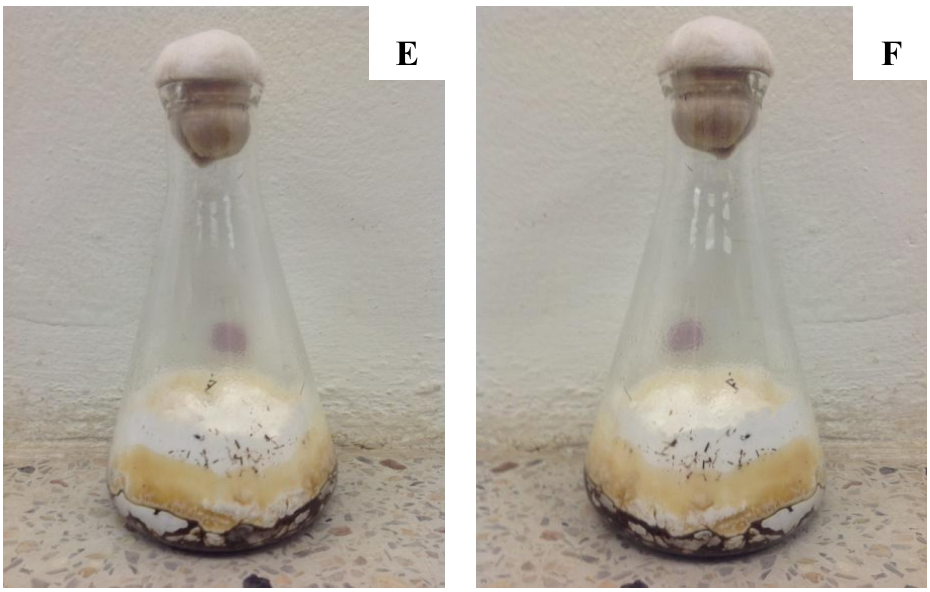


รูปที่ 3.11 น้ำหนักแห้งของราไวท์รอทสายพันธุ์ *Trametes hirsuta* AK4 ที่ถูกตรึงรวมกับน้ำหนักแห้งของทะลายปาล์มเปล่าที่ระยะเวลาการตรึง 2-10 วัน ก่อนและหลังนำไปบำบัดน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มความเข้มข้น 50%

3.3.3 การตรึงราไวท์รอทบนเส้นใยปาล์มน้ำมัน

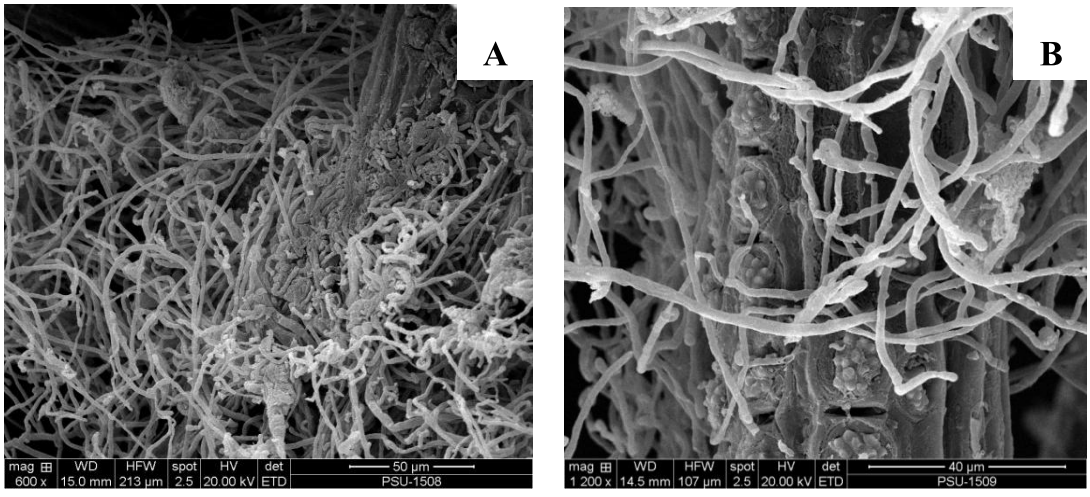
สำหรับการตรึงราไวท์รอทสายพันธุ์ *Trametes hirsuta* AK4 บนเส้นใยปาล์มน้ำมันซึ่งเป็นวัสดุเศษเหลือจากการสกัดน้ำมันปาล์มเช่นเดียวกัน ที่ผ่านการทำความสะอาดและฆ่าเชื้อแล้ว โดยแปรผันระยะเวลาการตรึงที่ 2, 4, 6, 8 และ 10 วัน พบว่า *Trametes hirsuta* AK4 สามารถเจริญเติบโตคลุมผิวหน้าของเส้นใยปาล์ม และการยึดเกาะของเส้นใยรากับเส้นใยปาล์มน้ำมันจนเป็นก้อนแน่นเช่นเดียวกับการตรึงบนทะลายปาล์มเปล่า ดังแสดงในรูปที่ 3.12





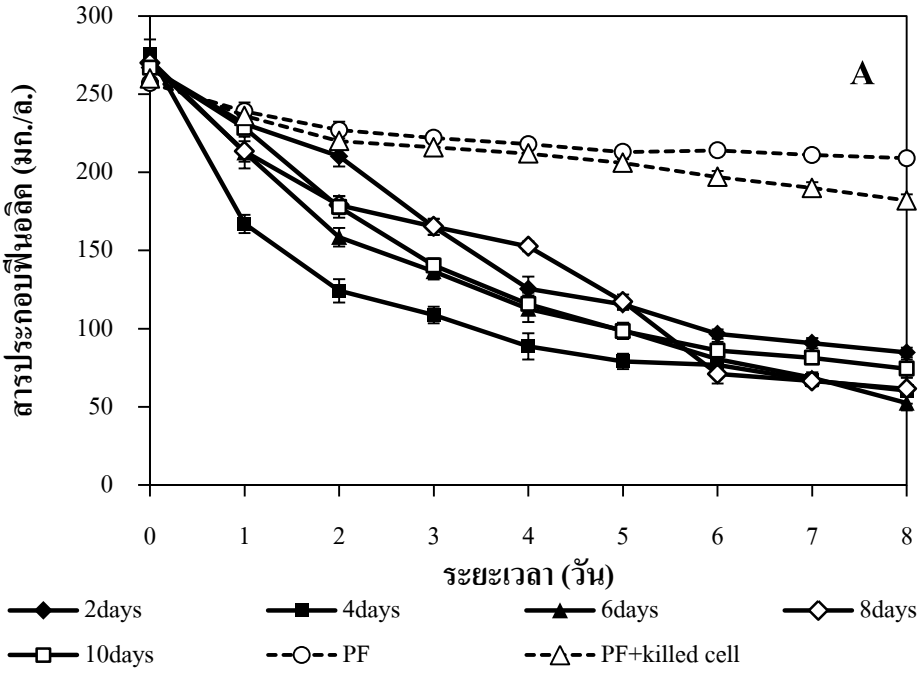
รูปที่ 3.12 รูปราไวท์รอท *Trametes hirsuta* AK4 ที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมันระยะเวลา 0 วัน (A), 2 วัน (B), 4 วัน (C), 6 วัน (D), 8 วัน (E) และ 10 วัน (F) เมื่อบ่มในอุณหภูมิห้อง สภาวะคงที่

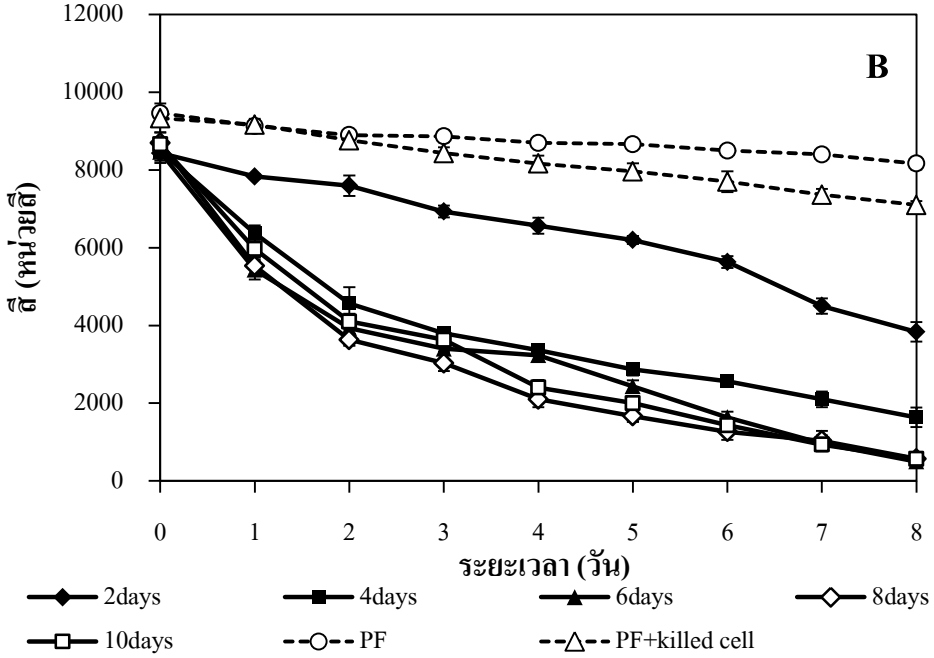
เมื่อนำชิ้นส่วนของเซลล์ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมันมาส่องด้วย SEM พบว่า เส้นใยของ *Trametes hirsuta* AK4 มีการเจริญเติบโตกระจายเต็มผิวหน้าของวัสดุตรึง (เส้นใยปาล์มน้ำมัน) (รูปที่ 3.15A) และสามารถสามารถเจริญเข้าไประหว่างช่องว่างของวัสดุตรึงและยึดเกาะกับวัสดุได้ดี (รูปที่ 3.13)



รูปที่ 3.13 ลักษะการยึดเกาะของราไวท์รอท *Trametes hirsuta* AK4 ที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมันหลังจากการตรึงเซลล์ 6 วัน (A) และการยึดเกาะในช่องว่างของวัสดุตรึง (B) เมื่อส่องโดย SEM กำลังขยาย 600X-1,200X

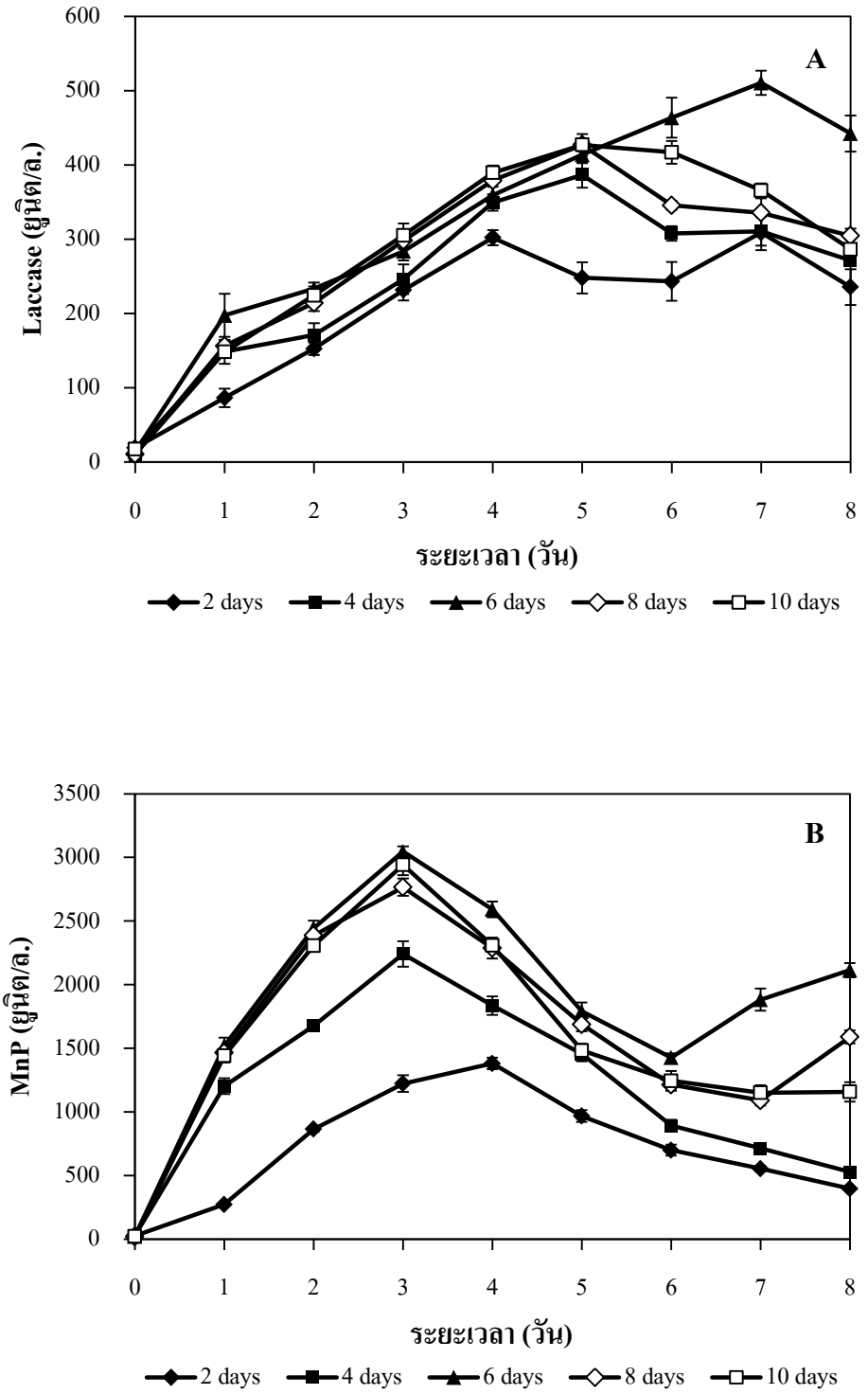
เมื่อนำเซลล์ตรึงของราไวท์รอทสายพันธุ์ *Trametes hirsuta* AK4 ที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมันเป็นระยะเวลา 2, 4, 6, 8 และ 10 วัน มาทดสอบประสิทธิภาพในการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม โดยการเติม 50%POME ปริมาตร 100 มล. ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงในขวดรูปชมพู่ที่มีเซลล์ตรึง พบว่ามีอัตราการลดลงของสารประกอบฟีนอลิคและสีอย่างต่อเนื่อง โดยเซลล์ตรึงที่ระยะเวลา 4, 6 และ 8 วันสามารถลดสารประกอบฟีนอลิคได้ใกล้เคียงกัน โดยสามารถลดสารประกอบฟีนอลิคจากความเข้มข้น 269-275 มก./ล. เหลือเพียง 52-61 มก./ล. โดยคิดเป็น 77-80% ของการลดลง ในขณะที่ราตรึงอายุ 2 และ 10 วันสามารถลดสารประกอบฟีนอลิคอยู่ในช่วง 68-72% ในวันที่ 8 ของการบ่มเชื้อและน้ำทิ้งร่วมกัน ดังแสดงในรูปที่ 3.14A สำหรับประสิทธิภาพในการกำจัดสีน้ำทิ้ง พบว่าเซลล์ตรึงที่ระยะเวลาตั้งแต่ 6 วัน เป็นต้นไป สามารถลดสีได้สูงสุดและไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยสามารถลดสีใน 50%POME จาก 8,466-8,700 หน่วยสี เหลือเพียง 500 หน่วยสี คิดเป็น 93-94% ของการลดลง ในขณะที่ราตรึงอายุ 2 และ 4 วันสามารถลดสีอยู่ในช่วง 54% และ 80% ตามลำดับ ในวันที่ 8 ของการบ่มเชื้อราตรึงกับน้ำทิ้งน้ำทิ้งร่วมกัน (รูปที่ 3.14B) และนอกจากนี้พบว่าชุดควบคุมที่มีเส้นใยปาล์มน้ำมันเพียงอย่างเดียวมีการดูดซับสารประกอบฟีนอลิคและสีไว้ถึง 18.8% และ 13.7% ตามลำดับ ส่วนชุดควบคุมที่มีเส้นใยปาล์มน้ำมันร่วมกับเส้นใยราที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วมีการดูดซับสารประกอบฟีนอลิคและสีไว้สูงกว่าชุดควบคุมที่มีทะลายปาล์มเปล่าร่วมกับเส้นใยราถึง 30% และ 23.9% ตามลำดับ ซึ่งราตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมันสามารถย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิคและสีรวมถึงการดูดซับด้วยวัสดุตรึงร่วมกับเส้นใยราได้สูงกว่าราตรึงบนทะลายปาล์มเปล่า





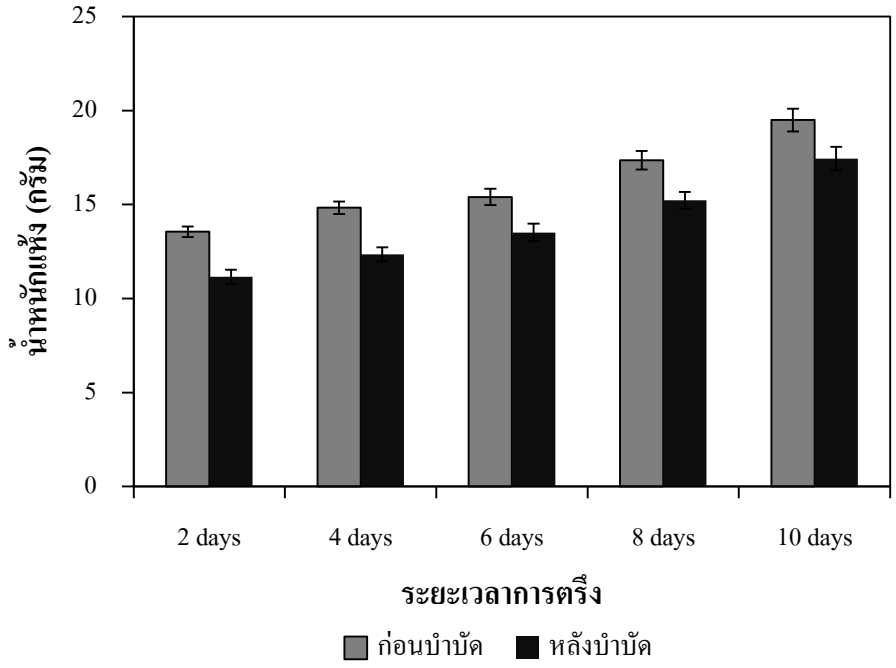
รูปที่ 3.14 ประสิทธิภาพการกำจัดสารประกอบฟีนอลิค (A) และสี (B)ในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มความเข้มข้น 50% ของราไวท์รอทสายพันธุ์ *Trametes hirsuta* AK4 ที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมันระยะเวลา 2-10 วัน บ่มในอุณหภูมิห้อง เขย่า 120 รอบต่อนาที

ผลการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ของ *Trametes hirsuta* AK4 ที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมัน พบว่ามีความสอดคล้องกับเซลล์ตรึง *Trametes hirsuta* AK4 ที่ถูกตรึงบนทะลายปาล์มเปล่า คือ ตรวจพบเฉพาะกิจกรรมของเอนไซม์ Laccase และ MnP เท่านั้น โดยพบกิจกรรมของเอนไซม์ Laccase ที่พบสูงที่สุดเท่ากับ 510 ยูนิต/ล.และ MnP สูงที่สุดเท่ากับ 3,046 ยูนิต/ล.ในราไวท์รอทที่มีอายุการตรึง 6 วัน บนเส้นใยปาล์มน้ำมัน (รูปที่ 3.15A และ B) ผลการศึกษาสอดคล้องกับประสิทธิภาพในการกำจัดสีและและสารประกอบฟีนอลิคที่สูงขึ้น อย่างไรก็ตามกิจกรรมเอนไซม์ Laccase และ MnP ที่ตรวจพบในราไวท์รอทที่ถูกตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมันมีค่าสูงกว่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ตรวจพบในเซลล์ตรึงบนทะลายปาล์มเปล่า ทั้งนี้ชนิดและปริมาณของเอนไซม์ที่ถูกสร้างขึ้นมีความแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ของราไวท์รอท โดยผลการศึกษากิจกรรมเอนไซม์ในกลุ่มลิกนิโนไลติกที่ตรวจพบจากการศึกษานี้แตกต่างจากการศึกษาของ Ergul *et al.* (2009) ซึ่งใช้ *Trametes versicolor* ในการกำจัดสีน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันมะกอก ตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์ Laccase ที่สูงกว่ากิจกรรมของเอนไซม์ MnP เท่ากับ 1,550 ยูนิต/ล. และ 128 ยูนิต/ล. ตามลำดับในวันที่ 7 และ 8 ของการบ่มราไวท์รอทที่ไม่ผ่านการปรับตัวในน้ำทิ้งที่เจือจาง 2เท่า สายพันธุ์ของราไวท์รอทที่แตกต่างกันในแต่ละการศึกษาจะให้ผลกิจกรรมเอนไซม์ที่แตกต่างกัน



รูปที่ 3.15 กิจกรรมเอนไซม์ Laccase (A), Manganese Peroxidase (B) ในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มความเข้มข้น 50% ของราไวท์รอทสายพันธุ์ *Trametes hirsuta* AK4 ที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมันระยะเวลา 2-10 วัน บ่มในอุณหภูมิห้อง เขย่า 120 รอบต่อนาที

จากการวิเคราะห์น้ำหนักแห้งของเซลล์ตรึง *Trametes hirsuta* AK4 บนเส้นใยปาล์มน้ำมันก่อนนำไปบำบัดน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม เพื่อวัดการเจริญของราไวท์รอท ซึ่งพิจารณาจากน้ำน้ำหนักแห้งของเส้นใยราไวท์รอทร่วมกับเส้นใยปาล์มน้ำมัน พบว่าระยะเวลาการตรึงที่สูงขึ้นจะทำให้เซลล์ตรึงมีน้ำหนักแห้งเพิ่มมากขึ้น สอดคล้องกับการตรึงราไวท์รอทบนทะลายปาล์มเปล่า โดยเซลล์ตรึงของ *Trametes hirsuta* AK4 บนเส้นใยปาล์มน้ำมันที่ระยะเวลาการตรึง 2-10 วัน มีน้ำหนักแห้งของเส้นใยราไวท์รอทและเส้นใยปาล์มเพิ่มขึ้นถึง 13.55 – 19.49 กรัม จากเริ่มต้นที่มีวัสดุตรึงรวมกับหัวเชื้อราประมาณ 10 กรัม แต่เมื่อนำเซลล์ตรึงไปบำบัดน้ำทิ้งความเข้มข้น 50% พบว่าเซลลตรึงที่ผ่านการบำบัดกลับมีปริมาณน้ำหนักแห้งลดลงจากเดิมเป็น 11.16 – 17.44 กรัม ดังแสดงในรูปที่ 3.16 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากลิกโนเซลลูโลสซึ่งเป็นองค์ประกอบในเส้นใยปาล์มน้ำมันถูกย่อยสลายด้วยราไวท์รอทเพื่อเป็นแหล่งอาหารสำหรับการเจริญเติบโต ค่าน้ำหนักแห้งของเส้นใยราไวท์รอทร่วมกับวัสดุตรึงนอกจากจะบอกอัตราการเจริญของราไวท์รอทแล้ว ยังสามารถใช้เป็นพารามิเตอร์เบื้องต้นที่ทดสอบได้ง่าย เพื่อจะใช้เป็นเกณฑ์ในการพิจารณาเติมวัสดุตรึงหรือเปลี่ยนเซลล์ตรึงใหม่เพื่อคงประสิทธิภาพในการบำบัดเมื่อนำราไวท์รอทไปใช้ในการบำบัดน้ำเสียด้วยระบบขยายขนาด



รูปที่ 3.16 น้ำหนักแห้งของราไวท์รอทสายพันธุ์ *Trametes hirsuta* AK4 ที่ถูกตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมันระยะเวลา 2-10 วัน ก่อนและหลังนำไปบำบัดน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มความเข้มข้น 50%

จากประสิทธิภาพการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลิคของราไวท์รอท *Trametes hirsuta* AK4 ที่ตรึงบนทะลายปาล์มเปล่าและเส้นใยปาล์มน้ำมันที่มีอายุการตรึงแตกต่างกัน สามารถสรุปประสิทธิภาพสูงสุดในการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มความเข้มข้น 50% ดังแสดงในตารางที่ 3.4 จากตารางจะพบว่าราไวท์รอท *Trametes hirsuta* AK4 ที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมัน เป็นระยะเวลา 6 วัน ให้ประสิทธิภาพในการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลิคสูงสุดถึง 94% และ 80% ตามลำดับ เนื่องจากเส้นใยปาล์มมีขนาดเล็ก มีช่องว่างระหว่างเส้นใยปาล์มให้ราเจริญเข้าไปได้ง่าย และมีพื้นที่ผิวสัมผัสสูง ทำให้เกิดการถ่ายเทมวลสารระหว่างเซลล์ตรึงกับน้ำทิ้งได้ดี รวมถึงวัสดุดังกล่าวยังสามารถเป็นตัวเหนี่ยวนำให้สร้างเอนไซม์ Laccase และ MnP สูง ทำให้ราตรึงกำจัดสารประกอบฟีนอลลิคและสีในน้ำทิ้งได้ดี จึงคัดเลือกราไวท์รอท *Trametes hirsuta* AK4 ที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมัน เป็นระยะเวลา 6 วัน เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

ตารางที่ 3.4 ประสิทธิภาพการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยราไวท์รอท *Trametes hirsuta* AK4 ที่ตรึงบนทะลายปาล์มเปล่าและเส้นใยปาล์มน้ำมันในระยะเวลาการตรึงต่างๆ

วัสดุตรึง	ระยะเวลาการตรึง (วัน)	การลดลงของสารประกอบฟีนอลิค (%)	การลดลงของสี (%)
ทะลายปาล์มน้ำมัน	2	65.9 ± 4.6^{c}	64.5 ± 2.5^{d}
	4	74.7 ± 0.9^{b}	70.5 ± 2.9^{c}
	6	59.8 ± 4.8^{d}	63.9 ± 4.3^{d}
	8	$55.0\pm2.2^{d, e}$	64.1 ± 1.6^{d}
	10	50.4 ± 5.0^{e}	57.6 ± 2.2^{e}
เส้นใยปาล์มน้ำมัน	2	$68.2\pm1.2^{b, c}$	54.5 ± 1.6^{e}
	4	78.0 ± 2.7^{a}	80.7 ± 2.8^{b}
	6	80.6 ± 2.2^{a}	94.0 ± 1.1^{a}
	8	$75.1\pm3.5^{a, b}$	93.4 ± 0.4^{a}
	10	72.0 ± 1.6^{b}	93.4 ± 1.0^{a}

หมายเหตุ ตัวอักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

3.4 การเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้ง

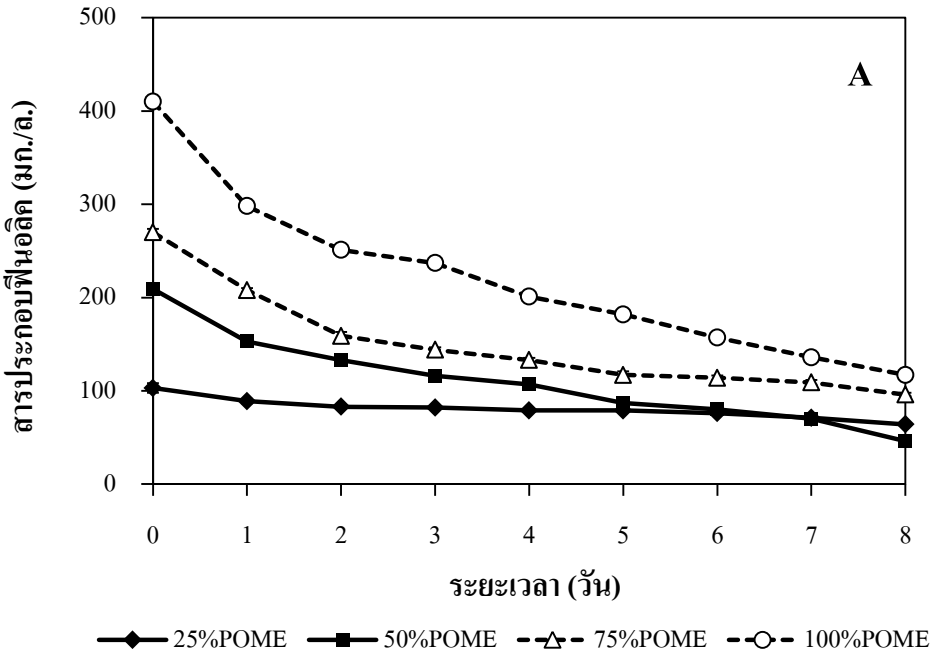
เมื่อได้คัดเลือกวัสดุตรึงและระยะเวลาการตรึงที่เหมาะสมซึ่งได้แก่ ราที่ถูกตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมัน เป็นระยะเวลา 6 วัน จากการทดลองข้างต้นโดยทดสอบกับน้ำทิ้งที่เจือจางความเข้มข้น 50% การศึกษาต่อไปนี้จึงสนใจเพิ่มประสิทธิภาพของเซลล์ตรึงในการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้งที่ยังไม่ผ่านการเจือจางด้วยวิธีการต่าง ๆ ได้แก่ 1) การแปรผันความเข้มข้นน้ำทิ้ง 2) การเติมสารอาหารร่วม 3) การบำบัดแบบสองขั้นตอน และ 4) การปรับตัวของเซลล์ตรึง เพื่อเป็นแนวทางในการประเมินศักยภาพของราตรึงเมื่อถูกนำไปใช้ในการบำบัดน้ำทิ้งของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในระบบบำบัดน้ำเสียจริง

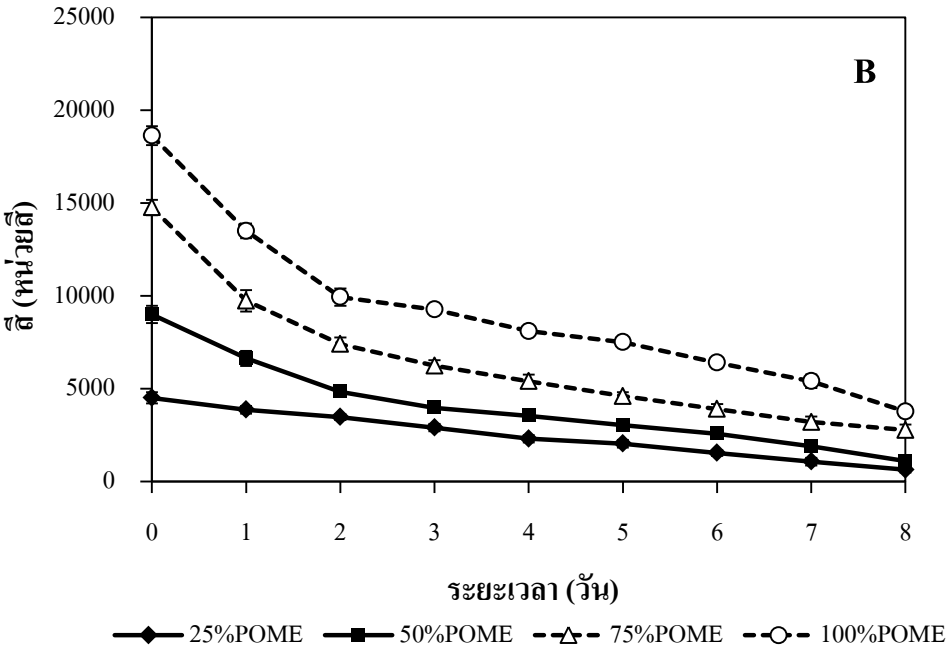
3.4.1 การแปรผันความเข้มข้นน้ำทิ้ง

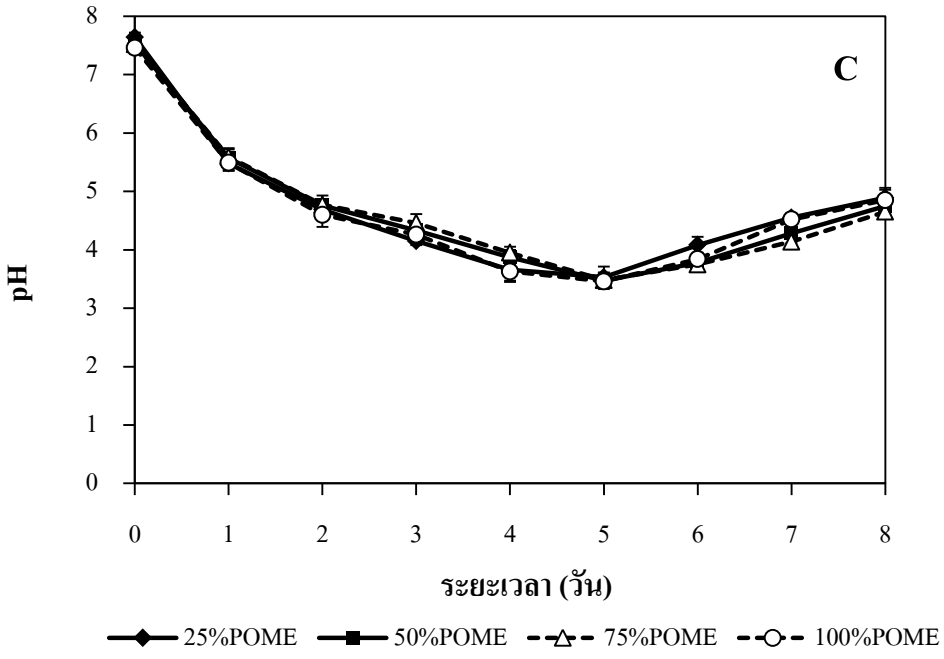
จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันมะกอกที่ไม่ผ่านการเจือจางมีผลยับยั้งการเจริญของราไวท์รอท (Ahmadi *et al*., 2006) ผู้วิจัยจึงเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเซลล์ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมันในการบำบัดน้ำทิ้งที่มีความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิคแตกต่างกัน โดยการแปรผันน้ำทิ้งด้วยน้ำกลั่นให้ได้ระดับความเข้มข้น 25%, 50% 75% และ 100% (ไม่เจือจาง) พบว่าราตรึงสามารถลดสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้งได้อย่างต่อเนื่องทุกระดับความเข้มข้นของน้ำทิ้ง ดังแสดงในรูปที่ 3.17A ทั้งนี้การทดสอบด้วยน้ำทิ้งที่ความเข้มข้นต่ำจะส่งผลให้ประสิทธิภาพในการกำจัดสารประกอบฟีนอลิคลดต่ำลง โดยที่ระดับความเข้มข้นของน้ำทิ้ง 25% ราไวท์รอทตรึงสามารถกำจัดสารประกอบฟีนอลิคได้เพียง 37% ซึ่งต่ำกว่าน้ำทิ้งที่มีความเข้มข้น 50%, 75% และน้ำทิ้งที่ไม่เจือจาง ซึ่งราตรึงสามารถกำจัดสารประกอบฟีนอลิคได้ถึง 64% -77% เนื่องจากการลดความเข้มข้นของน้ำทิ้งทำให้สารอาหารและสารอินทรีย์อื่นๆในน้ำทิ้งถูกเจือจางด้วยเช่นกัน ทำให้มีผลต่อการเจริญของราไวท์รอท และส่งผลให้เกิดการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิคต่ำในน้ำทิ้งที่มีความเข้มข้นต่ำ ในงานวิจัยของ Ahmadi *et al*. (2006) ใช้ราไวท์รอทสายพันธุ์ *Phanerochaete chrysosporium* ที่ถูกตรึงบนใยบวบ เพื่อกำจัดสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันมะกอก พบว่าราไวท์รอทสายพันธุ์ดังกล่าวไม่สามารถเจริญได้ในน้ำทิ้งที่มีความเข้มข้นสูง จึงต้องเติมสารอาหารร่วม เช่น กลูโคส แอมโมเนียมซัลเฟต และ yeast extract ลงในน้ำทิ้งที่มีความเข้มข้น 20 -50% จึงทำให้ราไวท์รอทสายพันธุ์ดังกล่าวย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้งได้ ส่วนประสิทธิภาพในการกำจัดสีของน้ำทิ้งนั้นให้ผลที่ใกล้เคียงกันคือเซลล์ตรึงสามารถกำจัดสีได้อย่างต่อเนื่อง เมื่อบ่มราตรึงกับน้ำทิ้งร่วมกัน ดังแสดงในรูปที่ 3.17B จะเห็นได้ว่าเซลล์ตรึงมีประสิทธิภาพในการกำจัดสีอยู่ในช่วง 79.7% - 87.8% ในวันที่ 8 ของการบ่ม เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิคซึ่งเป็นส่วนหนึ่งที่ทำให้เกิดสีในนำทิ้งถูกย่อยสลายไป อย่างไรก็ตามในน้ำทิ้งยังมีองค์ประกอบอื่น ๆ ที่ทำให้เกิดสีร่วมอยู่ด้วย เช่น สารประกอบ

จำพวกแอนโทไซยานิน แคโรทีน เมลานอยดิน ลิกนิน แทนนิน (Hartley, 1977; Hwang *et al*., 1978; Barker and Worgan, 1981) ซึ่งเป็นสารที่มีมวลโมเลกุลสูง โครงสร้างซับซ้อน สามารถถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ในกลุ่มลิกนิโนไลติก เช่น Laccase, MnP และ LiP ที่สร้างจากราไวท์รอททำให้สีในน้ำทิ้งลดความเข้มลง (Asses *et al*., 2009)

นอกจากการตรวจวัดสีและสารประกอบฟีนอลิคแล้ว การทดลองนี้ยังศึกษาการเปลี่ยนแปลง pH ของน้ำทิ้งตลอดการบำบัดด้วยราไวท์รอทที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมัน เนื่องจาก pH มีผลต่อปฏิกิริยา polymerization ของสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้งซึ่งจะทำให้สีเข้มขึ้น จาการศึกษาพบว่าเริ่มต้น pH ของน้ำทิ้งทุกอัตราการเจือจางอยู่ในช่วงที่เป็นกลางประมาณ 7.5 แต่เมื่อบ่มราตรึงร่วมกับน้ำทิ้งจะพบว่า pH ของน้ำทิ้งจะลดลงอยู่ในช่วงของกรดประมาณ 3.4-3.5 ในวันที่ 5 ของการบ่มเซลล์ตรึงร่วมกับน้ำทิ้งและหลังจากวันที่ 6 ของการบ่ม pH ของน้ำทิ้งจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ดังแสดงในรูปที่ 3.17C การลดลงของ pH นี้อาจมีเป็นผลมาจากการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้งโดยราไวท์รอท ซึ่งทำให้เกิดกรดอินทรีย์ขึ้นในน้ำทิ้ง สอดคล้องกับการทดลองของ Assas e*t al*. (2002) ซึ่งใช้รา *Geotrichum candidum* ในการกำจัดสีของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันมะกอก ซึ่งมีการรายงานว่า pH ของน้ำทิ้งจะลดลงอยู่ในช่วงที่เป็นกรด เกิดจากการที่ราไวท์รอทใช้น้ำตาลและสารอินทรีย์ในน้ำทิ้ง ทำให้เกิดกรดอินทรีย์ซึ่งเป็นสารตัวกลางก่อนเข้าสู่กระบวนการย่อยสลายผ่านวัฏจักเครบส์ (Krebs cycle) อย่างไรก็ตามค่า pH ที่สูงขึ้นในช่วงท้ายของการทดลอง อาจมีสาเหตุมาจากการย่อยสลายสารต่อกลางต่อไปเป็นสารชนิดอื่น หรือเกิดการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิคและสารอินทรีย์อื่นๆ อย่างสมบูรณ์ จึงทำให้กรดอินทรีย์เปลี่ยนเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ (Leonowicz *et al*., 2001)และนอกจากนี้ยังมีการรายงานว่าค่า pH ที่ลดลงช่วยส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวของกับการกำจัดสีได้ดี (Kim and Shoda, 1999) เนื่องจากเป็นค่าpHที่เหมาะสมในการเจริญและสร้างเอนไซม์ของราไวท์รอทซึ่งอยู่ในช่วง 3.5-5.5 (Boyle, 2006)

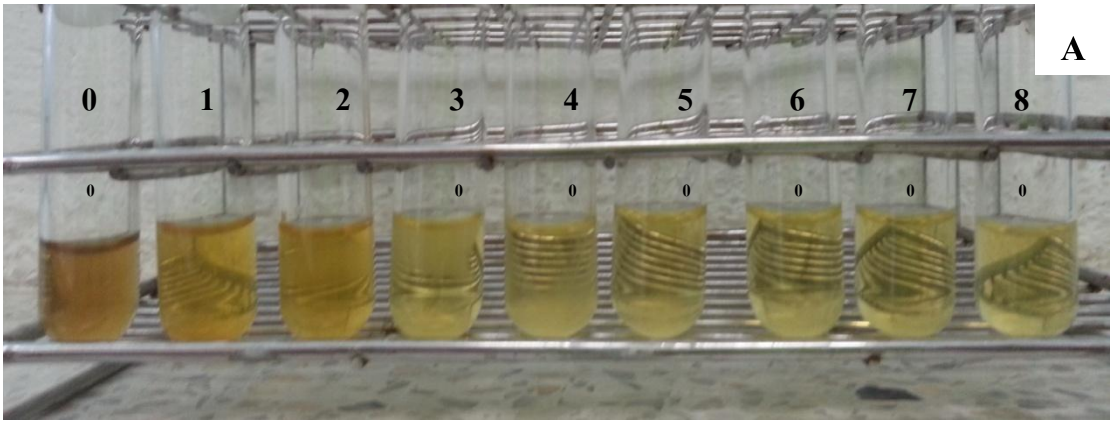

A
สารประกอบฟีนอลิค (มก./ล.)
500
400
300
200
100
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8
ระยะเวลา (วัน)
25%POME
50%POME
75%POME
100%POME

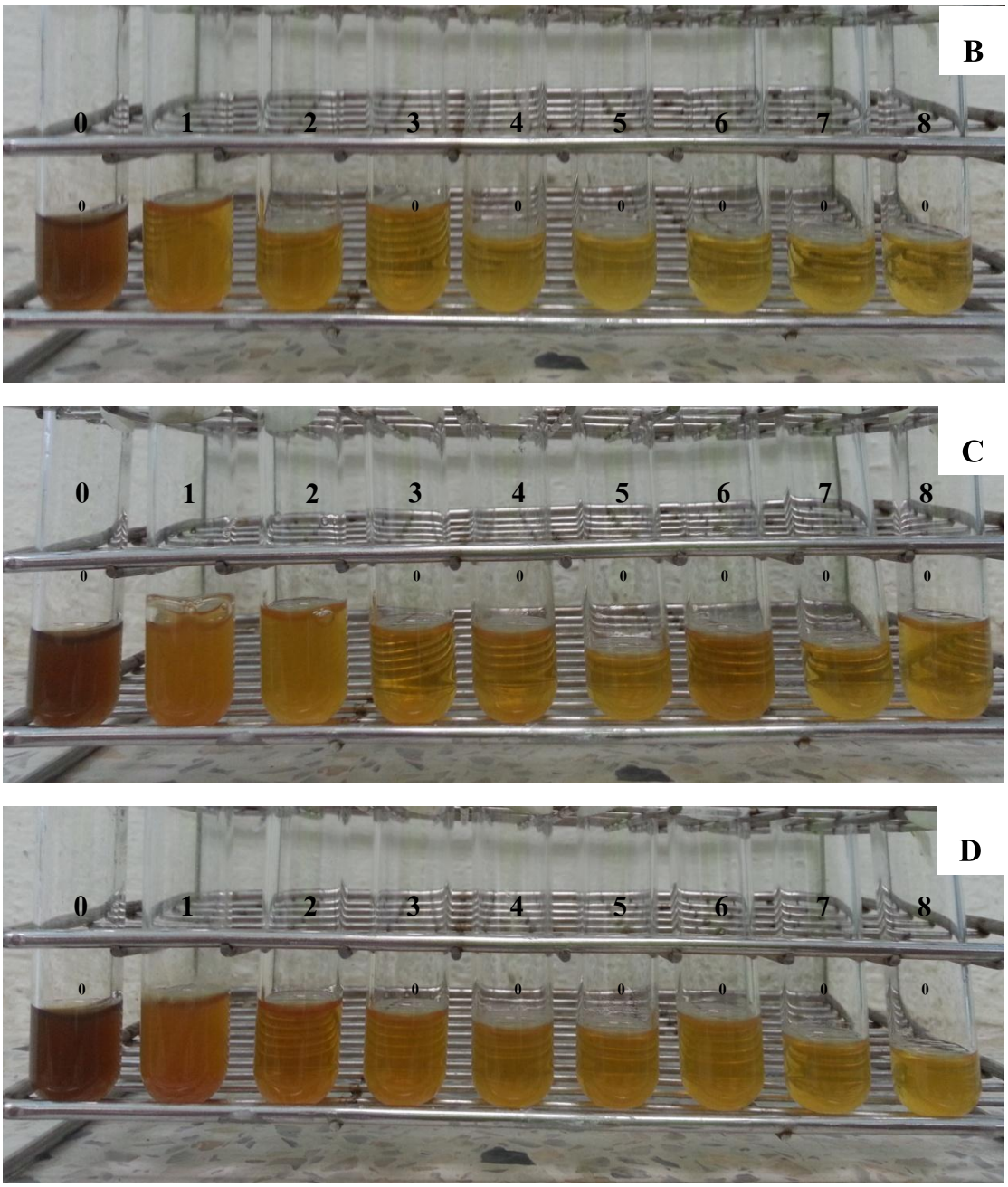

B
สี (หน่วยสี)
25000
20000
15000
10000
5000
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8
ระยะเวลา (วัน)
25%POME
50%POME
75%POME
100%POME



รูปที่ 3.17 การย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิค (A) การกำจัดสี (B) และการเปลี่ยนแปลงpH (C) ในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มความเข้มข้น25%- 100% ของราไวท์รอทสายพันธุ์ *Trametes hirsuta* AK4 ที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมัน บ่มในอุณหภูมิห้อง เขย่า 120 รอบต่อนาที

การลดลงของสีน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ซึ่งเริ่มต้นมีสีน้ำตาลคล้ำ และเมื่อนำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นทำให้ความเข้มของสีลดลงตามอัตราการเจือจาง หลังจากนำมาบำบัดด้วยราไวท์รอทสายพันธุ์ *Trametes hirsuta* AK4 ที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมัน พบว่าสีของน้ำทิ้งจะเปลี่ยนจากสีน้ำตาลคล้ำเป็นสีเหลืองที่มีความเข้มสีแตกต่างกัน ดังแสดงในรูปที่ 3.18A-D





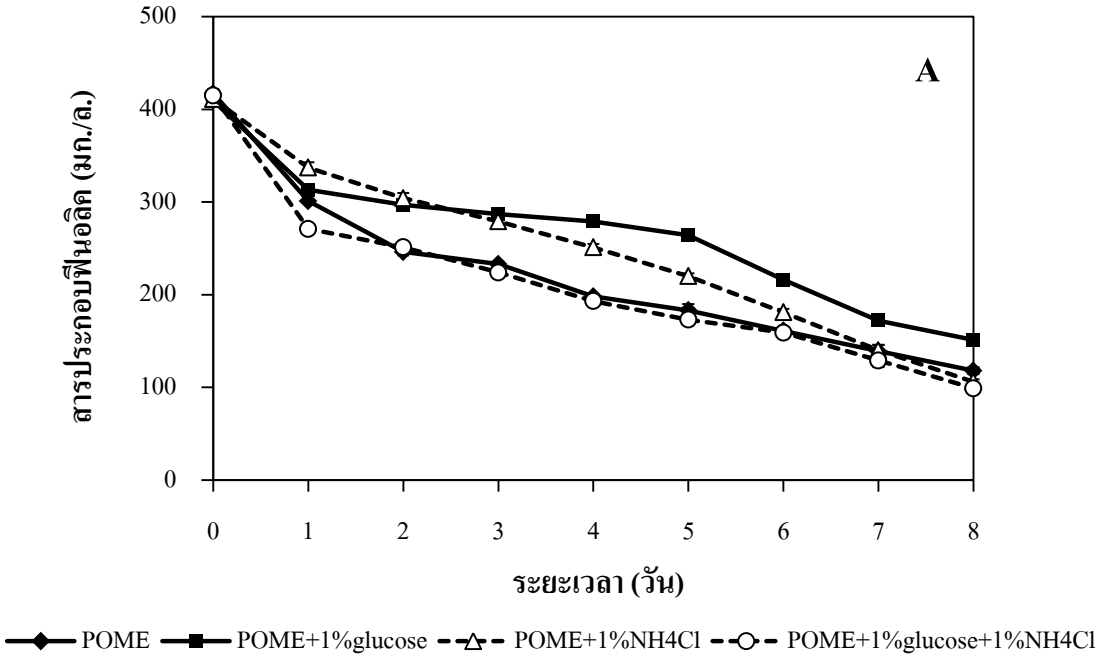
รูปที่ 3.18 การเปลี่ยนแปลงสีของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มความเข้มข้น25% (A), 50% (B) , 75% (C) และ100% (D) ที่ผ่านการบำบัดด้วยราไวท์รอทสายพันธุ์ *Trametes hirsuta* AK4 ที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมัน บ่มเป็นระยะเวลา 0-8 วัน

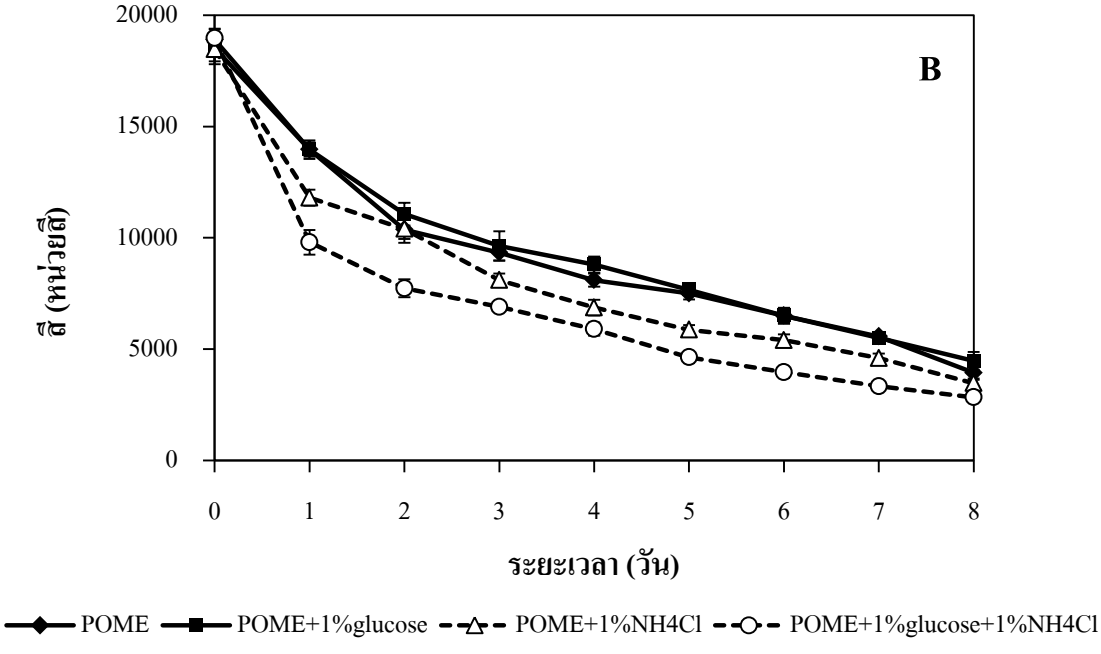
3.4.2 การเติมแหล่งอาหารร่วม

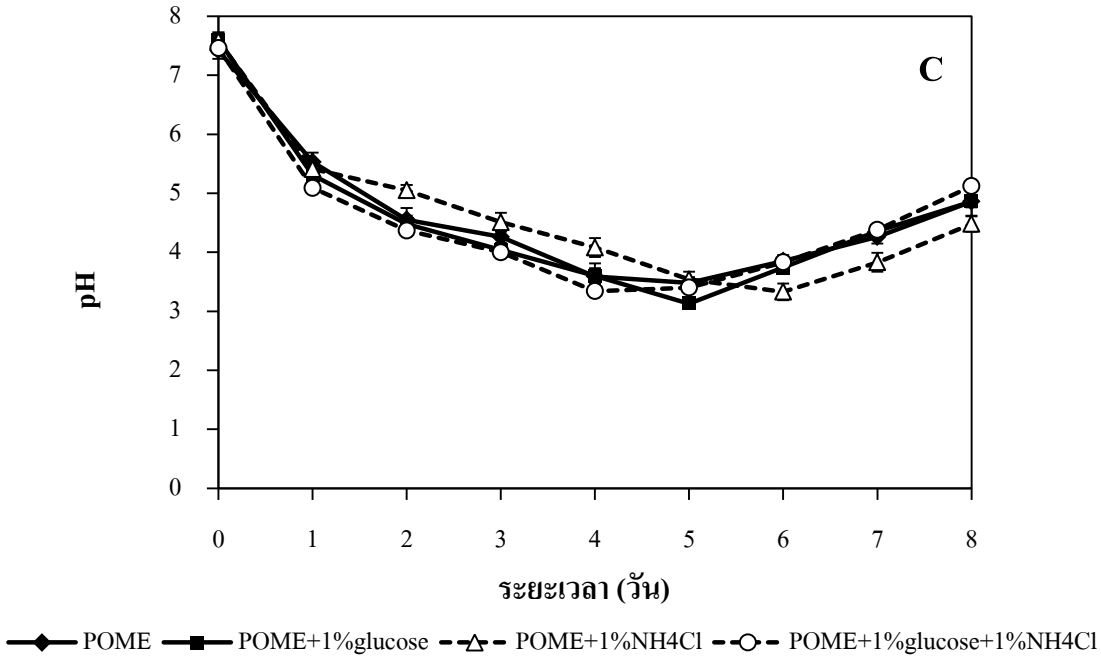
เมื่อนำเซลล์ตรึงของราไวท์รอทมาศึกษาการเติมแหล่งอาหารร่วมโดยการเติมน้ำตาลกลูโคส (1% w/v) หรือ แอมโมเนียมคลอไรด์ (1% w/v) และน้ำตาลกลูโคส (1% w/v) ร่วมกับแอมโมเนียมคลอไรด์ (1% w/v) ลงไปในน้ำทิ้งที่มีความเข้มข้น 100% (ไม่ผ่านการเจือจาง) เพื่อเป็นการเพิ่มเติมแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนให้กับราไวท์รอท พบว่าการเติมน้ำตาลกลูโคส ทำให้ประสิทธิภาพในการกำจัดสารประกอบฟีนอลิคลดลงเหลือ 62.9% ต่ำกว่าน้ำทิ้งที่ไม่เติมน้ำตาลกลูโคส ซึ่งสามารถกำจัดสารประกอบฟีนอลิคได้ 71.4% ในวันที่ 8 ของการบ่มราตรึงร่วมกับน้ำทิ้ง ส่วนการเติมแอมโมเนียมคลอไรด์ เพียงอย่างเดียว และการเติมน้ำตาลกลูโคส ร่วมกับแอมโมเนียมคลอไรด์ ส่งผลให้กำจัดฟีนอลิคได้เพิ่มขึ้นเป็น 74.0% และ 76.1% ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 3.19A ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมส่งผลให้การสร้างเอนไซม์ในกลุ่มลิกนิโนไลติกดีขึ้น (Swamy and Ramsay, 1999)

ส่วนประสิทธิภาพในการกำจัดสีน้ำทิ้งนั้นให้ผลสอดคล้องกับประสิทธิภาพในการกำจัดสารประกอบฟีนอลิค โดยที่น้ำทิ้งที่มีการเติมน้ำตาลกลูโคส เซลล์ตรึงสามารถกำจัดสีได้ 75% (รูปที่ 3.19B) ซึ่งต่ำกว่าน้ำทิ้งที่ไม่เติมน้ำตาลกลูโคสซึ่งสามารถกำจัดสีได้ถึง 79.2% ส่วนการเติมแอมโมเนียมคลอไรด์ เพียงอย่างเดียวและการเติมน้ำตาลกลูโคสร่วมกับแอมโมเนียมคลอไรด์ ส่งผลให้กำจัดสีได้เพิ่มขึ้นเป็น 81.1% และ 85.0% ตามลำดับ จากผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาของ Gomathi, *et al.* (2012) ซึ่งทำการศึกษาการกำจัดสีของน้ำทิ้งโรงงานกระดาษด้วยราตรึงของ *Phanerochaete chrysosporium* พบว่าการเติมแหล่งคาร์บอนร่วม เช่น น้ำตาลซูโครส จะทำให้ประสิทธิภาพการกำจัดสีต่ำกว่าการไม่เติมแหล่งคาร์บอนร่วม เนื่องจากราไวท์รอทสามารถใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งอาหารได้ง่ายกว่าการใช้สารอินทรีย์ในน้ำทิ้ง จึงเลือกที่จะใช้น้ำตาลกลูโคสเพื่อใช้ในการเจริญแทนการย่อยสลายสารอินทรีย์ที่ย่อยสลายยากกว่า เช่น สารประกอบฟีนอลิคหรือรงควัตถุอื่น ๆ ในน้ำทิ้ง ดังนั้นจึงไม่มีความจำเป็นที่จะต้องเติมแหล่งคาร์บอนร่วมในการบำบัดสีของน้ำทิ้ง

นอกจากนี้น้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่มีการเติมแหล่งอาหารร่วมและไม่เติมแหล่งอาหารร่วมมีการลดลงของ pH โดยลดลงจากประมาณ 7.5 มาเป็น 3.1-3.5 ในวันที่ 5 ของการบ่มราตรึงร่วมกับน้ำทิ้ง และค่อยๆเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในวันที่ 6-8 ของการบ่ม จนอยู่ในช่วง4.8-5.1 น้ำทิ้งที่เติมแอมโมเนียมคลอไรด์ 1% w/v จะมีการเปลี่ยนแปลงของ pH ที่ช้ากว่าการเติมสารชนิดอื่นดังแสดงในรูปที่ 3.19C การเปลี่ยนแปลงpH ของน้ำทิ้งที่มีการเติมแหล่งอาหารร่วมให้ผลสอดคล้องกับการเจือจางความเข้มข้นน้ำทิ้ง

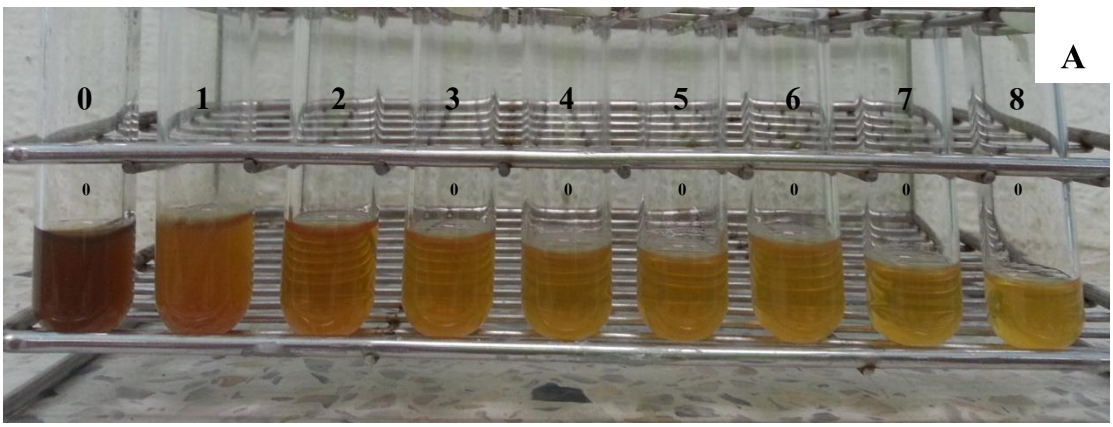

A
สารประกอบฟีนอลิค (มก./ล.)
500
400
300
200
100
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8
ระยะเวลา (วัน)
POME
POME+1%glucose
POME+1%NH4Cl
POME+1%glucose+1%NH4Cl

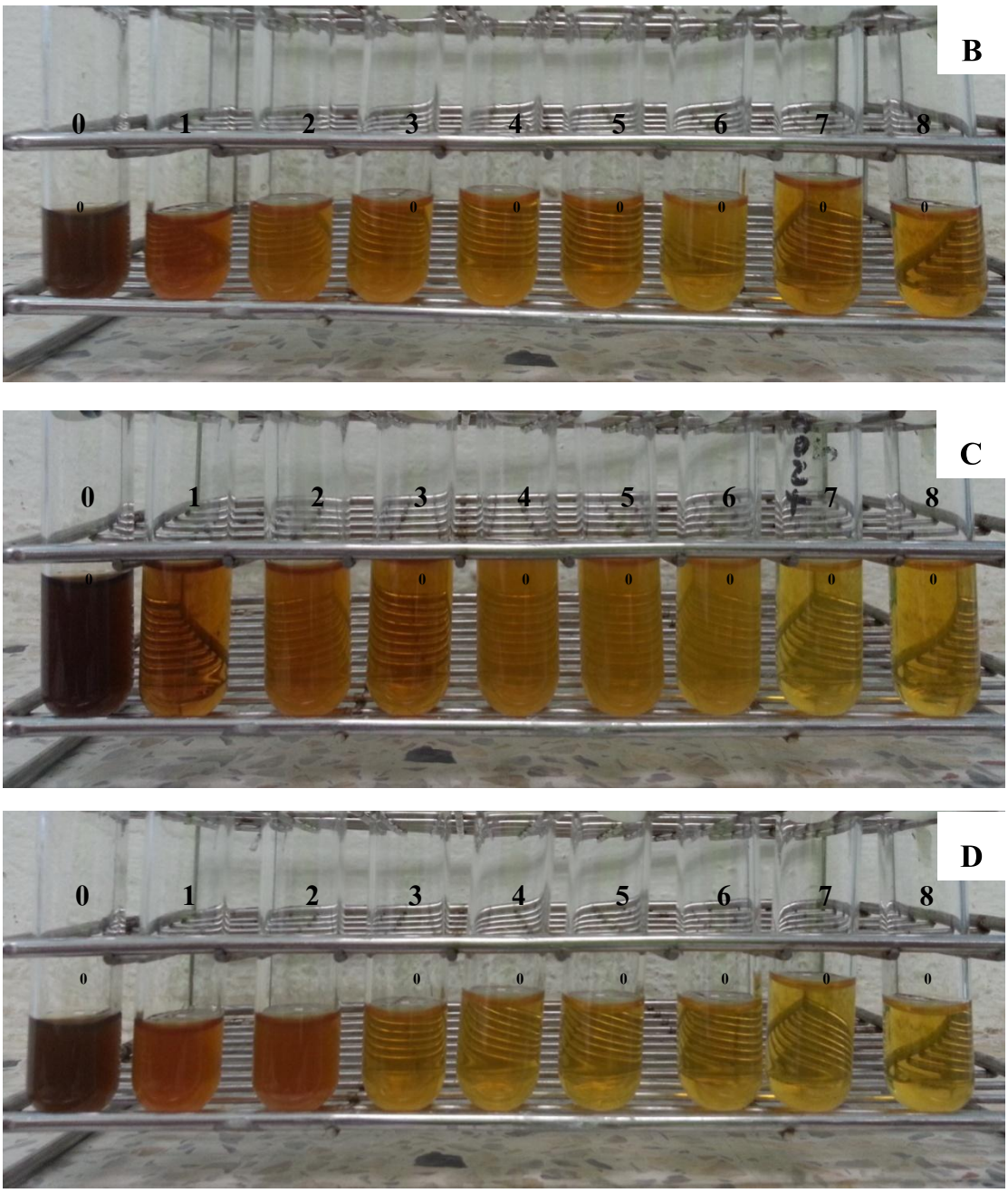

B
สี (หน่วยสี)
20000
15000
10000
5000
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8
ระยะเวลา (วัน)
POME
POME+1%glucose
POME+1%NH4Cl
POME+1%glucose+1%NH4Cl



รูปที่ 3.19 การย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิค (A) การกำจัดสี (B) และการเปลี่ยนแปลงpH (C) ในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่มีการเติมแหล่งอาหารร่วม C และ N ต่างๆ ของราไวท์รอท *Trametes hirsuta* AK4 ที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมัน บ่มในอุณหภูมิห้อง เขย่า 120 รอบต่อนาที

ลักษณะการลดลงของสีน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มหลังจากบำบัดด้วยราไวท์รอทสายพันธุ์ *Trametes hirsuta* AK4 ที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมัน เมื่อนำมาเติมกลูโคสหรือแอมโมเนียมคลอไรด์เพื่อเป็นแหล่งอาหารร่วมของราไวท์รอทลงในน้ำทิ้ง พบว่าสีของน้ำทิ้งจะเปลี่ยนจากสีน้ำตาลคล้ำเป็นสีเหลืองที่มีความเข้มสีแตกต่างกัน และความเข้มสีลดลงตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 3.20A-D เช่นเดียวกับการเปลี่ยนแปลงสีของน้ำทิ้งที่มีการแปรผันความเข้มข้น





รูปที่ 3.20 การเปลี่ยนแปลงสีของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม (A), น้ำทิ้งที่เติมน้ำตาลกลูโคส 1% w/v (B) ,น้ำทิ้งที่เติมแอมโมเนียมคลอไรด์ 1% w/v (C) และน้ำทิ้งที่เติมน้ำตาลกลูโคส 1% w/v ร่วมกับแอมโมเนียมคลอไรด์ 1% w/v (D) ที่ผ่านการบำบัดด้วยราไวท์รอทสายพันธุ์ *Trametes hirsuta* AK4 ที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมัน

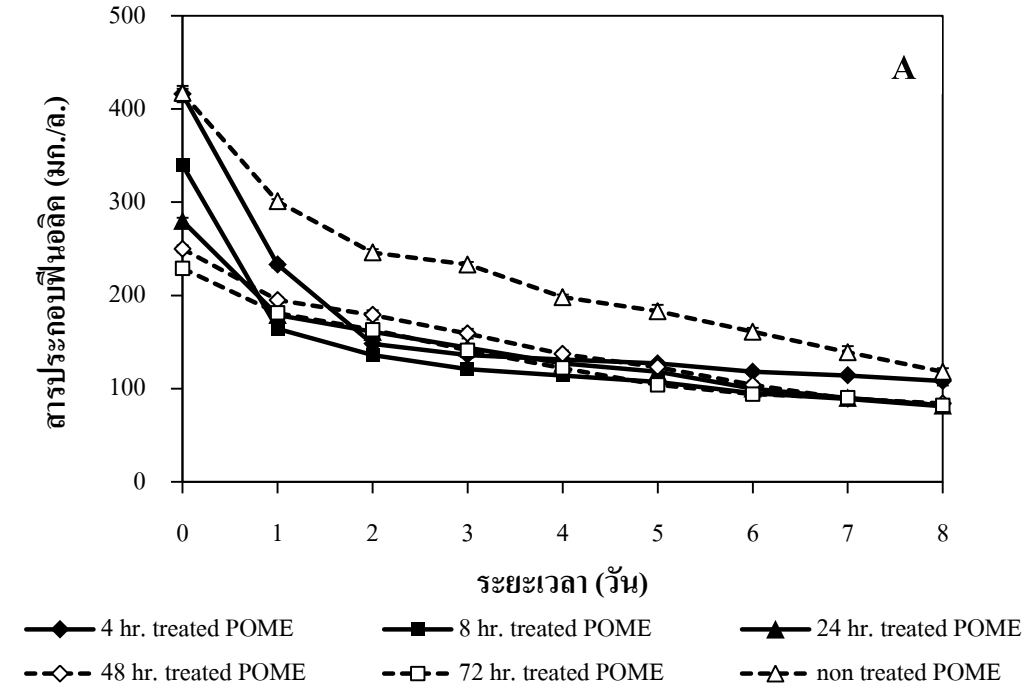
3.4.3 การบำบัดน้ำทิ้งแบบสองขั้นตอน

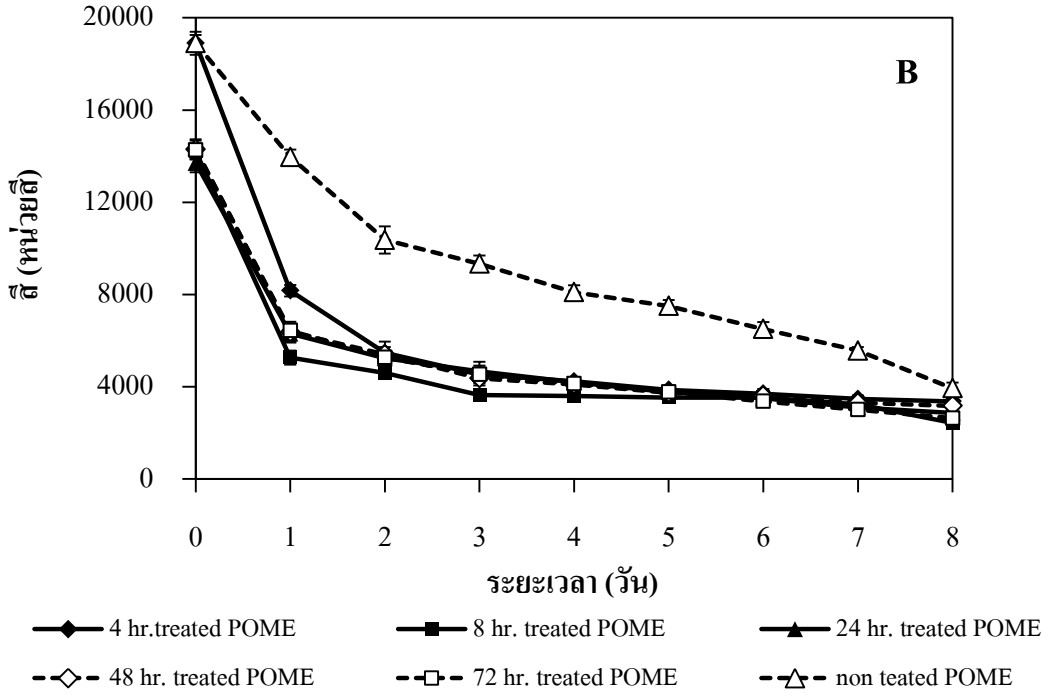
จากการศึกษาของพนิดา โต๊ะสู (**2555**) ใช้แบคทีเรียผสม *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 ซึ่งเป็นแบคทีเรียย่อยสลายฟีนอล (phenol-degrading bacteria) มาตรึงบนวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมันเพื่อประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำทิ้งที่มีการปนเปื้อนของฟีนอล ได้แก่ น้ำทิ้งของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม พบว่าเซลล์ตรึงบนทะลายปาล์มเปล่าที่ผ่านการกระตุ้นโดยการเลี้ยงในอาหาร carbon free mineral medium (CFMM) ที่มีการเติมฟีนอล 10 มก./ล. สามารถลดปริมาณฟีนอลในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มได้ 64 % ภายในเวลา 7 วัน ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะนำผลการศึกษาดังกล่าวมาประยุกต์ใช้ร่วมกับการบำบัดด้วยราไวท์รอทที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมัน ซึ่งเป็นการบำบัดแบบ 2 ขั้นตอน โดยขั้นต้น (Pretreatment) บำบัดน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มด้วยแบคทีเรียผสมที่ตรึงบนทะลายปาล์มเปล่าตามวิธีการของพนิดา โต๊ะสู (2555) โดยต้องการบำบัดสารประกอบฟีนอลิคขั้นต้นให้มีความเข้มข้นลดลง เพื่อลดความเป็นพิษของสารประกอบดังกล่าวที่อาจส่งผลต่อการเจริญและการสร้างเอนไซม์ของราไวท์รอท แล้วจึงนำน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นมาบำบัดต่อด้วยราไวท์รอท *Trametes hirsuta* AK4 ที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมัน

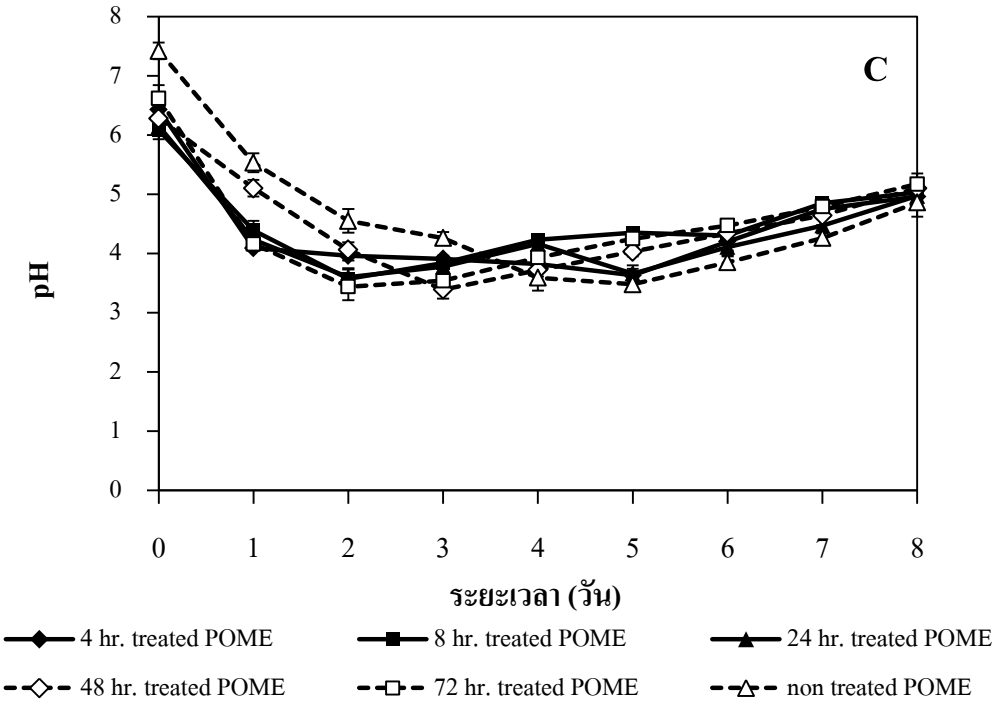
น้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นด้วยแบคทีเรียผสมที่ถูกตรึงบนทะลายปาล์มเปล่า ซึ่งแปรผันระยะเวลาการบำบัดที่ 4, 8, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าทำให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้งลดลงเหลือ 90%, 75%, 60% 55% และ 50% ตามลำดับ จากเริ่มต้นที่มีความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้งประมาณ 461 มก./ล. และมื่อนำน้ำที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นแล้วมาบำบัดต่อด้วยเซลล์ตรึงของราไวท์รอท *Trametes hirsuta* AK4 ที่ถูกตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมัน พบว่าราไวท์รอทที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมันสามารถกำจัดสารประกอบฟีนอลิคที่เหลือได้อย่างรวดเร็วหลังจากการบ่มน้ำทิ้งร่วมกับราตรึงเป็นเวลา 1 วัน และค่อยๆ ลดอย่างต่อเนื่องจนถึงวันที่ 8 ของการบ่ม ซึ่งเหลือสารประกอบฟีนอลิค อยู่ในช่วง 81.6-84.7 มก./ล. คิดเป็น 81.6-82.2% ในน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นด้วยแบคทีเรียตรึงเป็นระยะเวลา 8-72 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 3.21A การลดลงของสารประกอบฟีนอลิคของน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นจะลดลงอย่างรวดเร็วกว่าน้ำทิ้งที่ไม่ผ่านการบำบัดขั้นต้นในช่วง 4 วันแรกของการบ่มน้ำทิ้งร่วมกับราตรึง ซึ่งน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นเพียง 8 ชั่วโมงให้ประสิทธิภาพการกำจัดสารประกอบฟีนอลิคใกล้เคียงกับระยะเวลาการบำบัดขั้นต้นที่นานกว่า ดังนั้นการบำบัดน้ำทิ้งขั้นต้นด้วยแบคทีเรียตรึงเป็นระยะเวลา 8 ชั่วโมงจึงเพียงพอและเหมาะสมสำหรับการบำบัดน้ำทิ้งขั้นต้นก่อนที่จะบำบัดด้วยราไวท์รอทที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมันต่อไป

สำหรับประสิทธิภาพของราไวท์รอทตรึงในการกำจัดสีน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นแล้ว พบว่าน้ำทิ้งที่ผ่านบำบัดขั้นต้นมีสีเริ่มต้นที่ไม่เท่ากัน เนื่องจากการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิคและสารสีอินทรีย์อื่น ๆ ไปบางส่วนโดยแบคทีเรียตรึง รวมทั้งการดูดซับสีของทะลายปาล์มเปล่าในระหว่างการบำบัดขั้นต้น ทำให้น้ำทิ้งซึ่งมีค่าความเข้มสีเริ่มต้นประมาณ 14,000 หน่วยสี ถูกกำจัดให้ลดลงประมาณ 25% ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของพนิดา โต๊ะสู (2555) และเมื่อผ่านการบำบัดด้วยราตรึงจะพบว่าสีของน้ำทิ้งจะลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 1-2 ของการบ่มน้ำทิ้งร่วมกับราตรึง ดังแสดงในรูปที่ 3.21B และค่อย ๆ ลดลงเล็กน้อยจนถึงวันที่ 8 ของการบ่ม โดยลดลงเหลือ 2,433-3,366 หน่วยสี คิดเป็น 79.7-87.1% ซึ่งสีของน้ำทิ้งจะเปลี่ยนจากสีน้ำตาลคล้ำเป็นสีเหลืองที่มีความเข้มสีแตกต่างกันดังแสดงในรูปที่ 3.22 และเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการกำจัดสีของราตรึงในน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นกับน้ำทิ้งที่ไม่ผ่านการบำบัดขั้นต้นพบว่า ราตรึงสามารถกำจัดสีในน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นได้สูงกว่าในช่วงแรกของการบ่มน้ำทิ้งร่วมกับราตรึงและค่อนข้างคงที่ตั้งแต่วันที่ 3 ของการบ่มจนสิ้นสุดการศึกษา จะเห็นได้ว่าการกำจัดสารประกอบฟีนอลิคออกจากน้ำทิ้งเพียงบางส่วน สามารถส่งเสริมอัตราการย่อยสลายสารสีโดยราไวท์รอทในขั้นตอนต่อมาให้เร็วขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาซึ่งรายงานว่าสารประกอบฟีนอลิคมีผลยับยั้งการเจริญและการสร้างเอนไซม์ในราไวท์รอทหลายชนิด ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ราไวท์รอทยังไม่สามารถกำจัดสีในน้ำเสียที่มีสารประกอบฟีนอลิคเป็นองค์ประกอบได้อย่างมีประสิทธิภาพ เช่น น้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันมะกอก เป็นต้น

ค่า pH ของน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นมีค่าที่ใกล้เคียงกันโดยอยู่ในช่วงที่เป็นกลางแต่เมื่อนำมาบำบัดต่อด้วยราตรึง pH ของน้ำทิ้งจะลดลงอยู่ในช่วงที่เป็นกรดประมาณ 3.5-3.9 ในวันที่ 3 ของการบ่มน้ำทิ้งร่วมกับราตรึง ซึ่งเกิดจากการย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำทิ้งเกิดเป็นกรดอินทรีย์จึงส่งผลให้น้ำทิ้งมี pH ลดลง แต่เมื่อวันที่ 4 ของการบ่ม pH จะปรับตัวเพิ่มขึ้นเล็กน้อยจนถึงวันที่ 8 ของการบ่ม pHของน้ำทิ้งจะอยู่ที่ 4.9-5.1 ดังแสดงในรูปที่ 3.22C โดยผลการทดลองมีความสอดคล้องกับการทดลองการแปรผันความเข้มข้นน้ำทิ้งและการเติมอาหารร่วม

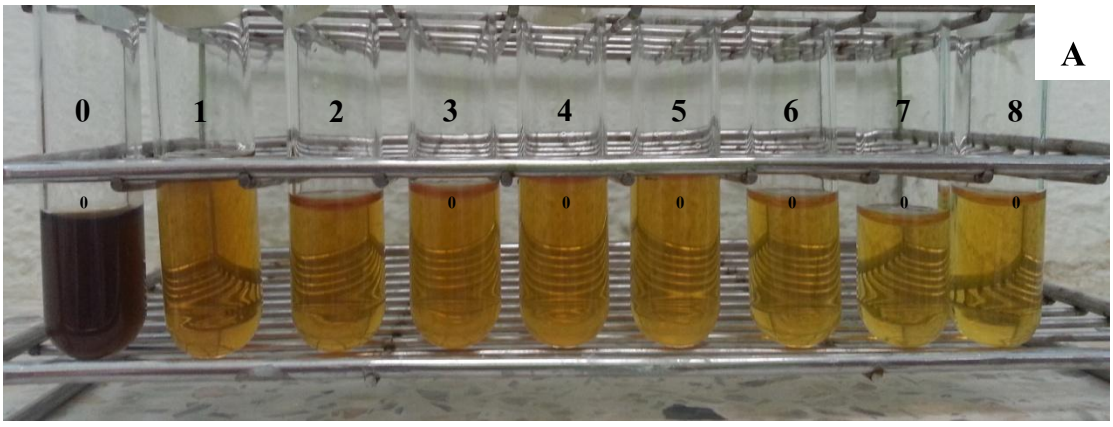

A
สารประกอบฟีนอลิค (มก./ล.)
500
400
300
200
100
0
0
1
2
3
4
5
6
7
8
ระยะเวลา (วัน)
4 hr. treated POME
8 hr. treated POME
24 hr. treated POME
48 hr. treated POME
72 hr. treated POME
non treated POME

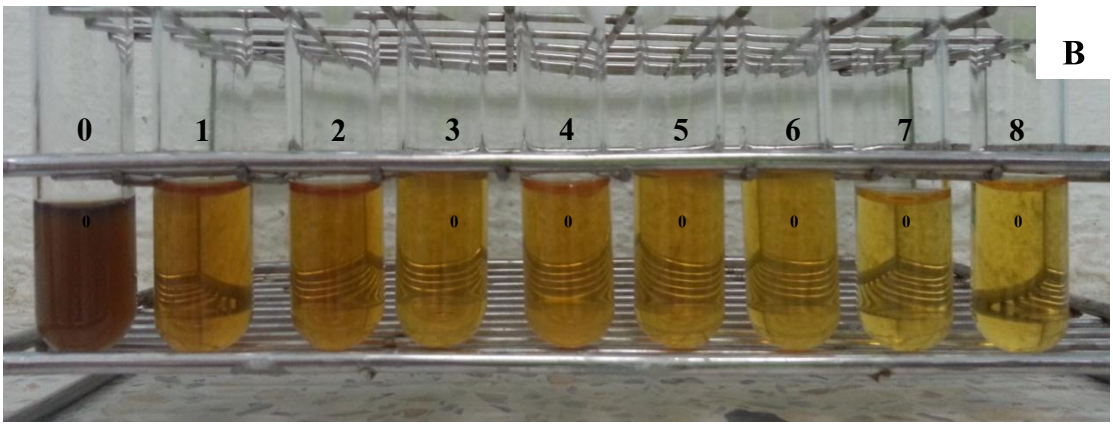

B
สี (หน่วยสี)
20000
16000
12000
8000
4000
0
0
1
2
3
4
5
6
7
8
ระยะเวลา (วัน)
4 hr.treated POME
8 hr. treated POME
24 hr. treated POME
48 hr. treated POME
72 hr. treated POME
non teated POME

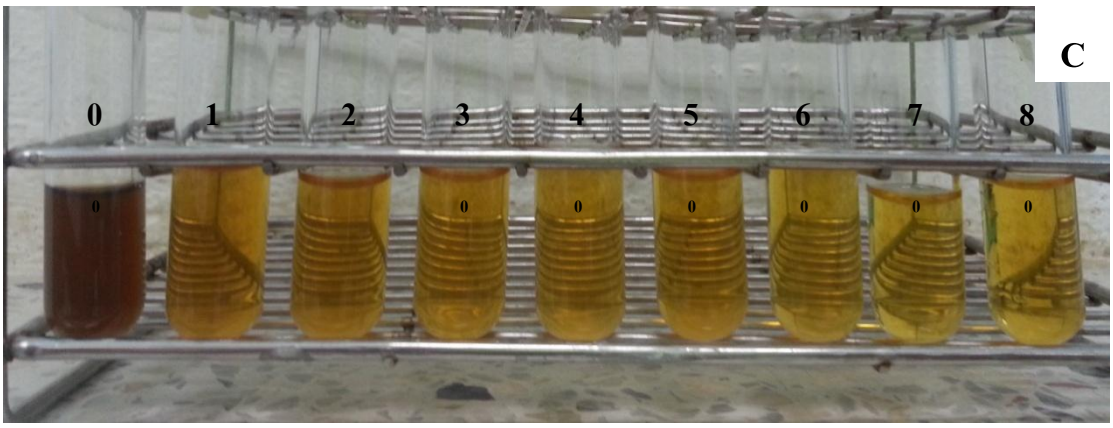


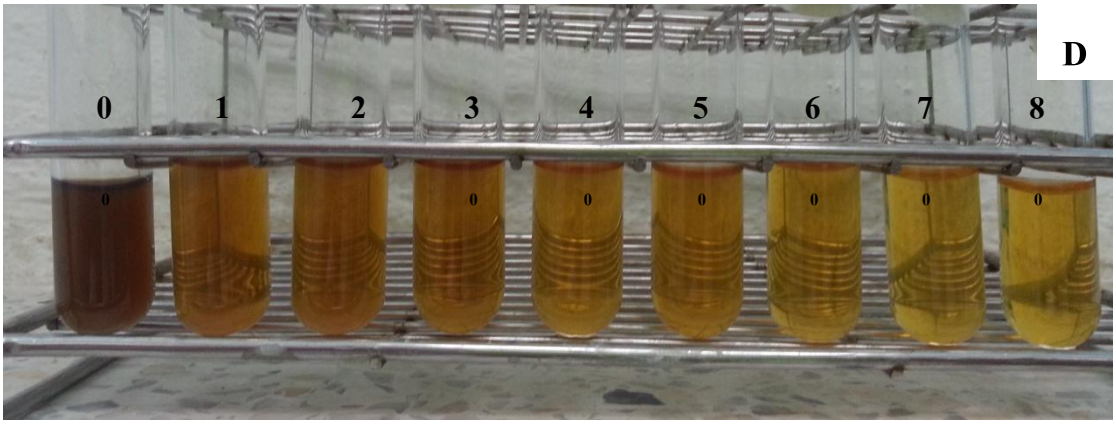
รูปที่ 3.21 การย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิค (A) การกำจัดสี (B) และการเปลี่ยนแปลง pH (C) ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นด้วยแบคทีเรียย่อยสลายฟีนอลเป็นระยะเวลา 4- 72 ชม. และบำบัดต่อโดยใช้ราไวท์รอทสายพันธุ์ *Trametes hirsuta* AK4 ที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมัน บ่มในอุณหภูมิห้อง เขย่า 120 รอบต่อนาที

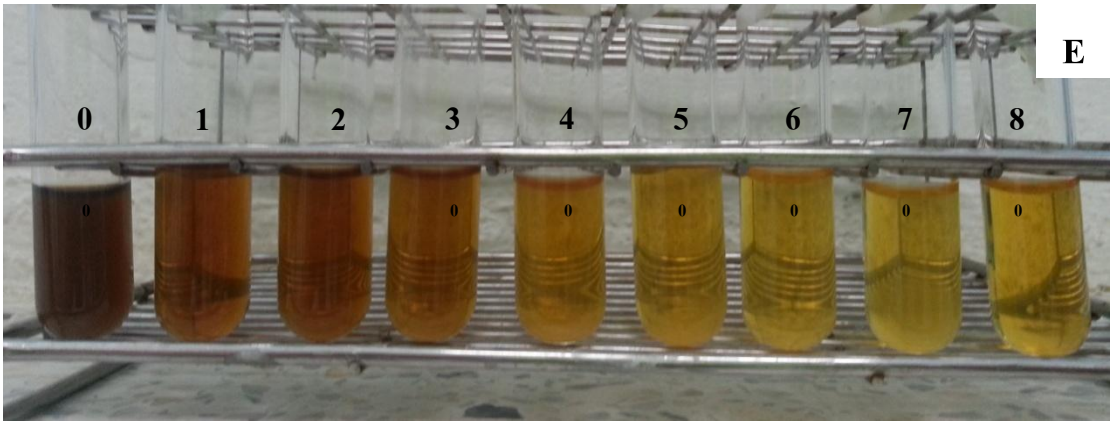
สีของน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นด้วยแบคทีเรียผสม *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 มีความเข้มสีที่ลดลงเล็กน้อย แต่น้ำทิ้งยังคงมีสีน้ำตาลคล้ำ หลังจากบ่มน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นร่วมกับราตรึงสีของน้ำทิ้งมีการเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่อน ดังแสดงในรูปที่ 3.22 ซึ่งการบำบัดแบบสองขั้นตอนให้ผลของสีที่ลดลงมากกว่าการทดลองการแปรผันความเข้มข้นน้ำทิ้งและการเติมอาหารร่วม

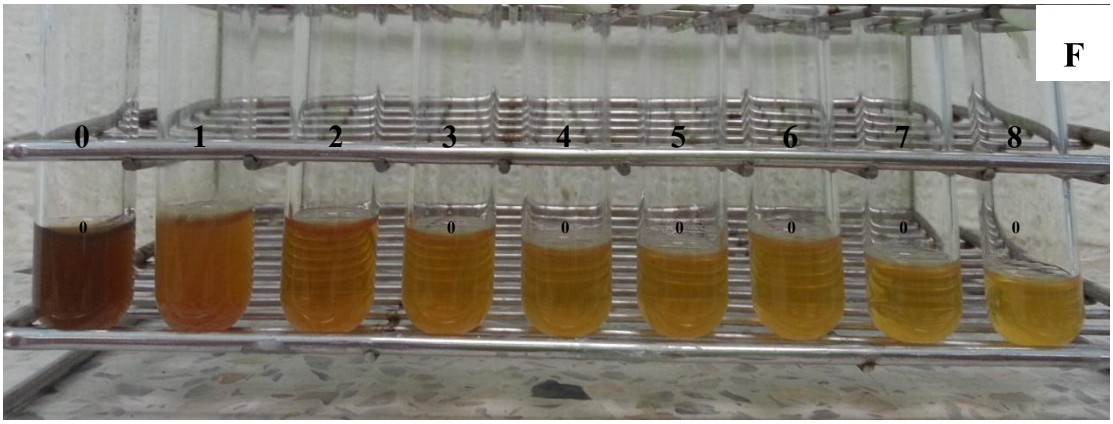



B
0 1 2 3 4 5 6 7 8


C
0 1 2 3 4 5 6 7 8


D
0 1 2 3 4 5 6 7 8


E
0 1 2 3 4 5 6 7 8



รูปที่ 3.22 การเปลี่ยนแปลงสีของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นด้วยแบคทีเรียย่อยสลายฟีนอลที่ระยะเวลา 4 ชม. (A), 8 ชม. (B) , 24 ชม. (C), 48 ชม. (D), 72 ชม. (E) และบำบัดต่อด้วยราไวท์รอทสายพันธุ์ *Trametes hirsuta* AK4 ที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมัน เปรียบเทียบกับน้ำทิ้งที่ไม่ผ่านการบำบัด (F) เมื่อบ่มเป็นระยะเวลา 0-8 วัน

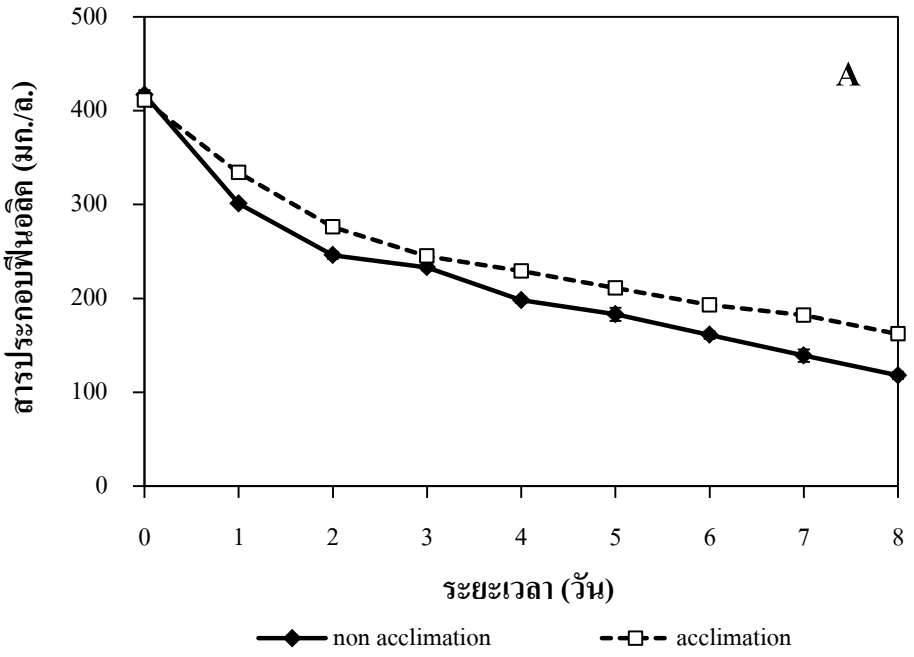
3.4.4 การปรับตัวของเซลล์ตรึง

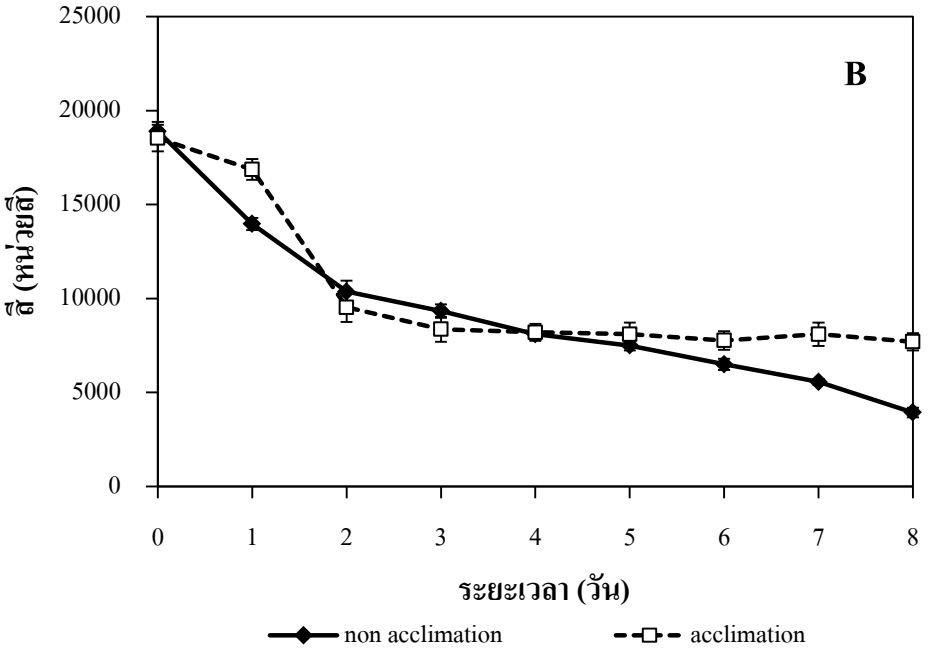
ราไวท์รอทที่ถูกตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมันเป็นระยะเวลา 6 วันถูกนำมาศึกษาการปรับตัวของเซลล์ตรึง โดยการเลี้ยงเซลล์ตรึงในน้ำทิ้งจากความเข้มข้นต่ำไปจนความเข้มข้นสูงเป็นระยะเวลา 3 วันในแต่ละความเข้มข้น เพื่อให้ราตรึงมีการปรับสภาพตามความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิคที่สูงขึ้น โดยศึกษาประสิทธิภาพในการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลิคเปรียบเทียบกับราตรึงที่ไม่ผ่านการปรับตัว พบว่าราตรึงที่มีการปรับตัวให้ประสิทธิภาพในการกำจัดสารประกอบฟีนอลิคเพียง 60.3% เมื่อบ่มราตรึงร่วมกับน้ำทิ้งเป็นเวลา 8 วัน ซึ่งต่ำกว่าราตรึงที่ไม่ผ่านการปรับตัวที่ให้ประสิทธิภาพในการกำจัดสารประกอบฟีนอลิคถึง 71.4% ดังแสดงในรูปที่ 3.23A

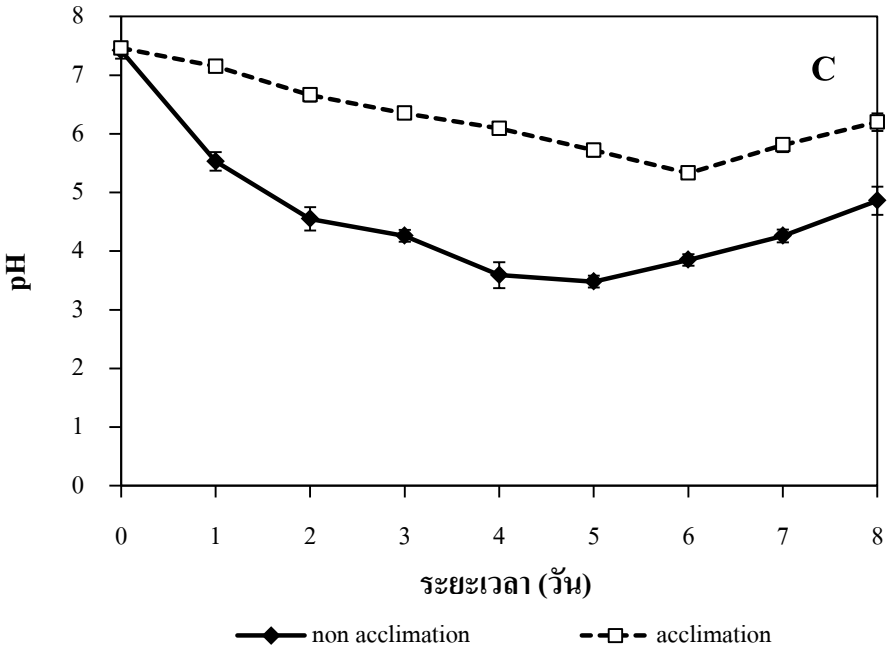
ประสิทธิภาพในการกำจัดสีน้ำทิ้งของราไวท์รอทที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมันแบบผ่านการปรับตัวจะกำจัดสีได้อย่างต่อเนื่องจนถึงวันที่ 3 ของการบ่มน้ำทิ้งร่วมกับราตรึง และค่อนข้างจะคงที่จนถึงวันที่ 8 ของการบ่ม ซึ่งต่างจากราตรึงแบบไม่ปรับตัวซึ่งมีการกำจัดสีน้ำทิ้งอย่างต่อเนื่องจนถึงวันที่ 8 ของการบ่ม ดังแสดงในรูปที่ 3.23B ทั้งนี้ประสิทธิภาพในการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลิคที่ลดลงของราตรึงที่ผ่านการปรับตัวอาจเกิดจากระยะเวลาของราตรึงที่มากขึ้นในช่วงที่ปรับตัวทำให้เส้นใยราที่เจริญมีความหนาแน่นมากขึ้นจึงส่งผลให้การแพร่ผ่านของสารและออกซิเจนลดน้อยลง สารประกอบฟีนอลิคและสีในน้ำทิ้งจึงถูกกำจัดได้น้อยลง ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวแตกต่างกับการทดลองของ Lu *et al*., (2009) ซึ่งใช้ราไวท์รอท *Phanerochaete chrysosporium* ตรึง

บนเศษไม้และถูกทำให้แห้งด้วย vacuum freeze desiccators เพื่อการเก็บรักษาราตรึงไว้ได้เป็นระยะเวลา 9 เดือนแล้วนำราตรึงที่เก็บรักษาไว้มาผ่านการกระตุ้นด้วยสารฟีนอลและปรับตัวในน้ำทิ้งของโรงงานถ่านหินที่เจือจาง 50% ก่อนใช้บำบัดสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้งที่ไม่ได้เจือจาง พบว่าสามารถกำจัดสารประกอบฟีนอลิคได้ถึง 87.05% ในระยะเวลาการบ่ม 6 วัน ทั้งนี้ผลการทดลองที่แตกต่างกันอาจเนื่องมาจากชนิดของราไวท์รอท ระยะเวลาในการตรึงเซลล์ และองค์ประกอบของน้ำเสียที่แตกต่างกัน

นอกจากนี้น้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่บำบัดด้วยราไวท์ตรึงที่ผ่านการปรับตัว มีการเปลี่ยนแปลง pH เพียงเล็กน้อย โดยลดลงจาก 7.46 เหลือ 5.33 ในวันที่ 6 ของการบ่มร่วมกันของราตรึงกับน้ำทิ้ง และ pH เพิ่มขึ้นเล็กน้อยในวันที่ 7 และ 8 ของการบ่ม ดังแสดงในรูปที่ 3.23C ซึ่งแตกต่างจากราตรึงแบบไม่ปรับตัวที่มีการลดลงของ pH อย่างต่อเนื่องและปรับสูงขึ้นในวันที่6 ถึง 8 ของการบ่ม ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของ pH ส่งผลต่อการย่อยสลายทางชีวภาพด้วยราไวท์รอท โดยราไวท์รอทสามารถเจริญและย่อยสลายสารได้ดีในช่วง 3.5-5.5 (Boyle, 2006)

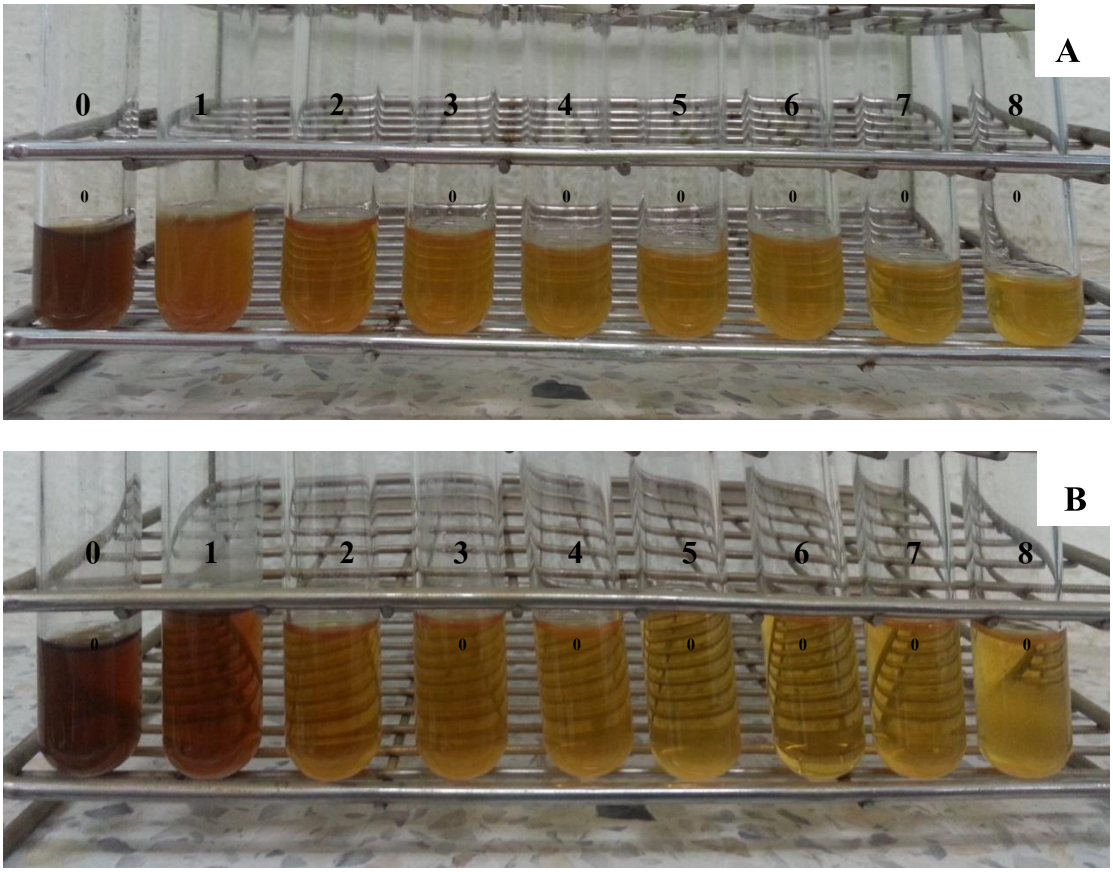






รูปที่ 3.23 การย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิค (A) การกำจัดสี (B) และการเปลี่ยนแปลง pH (C) ในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่บำบัดด้วย *Trametes hirsuta* AK4 ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมันที่ผ่านและไม่ผ่านการปรับตัว บ่มในอุณหภูมิห้อง เขย่า 120 รอบต่อนาที

สำหรับลักษณะการเปลี่ยนแปลงสีของน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดด้วยราไวท์รอทสายพันธุ์ *Trametes hirsute* AK4 ที่ถูกตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมันแบบที่ผ่านการปรับตัว มีการลดลงของสีที่ต่ำกว่าการทดลองการแปรผันความเข้มข้นน้ำทิ้ง การเติมอาหารร่วม และการบำบัดแบบสองขั้นตอน น้ำทิ้งมีการเปลี่ยนแปลงจากสีน้ำตาลคล้ำเป็นสีเหลืองที่มีระดับความเข้มสีที่แตกต่างกันดังแสดงในรูปที่ 3.24A และ B



รูปที่ 3.24 การเปลี่ยนแปลงสีของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ผ่านการบำบัดด้วยราไวท์รอทสายพันธุ์ *Trametes hirsuta* AK4 ที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมัน แบบไม่ปรับตัว (A) และแบบปรับตัว (B)

จากการทดลองในการเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มของราไวท์รอทสายพันธุ์ *Trametes hirsuta* AK4 ที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมัน ด้วยวิธีต่างๆ พบว่าการบำบัดแบบสองขั้นตอนโดยการบำบัดขั้นต้นด้วยแบคทีเรียผสม *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 ที่ถูกตรึงบนทะลายปาล์มเปล่าเป็นระยะเวลา 8 ชั่วโมง แล้วบำบัดต่อด้วยราตรึงจะให้ประสิทธิภาพในการกำจัดสารประกอบฟีนอลิคสูงถึง 82.2% และให้ประสิทธิภาพในการกำจัดสีสูงถึง 87% ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) ดังแสดงในตารางที่3.5 เนื่องจากการบำบัดขั้นต้นด้วยแบคทีเรียผสมจะย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้ง ซึ่งช่วยลดความเป็นพิษที่จะเกิดขึ้นต่อราตรึง ทำให้ราตรึงสามารถเจริญและย่อยสลายสารอื่นๆที่ก่อให้เกิดสีในน้ำทิ้งได้ดี

ตารางที่ 3.5 ประสิทธิภาพการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มด้วยราไวท์รอท *Trametes hirsuta* AK4 ที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมันด้วยวิธีต่างๆ

วิธีการศึกษา	การลดลงของสารประกอบฟีนอลิค(%)	การลดลงของสี (%)
การเจือจางความเข้มข้นน้ำทิ้ง		
- 25%POME	37.5 ± 4.4^{g}	$85.9 \pm 3.2^{a,b}$
- 50%POME	77.8 ± 1.3^{b}	87.8 ± 1.6^{a}
- 75%POME	64.3 ± 1.2^{e}	$81.2 \pm 1.8^{c,d}$
- 100%POME	71.4 ± 0.8^{d}	$79.7 \pm 1.0^{d,e}$
การเติมแหล่งอาหารร่วม		
- POME	71.4 ± 0.8^{d}	$79.7 \pm 1.0^{d,e}$
- POME+1%glucose	62.9 ± 0.8^{e}	77.1 ± 1.1^{e}
- POME+1%NH_4Cl	74.0 ± 0.9^{c}	$81.1 \pm 0.7^{c,d}$
- POME+1%glucose+1%NH_4Cl	$76.1 \pm 0.8^{b,c}$	$85.0 \pm 0.9^{b,c}$

หมายเหตุ ตัวอักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 3.5 ประสิทธิภาพการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มด้วยราไวท์รอท *Trametes hirsuta* AK4 ที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมันด้วยวิธีต่างๆ (ต่อ)

วิธีการศึกษา	การลดลงของสารประกอบฟีนอลิค(%)	การลดลงของสี (%)
การบำบัดบำบัดแบบสองขั้นตอน		
- 4 hr. Treated POME	76.4±0.7^{b,c}	82.2±1.4^{c}
- 8 hr. Treated POME	82.2±0.8^{a}	87.1±1.0^{a}
- 24 hr. Treated POME	81.9±0.6^{a}	84.8±0.6^{b,c}
- 48 hr. Treated POME	81.6±0.6^{a}	83.2±1.1^{b,c}
- 72 hr. Treated POME	82.0±1.0^{a}	79.7±1.0^{d,e}
- Non-treated POME	71.4±0.8^{d}	79.7±1.0^{d,e}
การปรับตัวของเซลล์ตรึง		
- Non Acclimation	71.4±0.8^{d}	79.7±1.0^{d,e}
- Acclimation	60.3±0.7^{f}	58.3±3.5^{f}

หมายเหตุ ตัวอักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

น้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดแบบสองขั้นตอนซึ่งให้ประสิทธิภาพสูงสุดในการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลิคถูกนำมาวิเคราะห์คุณลักษณะของน้ำทิ้งเปรียบกับน้ำทิ้งก่อนการบำบัด พบว่า pH ของน้ำทิ้งหลังบำบัดลดลงจาก 7.56 เหลือเพียง 5.03 ปริมาณ COD ลดลง 54.8% จากความเข้มข้นเริ่มต้น 22,488 มก./ล. ส่วนค่า TKN, TP, Oil & Grease และ TSS มีค่าเท่ากับ 251, 11.7, 17 และ 240 มก./ล. คิดเป็น 79-99% ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับค่ามาตรฐานคุณภาพน้ำทิ้ง เนื่องจากราไวท์รอทสามารถนำไปใช้เป็นแหล่งอาหารได้และนอกจากนั้นพบว่าหลังการบำบัดสามารถกำจัดสีในน้ำทิ้งได้ 87% และกำจัดสารประกอบฟีนอลิคได้ 82% เมื่อวิเคราะห์ด้วย Folin ciocalteu's และ 88.3% เมื่อวิเคราะห์ด้วย 4-aminoantipyrine ซึ่งเป็นวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคตามมาตรฐานน้ำทิ้ง (APHA, AWWA and WEF, 2005) ดังแสดงในตารางที่ 3.6

ตารางที่ 3.6 คุณลักษณะของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มก่อนและหลังบำบัดแบบสองขั้นตอนด้วยแบคทีเรียตรึงและราไวท์รอท *Trametes hirsuta* AK4 ที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมัน

พารามิเตอร์	*ค่ามาตรฐานคุณภาพน้ำทิ้ง	**ก่อนบำบัด	***หลังบำบัด
pH	5.5-9.0	7.56	5.03
COD (มก./ล.)	400	22,488	10,144
TKN (มก./ล.)	200	1,212	251
TP (มก./ล.)	-	221	11.7
Oil & Grease (มก./ล.)	15	620	17
TSS (มก./ล.)	-	24,900	240
Total phenolics (มก./ล.)			
- 4-aminoantipyrine****	1	74.3	8.6
- Folin ciocalteu*****	-	475	81
Color (หน่วยสี)	ไม่พึงรังเกียจ	18,600	2,400

ที่มา: *ประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม ฉบับที่ 2 (พ.ศ. 2539) ลงวันที่ 14 มิถุนายน 2539 เรื่อง กำหนดคุณลักษณะของน้ำทิ้งที่ระบายออกจากโรงงาน ตีพิมพ์ในราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 113 ตอนที่ 52 ง ลงวันที่ 27 มิถุนายน 2539

** น้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม จังหวัดสตูลเก็บตัวอย่างวันที่ 30 ตุลาคม 2555

***น้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นด้วยแบคทีเรียย่อยสลายฟีนอลเป็นเวลา 8 ชั่วโมง และบำบัดต่อด้วยราไวท์รอทที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมัน

****4-aminoantipyrine ไม่สามารถวัดสารประกอบฟีนอลิคที่มีหมู่ไฮดรอกซิลในตำแหน่งพาราได้

*****วิเคราะห์ด้วย Modification of the Folin-Ciocalteau method (Ergul *et al*., 2011)

น้ำเสียของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มเริ่มต้นมีความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิค 1,206 มิลลิกรัมต่อลิตร (Chantho *et al*., 2013) และเมื่อผ่านระบบบำบัดน้ำเสียด้วยระบบแบบบ่อปรับเสถียร (บ่อดิน) ซึ่งมีจำนวน 4 บ่อ สามารถบำบัดสารอินทรีย์ในรูปของ BOD และ COD ได้ส่วนหนึ่ง รวมถึงสารประกอบฟีนอลิคให้เหลือ 475 มิลลิกรัมต่อลิตร ในน้ำทิ้งบ่อสุดท้าย ซึ่งยังมีค่าสูงกว่ามาตรฐาน และยังคงมีสีน้ำตาลคล้ำ เมื่อนำตัวอย่างน้ำทิ้งจากบ่อบำบัดน้ำเสียบ่อสุดท้ายมาทดสอบในการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าน้ำทิ้งถูกบำบัดต่อด้วยการบำบัดน้ำทิ้งแบบสองขั้นตอนโดย

บำบัดน้ำทิ้งขั้นต้นด้วยแบคทีเรียผสม *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 ที่ถูกตรึงบนทะลายปาล์มน้ำมัน เป็นระยะเวลา 8 ชั่วโมง แล้วบำบัดต่อด้วยราไวท์รอท *Trametes hirsuta* AK4 ที่ถูกตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมัน เป็นวิธีการที่มีศักยภาพสูงที่สุดในการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม โดยกระบวนการบำบัดที่เกิดขึ้นมีสาเหตุจากการย่อยสลายทางชีวภาพจากเอนไซม์ที่แบคทีเรียและราไวท์รอทสร้างขึ้นรวมกับกลไกในการดูดซับร่วมกันของวัสดุตรึงและเส้นใยราที่นำมาใช้ ทำให้สารอินทรีย์และองค์ประกอบอื่นๆในน้ำทิ้งมีค่าลดลง แม้ว่าจะยังไม่สามารถทำให้คุณลักษณะน้ำทิ้งบางพารามิเตอร์บรรลุตามค่ามาตรฐานที่กำหนด อย่างไรก็ตามความรู้ที่ได้จากผลการทดลองนี้ มีความจำเป็นในการนำไปพัฒนาต่อยอดในระบบขยายขนาดด้วยถังปฏิกรณ์ชีวภาพซึ่งมีขนาดใหญ่ขึ้นและสามารถบำบัดน้ำทิ้งได้อย่างต่อเนื่อง รวมทั้งการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในระบบขยายขนาดก็เป็นแนวทางหนึ่งที่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพของการบำบัดสารประกอบฟีนอลิคและสีด้วยวิธีการที่นำเสนอในรายงานฉบับนี้ได้ เพื่อเป้าหมายที่สำคัญนั่นคือคุณลักษณะน้ำทิ้งบรรลุตามค่ามาตรฐานที่กำหนด

บทที่ 4

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

4.1 สรุปผลการทดลอง

4.1.1 การคัดเลือกราไวท์รอทที่มีศักยภาพในการลดสีและสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

จากการคัดเลือกราไวท์รอท 10 สายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการลดสีและสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม โดยทดสอบบนอาหารแข็ง Sabouraud Dextrose Agar (SDA) ที่มีการเติมน้ำทิ้งและในน้ำทิ้งที่มีการเจือจาง 2 เท่า พบว่าราไวท์รอทสายพันธุ์ Unknown 04 ซึ่งถูกระบุสายพันธุ์คือ *Trametes hirsuta* AK4 เป็นราที่มีอัตราการเจริญสูง มีความทนทานต่อสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้ง และยังสามารถกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้งที่มีความเข้มข้น 50% ได้ถึง 64.7% และ 66.5% ตามลำดับ จากเดิมที่มีความเข้มสีประมาณ 9,333 หน่วยสี และสารประกอบฟีนอลิค 261 มิลลิกรัมต่อลิตร จึงคัดเลือกราสายพันธุ์ดังกล่าวเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

4.1.2 การตรึงราไวท์รอทบนวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน

ราไวท์รอท *Trametes hirsuta* AK4 ที่ถูกตรึงบนวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน ได้แก่ ทะลายปาล์มเปล่าและเส้นใยปาล์มน้ำมัน สามารถเจริญยึดเกาะบริเวณผิวหน้าและภายในช่องว่างของวัสดุตรึงได้ดีและเมื่อนำราตรึงไปบำบัดน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มความเข้มข้น 50% พบว่าการแปรผันระยะเวลาการตรึงมีผลต่อการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลิค โดยราไวท์รอทที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมันเป็นระยะเวลา 6 วันให้ประสิทธิภาพในการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้งที่มีความเข้มข้น 50% สูงที่สุดคือ 94% และ 80.6% ตามลำดับ และมีความแตกต่างกับชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) ซึ่งการลดลงของสีและสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้งเกิดจากการย่อยสลายทางชีวภาพและการดูดซับของวัสดุตรึงร่วมกับเส้นใยรา โดยตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์กลุ่มลิกนิโนไลติกที่เกี่ยวข้องต่อการย่อยสลายของสีและสารประกอบฟีนอลิค ได้แก่เอนไซม์ Laccase และ Manganese peroxidase สูงสุดเท่ากับ 510 และ 3,046 ยูนิตต่อลิตร จึงคัดเลือกราตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมันเป็นระยะเวลา 6 วัน เพื่อใช้ในการทดลองถัดไป

4.1.3 การเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้ง

ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ไม่ผ่านการเจือจาง (ความเข้มข้น 100%) ด้วยวิธีการ 1) การแปรผันความเข้มข้นของน้ำทิ้งที่ระดับต่างๆ 2) การเติมแหล่งอาหารร่วม 3) การบำบัดแบบสองขั้นตอน และ 4) การปรับตัวของเซลล์ตรึง พบว่าการบำบัดแบบสองขั้นตอนโดยขั้นต้นจะใช้แบคทีเรียผสม *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 ที่ตรึงบนทะลายปาล์มเปล่ามาบำบัดน้ำทิ้งที่ไม่เจือจางเป็นระยะเวลา 8 ชั่วโมง และบำบัดต่อด้วยราตรึงบนเส้นใยปาล์มอีก 8 วัน ให้ประสิทธิภาพในการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลิคสูงสุดคือ 87.1% และ 82.2% ตามลำดับ จากเดิมที่น้ำทิ้งมีความเข้มสี 19,000 หน่วยสี และมีสารประกอบฟีนอลิค 461 มิลลิกรัมต่อลิตร และนอกจากนี้น้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดสามารถลด COD ได้ 54.8% จากความเข้มข้นเริ่มต้น 22,488 มิลลิกรัมต่อลิตร และทำให้ค่า TKN, TP, Oil & Grease และ TSS มีค่าใกล้เคียงค่ามาตรฐานคุณภาพน้ำทิ้ง

4.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาปัจจัยอื่นๆที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของราตรึง เช่น อัตราการให้อากาศ เป็นต้น

2.ควรศึกษาหรือคัดเลือกวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมันชนิดอื่นๆ เช่น ทะลายปาล์มที่ผ่านการบีบอัด มาใช้เป็นวัสดุตรึงเซลล์เพิ่มเติม เพราะโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มบางแห่งจะนำทะลายปาล์มเปล่าไปบีบอัดเพื่อสกัดน้ำมันออกมา ทำให้ลักษณะทางกายภาพของทะลายปาล์มเปล่าเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม

3. จากการศึกษานี้ได้ทำการทดลองในระบบกะ (batch system) เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลิคเบื้องต้น ดังนั้นควรมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยระบบที่มีความต่อเนื่อง (continuous system) เพื่อประโยชน์ในการนำไปใช้จริงในระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

4. ควรศึกษาแนวทางการนำเซลล์ตรึงไปประยุกต์ใช้บำบัดน้ำทิ้ง เช่น การเตรียมราตรึงในภาชนะอื่นๆ และพัฒนาไปใช้ในระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพเพื่อเป็นหน่วยบำบัดหนึ่งในระบบบำบัดน้ำทิ้ง โดยออกแบบเป็นถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่สามารถทำให้เซลล์ตรึงสัมผัสกับน้ำทิ้งได้ในสภาวะที่เหมาะสมและเกิดประสิทธิภาพในการบำบัด นอกจากนี้ชีวมวลที่เกิดขึ้นในระบบดังกล่าวสามารถนำไปใช้ประโยชน์โดยการสกัดสารที่มีมูลค่า เช่น โปรตีน เอนไซม์และสารต้านอนุมูลอิสระ หรือนำเซลล์ตรึงที่หมดประสิทธิภาพในการบำบัดไปทำปุ๋ยหมัก ซึ่งเป็นทางเลือกหนึ่งในการกำจัดของเสีย และนำวัสดุเศษเหลือจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มมาใช้ให้เกิดประโยชน์

บรรณานุกรม

กรมควบคุมมลพิษ. 2555. มาตรฐานคุณภาพน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมและนิคมอุตสาหกรรม (ออนไลน์). (15 กรกฎาคม 2555). Available from: http://www.pcd.go.th

จินตนา แก้วบริสุทธิ์. 2541. การปรับปรุงคุณภาพน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยกระบวนการดูดซับในชั้นตรึง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาการจัดการสิ่งแวดล้อม คณะการจัดการสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ธรรมศักดิ์ ศรีสุขใส. 2547. การกำจัดสารประกอบฟีนอลในน้ำทิ้งโรงงานน้ำมันปาล์มโดยการใช้เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากใบยางพารา, วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาการจัดการสิ่งแวดล้อม คณะการจัดการสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

พนิดา โต๊ะสู. 2555. การย่อยสลายฟีนอลโดยเชื้อผสม *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 ที่ตรึงบนวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน, วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาการจัดการสิ่งแวดล้อม คณะการจัดการสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

พูนสุข ประเสริฐสรรพ์, เสาวลักษณ์ จิตรบรรเจิดกุล และอรัญ หันพงศ์กิตติกูล. 2533. กระบวนการผลิต การใช้ประโยชน์วัสดุเศษเหลือทิ้ง และคุณลักษณะของน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม. วารสารสงขลานครินทร์. 12: 169-176.

พูนสุข ประเสริฐสรรพ์, อรัญ หันพงศ์กิตติกูลและโสภา จันทโสภา. 2544. เปรียบเทียบน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มด้วยวิธีการทางชีวภาพ ทางเคมี และทางกายภาพ. วารสารสงขลานครินทร์. 23: 807-819.

วีรยุทธ์ จวนซ้าย. 2554. การผลิตและการเพิ่มมูลค่าของปุ๋ยหมักจากวัสดุเศษเหลือโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม, วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สำนักเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อมโรงงาน. 2540. **คู่มือการจัดการสิ่งแวดล้อมอุตสาหกรรมสกัดน้ำมันปาล์ม**. กรมโรงงานอุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม. 80 น.

โสภาวรรณ รัตนพันธุ์. 2547. การบำบัดและการกำจัดสีของน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยเส้นใยเห็ด *Lentinus spp.*, วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

Aggelis, G., Iconomou, D., Christou, M., Bokas, D., Kotzailias, S., Christou, G., Tsagou, V. and Papanikolaou, S. 2003. Phenolic removal in a model olive oil mill wastewater using *Pleurotus ostreatus* in bioreactor cultures and biological evaluation ofthe process. *Water Research*. 37: 3,897–3,904.

Ahmad, A.L., Chong, M.F., Bhatia, S. and Ismail, S. 2006. Drinking water from palm oil mill effluent (POME) using membrane technology. *Desalination.* 191: 35-44.

Ahmad, A.L., Ismail, S., and Bhatia, S. 2003. Water recycling from palm oil mill effluent (POME) using membrane technology. *Desalination.* 157:87-95.

Ahmaadi, M. Vahabzadeh, F., Bonakdarpour, B.,Mehranian, M. and Mofarrah, E. 2006. Phenolic removal in olive mill wastewater using loof-immobilized *Phanerochaete chrysosporium*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 22: 119-127.

Aken, B.V., Hofrichter, M., Scheibner, K., Hatakka, A.I., Naveau, H. and Agathos, S.N. 1999. Transformation and mineralization of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by manganese peroxidase from the white-rot basidiomycete *Phlebia radiata*. *Biodegradation*. 10: 83–91.

Akhtar, M., Kirk, T.K. and Blanchette R.A., 1999. Advances in Applied and Fundamental Research, Proceedings of the 6th International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry, pp.187-192. USA.

Alam, Md. Z., Ameem, E.S., Muyibi, S.A. and Kabbashi, N.A. 2009. The factors affecting the performance of activated carbon prepared from oil palm empty fruit bunches for adsorption of phenol. *Chemical Engineering Journal*. 155: 191–198.

Alam, Md. Z., Muyibi, S. A., Mansor, M. F. and Wahid, R. 2007. Activated carbons derived from oil palm empty fruit bunches: Application to environmental problems. *Journal of Environmental Sciences*. 19: 103-108.

Alaoui, S.M. Merzouki, M., Penninckx, M.J. and Benlemlih, M. 2008. Relationship between cultivation mode of white rot fungi and their effiency for olive oil mill wastewater treatment. *Electronic Journal of Biotechnology*. 11: 1-8.

Annibale, A.D., Crestini, C., Vinciguerra, V. and sermanni, G.G. 1998. The biodegradation of recalcitrant effluent from an olive mill by a white-rot fungus. *Journal of Biotechnology*. 61: 209-218.

Annibale, A.D., Stazi, S.R. Vinciguerra, V., Mattia, E.D. and Sermanni, G.G. 1999. Charaterization of immobilized laccase from Lentinus edodes and its use in olive mill wastewater treatment. *Process Biochemistry*. 34: 697-706.

Annibale, A.D., Ricci, M., Quaratino, D., Federici, and Fenice, M. 2004. *Panus tigrinus* efficiently removes phenols, color and organic load from olive-mill wastewater. *Research in Microbiology*. 155: 596–603.

APHA, AWWA and WEF. 2005. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 21th edition. American Public Health Association. Washington DC. Association of Official Analytical Chemisists (AOAC), 1995, Official Methods of Virginia,USA

Assas, N., Ayed, L., Marouani, L. and Hamdi, M. 2002. Decolorization of fresh and stored-blank olive mill wastewater by *geotrichum candidum*. *Process Biochemistry*. 38: 361-365.

Attanun, T. and Chanchroensuk, J. 1999. Soil and plant analysis. Department of geology, Faculty of agriculture, Kasetsart University, Bangkok, Thailand.

Aurora, D.S., and Gill, P.K., 2001, Effects of various media and supplements on laccase production by some white rot fungi. *Bioresource Technology*. 77: 89-91.

Baborova, P., Moder, M., Baldrian, P., Cajthamlova, K. and Cajthaml, T. 2006. Purification of a new manganese peroxidase of the white-rot fungus *Irpex lacteus*, and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the enzyme. *Research in Microbiology*. 157: 248–253.

Baciocchi, E., Bietti, M., Francesca Gerini, M. and Lanzalunga O., 2002, The mediation of veratryl alcohol in oxidations promoted by lignin peroxidase: the lifetime of veratryl alcohol radical cation. *Biochemical and biophysical research communications*. 293: 832-835.

Bajpai, P., Mehna, A. and Bajpai, P.K. 1993. Decolorization of kraft bleach plant effluent with the white rot fungus *Trametes versicolor*. *Process Biochemistry*. 28: 387-384.

Baker, T.W. and Worgan, J.T. 1981. The utilization of palm oil processing effect as substrate of microbial protein by fungus *Aspergillus oryzae*. *European Journal of Appliled Microbiology*. 11: 234-240.

Bhatia, S., Othman, Z., and Ahmad, A.L. 2007. Coagulation-flocculation process for POME treatment using Moringa oleifera seeds extract: Optimization studies. *Chemical Engineering Journal*. 133: 205-212.

Boyle, D. 2006.Effects of pH and cyclodextrins on pentachlorophenol degradation (mineralization) by white-rot fungus, *Journal of Environmental Management*. 80: 380–386.

Cassidy, M.B., Lee, H. and Trevors, J.T. 1996. Packed-bed reactor for the integrated biodegradation of cyanide and formamide by immobilized *Fusarium oxysporum* CCMI 876 and *Methylobacterium* sp. RXM CCMI 908. *Enzyme and Microbial Technology*. 38: 848–854.

Chantho, P., Musikavong, C. and Suttinun, O. 2013. Pretreatment of phenolic compounds in palm oil mill wastewater by the thermophilic Bacillus thermoleovorans strain A2 for enhancement of biogas production. Proceeding of the 2nd International Conference on Environmental Engineering, Science and Management.March 27-29. Pullman Khon Kaen Raja Orchid Hotel, Thailand.

Chavalparit, O., Rulkens, W.H., Mol, A.P.J. and Khaodhair, S. 2006. Options for environmental sustainability of the crude palm oil industry in Thailand through enhancement of industrial ecosystems. *Environment, Development and Sustainability*. 8: 281-287.

Cohen, Y. 2001. Biofiltration-the treatment of fluids by microorganisms immobilized into the filter bedding material: a review. *Bioresource Technology*. 77: 257–274.

Crecchio, C., Ruggiero, P. and Pizzigallo, M.D. 1995. Polyphenoloxidases Immobilized in Organic Gel: Properties and Application in the Detoxicfication of Aromatic Compounds. *Biotechnology and Bioengineering*. 48: 585-591.

Dias, A.A., Bezerra, R.M. and Pereira, A.N. 2004. Activity and elution profile of laccase during biological decolorization and de phenolization of olive mill wastewater. *Bioresource Technology*. 92: 7-13

Eilers, A., Rungeling, E., Stundl, U.M. and Gottschalk, G. 1999. Metabolism of 2,4,6-trinitrotoluene by the white-rot fungus *Bjerkandera adusta* DSM 3375 depends on cytochrome P-450. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 53: 75–80.

Enayatzamir, K., Alikhani, H.A. and Rodríguez Couto S. 2008. Simultaneous production of laccase and decolouration of the diazo dye Reactive Black 5 in a fixed-bed bioreactor. *Journal of Hazardous Materials*. 164(1): 296-300.

Ergul, F.E., Sagin, S., Ongen, G. and Sukan F.V. 2009. Dephenolisation of olive mill wastewater using adapted *Trametes versicolor*. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 63: 1-6.

Ergul, F.E., Sagin, S., Ongen, G. and Sukan F.V. 2011. Dephenolization and decolorization of olive mill wastewater through sequential batch and co-culture application. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 27: 107-114.

Fadil, K. Chahlaoui, A. Ouahbi, A. Zaid, A. and Borja, R. 2003. Aerobic biodegradation and detoxification of wastewater from the olive oil industry. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 51: 37-41

Fountoulakis, M.S., Dokianakis, S.N. and Kornaros, M.E. 2002. Removal of phenolics in olive mill wastewaters using the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Water Research*. 36: 4,735-4,744.

Gao, D., Du, L., Yang, J., Wu, W.N. and Liang, H. 2010. A critical review of the application of white rot fungus to environmental pollution control. *Critical Reviews in Biotechnology*. 30(1): 70-77.

Gavril, M. and Hodson, P.V. 2007. Chemical evidence for the mechanism of the biodecoloration of Amaranth by *Trametes versicolor*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 23: 103–124.

Gomaa, O.M., Linz, J.E. and Reddy, C.A. 2008. Decolorization of Victoria blue by the white rot fungus, *Phanerochaete chrysosporium*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 24: 2,349–2,356.

Gomathi, V., Cibichakravarthy, B., Ramanathan, A., Nallapeta, S., Ramanjaneya, V., Mula, R. and Jayasimha Rayalu, D. Decolourization of paper mill effluent by immobilized cell of *Phanerochaete chrysosporium*. *International Journal of Plant Animal and Environmental Sciences*. 2: 141-146.

Hartley, C.W.S. 1977. **Oil palm selection and breeding In The Oil Palm**. Longman. Inc., New York. pp. 195-310.

Hatakka, A. 2001. Biodegradation of lignin. In: Hofrichter M, Steinbüchel A, editors. Biopolymers. Weinheim, Germany: Wiley-VCH; pp. 129–180.

Heinfling, A., Martinez, M.J., Martinez, A.T., Bergbaure, M. and Szewzyk, U., 1998, Transformation of industrial dyes dy manganese peroxidase from *Bjerkandera adusta* and *Pleurotus eryngii* in a manganese-independent reaction. *Appllied and Environmental Microbiology*. 64(8): 2,788-2,793.

Hofrichter, M. 2002. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and Microbial Technology*. 30: 454-466.

Hwang, T.K. Ong, S.M., Scow, C.C. and Tan, H.K. 1978. Chemical composition of palm mill effluent. *Planter*. 54: 749-756.

Katzbauer, B., Narodoslawsky, B. and Moser, A. 1995. Classification system for immobilization techniques. *Bioprocess Engineering*. 12: 173–179.

Khalil, H.P.S.A., Mohamad, H, Kang, C.W., Fuaad, N.A. 2007. Agro-hybrid composite: the effects on mechanical and physical propoties of oil palm fiber (EFB)/glass hybrid reinforced polyster composites. *Journal of Reinforced Plastic Composites*. 26(2): 203-218

Kim, S., Park, C., Kim, T-H., Lee, J. and Kim, S-W. 2003. COD Reduction and decolorization of textile effluent using a combined process. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 95: 120-105.

Kim, S.J. and Shoda, M. 1999. Batch decolorization of molasses by suspended and immobilized fungus *Geotrichum candidum* Dec 1. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 88: 586-589.

Kongjan, P., O-Thong , S., Kotay, M., Min, B. and Angelidaki, I. 2010. Biohydrogen production from wheat straw hydrolysate by dark fermentation using extreme thermophilic mixed culture. *Biotechnology and Bioengineering* 105: 899–908.

Kornillowicz-Kowalska, T., Ginalska, G., Belcarz, A. and Iglik, H. 2006. Microbial conversion of daunomycin wastes in unsteril soil inoculated with *Bjerkandera adusta* R59. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 70: 497–504.

Kourkoutas, Y., Bekatorou, A., Banat, M.I., Marchant, R. and Koutinas, A.A. 2004. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. *Food Microbiology*. 21: 377–397.

Lakhtar, H., Ismaili-Alaoui, M., Philippoussis, A., Perraud-Gaime, I. and Roussos, S. 2010. Screening of strains of *Lentinula edodes* grown on model olive mill wastewater in solid and liquid state culture for polyphenol biodegradation. . *International Biodeterioration and Biodegradation*. 64: 167-172.

Lam, M.K. and Lee, K.T. 2011. Renewable and sustainable bioenergies production from palm oil mill effluent (POME): Win-win strategies toward better environmental protection. *Biotechnology Advances*. 29: 124–141.

Lee, G.M. and Palsson, B.O. 1994. Monoclonal antibody production using free-suspended and entrapped hybridoma cells. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*. 12: 509-533.

Leonowicz, A., Matuszewska, A., Luterek, J., Ziegenhagen, D.,Wojtas´Wasilewska, M., Cho, N-S., Hofrichter,M., and Rogalski J. 1999. Biodegradation of lignin by white rot fungi. *Fungal Genetics and Biology*. 21: 175–185.

Levin, L., Papinutti, L. and Forchiassin, F., 2004. Evaluation of argentinean white rot fungi for their ability to produce lignin-modifying enzyme and decolorize industrial dyes. *BioresourceTechnology*. 94: 169-176.

Li, K., Xu, F., and Eriksson, K.E. 1998. Comparison of fungal laccase and redox mediators in oxidation of non-phenolic lignin model compound. *Applied Environmental Microbiology*. 65: 2,654-2,660.

Li, X. and Jia, R. 2008. Decolorization and biosorption for Congo red by system rice hull Schizophyllum sp. F17 under solid-state condition in a continuous flow packed-bed bioreactor. *Bioresource Technology*. 99: 85–92.

Limkhuansuwan, V. and Chaiprasert, P. 2010. Decolorization of molasses melanoidins and palm oil mill effluent phenolic compounds by fermentative lactic acid bacteria. *Journal of Environmental Sciences*. 22: 1,209–1,217.

Lu, Y., Yan, L, Wang, Y., Zhou, S., Fu, J. and Zhang, J. 2009. Biodegradation of phenolic compounds from coking wastewater by immobilized white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Hazardous Materials* 165: 1091–1097.

Ma, A. N., 2000. Environmental Management for the Oil Palm Industry. *Palm Oil Development* 30: 1-10.

Marco-Urrea, E., Parella, T., Gabarrell, X., Caminal, G., Vicent, T. and Adinarayana Reddy, C. 2008. Mechanistics of trichloroethylene mineralization by the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Chemosphere*. 70: 404–410.

Mohammadi, A. and Nasernejad, B. 2009. Enzymatic degradation of anthracene by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* immobilized on sugarcane bagasse. *Journal of Hazardous Materials*. 161: 534–537.

Ng Mei Han and Choo Yuen May. 2012. Determination of Antioxidants in Oil Palm Empty Fruit Bunches. *American Journal of Applied Sciences*. 9(11): 1,862-1,867.

Obuekwe, C. O. and Al-Muttawa, E. M., 2001. Self-immobilized bacterial cultures with potential for application as ready-to-use seeds for petroleum bioremediation. *Biotechnology Letters*. 23: 1,025–1,032.

Park, C., Lee, B., Han, E.J., Lee, J. and Kim, S. 2006. Decolorization of Acid Black 52 by fungal immobilization. *Enzyme and Microbial Technology*. 39: 371–374.

Park, C., Lee, M., Lee, B., Kim, S., Chase, H., Lee, J. and Kim, S. 2007. Biodegradation and biosorption for decolorization of synthetic dyes by *Funalia trogii*. *Biochemical Engineering Journal*. 36:59-65.

Radha, K.V., Regupathi, I., Arunagiri, A. and Murugesan, T. 2005. Decolorization studies of synthetic dyes using *Phanerochaete chrysosporium* and their kinetics. *Process Biochemistry*. 40: 3,337–3,345.

Rakamthong, C. and Prasertsan, P. 2011. Decolorization and phenol removal of anaerobic palm oil mill effluent by *Phanerochaete chrysosporium* ATTC 24725. TIChE International conference 2011, November 10-11, Songklha, Thailand.

Rodrigues, Y., Clarissa, F.S., Dasio, R.M. and Vazquez-Duhalt, R., 1999, Industrial dye decolorization by laccase from ligninolytic fungi. *Current Microbiology*. 38: 27-32.

Rodriguez Couto, S. 2009. Dye removal by immobilised fungi: a review. *Biotechnology Advance*. 64: 167–172.

Rodriguez Couto, S., Osma J.F., and Toca Herrera, J.L. 2008. Effective-cost production of laccase: reutilisation of a natural adsorbent. 4th European Meeting on Oxizymes, Helsinki. Finland.

Rodriguez Couto, S., Sanroman, M.A., Hofer, D. and Gübitz, G.M. 2004. Production of laccase by *Trametes hirsuta* grown in an immersion bioreactor and its application in the decolorisation of dyes from a leather factory. *Engineering in Life Sciences*. 4: 233–237.

Ruttimann-Johnson, C. and Lamar, R.T. 1997. Binding of pentachlorophenol to humicsubstances in soil by the action of white rot fungi. *Soil Biology and Biochemistry*. 29: 1143–1148.

Santhy, K. and Selvapathy. P. 2005. Removal of reactive dyes from wastewater by adsorption on coir pith activated carbon. *Bioresource Technology*. 97(11): 1,329-1,336.

Sapers, G.M. and Miller, R.L. 1993. Control of enzymatic browning in pre-peeled potatoes by surface digestion. *Journal of Food Science*. 58: 1,076-1,078.

Schliephaje, K. and Lonergan, G.T. 1996. Laccase variation during dye decolorisation in a 200 L packed-bad bioreactor. *Biotechnology Letters*. 18: 881–886.

Shin, M., Nguyen, T. and Ramsay, J. 2002. Evaluation of support materials for the surface immobilization and decoloration of amaranth by *Trametes versicolor*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 60:218–223.

Sundram, K., Sambanthamurthi R. and Tan, Y.A. 2003. Palm fruit chemistry and nutrition. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*. 12: 355-362.

Svobodov, K., Majcherczyk, A., Novotn, C. and Kues, U. 2008. Implication of mycelium associated Laccase from *Irpex lacteus* in the decolorization of synthetic dyes. *Bioresource Technology*. 99: 463–471.

Tekre, M., Mswaka, A.Y., Vauya, R.Z. and Read, J.S. 2001. Growth, dye degradation and ligninolytic activity studies on zimbabwean white rot fungi. *Enzyme and Microbial Technology*. 28: 420-426.

Tieng, YP.and Sun, G. 2000. Use of polyvinyl alcohol as a cell entrapment matrix for copper biosorption by yeast cells. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 75: 541–546.

Torrecilla, J.S. 2010. Phenolic compounds in olive mill wastewater, olive and olive oil .in health and disease prevention. Amsterdam.

Tychanowicz, G.K., Zilly, A., Marques de Souza, C.G. and Peralta, RM. 2004. Decolourisation of industrial dyes by solid-state cultures of *Pleurotus pulmonarius*. *Process Biochemistry*. 39:855–859.

Vahabzadeh, F., Mehranian, M. and Saatari, A.R. 2004. Color removal ability of *Phanerochaete chrysosporium* in relation to lignin peroxidase and manganese peroxidase produced in molasses wastewater. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 20: 859–864.

Valentin, L., Feijoo, G., Moreira, M.T. and Lema, J.M. 2006. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in forest and salt marsh soils by white-rot fungi. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 58: 15–21.

Valentin, L., Lu-Chau T.A., Lopez, C., Feijoo, G., Moreira, M.T. and Lema, J.M. 2007. Biodegradation of dibenzothiophene, fluoranthene, pyrene and chrysene in a soil slurry reactor by the white-rot fungus *Bjerkandera* sp. BOS55. *Process Biochemistry*. 42: 641–648.

Wang, S. 2008. A comparative study of Fenton and Fenton-like reaction kinetics in decolourisation of wastewater. *Dyes Pigments*. 76: 714-720

Wesenberg, D., 2003, White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnology Advances*. 22: 161-187.

Wong, W.S. 2008. Structure and Action Mechanism of Ligninolytic Enzyme. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 157(2): 174-209.

Wu, Y. T., Mohammad, W. A., Jahim, Md. J. and Anuar, N. 2009. A holistic approach to managing palm oil mill effluent (POME): Biotechnological advances in the sustainable reuse of POME. *Biotechnology Advance*s. 27: 40–52.

Xavier, A.M.R.B., Evtuguin, D.V., Ferreira, R.M.P. and Amado, F.L. 2001. Laccase production for lignin oxidative activity. Proceeding of 8th International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry, 4-8 June, Helsinki, Finland.

Zhu, Y.X., Sun, H.Y. and Cao, G.L. 2005. The comparative study on decoloration efficiency of polysaccharide from wildness *Pleurotus ostreatus*. *Chinese Journal of Spectroscopy Laboratory*. 22: 1,070–1,073

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
สูตร และวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ภาคผนวก ก

สูตร และวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ก.1 Potato Dextrose Agar (PDA)

Potato infution	4.0	กรัมต่อลิตร
Dextrose	20.0	กรัมต่อลิตร
Bacteriological agar	15.0	กรัมต่อลิตร

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (Difco) 39 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร บรรจุขวด ปิดจุกด้วยสำลี ครอบด้วยกระดาษ แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นเทลงใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

ก.2 Sabouraud Dextrose Agar (SDA)

Yeast extract	2.0	กรัมต่อลิตร
Peptone	10.0	กรัมต่อลิตร
Dextrose	40.0	กรัมต่อลิตร
Agar	15.0	กรัมต่อลิตร

นำ Yeast extract 2 กรัม Peptone 10 กรัม และAgar 15 กรัม เติมลงในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร บน hot plate คนจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วจึงเติม dextrose 40 กรัม ปรับ pH ให้ได้เท่ากับ 5.0-5.5 ถ้า pH ต่ำเกินไปให้ปรับด้วย 1N NaOH แต่ถ้า pH สูงเกินไปให้ปรับด้วย 1 N HCl บรรจุขวด ปิดจุกด้วยสำลี ครอบด้วยกระดาษ นำไปนึ่งด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นเทลงใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

ก.3 Glucose Yeast Extract Broth (GYEB)

Yeast extract	10.0	กรัมต่อลิตร
Glucose	100.0	กรัมต่อลิตร

นำ Yeast extract 10 กรัม และGlucose 100 กรัม เติมลงในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร บน hot plate คนจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน บรรจุขวด ปิดจุกด้วยสำลี ครอบด้วยกระดาษ นำไปนึ่งด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นก่อนนำไปใช้

ภาคผนวก ข
กราฟมาตรฐานเพื่อการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดและสี

ภาคผนวก ข

กราฟมาตรฐานเพื่อการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดและสี

ข.1 กราฟมาตรฐานเพื่อการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

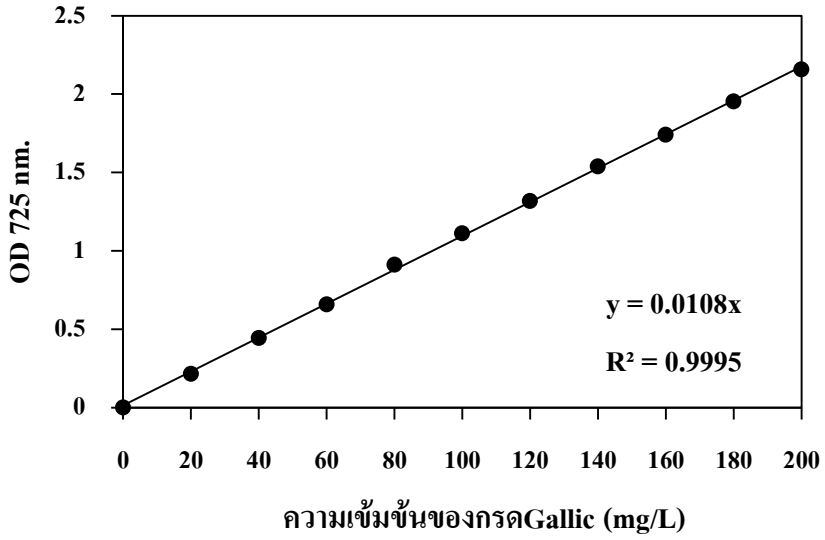
เตรียมสารละลายมาตรฐานของกรดGallic ความเข้มข้น 500 mg/Lโดยชั่งGallic acid monohydrate (Sigma) 0.55 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตร จากนั้นนำสารละลายมาตรฐานของกรดGallic มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 20 - 200 mg/L โดยการปิเปตสารละลายมาตรฐานของกรดGallic ความเข้มข้น 500 mg/L และเติมน้ำกลั่นตามปริมาตรดังแสดงในตารางภาคผนวกที่ ข.1

ตารางภาคผนวกที่ ข.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดGallic ความเข้มข้น 20-200 mg/L

ความเข้มข้น (mg/L)	ปริมาตรสารละลายมาตรฐาน (mL)	ปริมาตรน้ำกลั่น (mL)
20	0.2	4.8
40	0.4	4.6
60	0.6	4.4
80	0.8	4.2
100	1.0	4.0
120	1.2	3.8
140	1.4	3.6
160	1.6	3.4
180	1.8	3.2
200	2.0	3.0

การสร้างกราฟมาตรฐาน

ปิเปตสารละลายกรดGallic ความเข้มข้น 20-200 mg/L ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงใน Folin–Ciocalteau phenol reagents ที่เจือจาง 4 เท่า ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นจึงเติม 1 มิลลิลิตร ของสารละลาย sodium carbonate ความเข้มข้น 200 g/L ทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 725 nm ใช้น้ำกลั่นที่ทำปฏิกิริยาเช่นเดียวกับตัวอย่างเป็น blank นำค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานของกรดGallic (รูปภาคผนวกที่ ข.1)



รูปภาคผนวกที่ ข.1 กราฟมาตรฐานของกรดGallic

ข.2 กราฟมาตรฐานเพื่อการวิเคราะห์สี

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

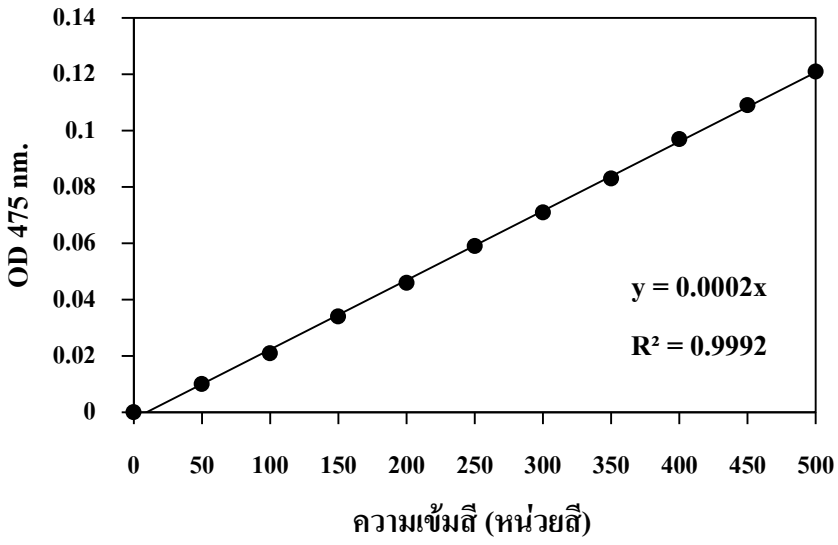
เตรียมสารละลายมาตรฐานแพลทตินัมโคบอลต์ความเข้มข้น 500 หน่วยสี โดยชั่ง potassium chloroplatinate 0.1246 กรัม และ cobalt (II) chloride 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่มีกรดไฮโดรคลอลิค 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร จะได้สารละลายมาตรฐานแพลทตินัมโคบอลต์ความเข้มข้น 500 หน่วยสี จากนั้นนำสารละลายมาตรฐานที่ได้มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 50-500 หน่วยสี โดยการปิเปตสารละลายมาตรฐาน และเติมน้ำกลั่นตามปริมาตรดังแสดงในตารางภาคผนวกที่ ข.2

ตารางภาคผนวกที่ ข.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานแพลทตินัมโคบอลต์ความเข้มข้น 50-500 หน่วยสี

ความเข้มข้น (หน่วยสี)	ปริมาตรสารละลายมาตรฐาน (mL)	ปริมาตรน้ำกลั่น (mL)
50	0.5	4.5
100	1.0	4.0
150	1.5	3.5
200	2.0	3.0
250	2.5	2.5
300	3.0	2.0
350	3.5	1.5
400	4.0	1.0
450	4.5	0.5
500	5.0	0.0

การสร้างกราฟมาตรฐาน

นำสารละลายมาตรฐานแพลทตินัมโคบอลต์ความเข้มข้น 50-500 หน่วยสีนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 475 nm โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank นำค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานแพลทตินัมโคบอลต์ (รูปภาคผนวกที่ ข.2)



รูปภาคผนวกที่ ข.2 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานแพลทตินัมโคบอลต์

ภาคผนวก ค
การวิเคราะห์ทางด้านชีววิทยาโมเลกุลเพื่อจำแนกสายพันธุ์ราไวท์รอท Unknown04

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์ทางด้านชีววิทยาโมเลกุลเพื่อจำแนกสายพันธุ์ราไวท์รอท Unknown04

ง.1 วิธีการวิเคราะห์

การเพาะเลี้ยงและเก็บตัวอย่างเชื้อรา

เลี้ยงราไวท์รอท Unknown04 บนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4-16 สัปดาห์ ทำการเก็บเส้นใยของราไวท์รอทบริเวณผิวหน้าของอาหารแข็งในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 2 มิลลิลิตร จากนั้นเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

วิธีการสกัดDNA

เติม Extraction buffer (1% CTAB, 0.7 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8) ลงในตัวอย่าง บดตัวอย่างในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรโดยการเติม Extraction buffer 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการเขย่า และบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000xg เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างส่วนใสในหลอดหลอดใหม่ที่มี phenol-chloroform-isoamyl alcohol เขย่าให้เข้ากันแล้วปั่นเหวี่ยงที่ 12,000xg เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เก็บตัวส่วนบนไปยังหลอดใหม่ที่มี 7.5 M ammonium acetate จากนั้น DNA จะถูกตกตะกอนด้วยEthanol ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 12,000xg เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ตะกอนDNA จะถูกล้างด้วย 70%Ethanol ที่เย็น และถูกทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ตะกอนDNA จะถูกละลายด้วย TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA pH 8.0)

การเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR)

ในการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วย PCR และการทำ DNA sequencing จะใช้primer ของ the internal transcribed spacer region (ITS) โดยเฉพาะ ITS4 และ ITS5 (White et al., 1990; Bunyard et al., 1994; Landvik 1996) การเพิ่มปริมาณDNA ถูกทำใน 50 µl ของส่วนผสมในการทำปฏิกิริยาซึ่งประกอบด้วย 10 mM ของ dNTP (1 µ l), 10 µM ของไพรเมอร์แต่ละตัว (1 µ l), 10% ของ dilution buffer (5 µ l), 25 mM ของ Mg (5 µ l), 4 M ของ enhancer (5 µ l) และ 60-62% ของ น้ำ

กลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ(30.8 µl), 0.2µl ของ Taq DNA polymerase kit จาก FERMENTAS และ 10-50 ng ของ genomic DNA template (1 µ l) ทำปฏิกิริยาโดยใช้ PCR Model MJ Research DYAD ALD ในหลอดขนาด 200 µl (95ºC, 0.5 min; 52ºC, 1 min; 72ºC, 1.5 min; 35 cycles). PCR products (7 µ l aliquots) ถูกทดสอบโดยวิธี electrophoresis ใน 1% agarose gels กับ 0.003% ethidium bromide ใน 0.5×TBE buffer (0.044 M Boric acid, 1.1 mM EDTA, 0.045 M Tris, pH 8) เพื่อการทำให้บริสุทธิ์

การทำบริสุทธิ์ DNA และการทำ DNA sequencing

ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR ถูกทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ NucleoSpin® Extract Kit (Macherey-Nagel, Germany) และศึกษาลำดับเบสโดยบริษัท Macrogen โดยใช้ไพรเมอร์ตัวเดียวกับการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยปฏิกิริยา PCR

การวิเคราะห์ Phylogenetic

ลำดับเบสจะถูกตรวจสอบด้วยโปรแกรม BioEdit 7.0.9.1 (Hall 1999) ลำดับเบสที่สอดคล้องกันของDNA แต่ละส่วนจะถูกจัดตำแหน่งโดย Clustal W 1.6 (Thompson et al., 1994) จากนั้นตรวจสอบกับฐานข้อมูล Genbank หา accession number เพื่อประกอบกันใน Phylogenetic tree และ BLAST ข้อมูลหาความคล้ายกันมากที่สุด

ง.2 ผลการวิเคราะห์

จากการวิเคราะห์ทางด้านชีววิทยาโมเลกุลเพื่อจำแนกสายพันธุ์ของราไวท์รอท Unknown04 พบว่าเมื่อนำตัวอย่างเชื้อรามาสกัดDNA และเพิ่มจำนวนDNA ด้วยปฏิกิริยา Polymerase chain reaction (PCR) และทำDNA sequencing เพื่อศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1-4 บน 18S rDNA พบว่าบริเวณดังกล่าวมี 605 นิวคลีโอไทด์ ดังแสดงในรูปภาคผนวก ค. 1 และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาเปรียบเทียบในฐานข้อมูล Genbank พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ ITS1-4 บน 18S rDNA ของราไวท์รอท Unknown04 มีความใกล้เคียงกับราไวท์รอทสายพันธุ์ *Trametes hirsuta* ถึง 99% จึงสามารถระบุสายพันธุ์ของราไวท์รอท Unknown04 ว่าเป็น *Trametes hirsuta* AK4

TTCCGGGGGGGGGGGCTCGGAAGGATCATTAACGAGTTTTGAAATGGGTTGT
TGCTGGCCTTCCGAGGCATGTGCACGCCCTGCTCATCCACTCTACACCTGTGCACTTA
CTGTAGGTTGGCGTGGGTTTCTAGCCTCCGGGCTGGGAGCATTCTGCCGGCCTATGTA
CACTACAAACTCTAAAGTATCAGAATGTAAACGCGTCTAACGCATCTTAATACAACT
TTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAA
GTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCC
TTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATGAAATTCTCAACCCATAAGTCC
TTGTGATCTATGGGCTTGGATTTGGAGGCTTGCTGGCCCTAGCGGTCGGCTCCTCTTG
AATGCATTAGCTTGATTCCGTGCGGATCGGCTCTCAGTGTGATAATTGTCTACGCTGT
GACCGTGAAGCGTTTTGGCAAGCTTCTAACCGTCCATTAGGACAATCTTCAACATCTG
ACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTT

รูปภาคผนวกที่ ง.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ ITS1-4 บน 18S rDNA ของราไวท์รอท Unknown04

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นายอนุกูล เกียรติขวัญบุตร

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5410920019

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี	2554

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Anukool Kietkwanboot, Tran Thi My Hanh and Oramas Suttinun. Decolorization and Biodegradation of Phenolic Compounds in Palm Oil Mill Effluent by White Rot Fungi Immobilized on Oil Palm Residues**.** Proceeding of The 2nd International Conference on Environmental Engineering, Science and Management**,** March 27-29, 2013, Pullman Khon Kaen Raja Orchid Hotel, Khon Kaen, Thailand.