

## บทที่ 2

### การตรวจเอกสาร

#### 2.1 สีย้อม (Dyestuff)

สีย้อม คือ สารสีที่มีลักษณะเป็นผลึกหรือผงละเอียด ที่เป็นสารอินทรีย์หรืออนินทรีย์ ที่สร้างมาเพื่อดูดซึม หรือดูดซับแสงโดยการทำให้อยู่บน หรือ ในผิวหน้าของวัตถุ แล้วเกิดการแพร่ แทรกซึมเข้าสู่ภายในโครงสร้างของวัตถุ เพื่อที่จะทำให้วัตถุนั้นมีสีขึ้นมา สีย้อมบางชนิดละลายน้ำ ได้ บางชนิดจะไม่สามารถละลายน้ำแต่จะละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ได้ สีที่เห็นจากสีย้อมนั้น เกิดจากอิเล็กตรอนในพันธะคู่ซึ่งอยู่ในโมเลกุลของสี มีความสามารถดูดกลืนพลังงานในช่วง สเปกตรัมต่างกัน ตั้งแต่ 400 –700 นาโนเมตร สีย้อมที่มีโครงสร้างทางโมเลกุลแตกต่างกันจะมีโทน สีและความสามารถในการดูดกลืนพลังงานแสงในช่วงความยาวคลื่นต่างกันด้วย (กาวิ, 2545)

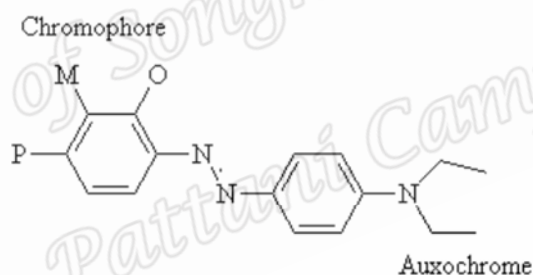
#### 2.2 การจำแนกประเภทของสีย้อม

การจำแนกประเภทของสีย้อมจะจำแนกตามแหล่งที่มาของสีย้อมแต่ละชนิด ซึ่งแบ่งได้เป็น 2 ประเภท ดังนี้

1. สีย้อมธรรมชาติ (Natural dyestuff) เป็นสีย้อมที่มาจากแหล่งธรรมชาติจากพืชและสัตว์ สีย้อมที่มาจากส่วนประกอบของพืช เช่น ส่วนลำต้น ดอก เปลือก ใบ เป็นต้น ตัวอย่างเช่น สีจาก ลูกมะเกลือ สีน้ำเงินจากต้นคราม สีเหลืองจากเนื้อไม้ไผ่ สีแดงจากดอกกรรณิการ์ สีแดงจากราก ต้นเข็ม ส่วนสีย้อมที่มาจากสัตว์ เช่น สีม่วงแดงของครั่ง สีม่วงจากหอยสังข์หนาม เป็นต้น สมัยโบราณสีย้อมธรรมชาตินิยมนำสีย้อมตกแต่งเพิ่มความสวยงามให้กับเสื้อผ้าเครื่องนุ่งห่ม โดย สีย้อมที่ใช้ในระยะนั้นจะเป็นสีย้อมที่สกัดจากธรรมชาติ และมีการใช้สารช่วยยิด (mordant) เพื่อ ช่วยทำให้สีย้อมติดคงทน การใช้สีย้อมที่สกัดมาจากธรรมชาติเป็นที่นิยมต่อเนื่องมา จนกระทั่งปลาย ศตวรรษที่ 19 ความนิยมสีย้อมธรรมชาติลดลง เนื่องจากกรรมวิธีการสกัดที่ค่อนข้างยุ่งยาก ความไม่ แน่นอนของเจดสีสีย้อม มีปัญหาเรื่องความคงทนของสีย้อมธรรมชาติ (กาวิ, 2545)

2. สีย้อมสังเคราะห์ (Synthetic dyestuff) สีย้อมประเภทนี้เป็นผลิตภัณฑ์จากน้ำมันปิโตรเลียม เมื่อน้ำมันปิโตรเลียมผ่านการสกัดแล้วจะได้สารไฮโดรคาร์บอน ได้แก่ เบนซีน และ ไซลีน ซึ่งเป็นสารไฮโดรคาร์บอนไม่อิ่มตัว สารเหล่านี้จะถูกนำไปทำปฏิกิริยาด้วยกระบวนการ ไนเตรชันแอมมิเนชัน (nitrationamination) เพื่อที่เปลี่ยนสภาพให้เป็นสารตัวกลาง และจากสาร ตัวกลางจะเปลี่ยนเป็นสีย้อมด้วยเทคนิคต่าง ๆ สีของสีย้อมสังเคราะห์ที่สะท้อนออกมาทำให้ตา

มนุษย์ปกติมองเห็นได้เกิดจากองค์ประกอบ 2 ส่วน ด้วยกัน คือ โครโมฟอร์ (chromophores) (รูปที่ 2.1) เป็นกลุ่มอะตอมของสารประกอบอินทรีย์ที่มีสีสามารถดูดกลืนแสงในช่วงที่มองเห็นได้ เนื่องจากความแตกต่างของกลุ่มโครโมฟอร์นี้ ทำให้สีย้อมสังเคราะห์ถูกแบ่งตามกลุ่มโครโมฟอร์ มีอยู่ด้วยกันหลายกลุ่ม คือ กลุ่มเอโซ (azo group) กลุ่มแอนทราควิโนน (anthraquinone group) เป็นสารกลุ่มที่นิยมใช้มากที่สุด และกลุ่มอื่น ๆ เช่น กลุ่มอินดิโก (indigo group) กลุ่มเบนโซดิฟูแรน โนน (benzodifuranone group) กลุ่มไนโตรโซ (nitroso group) กลุ่มไนโตร (nitro group) กลุ่มเอทิลีน (ethylene group) กลุ่มคาร์บอนิล (carbonyl group) กลุ่มคาร์บอนิล-ไนโตรเจน (carbonyl-nitrogen group) กลุ่มซัลเฟอร์ (sulphur group) และกลุ่มฟอร์มazan (formazan group) แต่หากสีย้อมประกอบด้วยโครโมฟอร์เพียงอย่างเดียวจะทำให้ได้เพียงสีอ่อน ๆ เท่านั้น หากต้องการสีเข้มขึ้นจะต้องมีการเพิ่มเติมโครงสร้างทางเคมีของสารเคมีกลุ่มอื่นด้วย เรียกสารกลุ่มนี้ว่า ออกโซโครม (auxochromes) (รูปที่ 2.1) เป็นกลุ่มที่สร้างความเข้ม และความสว่างของสี มีคุณสมบัติการละลายน้ำ และ ปรับปรุงคุณสมบัติ ในการ ดูดติดกับเส้นใยให้กับสีย้อม หมู่ที่ละลายน้ำ เช่น  $-\text{SO}_3\text{Na}$ ,  $-\text{COONa}$ ,  $-\text{OH}$  เป็นต้น (กาวิ, 2545)



รูปที่ 2.1 โครโมฟอร์และออกโซโครมของสีย้อม  
ที่มา: กาวิ (2545)

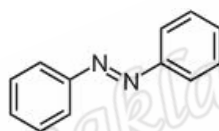
### 2.3 การจำแนกสีย้อมสังเคราะห์

1. จำแนกตามความสามารถในการละลายน้ำ โดยจำแนกเป็นสีย้อมที่สามารถละลายน้ำ เช่น สีไดเรกต์ (Direct dye) สีเบสิก (Basic dye) สีรีแอคทีฟ (Reactive dye) และสีย้อมที่ไม่ละลายน้ำ เช่น สีแวต (Vat dye) สีดีสเพอร์ส (Disperse dye) เป็นต้น (Joseph, 1992)

2. จำแนกตามโครงสร้างทางเคมี สีย้อมในปัจจุบันมีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็นโครงสร้างหลัก ๆ อยู่มากกว่า 30 ชนิด แต่ที่ใช้งานกันมากจริง ๆ มีอยู่ไม่ถึง 10 ชนิด อาทิ เช่น สีย้อมเอโซ สีย้อมแอนทราควิโนน สีย้อมซัลเฟอร์ สีย้อมอินดิโกอยด์ สีย้อมไนโตรโซ สีย้อมไนโตร สีย้อมฟอร์มazan เป็นต้น (กาวิ, 2543)

### 2.3.1 สีย้อมเอโซ (Azo dye)

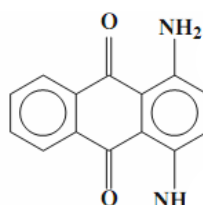
สีย้อมเอโซ เป็นสีย้อมสังเคราะห์ ที่มีกลุ่มเอโซ (-N=N-) หนึ่งกลุ่มหรือมากกว่าอยู่ในโครงสร้างของสี (รูปที่ 2.2) ทำหน้าที่เป็นโครโมฟอร์ และมีออกโซโครมได้หลายกลุ่ม จัดเป็นกลุ่มสีที่มีการนำมาใช้มากที่สุดในอุตสาหกรรม โดยเฉพาะในการฟอกย้อม สีย้อมเอโซมิให้เล็อกในทุกเจดสีเนื่องจากกลุ่มเอโซ (N=N) จะต่ออยู่กับโครงสร้างของเบนซีน เนพทาลิน โครงสร้าง aromatic heterocyclic หรือโครงสร้าง aliphatic และยังประกอบด้วยหมู่ที่ต่อกับโครงสร้างเหล่านี้ เช่น หมู่ของเมทอกซี (methoxy), ไฮดรอกซี (hydroxy), คาร์บอกซิล (carboxyl), ไนโตร (nitro), คลอโร (chloro), ซัลโฟเนต (sulphonate) ซึ่งองค์ประกอบเหล่านี้เป็นตัวกำหนดให้เกิดโครงสร้างสีแบบต่าง ๆ (Razo-Flores *et al.*, 1997) แต่จะนิยมใช้ในช่วงสีเหลือง แสด แดง น้ำตาลและดำ อีกทั้งสีย้อมเอโซเป็นสีเป็นสีที่สังเคราะห์ได้ง่าย ละลายน้ำได้ดี มีความสว่างสดใส และความคงทนต่อแสงอยู่ในเกณฑ์ปานกลางถึงดี ที่สำคัญคือ ราคาไม่แพง (กาวิ, 2543)



รูปที่ 2.2 ตัวอย่างโครงสร้างสีย้อมเอโซ  
ที่มา: Zhang *et al.* (2009)

### 2.3.2 สีย้อมแอนทราควิโนน (Anthraquinone dyes)

สีย้อมแอนทราควิโนน เป็นสีย้อมที่มีโครงสร้างแอนทราควิโนนเป็นโครงสร้างหลักอยู่ในโมเลกุล (รูปที่ 2.3) และส่วนใหญ่จะสังเคราะห์โดยอาศัยแอนทราควิโนนเป็นสารเริ่มต้น สีย้อมกลุ่มนี้มีความสำคัญเป็นอันดับสองรองจากสีย้อมเอโซ โดยมีการใช้งานประมาณร้อยละ 25 ของสีย้อมทั้งหมด เจดสีที่สำคัญ คือ ม่วง ฟ้า เขียวและแดงสด เป็นสีที่มีความสว่างสดใส และมีความคงทนต่อแสงอยู่ในเกณฑ์ดี แต่ความเข้มสีน้อยกว่าสีย้อมเอโซ และยังมีราคาแพงอีกด้วย (กาวิ, 2543)



รูปที่ 2.3 โครงสร้างที่สำคัญในโมเลกุลของสีย้อมแอนทราควิโนน  
ที่มา: Xu *et al.* (2006)

### 2.3.3 สีย้อมซัลเฟอร์ (Sulphur dyes)

สีย้อมซัลเฟอร์ เป็นสีย้อมที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบอยู่ใน โครงสร้างของโมเลกุล นิยมใช้ย้อมสีทึบ ๆ ที่ต้องการความเข้มสูง เช่น สีดำ สีนํ้าตาล และสีนํ้าเงิน สีย้อมซัลเฟอร์ มีราคาถูก แต่มีเฉดสีให้เลือกไม่มากนักส่วนมากมักให้สีทึบไม่สดใส (กาวิ, 2543)

### 2.3.4 สีย้อมอินดิโกอยด์ (Indigoid dyes)

สีย้อมอินดิโกอยด์ เป็นสีที่มีโครงสร้างของอินดิโกติน (Indigotin) ซึ่งเป็นโครงสร้างหลักสีย้อมอินดิโกอยด์เป็นสีที่มีความสว่าง สดใส ราคาถูก มีความคงทนต่อการซักและการฟอกขาวดี จึงเป็นที่ต้องการของอุตสาหกรรมฟอกย้อม (กาวิ, 2543)

### 2.3.5 สีย้อมไนโตรโซ (Nitroso dyes)

สีย้อมไนโตรโซ สีย้อมกลุ่มนี้มีโครงสร้างทางเคมีเป็นสารประกอบอะโรมาติกที่มีหมู่ไนโตรโซ (-NO) และหมู่ไฮดรอกซิลในตำแหน่งที่ติดกันบนวงแหวนเบนซีน ในการย้อมจะทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับโลหะต่าง ๆ เช่น เหล็ก โครเมียม โคบอลต์ และนิกเกิล เป็นต้น (กาวิ, 2543)

### 2.3.6 สีย้อมไนโตร (Nitro dyes)

สีย้อมไนโตร สีย้อมกลุ่มนี้มีโครงสร้างทางเคมีเป็นสารประกอบอะโรมาติกที่มีหมู่ไนโตร (-NO<sub>2</sub>) และหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) หรือหมู่อะมิโน (-NH<sub>2</sub>) ในตำแหน่งที่ติดกันหรือตรงข้ามบนวงแหวนเบนซีน (กาวิ, 2543)

### 2.3.7 สีย้อมฟอร์มาซาน (Formazan dyes)

สีย้อมฟอร์มาซานเป็นสีที่มีโครงสร้างของกลุ่มไตรไซคลิกที่แสดงอยู่ในรูปสารประกอบเชิงซ้อนกับทองแดง ส่วนใหญ่พบในสีย้อมเอซิด และสีย้อมรีแอคทีฟโดยที่เฉดสีส่วนใหญ่เป็นสีนํ้าเงิน (กาวิ, 2543)

## 2.4 ความเป็นพิษของสีย้อม

ปัจจุบันโรงงานอุตสาหกรรมและกรมควบคุมมลพิษยังไม่ได้กำหนดมาตรฐานสีย้อมในน้ำทิ้ง โดยระบุเพียงว่าน้ำทิ้งต้องไม่มีสีย้อมเป็นที่พึงรังเกียจ เมื่อเปรียบเทียบกับต่างประเทศที่มีความเข้มงวดเรื่องการรักษาสีสิ่งแวดล้อม เช่น เยอรมัน ญี่ปุ่น และสิงคโปร์ พบว่า ต่างก็ยังไม่มีความมาตรฐานสีย้อมในน้ำทิ้งเช่นเดียวกัน สาเหตุที่สีย้อมในน้ำทิ้งไม่เป็นที่เข้มงวดในต่างประเทศนั้น เนื่องมาจาก

สี้อมมีความเป็นพิษต่ำ แต่สี้อมบางชนิดอาจเปลี่ยนแปลงกลายเป็นสารมีพิษได้ เช่น สี้อมที่มีโครงสร้างแบบเอโซ (อังคณา, 2540)

## 2.5 ความเป็นพิษของสี้อมเอโซ

โดยทั่วไปสี้อมถือได้ว่าเป็นสารที่มีความเป็นพิษต่ำ สำหรับสี้อมเอโซที่มีจำหน่ายอยู่ในรูปของเหลว เป็นผง และเป็นเม็ดละเอียด ดังนั้น สี้อมสามารถเข้าสู่ร่างกายได้ 3 ทาง คือ ทางจุกด้วยการสูดดมสีที่ฟุ้งกระจายในอากาศ ก่อให้เกิดการระคายเคืองต่อระบบทางเดินหายใจ ทางผิวหนังโดยการสัมผัสทำให้ระคายเคืองต่อเยื่อเมือก และทางปากโดยปะปนไปกับอาหารที่รับประทานเข้าไป เนื่องจากสีชนิดนี้จะรวมตัวกับโปรตีนในร่างกายมนุษย์ที่อุณหภูมิปกติของร่างกาย ซึ่งไปกระตุ้นความสามารถในการรับรู้ของระบบทางเดินหายใจ จนทำให้เกิดการระคายเคือง ในปี 1991 องค์กร ETAD (Ecological and Toxicology Association of Dyes and Organic Pigment Manufacturers) ได้ออกประกาศเกี่ยวกับความเป็นพิษของสี้อมเอโซเมื่อสัมผัสโดยผิวหนังหรือสูดดมเข้าไป ตลอดจนแนวทางปฏิบัติในการใช้สี้อมเอโซอย่างถูกวิธีเพื่อสุขภาพที่ดีของผู้ปฏิบัติงาน (อังคณา, 2540) นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Gottlieb *et al.* (2003) ที่ศึกษาความเป็นพิษของสี้อมเอโซหลังจากการย่อยสลาย พบว่า สี้อมเอโซหลังจากการย่อยสลาย จะมีสารประกอบอะโรมาติกเอมีน ซึ่งเป็นสารมัลติเจน และมีความเป็นพิษโดยก่อให้เกิดอาการวิงเวียน หากได้รับสารนี้เป็นเวลานานจะเป็นอันตรายต่อระบบประสาทได้ อีกทั้งยังเป็นสารก่อมะเร็งอีกด้วย แต่อย่างไรก็ตาม เอมีนที่เกิดขึ้นไม่ได้เป็นพิษทั้งหมด เช่น กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีน และพอลิเอไมด์ ซึ่งไม่เป็นอันตราย (Diaz, 2004)

## 2.6 กลไกที่มีผลต่อการเปลี่ยนรูปของสี้อมเอโซ

กลไกที่มีผลต่อการเปลี่ยนรูปของสี้อมเอโซเป็นกลไกการเกิดปฏิกิริยาต่าง ๆ ของสี้อมเอโซซึ่งทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างหลัก โครงสร้างรอง เช่น การเปลี่ยนแปลงหรือการคัดออกของหมู่ไฮดรอกซิล รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างที่ทำให้สี้อมเอโซมีความซับซ้อนของโครงสร้างน้อยลง เช่น การย่อยสลายซึ่งมักจะทำให้ความเป็นพิษของสารลดลง กลไกการเปลี่ยนรูปของสี้อมเอโซประกอบด้วย การเปลี่ยนรูปทางเคมี (Chemical transformation) ทางกายภาพ (Physical transformation) และทางชีวภาพ (Biotransformation) (อลิสสา, 2550)

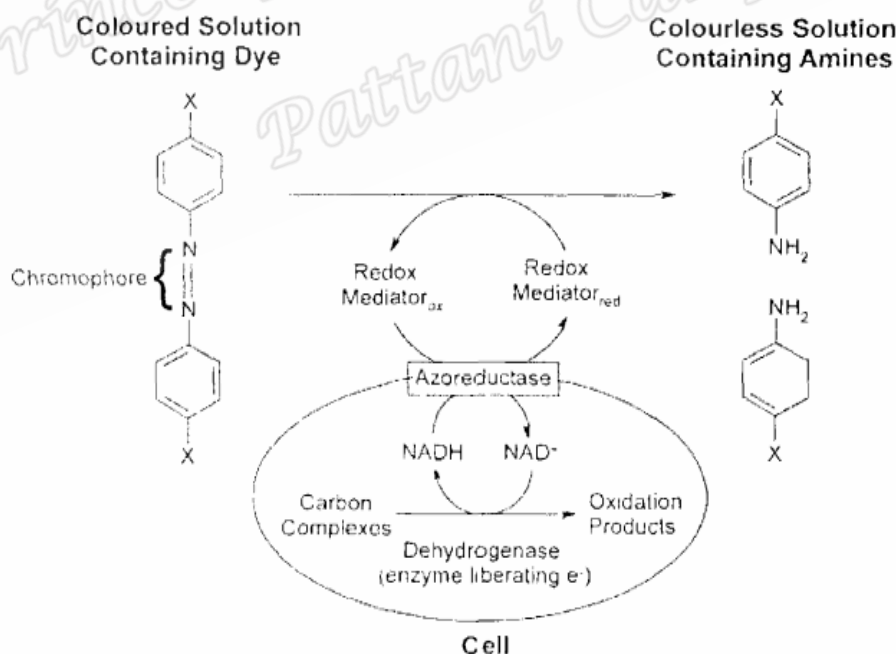
บทบาทของกลไกที่มีผลต่อการเปลี่ยนรูปของสี้อมเอโซต่อการบำบัดสี้อมเอโซที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม การเปลี่ยนรูปทางเคมีและกายภาพนั้นส่วนใหญ่จะเกิดจากการเกิดปฏิกิริยาหรือการสร้างพันธะของสี้อมเอโซ สำหรับการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพมักจะเกิดขึ้นจากการทำงาน

ของแบคทีเรียและสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ในธรรมชาติ การเปลี่ยนรูปทางชีวภาพเป็นการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างสารด้วยวิถีเมแทบอลิซึมต่าง ๆ ของแบคทีเรีย ส่วนใหญ่ทำให้สีของเอโซมีโครงสร้างที่ก่อให้เกิดความเป็นพิษน้อยลง (รูปที่ 2.4) และผลพลอยได้จากปฏิกิริยาทางชีวภาพเหล่านี้คือแบคทีเรียได้รับสารอาหารและพลังงานจากปฏิกิริยาดังกล่าว หากแบคทีเรียสามารถย่อยสลายสีของเอโซเหล่านี้ได้อย่างสมบูรณ์จะได้คาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ เช่นเดียวกันกับการย่อยสลายสารอินทรีย์ต่าง ๆ ในธรรมชาติ แบคทีเรียก็จะได้รับประโยชน์สูงสุดจากปฏิกิริยานี้โดยการใช้สีของเอโซเหล่านี้เป็นสารอาหารในการสร้างชีวโมเลกุลต่าง ๆ และใช้พลังงานจากปฏิกิริยาเหล่านี้ในวิถีเมแทบอลิซึมต่าง ๆ รวมทั้งการซ่อมแซมเซลล์ต่าง ๆ (อลิสตา, 2550)

กลไกการย่อยสลายโดยสรุปมี 2 แบบ คือ

1. การขนส่งอิเล็กตรอนโดยสีเอโซเป็นตัวรับอิเล็กตรอน โดยอาศัยเอนไซม์ระหว่างกระบวนการเมแทบอลิซึม ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้างพลังงาน ATP ภายในเซลล์ (Pearce *et al.*, 2003)

2. การเกิดปฏิกิริยารีดักชันโดยสีเอโซเป็นตัวเสี่ยอิเล็กตรอนโดยผ่านสารตัวกลางของผลผลิตสุดท้ายในปฏิกิริยา จากกระบวนการเมแทบอลิซึมของเชื้อแบคทีเรียที่ไม่เกี่ยวข้องกับการสร้างพลังงาน ATP ภายในเซลล์ (Wang *et al.*, 2008)



รูปที่ 2.4 กลไกการสลายสีโดยเซลล์แบคทีเรีย

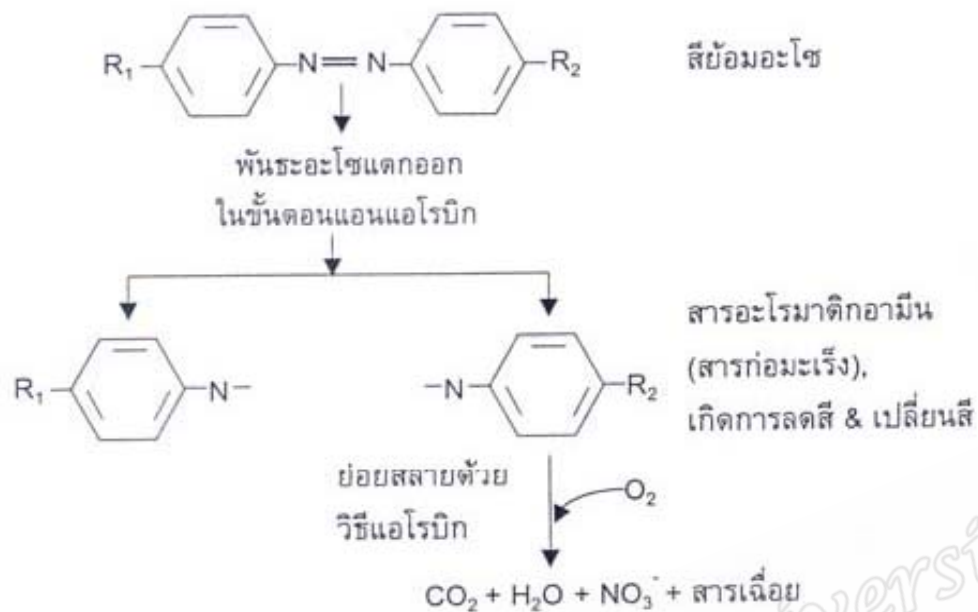
ที่มา: Pearce *et al.* (2003)

## 2.7 เทคโนโลยีและวิธีการในการย่อยสลายสีย้อมเอโซ

เทคโนโลยีและวิธีการในการย่อยสลายสีย้อมเอโซและบำบัดน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมฟอกย้อมควบคู่กันไป มีทั้งการบำบัดสีย้อมด้วยวิธีทางกายภาพ เคมี หรือทั้งสองวิธีร่วมกัน เช่น การตกตะกอนด้วยสารเคมี การแลกเปลี่ยนไอออน การใช้โอโซน และวิธีทางชีวภาพ เช่น การใช้ระบบแอกทิเวเต็ดสลัดจ์ (activate sludge) การสลายย่อยสีย้อมเอโซโดยแบคทีเรีย (Sen and Demirer, 2003)

## 2.8 การสลายย่อยสีย้อมเอโซโดยแบคทีเรีย

การย่อยสลายสีเอโซโดยแบคทีเรียเป็นวิธีการที่อาศัยความสามารถของแบคทีเรียในการย่อยสลายพันธะเอโซ จากโมเลกุลใหญ่ให้เป็นโมเลกุลที่เล็กลง (Forgacs *et al.*, 2004) แต่ในสภาวะที่มีออกซิเจนอยู่ด้วย (aerobic condition) การย่อยสลายสีเอโซโดยแบคทีเรียจะเป็นไปได้ยาก เนื่องจากออกซิเจนจะเป็นตัวที่รับอิเล็กตรอนที่ดีกว่าหมู่เอโซ (N=N) ดังนั้นแบคทีเรียจะให้อิเล็กตรอนอิสระแก่ออกซิเจนมากกว่าสีเอโซ ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (anaerobic condition) อิเล็กตรอนอิสระที่เกิดจากแบคทีเรียจะทำให้หมู่เอโซแตกออก เนื่องจากเอนไซม์เอโซรีดักเทส (azoreductase) ที่เกิดในไซโทพลาสซึมเมมเบรน (cytoplasmic membrane) ได้ผลผลิตคืออะโรมาติกเอมีน และจากการที่หมู่เอโซแตกออกนี้เองทำให้สีมีปริมาณลดลง หมู่อะโรมาติกบางชนิดที่เกิดจากการแตกของหมู่เอโซอาจมีความเป็นพิษหรือมีความสามารถในการก่อมะเร็งได้ แต่สารเหล่านี้สามารถสลายหรือเปลี่ยนโครงสร้างให้เป็นสารที่ไม่มีพิษโดยการบำบัดแบบใช้ออกซิเจน (Frijter *et al.*, 2006) (รูปที่ 2.5) ซึ่งอาจทำโดยปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชัน (Hydroxylation) หรือการทำให้วงอะโรมาติกเปิดออก การสลายสีเอโซจึงเหมาะที่จะใช้สภาวะที่มีการใช้ ออกซิเจนและไม่ใช้ออกซิเจนร่วมกัน (Jirasripongpun *et al.*, 2007) การบำบัดโดยการใช้เอนไซม์บริสุทธิ์ไม่นิยมทำเนื่องจากมีราคาสูง ตลอดจนเซลล์ของแบคทีเรียมีความสามารถในการป้องกันอันตรายจากสิ่งแวดล้อมต่อเอนไซม์ได้ เนื่องจากคุณสมบัติความเป็นเยื่อเลือกผ่านของผนังเซลล์ของแบคทีเรีย (ศศิพงษ์, 2550)



รูปที่ 2.5 ขั้นตอนการสลายตัวของพันธะอะโซทำให้ความเข้มข้นลดลง  
 ที่มา: รัชิตัญญ์และคณะ (2549)

## 2.9 กลไกในการย่อยสลายสีย้อมโดยแบคทีเรีย

กลไกในการย่อยสลายสีย้อมมี 2 กลไกหลัก คือ

### 1. กลไกการดูดซับ (Bioadsorption)

กลไกการดูดซับเป็นการดูดซับสีเข้ามาในเยื่อหุ้มเซลล์และมีบางส่วนถูกดูดซับภายในไซโทพลาซึม

### 2. กลไกการถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ (Biodegradation)

การผลิตเอนไซม์ (Enzyme) มีทั้งเอนไซม์ที่ปล่อยออกมาภายในเซลล์ (Intracellular enzyme) และเอนไซม์ที่ปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ (Extracellular enzyme)

เอนไซม์ที่ปล่อยออกมาภายในเซลล์ คือ เอนไซม์ที่ทำหน้าที่อยู่ภายในเซลล์เพื่อสร้างพลังงาน และสารต่าง ๆ ให้แก่เซลล์ (เสาวนีย์, 2547)

เอนไซม์ที่ปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ คือ เอนไซม์ที่สร้างขึ้นแล้วถูกปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ ทำหน้าที่ย่อยสารอาหารที่อยู่นอกเซลล์ เพื่อจะได้ดูดซึมผ่านเข้าไปในเซลล์ได้ง่าย (เสาวนีย์, 2547)



### 2.9.1 กลไกการดูดซับ

กลไกการดูดซับในกิจกรรมการย่อยสลายสีเขียวของเชื้อราเกิดจากแบคทีเรียดูดซับสีเขียวเข้าสู่เซลล์ ทำให้ความเข้มข้นของสีเขียวลดลงขั้นหนึ่ง แต่เป็นเพียงระยะเวลาสั้น ๆ ไม่สามารถลดสีได้ในระยะยาว จนเมื่อถึงจุดที่แบคทีเรียดูดซับสีจนถึงจุดอิ่มตัวแล้ว เซลล์จะมีกระบวนการทางชีวภาพเพื่อย่อยสลายสีเกิดขึ้น (Silveira *et al.*, 2009)

### 2.9.2 กลไกการย่อยสลายสีเขียวด้วยเอนไซม์

จุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์ที่ปล่อยออกมาภายในเซลล์และเอนไซม์ที่ปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ เพื่อเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสีเขียว โดยในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสีเขียว อาจประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิด เรียกรวมว่า Ligninolytic enzymes ได้แก่ เอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (lignin peroxidases; Lip) แลคเคส (laccases; Lac) และแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (manganese peroxidases; MnP) เป็นเอนไซม์ที่เกิดจากกลไกการย่อยสลายแบบออกซิเดทีฟสำหรับเอนไซม์เอโซรีดักเตส (azoreductase) เป็นเอนไซม์ที่เกิดจากกลไกการย่อยสลายแบบรีดักทีฟ โดยจุลินทรีย์ผลิตขึ้นและปล่อยออกมาย่อยสลายสารจำพวกอะโรมาติกซึ่งมีโมเลกุลขนาดใหญ่ เอนไซม์เอโซรีดักเตสต้องการ NADH และ NADPH เป็นโคแฟกเตอร์ ในการย่อยสลายสีเขียว (Nishiya and Yamamoto, 2007) เอนไซม์เอโซรีดักเตสมีทั้งชนิดที่เป็น Intracellular enzyme (Hsueh and Chen, 2008) และ Extracellular enzyme (Dafale *et al.*, 2008)

#### 2.9.2.1 เอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (Lignin Peroxidase; LiP)

เป็นกลไกการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์จะทำปฏิกิริยากับ  $H_2O_2$  เกิดการออกซิไดซ์สารประกอบอะโรมาติก เช่น Veratryl alcohol ได้อนุมูลบวกแอริล ซึ่งสามารถถูกออกซิไดซ์ต่อไปได้เมื่อมีออกซิเจน ระบบย่อยสลายลิกนินมีลักษณะไม่จำเพาะเจาะจง ทำให้สามารถนำเอนไซม์กลุ่มนี้ไปใช้ออกซิไดซ์สารประกอบอะโรมาติกอื่น ๆ ได้อีกมากมาย ตัวอย่างเช่น สารประกอบ Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, Polychlorinated Phenol, Dioxins และ Synthetic dye เป็นต้น (อรชรีรา, 2552)

#### 2.9.2.2 เอนไซม์แลคเคส (Laccase; Lac)

แลคเคส มีประสิทธิภาพการออกซิไดซ์ สารประกอบที่มีโครงสร้างคล้ายลิกนิน ทั้งที่เป็นกรดฟีนอลิก และไม่เป็นกรด ฟีนอลิก ตลอดจนสารก่อนมลพิษชนิดต่าง ๆ ได้ในสถานะที่มีออกซิเจน จึงมีการประยุกต์ใช้แลคเคส ในการบำบัดน้ำเสียของโรงงานอุตสาหกรรม โดยเฉพาะอย่างยิ่งน้ำเสียจากโรงงานกระดาษและเยื่อกระดาษ โรงงานสิ่งทอ โรงงานปิโตรเคมี สารกำจัดวัชพืช และสารกำจัดแมลง เป็นต้น (Eichlerova *et al.*, 2003)

### 2.9.2.3 เอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (Manganese Peroxidase ; MnP)

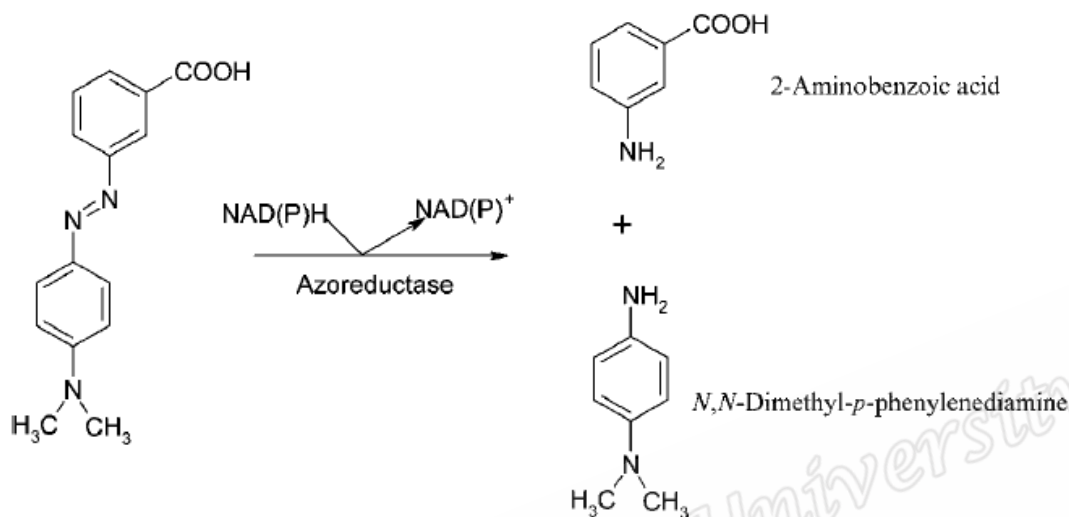
เป็นไกลโคโปรตีนที่เร่งปฏิกิริยาการออกซิไดซ์สารประกอบอะโรมาติกได้อินนูลิฟีนออกซีหรืออินนูลบวกรแอริล (อรชิวรา, 2552)

### 2.9.2.4 เอนไซม์เอโซรีดักเทส (Azoreductase)

แบคทีเรียสร้างเอนไซม์เอโซรีดักเทสเพื่อย่อยสลายพันธะเอโซให้แตกออก ทำให้โมเลกุลของสีเอโซเล็กลงและในขั้นตอนนี้จะทำให้ความเข้มข้นลดลงด้วย กระบวนการย่อยสลายสีเอโซโดยเอนไซม์เอโซรีดักเทสเกิดขึ้นได้ทั้งในสภาพเดิมหรือไม่เดิมอากาศ Chen (2006) พบว่า แบคทีเรียบางชนิดสามารถย่อยสลายสีย้อมเอโซได้ ทั้งในสภาพที่มีอากาศและในสภาพที่ไม่มีอากาศ โดยแบคทีเรียจะมีการสร้างเอนไซม์เอโซรีดักเทสเพื่อย่อยสลายพันธะเอโซในโมเลกุลของสีย้อมให้แตกออก ทำให้ได้สารประกอบอะโรมาติกเอมีน อย่างไรก็ตาม Dong-lei *et al.* (2007) ได้ศึกษาการย่อยสลายสีย้อมเอโซได้ ทั้งในสภาพที่มีอากาศและในสภาพที่ไม่มีอากาศ พบว่า ในสภาพที่ไม่มีอากาศจะเหมาะสมต่อการย่อยสลายสีเอโซมากกว่า และ Chen (2002) พบว่า การเติมออกซิเจนลงไประหว่างเพาะเลี้ยงเชื้อ *Pseudomonas luteola* จะลดการสร้างเอนไซม์เอโซรีดักเทสที่สร้างขึ้นภายในเซลล์ ทำให้การย่อยสีหยุดลง ในทางตรงกันข้ามการบ่มในสภาวะคงที่ (static condition) ปริมาณออกซิเจนจะมีเพียงเล็กน้อยที่บริเวณผิวหน้าอาหาร จะก่อให้เกิดการชักนำการสร้างเอนไซม์เอโซรีดักเทสมากยิ่งขึ้น Zimmermann *et al.* (1982) เสนอกลไกการย่อยสีกลุ่มเอโซโดยแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการตัดพันธะของหมู่เอโซด้วยเอนไซม์เอโซรีดักเทส ที่ใช้ NADH หรือ NADPH ในสภาพไม่มีอากาศหรือมีออกซิเจนปริมาณจำกัด (เช่นเพาะเลี้ยงในสภาวะคงที่) ซึ่ง NADH หรือ NADPH จะทำหน้าที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอน (รูปที่ 2.6) เป็นผลให้เกิดการสร้างผลิตภัณฑ์เป็นสารอะโรมาติกเอมีนซึ่งจะถูกย่อยสลายในสภาพมีออกซิเจนด้วยเอนไซม์ประเภทไม่จำเพาะเจาะจงเข้าสู่กระบวนการ hydroxylation และการเปิดวงอะโรมาติก

ในสภาพที่มีออกซิเจน กระบวนการย่อยสลายจะเกิดแบบจำเพาะและจะต้องเกิดขึ้นในระบบที่เป็นระบบต่อเนื่อง จนกระทั่งเซลล์สร้างเอนไซม์เอโซรีดักเทส ซึ่งมีความจำเพาะต่อสีเอโซภายใต้สภาวะที่กำหนด จึงทำการย่อยสลายพันธะเอโซได้ ในทางตรงกันข้ามถ้าเกิดการสลายในสภาพที่ไม่มีออกซิเจน การเกิดปฏิกิริยารีดักชันจะเกิดในแบบไม่จำเพาะซึ่งหมายถึงการเกิดกับหมู่เอโซด้วยการเคลื่อนที่ของอิเล็กตรอนระหว่างสีย้อมเอโซในสิ่งแวดล้อมและเซลล์แบคทีเรียมีความสัมพันธ์กัน โดยมักจะเกิดที่เยื่อหุ้มเซลล์ด้านนอก (outer membrane) แบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์เอโซรีดักเทสในการย่อยสลายหรือลดสีย้อมเอโซได้ เช่น *Xenophilus azovorans* (Blumel *et al.*, 2002) *Rhodobacter sphaeroides* (Bin *et al.*, 2004) *Staphylococcus aureus* (Chen *et al.*,

2005) *Bacillus velezensis* (Bafana et al., 2008) และ *Pseudomonas aeruginosa* (Dafale et al., 2008)



รูปที่ 2.6 การย่อยสลายสีซ้อมเอโซชนิด Methyl Red โดยเอนไซม์เอโซรีดักเทส  
ที่มา: Chen et al. (2005)

## 2.10 ปัจจัยที่มีผลต่อแบคทีเรียในการย่อยสลายสีซ้อมเอโซ

ความสามารถของแบคทีเรียในการย่อยสลายสีซ้อมเอโซนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยที่ส่งผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย ซึ่งประกอบด้วยปัจจัยทางกายภาพและเคมี ได้แก่

1. สารอาหาร เป็นสิ่งจำเป็นต่อการเจริญและการดำรงชีวิตของแบคทีเรีย แบคทีเรีย คูดซิม สารอาหารเพื่อการแบ่งเซลล์และเพิ่มจำนวน ดังนั้นสารอาหารที่จำเป็นดังกล่าวได้แก่ สารที่เป็นองค์ประกอบหลักของเซลล์ซึ่งได้แก่ คาร์บอน ไนโตรเจน และฟอสฟอรัส สำหรับองค์ประกอบอื่น จำพวกสารอนินทรีย์นั้น ถึงแม้เป็นองค์ประกอบย่อยในเซลล์แต่เป็นสารที่จำเป็นต่อการทำงานของเอนไซม์ในวิถีเมแทบอลิซึมต่าง ๆ (อลิสสา, 2550)

2. ความเป็นกรดต่าง (pH) ของสิ่งแวดล้อมมีผลต่อระบบการคูดซิมสารอาหารการเจริญ และการทำงานของแบคทีเรียในการย่อยสลายสีซ้อมเอโซในสิ่งแวดล้อม Vidali (2001) รายงานถึงค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียโดยทั่วไปอยู่ในช่วง 5.5–8.8 แต่ช่วงที่เหมาะสมต่อการเกิดการย่อยสลายทางชีวภาพ คือ ในช่วง 6.5–8.0 (วีรานูชและคณะ, 2551) การควบคุมความเป็นกรดต่างของสิ่งแวดล้อมนั้น นอกเหนือจากจะเป็นการควบคุมให้อยู่ในช่วงที่แบคทีเรียมีการเจริญที่ดีแล้วนั้น ยังต้องคำนึงถึงสมบัติการแตกตัวของสีซ้อมเอโซในสภาวะที่มี

ค่าความเป็นกรดต่างที่แตกต่างกัน กล่าวคือ สำหรับสีย้อมเอโซบางชนิด เมื่อแตกตัวในช่วงความเป็นกรดต่างหนึ่ง ๆ แล้ว จะมีลักษณะสมบัติของสารที่แตกต่างไปซึ่งอาจส่งผลต่อการย่อยสลายทางชีวภาพของแบคทีเรีย เช่น มีความเป็นพิษมากขึ้น หรือมีประจุในโครงสร้าง ทำให้แบคทีเรียไม่สามารถดูดซึมและย่อยสลายได้ นอกจากนี้แล้วในปฏิกิริยาการย่อยสลายสารประกอบฮาโลเจน เช่น สารประกอบคลอรีนไฮโดรคาร์บอน สารผลิตภัณฑ์ชนิดหนึ่งที่ได้คือ กรดไฮโดรคลอริก ซึ่งมีผลทำให้ค่าความเป็นด่างของสิ่งแวดล้อมเปลี่ยนแปลงไปและมีผลต่อการเจริญ การทำงานของแบคทีเรีย ดังนั้นในทางปฏิบัติแล้วในการบำบัดสีย้อมเอโซในสิ่งแวดล้อมด้วยวิธีทางชีวภาพนั้น จะต้องมีการตรวจสอบและควบคุมความเป็นกรดอย่างสม่ำเสมอ (อลิสตา, 2550)

3. อุณหภูมิ เป็นปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการย่อยสลายสีย้อมเอโซ ซึ่งเป็นไปตามกฎของ Arrhenius ซึ่งกล่าวถึงการผันตรงระหว่างอัตราการเกิดปฏิกิริยา (Reaction rate) และการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิ สำหรับปฏิกิริยาทางชีวภาพนั้น การเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิจนถึงระดับหนึ่งส่งผลให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาในแบคทีเรียเพิ่มขึ้นด้วย นอกจากนั้นแล้วการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมียังทำให้สีย้อมที่ส่วนใหญ่มีสมบัติการละลายน้ำต่ำและเป็นสารไฮโดรโฟบิก มีการละลายน้ำออกมามากขึ้น ซึ่งทำให้แบคทีเรียสามารถดูดซึมเพื่อย่อยสลายได้มากขึ้นด้วย (Increase of bioavailability) อย่างไรก็ตามเนื่องจากอุณหภูมิมิผลต่อโครงสร้างและการทำงานของเอนไซม์ในวิถีเมแทบอลิซึมต่าง ๆ ของแบคทีเรีย ดังนั้นการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิที่สูงเกินไปจึงมีผลเสียต่อความเสถียรของโครงสร้างและการทำงานของเอนไซม์ Dafale *et al.* (2008) รายงานถึงรูปแบบความสัมพันธ์ของอุณหภูมิและอัตราการเกิดปฏิกิริยาการย่อยสลายจะมีลักษณะเป็นรูปแบบระฆังคว่ำ (Bell - shaped curve) กล่าวคือ ที่อุณหภูมิต่ำ (ต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียส) อัตราการทำงานของวิถีเมแทบอลิซึมในแบคทีเรียจะเป็นไปอย่างช้า ๆ ส่งผลให้การย่อยสลายสีย้อมเกิดขึ้นได้อย่างช้ามาก การเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิส่งผลให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นจนถึงจุดหรือช่วงสูงสุดซึ่งเป็นช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดของการเกิดปฏิกิริยา ซึ่งอัตราการเกิดการย่อยสลายสีย้อมเอโซจะเกิดได้อย่างสูงสุด และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้นต่อไปจะมีผลต่อระบบเอนไซม์ของแบคทีเรีย จึงทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาลดลง

4. ลักษณะสมบัติของแบคทีเรีย วิถีเมแทบอลิซึมและกระบวนการต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับความสามารถของแบคทีเรียในการทนทานต่อความเป็นพิษของสีย้อมเอโซและความสามารถในการย่อยสลายสีย้อมเอโซและวิถีเมแทบอลิซึมของแบคทีเรีย (อลิสตา, 2550)

5. ความเข้มของสี ความเข้มของสีมีผลต่ออัตราการสลายสีย้อมเอโซโดยแบคทีเรีย เนื่องจากความเข้มของสีที่เพิ่มขึ้นมีผลต่อการเจริญและการสร้างเอนไซม์ในการย่อยสลาย ดังนั้นความเข้มของสีที่สูงจึงต้องใช้ระยะเวลาเพิ่มขึ้นในการย่อยสลาย (Dafale *et al.*, 2008)

6. โครงสร้างและสมบัติของสีย้อม เช่น ความมีหรือไม่มีขั้วของสาร ความคงทนในสิ่งแวดล้อม ความสามารถในการละลายน้ำ เป็นต้น ซึ่งสมบัติเหล่านี้เป็นปัจจัยส่วนหนึ่งที่มีผลกระทบต่อความสามารถของแบคทีเรียในการย่อยสลายสารเหล่านี้ได้แตกต่างกัน โครงสร้างของสีที่มีความซับซ้อนน้อยกว่าจะถูกสลายได้ง่ายกว่า (วีรานุชและคณะ, 2551) นอกจากนี้หมู่ที่เกาะบนวงอะโรมาติก เช่น methoxy, sulpho, nitro หรือ hydroxy รวมทั้งตำแหน่งที่เกาะ เช่น ตำแหน่ง *ortho*, *meta*, *para* ก็มีผลต่ออัตราการย่อยสลายสีเช่นกัน (อลิสตา, 2550)

7. ตัวให้อิเล็กตรอน (electron donor) การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของตัวให้อิเล็กตรอน เป็นปฏิกิริยาที่เกิดควบคู่กับการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของสีเอโซ เช่น NADH, NADPH และ formate เป็นตัวให้อิเล็กตรอนในสถานะที่ไม่มีออกซิเจนแก่สีเอโซโดย formate จะผ่าน formate dehydrogenase จากรายงานของ Bafana *et al.* (2008) ที่ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายสีย้อมเอโซชนิด Direct Red 28 โดยเอนไซม์เอโซรีดักเตสจากแบคทีเรีย *Bacillus velezensis* และใช้ NADH และ NADPH เป็นตัวให้อิเล็กตรอนในสถานะที่ไม่มีออกซิเจน พบว่า เอนไซม์เอโซรีดักเตสต้องการ NADH เป็นตัวให้อิเล็กตรอนในการย่อยสลายสี Direct Red 28 และพบกิจกรรมเอนไซม์เอโซรีดักเตส เท่ากับ 0.48 ยูนิต์ต่อมิลลิกรัมโปรตีน Chen *et al.* (2005) ศึกษาประสิทธิภาพของเอนไซม์เอโซรีดักเตส (Azo1) จากแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* และใช้ NADPH เป็นตัวให้อิเล็กตรอนในการย่อยสลายสีย้อมเอโซชนิด Methyl Red พบว่า หลังจากย่อยสลาย Methyl red แยกตัวได้เป็น *N,N*-dimethyl-p-phenylenediamine และ 2-aminobenzoic acid (รูปที่ 2.8) Yoo *et al.* (2001) พบว่า องค์ประกอบที่อยู่ภายในของเซลล์ที่แตกออก สามารถทำหน้าที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนได้ในกระบวนการย่อยสลายสีเอโซทางชีวภาพภายใต้สถานะแอนแอโรบิก

8. ค่า redox potential อัตราการย่อยสลายขึ้นอยู่กับความต่างศักย์ระหว่างให้อิเล็กตรอนและตัวรับอิเล็กตรอน โดยอัตราการย่อยสลายจะเพิ่มขึ้นเมื่อค่าความต่างศักย์เป็นบวก (Wang *et al.*, 2008)

9. Redox Mediator การเติมสารสังเคราะห์ที่ทำหน้าที่เป็น redox mediator ซึ่งมีผลต่อค่า redox potential ให้อยู่ระหว่าง -200 mV ถึง -350 mV ตัวอย่างเช่นในปฏิกิริยารีดักชันของสีเอโซจะอาศัยสารจำพวก quinone และ hydroquinone ร่วมกันทำหน้าที่เป็น redox mediator ในการขนส่ง reduction equivalents จากเซลล์สู่ภายนอก (Wang *et al.* 2008)