



การกำจัดสีย้อมผ้ารีเอกทีฟโดยใช้เซลล์ตรึงจากราไวท์รอตสายพันธุ์ใหม่ *TRAMETES HIRSUTA* PW17-41 และความสามารถในการผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส
DECOLOURISATION OF TEXTILE REACTIVE DYES BY A NEWLY ISOLATED,
IMMOBILISED WHITE-ROT FUNGUS, *TRAMETES HIRSUTA* PW17-41 AND ITS
CAPABILITY TO PRODUCE MANGANESE PEROXIDASE

บัญชา ธรรมประภาพร

การกำจัดสี่ข้อมผ้ารีเอกทีฟโดยใช้เซลล์ตรึงจากราไวท์รอสสายพันธุ์ใหม่ *TRAMETES*
HIRSUTA PW17-41 และความสามารถในการผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส



ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ปีการศึกษา 2564
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

DECOLOURISATION OF TEXTILE REACTIVE DYES BY A NEWLY ISOLATED,
IMMOBILISED WHITE-ROT FUNGUS, *TRAMETES HIRSUTA* PW17-41 AND ITS
CAPABILITY TO PRODUCE MANGANESE PEROXIDASE



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of MASTER OF SCIENCE
(Applied Microbiology)

Faculty of Science, Srinakharinwirot University

2021

Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

การกำจัดสีย้อมผ้ารีเอกทีฟโดยใช้เซลล์ตรึงจากราไวท์รอสายพันธุ์ใหม่ *TRAMETES HIRSUTA* PW17-41 และความสามารถในการผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส

ของ

บัญชา ธรรมประภาพร

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาประยุกต์

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

..... ที่ปรึกษาหลัก ประธาน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐริกา สวรรณาศรัย) (ศาสตราจารย์ ดร.นิพนธ์ พิสุทธิไพศาล)

..... ที่ปรึกษาร่วม กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.เชิดชัย โพธิ์ศรี) (รองศาสตราจารย์ ดร.พิชามัก ศรียามัย)

ชื่อเรื่อง	การกำจัดสีย้อมผ้ารีเอกทีฟโดยใช้เซลล์ตรึงจากราไทร์ออสายพันธุ์ใหม่ <i>TRAMETES HIRSUTA</i> PW17-41 และความสามารถในการผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส
ผู้วิจัย	บัญชา ธรรมประภาพร
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
ปีการศึกษา	2564
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ณัฐริกา สวรรณาศรัย
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. เชิดชัย โพธิ์ศรี

ราไทร์ออสายพันธุ์ 16 ไอโซเลท นำมาคัดเลือกสายพันธุ์ที่สามารถลดสีย้อมผ้าจากน้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรม ในจังหวัดสมุทรปราการ ซึ่งประกอบด้วยสีรีเอกทีฟ 3 ชนิด ได้แก่ สี NEC-R, NR-S3B และ NSB-G พบว่ารา *Trametes hirsuta* PW17-41 สามารถลดความเข้มสีย้อมได้สูงถึง 73.98% ที่ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ภายในเวลา 7 วัน ดังนั้นจึงเลือกกรดกลูตามิกมาเพิ่มประสิทธิภาพในการลดสีย้อมด้วยสารตรึงเซลล์บนวัสดุที่เหมาะสม พบว่าฟองน้ำไพลอนเป็นวัสดุตรึงที่ดีที่สุดจากวัสดุตรึงที่ทดสอบจำนวน 5 ชนิด โดยมีมวลชีวภาพของเส้นใยราสูงที่สุด ส่วนสภาวะที่เหมาะสมในการลดสีย้อมของราตรึงคือการใช้น้ำตาลปี๊บและแอมโมเนียมไนเตรท เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ตามลำดับ โดยปรับค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 และเลี้ยงในสภาวะแบบเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สามารถลดความเข้มสีย้อมจาก 2,475 ADMI ให้เหลือเท่ากับ 114 ADMI ภายในเวลา 2 วัน ซึ่งผ่านมาตรฐานสีน้ำทิ้งตามที่กระทรวงอุตสาหกรรมกำหนด โดยกลไกหลักในการลดความเข้มสีย้อมด้วยราตรึงคือ การย่อยสลายทางชีวภาพด้วยเอนไซม์กลุ่มลิกนินโอไลติก ซึ่งเอนไซม์ที่มีบทบาทหลักคือ แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส รองลงมาคือแลคเคส โดยน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสที่รา *T. hirsuta* PW17-41 ผลิตมีค่าเท่ากับ 40 kDa เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE และ native-PAGE ส่วนการย่อยสลายสีย้อมด้วยเอนไซม์ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีของสีย้อมด้วยเทคนิค UV-visible และ Fourier Transform Infrared Spectroscopy พบว่าโครงสร้างทางเคมีของสีถูกย่อย และเปลี่ยนไปเป็นสารอื่นภายหลังการบำบัด จากนั้นได้ประเมินประสิทธิภาพของราตรึงในการลดความเข้มสีย้อมที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ตั้งแต่ 4 ถึง 100% (v/v) พบว่าสามารถลดความเข้มของสีย้อมได้ในช่วง 89.17 ถึง 94.38% นอกจากนี้ยังนำกลับมาใช้ซ้ำได้สูงถึง 12 รอบ และสามารถใช้ในการลดความเข้มสีย้อมภายใต้สภาวะที่ไม่ปราศจากเชื้อได้อีกด้วย

คำสำคัญ : ประสิทธิภาพการลดสี, สีย้อมสิ่งทอ, การตรึง, แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส, ราไทร์ออสายพันธุ์, *Trametes hirsuta*

Title	DECOLOURISATION OF TEXTILE REACTIVE DYES BY A NEWLY ISOLATED, IMMOBILISED WHITE-ROT FUNGUS, <i>TRAMETES HIRSUTA</i> PW17-41 AND ITS CAPABILITY TO PRODUCE MANGANESE PEROXIDASE
Author	BANCHA THAMPGRAPHAPHON
Degree	MASTER OF SCIENCE
Academic Year	2021
Thesis Advisor	Assistant Professor Dr. Nuttika Suwannasai
Co Advisor	Associate Professor Dr. Cherdchai Phosri

This study examines 16 isolates of white-rot fungi that were screened for textile dye decolourisation of wastewater from textile industry in Samut Prakan Province, which contained three different reactive dyes of NEC-R, NR-S3B and NSB-G. *Trametes hirsuta* PW17-41 showed the highest efficiency of dye decolourisation in a working volume of 50 mL up to 73.98% within seven days. Then, it was selected to improve the efficiency of dye decolourisation by the immobilisation of fungal cells with suitable support. Among five different supports, nylon sponge exhibited the most suitable support for *T. hirsuta* PW17-41, which contained the highest fungal biomass. The optimal conditions of carbon and nitrogen sources for textile dye decolourisation by immobilised fungal cells were palm sugar and ammonium nitrate, respectively. The initial pH value was 5.0 and the agitation speed was 100 rpm at 30 °C. The textile dyes were removed from 2,475 ADMI to 114 ADMI within two days under optimal conditions, which passed the standard value of the effluent colour according to the Ministry of Industry. The major mechanism of dye decolourisation by immobilised *T. hirsuta* PW17-41 was biodegradation and the main ligninolytic enzymes found during the dye decolourisation process was manganese peroxidase (MnP) followed by laccase. The molecular weight of MnP was 40 kDa observed by SDS-PAGE and native-PAGE. The biodegradation process of textile dye decolourisation was confirmed by UV-visible and Fourier transform infrared spectroscopy. The results indicated that the chemical structures of textile dyes were degraded and/or transformed to other structures after treatment. The efficiency of dye decolourisation by fungal immobilisation was evaluated at different concentration of textile dyes varying from 4 to 100% (v/v) and the results showed high % decolourisation ranging from 89.17 to 94.38%. In addition, the immobilised cells were reusable up to 12 cycles and could remove the textile dyes under non-sterile conditions.

Keyword : Decolourisation, Textile dye, Immobilisation, Manganese peroxidase, White-rot fungi, *Trametes hirsuta*

กิตติกรรมประกาศ

ปริญญาานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความช่วยเหลือเป็นอย่างดีจากหลาย ๆ ฝ่าย ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐริกา สวรรณาศรัย อาจารย์ที่ปรึกษา และรองศาสตราจารย์ ดร.เชิดชัย โพธิ์ศรี อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่เสียสละเวลาอันมีค่ากรุณาให้ความอนุเคราะห์ในทุก ๆ ด้าน ให้คำปรึกษา และคำแนะนำทางด้านการศึกษา การจัดทำงานวิจัย การตรวจแก้ไขปริญญาานิพนธ์ ตลอดจนให้คำสั่งสอน คำตักเตือนในด้านวิทยาการ ความรู้ และจริยธรรมในการจัดทำวิจัยให้มีความสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.นิพนธ์ พิสุทธิไพศาล ภาควิชาเทคโนโลยีอุตสาหกรรมเกษตร อาหาร และสิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ประยุกต์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ ที่จัดหาตัวอย่างสีย้อม และน้ำทิ้งที่ใช้ในงานวิจัย รวมทั้งเป็นประธานกรรมการสอบปริญญาานิพนธ์ และ Dr. Sarper Sarp จาก มหาวิทยาลัยสวอนซี (Swansea University) ที่ช่วยให้คำแนะนำเกี่ยวกับงานวิจัยและแก้ไขบทความวิจัยเพื่อตีพิมพ์

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.พิชามัก ศรียากย์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุชมาภรณ์ กระจ่างสังข์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ประภากร ตันตโยทัย ที่กรุณาให้คำแนะนำ ให้แนวทางในการทำปริญญาานิพนธ์ และคณาจารย์ทุกท่านที่ให้ความรู้แก่ผู้วิจัยตลอดการศึกษา และขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยาที่เอื้อเฟื้อสถานที่รวมทั้งอุปกรณ์และเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ที่ใช้สำหรับงานวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณ ห้างหุ้นส่วนสามัญนิติบุคคลธนไพศาล จังหวัดสมุทรปราการ ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างสีย้อม และน้ำทิ้งที่ใช้ในงานวิจัย

ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุชมาภรณ์ กระจ่างสังข์ ที่ให้ความอนุเคราะห์เปลือกเมล็ดกาแฟ และกะลากาแฟที่ใช้ในงานวิจัย

ขอขอบคุณทุน 70 ปี 70 ทุน มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ (Grant no. 633/2563) ที่สนับสนุนทุนการศึกษาตลอดการศึกษาในระดับปริญญาโท

ขอขอบคุณทุน Royal Academy of Engineering สหราชอาณาจักร (Grant no. TSP1355) ที่สนับสนุนทุนในการดำเนินงานวิจัย

ขอขอบคุณ ดร.นิวนา หวังสวัสดิ์ นายพิสิฐ ธรรมวิทยากร นางสาวพิชชาภา ธงสุวรรณ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกท่าน ตลอดจนพี่ ๆ และ เพื่อน ๆ ทุกคนสำหรับมิตรภาพ คำปรึกษา และยังให้ความช่วยเหลือเสมอมา

ท้ายที่สุดข้าพเจ้าขอขอบพระคุณบิดา มารดา พี่ชาย และน้องสาว ที่สนับสนุนช่วยเหลือ และให้กำลังใจ ตั้งแต่เริ่มทำปริญญาานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญรูปภาพ	ฐ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ที่มาและความสำคัญ.....	1
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	3
ขอบเขตของงานวิจัย	4
ผลที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย.....	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
1. อุตสาหกรรมฟอกย้อมและกระบวนการผลิตในประเทศไทย	5
1.1 อุตสาหกรรมสิ่งทอ เครื่องนุ่งห่ม และฟอกย้อมในประเทศไทย	5
1.2 กระบวนการผลิตในอุตสาหกรรมฟอกย้อม	6
2. สีย้อมที่ใช้ในอุตสาหกรรมฟอกย้อม.....	7
2.1 สีย้อมที่ละลายน้ำ	9
2.2 สีย้อมที่ไม่ละลายน้ำ	9
3. ผลกระทบของน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมฟอกย้อมต่อสิ่งแวดล้อมและมาตรฐานอุตสาหกรรม 10	
3.1 ผลกระทบของน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมฟอกย้อมต่อสิ่งแวดล้อม	11
3.2 มาตรฐานน้ำทิ้งของอุตสาหกรรมฟอกย้อมและการวัดค่าสี.....	12

4. กระบวนการบำบัดน้ำทิ้งในอุตสาหกรรมฟอกย้อม	15
4.1 การบำบัดทางกายภาพ (physical treatment).....	15
4.2 การบำบัดทางเคมี (chemical treatment).....	15
4.3 การบำบัดทางชีวภาพ (biological treatment).....	16
5. ราไทรออตและเอนไซม์ในกลุ่มลิกนินโพลีติก.....	18
5.1 เอนไซม์แลคเคส.....	21
5.2 เอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส.....	23
5.3 เอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส	24
5.4 การประยุกต์ใช้ราไทรออตและเอนไซม์กลุ่มลิกนินโพลีติกในการกำจัดสีย้อมสังเคราะห์	26
5.5. การศึกษาขนาดและน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์กลุ่มลิกนินโพลีติก	29
6. การตรึงเซลล์ (cell immobilisation).....	30
6.1 การยึดเกาะหรือการดูดซับทางกายภาพ (adsorption).....	30
6.2 การกักขัง (entrapment).....	31
6.3 การห่อหุ้ม (encapsulation)	32
7. ปัจจัยที่มีผลต่อการบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม.....	34
7.1 สารอาหาร (nutrients)	34
7.2 ค่า pH	35
7.3 อุณหภูมิ (temperature).....	35
7.4 ความเข้มข้นของสีย้อม (dye concentration).....	36
7.5 อัตราการกวน (agitation).....	36
8. การศึกษาหมู่ฟังก์ชันสารเคมีด้วยเทคนิค Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)	37
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	39

อุปกรณ์และเครื่องมือ	39
อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี	40
วิธีดำเนินการทดลอง	42
1. ตัวอย่างน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมฟอกย้อม และการวัดคุณสมบัติเบื้องต้น	42
2. การคัดเลือกสายพันธุ์ราไวโรทที่สามารถลดสีน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมฟอกย้อม ...	43
3. การทดสอบหาวัสดุที่ตรงที่เหมาะสมต่อราที่คัดเลือก	44
4. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการลดสีย้อมเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมโดยใช้ราตริง	45
4.1 การเตรียมราตริง.....	45
4.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการลดสีย้อมเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม	45
5. การศึกษากลไกในการดูดซับ (adsorption) และการย่อยสลาย (degradation) สีย้อมเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมโดยใช้ราตริง	46
5.1 ความสามารถในการดูดซับสีย้อมเหลือทิ้ง	46
5.2 ความสามารถในการย่อยสลายสีย้อมเหลือทิ้ง	47
5.3 การศึกษาข้อมูลของเอนไซม์แอมกาเนียสเปอร์ออกซิเดสเบื้องต้น	48
6. การศึกษาความสัมพันธ์ของการลดสีย้อม การผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโอไลติกของราตริง และการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีของสีย้อม	50
6.1 ความสัมพันธ์ของการลดสีย้อมและการผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโอไลติก	50
6.2 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างสีย้อมด้วยเทคนิค UV-visible และ Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)	50
7. การศึกษาประสิทธิภาพของราตริงในการลดสีย้อมที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	51
8. การประเมินประสิทธิภาพของราตริงในการนำกลับมาใช้ซ้ำเพื่อลดสีย้อมเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม.....	51

9. การประเมินความสามารถของราตรีงในการลดสีย้อมเหลือทิ้งภายใต้สภาวะที่ไม่ปราศจากเชื้อ.....	51
10. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	52
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	53
1. การคัดเลือกสายพันธุ์ราไตรรอกที่สามารถลดสีน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมฟอกย้อม ...	53
1.1 คุณลักษณะเบื้องต้นของตัวอย่างน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมฟอกย้อม	53
1.2 การคัดเลือกสายพันธุ์ราไตรรอกที่สามารถลดสีน้ำทิ้ง	55
2. การทดสอบหาวัสดุตรีงที่เหมาะสมต่อราไตรรอก <i>T. hirsuta</i> PW17-41.....	58
3. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการลดสีย้อมเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมโดยใช้ราตรีง	60
3.1 ผลของแหล่งคาร์บอน.....	60
3.2 ผลของแหล่งไนโตรเจน.....	62
3.3 ผลของค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	63
3.4 ผลของความเร็วยอบในการเขย่า.....	65
4. กลไกการลดความเข้มของสีย้อมโดยการดูดซับ และการย่อยสลายทางชีวภาพด้วยเอนไซม์ของราตรีง <i>T. hirsuta</i> PW17-41	66
4.1 กลไกการลดความเข้มของสีย้อมโดยใช้ราตรีง <i>T. hirsuta</i> PW17-41	66
4.2 การวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลุ่มลิกนินโกลติกของราตรีง <i>T. hirsuta</i> PW17-41	67
4.3 การหาน้ำหนักมวลโมเลกุลของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสด้วยวิธี SDS-PAGE และ native-PAGE	68
5. ความสัมพันธ์ของการลดสีย้อม และการผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโกลติกของราตรีง <i>T. hirsuta</i> PW17-41.....	71
5.1 ความสัมพันธ์ของการลดสีย้อม และการผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโกลติก	71

5.2 การตรวจสอบโครงสร้างทางเคมีของสีย้อมด้วยเทคนิค UV-visible และ Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)	75
6. ประสิทธิภาพของราตริง <i>T. hirsuta</i> PW17-41 ในการลดความเข้มข้นของสีย้อมภายใต้สภาวะต่าง ๆ	80
6.1 ประสิทธิภาพของราตริง <i>T. hirsuta</i> PW17-41 ในการลดสีย้อมที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	80
6.2 ประสิทธิภาพของราตริง <i>T. hirsuta</i> PW17-41 ในการนำกลับมาใช้ซ้ำ	82
6.3 ประสิทธิภาพของราตริง <i>T. hirsuta</i> PW17-41 ในการลดความเข้มข้นของสีย้อมภายใต้สภาวะที่ไม่ปราศจากเชื้อ	84
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง	86
บรรณานุกรม	98
ภาคผนวก	111
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง	112
ภาคผนวก ข สารเคมีและบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทดลอง	115
ภาคผนวก ค ข้อมูลทางสถิติ	120
ประวัติผู้เขียน	133

สารบัญตาราง

	หน้า
ตาราง 1 มาตรฐานน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมตามประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม	13
ตาราง 2 ตัวอย่างงานวิจัยที่เกี่ยวข้องในการใช้ราไวทรีทและเอนไซม์กลุ่มลิกนินโกลติกในการบำบัดสีย้อม.....	27
ตาราง 3 การประยุกต์ใช้ราตริงในการบำบัดสีย้อม	33
ตาราง 4 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	39
ตาราง 5 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง	40
ตาราง 6 สายพันธุ์ราไวทรีทที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้.....	43
ตาราง 7 ลักษณะของน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมฟอกย้อม	54
ตาราง 8 มวลชีวภาพของ <i>T. hirsuta</i> PW17-41 บนวัสดุตริงทั้ง 5 ชนิด ภายหลังจากการตริงเซลล์	59
ตาราง 9 กิจกรรมของเอนไซม์กลุ่มลิกนินโกลติก (แลคเคส และแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส) ของฟองน้ำในลอนที่ไม่ได้ตริงรา เส้นใยราที่ไม่ได้ตริงบนวัสดุ ราตริงที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ และราตริงที่ไม่ได้ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ	68
ตาราง 10 การทำให้เอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์บางส่วน (partial purification)	70
ตาราง 11 ตารางแสดงค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสีย้อมเข้มข้น 33% (v/v) เมื่อบำบัดด้วยราตริง <i>T. hirsuta</i> PW17-41 ระยะเวลา 20 วัน	74
ตาราง 12 FTIR สเปกตรัมของสีย้อมที่ไม่ผ่านการบำบัดด้วยราตริง <i>T. hirsuta</i> PW17-41 (วันที่ 0) และหลังจากการบำบัดด้วยราตริง ในวันที่ 12 ภายใต้อุณหภูมิที่เหมาะสม.....	78
ตาราง 13 ตารางแสดงค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ เมื่อนำราตริง <i>T. hirsuta</i> PW17-41 กลับมาใช้ซ้ำในการบำบัดสีย้อมเข้มข้น 4% (v/v) เป็นจำนวน 12 รอบ.....	83

สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพประกอบ 1 ตัวอย่างการจัดจำแนกสีย้อมตามโครงสร้างทางเคมีหรือหมู่โครโมฟอร์	8
ภาพประกอบ 2 ผลกระทบทางตรงและทางอ้อมของสีย้อมสิ่งทอต่อสิ่งแวดล้อม.....	11
ภาพประกอบ 3 ลักษณะของเฉดสี (hue) ความเข้มอ่อนของเฉดสี (chroma) และความสว่างของสี (value) ที่ใช้ในการวิเคราะห์ค่า ADMI ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์.....	14
ภาพประกอบ 4 การบำบัดน้ำเสียด้วยกระบวนการเอเอส หรือระบบแอกทิเวเต็ดสลัดจ์.....	18
ภาพประกอบ 5 องค์ประกอบของผนังเซลล์พืชที่ประกอบด้วยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน	19
ภาพประกอบ 6 ตัวอย่างของราไวท์รอต (A) <i>Trametes hirsuta</i> (B) <i>Trametes versicolor</i> (C) <i>Pleurotus ostreatus</i> (D) <i>Bjerkandera adusta</i> (E) <i>Ganoderma applanatum</i> และ (F) <i>Microporus xanthopus</i>	20
ภาพประกอบ 7 กระบวนการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์แลคเคส.....	22
ภาพประกอบ 8 แผนภาพแสดงการเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ในการย่อยสลายสารตั้งต้นของเอนไซม์แลคเคส (A) การย่อยสารตั้งต้นโดยตรง (B) การย่อยสารตั้งต้นโดยผ่านสารตัวกลาง.....	22
ภาพประกอบ 9 กระบวนการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส.....	24
ภาพประกอบ 10 กระบวนการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส	25
ภาพประกอบ 11 ตัวอย่างน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมฟอกย้อม (A) สีย้อมเหลือทิ้งจากกระบวนการย้อมที่ยังไม่ผ่านระบบบำบัด (B) น้ำทิ้งภายหลังการบำบัดจากโรงงานอุตสาหกรรม	54
ภาพประกอบ 12 ตัวอย่างราบริสุทธิ์ที่เจริญบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน (A) <i>C. aspera</i> NP17-02 (B) <i>A. subresinosum</i> NP17-12 (C) <i>T. elegans</i> PP17-06 (D) <i>M. xanthopus</i> PP17-17 (E) <i>Pseudolagarobasidium</i> sp. PP17-33 (F) <i>G. mastoporum</i> PW17-06 (G) <i>T. hirsuta</i> PW17-41 (H) <i>G. lingzhi</i> PW17-43 (I) <i>T. sanguinea</i> PP17-18 (J) <i>G. fornicatum</i> PW17-145 (K) <i>G. mastoporum</i> PW17-154 (L) <i>M. vernicipes</i> PW17-173 บาร์ (Bars) ของรูป A-L เท่ากับ 1 เซนติเมตร.....	57

- ภาพประกอบ 13 ประสิทธิภาพการลดสีขมเหลืองทิ้ง (% decolourisation) ที่ความเข้มข้น 4% (v/v) โดยราไวท์รอกจำนวน 16 ไอโซเลท ภายในเวลา 7 วัน ภายใต้สภาวะการเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 58
- ภาพประกอบ 14 การเจริญของเส้นใย *T. hirsuta* PW17-41 บนวัสดุตั้งทิ้ง 5 ชนิด ในอาหาร PDB นาน 5 วัน ภายใต้สภาวะการเขย่าที่ 120 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (A) ฟองน้ำ ไนลอน (B) โยบวบ (C) กะลากาแฟ (D) เปลือกเมล็ดกาแฟ และ (E) ไบโสบัปรอด บาร์ (Bars) ของรูป A-E เท่ากับ 1 มิลลิเมตร 60
- ภาพประกอบ 15 ประสิทธิภาพการลดสีขมเหลืองทิ้ง (% decolourisation) ที่ความเข้มข้น 4% (v/v) โดยราตริง *T. hirsuta* PW17-41 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ (กลูโคส ซูโครส ฟรักโทส แลคโทส กาแลคโทส น้ำตาลปีบ แป้ง และ ชุดควบคุมที่ไม่เติมแหล่งคาร์บอน) ในระยะเวลา 2 วัน ภายใต้สภาวะแบบเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 61
- ภาพประกอบ 16 ประสิทธิภาพการลดสีขมเหลืองทิ้ง (% decolourisation) ที่ความเข้มข้น 4% (v/v) โดยราตริง *T. hirsuta* PW17-41 เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ (เปปโติน ยีสต์สกัด แอมโมเนียมซัลเฟต โซเดียมไนเตรท แอมโมเนียมไนเตรท ยูเรีย และชุดควบคุมที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจน) ในระยะเวลา 2 วัน ภายใต้สภาวะแบบเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 63
- ภาพประกอบ 17 ประสิทธิภาพการลดสีขมเหลืองทิ้ง (% decolourisation) ที่ความเข้มข้น 4% (v/v) โดยราตริง *T. hirsuta* PW17-41 เมื่อปรับค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ (4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10) ในระยะเวลา 2 วัน ภายใต้สภาวะแบบเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 64
- ภาพประกอบ 18 ประสิทธิภาพการลดสีขมเหลืองทิ้ง (% decolourisation) ที่ความเข้มข้น 4% (v/v) โดยราตริง *T. hirsuta* PW17-41 เมื่อเลี้ยงในสภาวะแบบเขย่าที่ความเร็วรอบต่าง ๆ (0, 50, 100 และ 150 รอบต่อนาที) ในระยะเวลา 2 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 65
- ภาพประกอบ 19 ประสิทธิภาพการลดสีขม (% decolourisation) ที่ความเข้มข้น 4% (v/v) ของฟองน้ำไนลอนที่ไม่ได้ตรึงรา เส้นใยที่ไม่ได้ตรึงบนวัสดุ ราตริงที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ และราตริงที่ไม่ได้ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ ภายในระยะเวลา 2 วัน ภายใต้สภาวะแบบเขย่าที่ 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และปรับค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 5 67

ภาพประกอบ 20 ผล SDS-PAGE และ native-PAGE ของตัวอย่างเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสที่ได้จากรา *T. hirsuta* PW17-41 (M) protein ladder (1) น้ำเลี้ยงเชื้อ *T. hirsuta* PW17-41 (2) เอนไซม์ที่ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต (3) เอนไซม์ที่ผ่านการกำจัดเกลือด้วยการไดอะไลซิส 70

ภาพประกอบ 21 ความสัมพันธ์ของการลดความเข้มข้นของสีย้อม การผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโอไลติก และการเจริญของราตริ่ง *T. hirsuta* PW17-41 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสีย้อมเข้มข้น 33% (v/v) ภายใต้สภาวะแบบเขย่าที่ 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 5 ในระยะเวลา 20 วัน 72

ภาพประกอบ 22 การเปลี่ยนแปลงของสีย้อมในระหว่างการบำบัดด้วยราตริ่ง *T. hirsuta* PW17-41 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสีย้อมเข้มข้น 33% (v/v) ภายใต้สภาวะแบบเขย่าที่ 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 5 ในระยะเวลา 0, 4, 12 และ 20 วัน..... 73

ภาพประกอบ 23 UV-visible สเปกตรัมของสีย้อมที่ไม่ผ่านการบำบัดด้วยราตริ่ง *T. hirsuta* PW17-41 (วันที่ 0) และหลังจากการบำบัดด้วยราตริ่งที่ความเข้มข้นของสีย้อมเท่ากับ 33% (v/v) ในวันที่ 4, 12 และ 20 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม 76

ภาพประกอบ 24 FTIR สเปกตรัมของสีย้อมที่ไม่ผ่านการบำบัดด้วยราตริ่ง *T. hirsuta* PW17-41 (วันที่ 0) และหลังจากการบำบัดด้วยราตริ่ง ในวันที่ 12 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม..... 77

ภาพประกอบ 25 ประสิทธิภาพการลดความเข้มข้นของสีย้อม (A) และค่าความเข้มข้นสีในหน่วย ADMI ที่เหลือ (B) เมื่อทดสอบกับสีย้อมที่ความเข้มข้น 4, 8, 17, 25, 33, 42, 50, 66, 83 และ 100% (v/v) ด้วยราตริ่ง *T. hirsuta* PW17-41 เป็นเวลา 2, 4, 6 และ 8 วัน ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม... 81

ภาพประกอบ 26 ประสิทธิภาพของราตริ่ง *T. hirsuta* PW17-41 ในการนำกลับมาใช้ซ้ำเพื่อลดความเข้มข้นของสีย้อมที่ความเข้มข้น 4% (v/v) จำนวน 12 รอบ..... 84

ภาพประกอบ 27 ประสิทธิภาพการลดความเข้มข้นของสีย้อมที่ไม่ปราศจากเชื้อความเข้มข้น 4, 8, 17 และ 25% (v/v) โดยราตริ่ง *T. hirsuta* PW17-41 ในสภาวะที่เติมอาหาร (A) และสภาวะที่ไม่เติมอาหาร (B) ภายใต้สภาวะแบบเขย่าที่ 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และปรับค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 5 เป็นเวลา 8 วัน 85

บทที่ 1

บทนำ

ที่มาและความสำคัญ

อุตสาหกรรมฟอกย้อมเป็นอุตสาหกรรมในกลุ่มสิ่งทอและเครื่องนุ่งห่มที่มีความสำคัญต่อการพัฒนาเศรษฐกิจของประเทศไทย และเป็นแหล่งรองรับแรงงานจำนวนมาก จากข้อมูล ณ สิ้นปี 2564 พบว่ามีโรงงานอุตสาหกรรมฟอกย้อมจำนวน 199 โรงงาน และมีอัตราการจ้างงานมากถึง 20,554 คน นอกจากนี้ประเทศไทยยังมีการส่งออกสินค้าในกลุ่มสิ่งทอและเครื่องนุ่งห่มอย่างต่อเนื่องโดยมีมูลค่าทางเศรษฐกิจสูงถึง 600.7 ล้านดอลลาร์สหรัฐ⁽¹⁾ โดยกระบวนการผลิตในอุตสาหกรรมฟอกย้อมมักมีการใช้สารเคมีในขั้นตอนต่าง ๆ รวมทั้งการฟอกขาว (bleaching) และการย้อมสี (dyeing) โดยสีส่วนใหญ่เป็นสีเคมีสังเคราะห์ในกลุ่มเอโซ (azo) กลุ่มไนโตร (nitro) กลุ่มไนโตรโซ (nitroso) และกลุ่มไดเอริลมีเทน (diarylmethane)⁽²⁾ รวมแล้วมากกว่า 10,000 สีที่ใช้อยู่ในอุตสาหกรรมฟอกย้อม ซึ่งสีที่เหลือจากกระบวนการย้อมจะถูกปล่อยรวมกับน้ำทิ้งที่ต้องผ่านกระบวนการบำบัดก่อนปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อม ไม่เช่นนั้นอาจก่อให้เกิดมลภาวะในแหล่งน้ำ โดยเฉพาะความเข้มของสีย้อม ค่า COD (Chemical Oxygen Demand) BOD (Biochemical Oxygen Demand) และความเป็นด่างที่สูง โดยความเข้มของสีน้ำทิ้งต้องมีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 300 ADMI (American Dye Manufacturers Institute) ซึ่งเป็นค่ามาตรฐานสากล ทั้งนี้สีน้ำทิ้งที่เกินค่ามาตรฐานเมื่อปล่อยลงสู่แหล่งน้ำ อาจขัดขวางการส่องผ่านของแสงอาทิตย์ ลดการละลายของก๊าซออกซิเจน ทำให้พืชน้ำสังเคราะห์แสงได้ลดลง เกิดผลกระทบต่อสัตว์น้ำ และระบบนิเวศในแหล่งน้ำ⁽³⁻⁶⁾ นอกจากนี้ยังก่อให้เกิดความเป็นพิษกับคนและสัตว์เนื่องจากสีย้อมเคมีบางชนิดมีองค์ประกอบของสารก่อมะเร็ง แม้ว่าสีย้อมหลายชนิดสามารถย่อยสลายได้ในธรรมชาติหรือกระบวนการทางกายภาพและเคมี แต่อาจก่อให้เกิดผลผลิตที่เป็นพิษ และชักนำให้เกิดอาการแพ้กับคนและสัตว์ที่อาศัยอยู่ในชุมชนใกล้เคียง หรือใช้แหล่งน้ำที่ปนเปื้อนสารดังกล่าวในการอุปโภคและบริโภค เป็นต้น⁽⁷⁾ ด้วยเหตุนี้จึงต้องมีการบำบัดสีน้ำทิ้งให้ได้มาตรฐานก่อนปล่อยออกสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ

กระบวนการที่ใช้บำบัดสีน้ำทิ้งจากโรงงานฟอกย้อมในปัจจุบันมีหลายวิธี ได้แก่ วิธีทางเคมี เช่น วิธีโฟโตแคตตาไลซิส (photocatalysis) การออกซิเดชัน (oxidation) และวิธีทางกายภาพ เช่น การดูดซับบนวัสดุ (adsorption) การรวมตะกอน (coagulation-flocculation)⁽⁸⁾ ซึ่งวิธีการต่าง ๆ เหล่านี้มักมีค่าใช้จ่ายสูงและกระบวนการที่ยุ่งยาก เช่น การบำบัดด้วยการออกซิเดชันและการดูดซับพบว่าสามารถลดสีย้อมได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่ค่าดำเนินการและค่าเสื่อมสภาพของ

วัสดุดูดซับมีราคาต้นทุนสูงประกอบด้วยผลัฟท์ที่ได้คือกากตะกอนจำนวนมากที่ต้องกำจัดต่อไปอีกด้วย ดังนั้นการบำบัดสีย้อมด้วยวิธีทางชีวภาพโดยการใช้จุลินทรีย์หรือเอนไซม์จึงเป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่น่าสนใจ ในปัจจุบันมีการพัฒนากระบวนการและคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่เหมาะสม และมีประสิทธิภาพอย่างต่อเนื่อง จุลินทรีย์สามารถบำบัดสีย้อมได้โดยการดูดซับไว้ที่ผิวเซลล์ หรือการย่อยสลายทางชีวภาพโดยอาศัยเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ซึ่งทำให้เกิดกากตะกอนของเสียน้อยกว่า ที่สำคัญเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม และไม่ก่อให้เกิดมลภาวะที่เป็นพิษ

ราไวท์รอต (white-rot fungi) เป็นราที่สามารถย่อยสลายโครงสร้างของลิกนิน (lignin) เซลลูโลส (cellulose) และเฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) ได้ จึงเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่น่าสนใจในการนำมาใช้บำบัดสีน้ำทิ้งที่ปนเปื้อนสีย้อมจากโรงงานอุตสาหกรรม รวมทั้งบำบัดสารพิษชนิดต่าง ๆ เนื่องจากราไวท์รอตสามารถผลิตเอนไซม์ในกลุ่มลิกนินโอไลติก (ligninolytic enzymes) เช่น แลคเคส (laccase; EC 1.10.3.2) แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (manganese peroxidase; 1.11.1.13) และ ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (lignin peroxidase; 1.11.10.14) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่รื้อสร้างแล้วปล่อยออกนอกเซลล์ สามารถย่อยสลายสารตั้งต้นได้หลายชนิดแบบไม่จำเพาะ รวมทั้งสีย้อมประเภทต่าง ๆ ที่มีโครงสร้างคล้ายลิกนิน เช่น สีย้อมกลุ่มเฮเทอโรไซคลิก (heterocyclic) และพอลิเมอร์ (polymeric) เป็นต้น⁽⁹⁾ โดยงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้นำรา *Coriolus versicolor* IBL-04 มาใช้ในการลดสีน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมที่มีการปนเปื้อนสีย้อม Maroon พบว่าสามารถลดสีน้ำทิ้งได้ 36.3% ภายในเวลา 6 วัน⁽¹⁰⁾ และรา *Pycnoporus sanguineus* MUCL 51321 สามารถลดสีสังเคราะห์ Orange G และ Reactive Blue 4 ที่ความเข้มข้น 0.05 และ 0.3 กรัมต่อลิตรได้ 81% และ 97% ตามลำดับ เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน⁽¹¹⁾ ต่อมาได้มีการนำเทคโนโลยีการตรึงเซลล์บนวัสดุมาใช้ในการลดสี เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของราไวท์รอตลดระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเซลล์รา และสามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้หลายครั้ง เป็นต้น ตัวอย่างงานวิจัยของ Megha และ Meenakshi ได้นำรา *Mucor hiemalis* MV04 มาตรึงกับเปลือกส้ม จากนั้นนำมาใช้ในการลดสีสังเคราะห์ RBBR, Malachite Green และ Congo Red โดยเทียบกับการใช้ราแบบอิสระ (free cell) พบว่าราที่มีการตรึงอยู่กับวัสดุตรึงมีประสิทธิภาพในการลดสีสังเคราะห์ได้ดีกว่าราแบบอิสระสูงถึง 63%⁽¹²⁾ นอกจากนี้ในงานวิจัยของ Przystas และคณะ ได้นำรา *Pleurotus ostreatus* BWPH, *Gleophyllum odoratum* DCa และ *Polyporus picipes* RWP17 มาตรึงบนวงแหวนโลหะแล้วนำมาลดสีสังเคราะห์ Evans Blue พบว่าสามารถลดสีได้อย่างสมบูรณ์ภายใน 24 ชั่วโมงซึ่งให้ประสิทธิภาพดีกว่าการตรึงด้วยแปรงที่ต้องใช้เวลาในการลดสีถึง 48 ชั่วโมง⁽¹³⁾

อย่างไรก็ตามราไวท์รอตแต่ละสายพันธุ์สามารถผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินไโกลติกได้มากกว่า 1 ชนิด และมีประสิทธิภาพที่แตกต่างกัน ประกอบกับประเทศไทยมีความหลากหลายทางชีวภาพของเห็ดราสูง การศึกษาเพื่อค้นหาและคัดเลือกสายพันธุ์ราไวท์รอตที่สามารถผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินไโกลติก และลดสีย้อมสังเคราะห์ได้ เป็นการเพิ่มทางเลือกในการใช้ประโยชน์จากความหลากหลายของราไวท์รอต ที่เป็นทรัพยากรธรรมชาติสำคัญของประเทศไทย ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะคัดเลือกสายพันธุ์ของราไวท์รอตที่มีประสิทธิภาพในการลดสีน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมฟอกย้อม หาวัสตุตรึ่งที่มีความเหมาะสมต่อการเจริญของราไวท์รอตที่คัดเลือก และหาสภาวะที่เหมาะสมในการลดสีน้ำทิ้งโดยใช้ราตรึง ประเมินประสิทธิภาพของราตรึงในการลดสีน้ำทิ้งภายใต้สภาวะที่ปราศจากเชื้อและไม่ปราศจากเชื้อ ศึกษาความสัมพันธ์ของการลดสีน้ำทิ้งและการผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินไโกลติก รวมทั้งศึกษาข้อมูลของเอนไซม์กลุ่มลิกนินไโกลติกที่ราไวท์รอตผลิต เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในระบบบำบัดสีน้ำทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรมต่อไป

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ราไวท์รอตที่สามารถลดสีย้อมเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมฟอกย้อม
2. เพื่อหาหิวสตุตรึ่งที่มีความเหมาะสมต่อการเจริญของราไวท์รอตที่คัดเลือก และหาสภาวะที่เหมาะสมในการลดสีย้อมเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมฟอกย้อม
3. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของการลดสีย้อมเหลือทิ้งและการผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินไโกลติก (แลคเคส แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส และลิกนินเปอร์ออกซิเดส) ของราไวท์รอตที่คัดเลือก
4. เพื่อประเมินประสิทธิภาพของราตรึงในการลดสีย้อมเหลือทิ้งที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และการนำกลับมาใช้ซ้ำ รวมทั้งประสิทธิภาพในการลดสีย้อมภายใต้สภาวะที่ไม่ปราศจากเชื้อ และการตรวจวัดโครงสร้างสีที่ถูกย่อยด้วยเทคนิค UV-visible และ Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

ขอบเขตของงานวิจัย

คัดเลือกสายพันธุ์ราไวท์รอตที่มีประสิทธิภาพในการลดสีย้อมเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมฟอกย้อม จากนั้นหาวัสดุตั้งที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยราที่คัดเลือก ศึกษาประสิทธิภาพของราตริงในการลดสีย้อมโดยการหาสภาวะที่เหมาะสมในการลดสี ได้แก่ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ค่า pH เริ่มต้น และความเร็วรอบในการเขย่า ประเมินความสามารถของราตริงในการย่อยสีย้อมและดูดซับสีย้อมเหลือทิ้ง ศึกษาความสัมพันธ์ของการลดสีย้อมกับความสามารถในการผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโอไลติก (แลคเคส แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส และลิกนินเปอร์ออกซิเดส) ของราตริง รวมทั้งประเมินประสิทธิภาพของราตริงในการนำกลับมาใช้ซ้ำ จากนั้นทดสอบการใช้ราตริงในการลดสีย้อมภายใต้สภาวะที่ไม่ปราศจากเชื้อ ตรวจวัดการคงอยู่ของสีย้อมที่ถูกย่อยด้วยเทคนิค UV-visible และ FTIR แล้วศึกษาเอนไซม์กลุ่มลิกนินโอไลติกที่มีบทบาทในการลดสีย้อมดังกล่าว

ผลที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย

1. สายพันธุ์ราไวท์รอตที่มีประสิทธิภาพในการลดสีย้อมเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมฟอกย้อม และวัสดุตั้งที่มีความเหมาะสมต่อการเจริญของราไวท์รอตที่คัดเลือก ที่สามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้
2. สภาวะที่เหมาะสมของราตริงในการลดสีย้อม และข้อมูลความสัมพันธ์ของการลดสีย้อมกับการผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโอไลติก (แลคเคส แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส และลิกนินเปอร์ออกซิเดส)
3. ข้อมูลของเอนไซม์ที่มีบทบาทในการลดสีย้อม และการคงอยู่ของสีย้อมภายหลังการย่อยด้วยราตริง
4. ข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการลดสีย้อมด้วยราตริงภายใต้สภาวะที่ไม่ปราศจากเชื้อ เพื่อประยุกต์ใช้ในระบบบำบัดน้ำทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรมฟอกย้อม

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. อุตสาหกรรมฟอกย้อมและกระบวนการผลิตในประเทศไทย

1.1 อุตสาหกรรมสิ่งทอ เครื่องนุ่งห่ม และฟอกย้อมในประเทศไทย

อุตสาหกรรมสิ่งทอและเครื่องนุ่งห่มจัดเป็นอุตสาหกรรมการผลิตที่มีขนาดใหญ่ มีโครงสร้างการผลิตที่เชื่อมโยงต่อเนื่องกันอย่างครบวงจร ครอบคลุมอุตสาหกรรมย่อยหลาย อุตสาหกรรม จัดเป็นอุตสาหกรรมที่มีความสำคัญของประเทศไทย ทั้งในแง่ของการสร้างรายได้ จากการส่งออก และการเป็นแหล่งรองรับแรงงานจำนวนมาก จากข้อมูล ณ สิ้นปี 2564 มีโรงงาน อุตสาหกรรมสิ่งทอและเครื่องนุ่งห่ม (สะสม) รวม 2,633 โรงงาน คนงานประมาณ 405,638 คน โดยภาพรวมการค้าระหว่างประเทศของอุตสาหกรรมสิ่งทอและเครื่องนุ่งห่มไทยในเดือนธันวาคม 2564 พบว่าการส่งออกสิ่งทอและเครื่องนุ่งห่มมีมูลค่าสูงถึง 600.7 ล้านดอลลาร์สหรัฐ ขยายตัว เพิ่มขึ้นร้อยละ 15.5 เมื่อเทียบกับช่วงเดียวกันของปีก่อน⁽¹⁾ โดยอุตสาหกรรมสิ่งทอและเครื่องนุ่งห่ม สามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มอุตสาหกรรมหลัก คือ 1) อุตสาหกรรมต้นน้ำหรืออุตสาหกรรมขั้นต้น (upstream) เป็นอุตสาหกรรมเริ่มแรกในโครงสร้างอุตสาหกรรมสิ่งทอและเครื่องนุ่งห่ม ได้แก่ การ ผลิตเส้นใย และการปั่นด้าย 2) อุตสาหกรรมกลางน้ำหรืออุตสาหกรรมขั้นกลาง (middle stream) เป็นกลุ่มอุตสาหกรรมที่ต้องอาศัยวัตถุดิบจากอุตสาหกรรมต้นน้ำ โดยนำมาผ่านกระบวนการ เพื่อให้เป็นผลิตภัณฑ์ใหม่ด้วยกิจกรรมต่าง ๆ เช่น การทอผ้า การถักผ้า การฟอกย้อม การพิมพ์ และการแต่งสำเร็จ 3) อุตสาหกรรมปลายน้ำหรืออุตสาหกรรมขั้นปลาย (downstream) เป็นการ นำเอาวัตถุดิบจากอุตสาหกรรมขั้นกลางมาทำการออกแบบสร้างคุณค่าและมูลค่าเพิ่ม ผลิตเป็น เสื้อผ้าสำเร็จรูป หรือผลิตภัณฑ์สิ่งทอสำเร็จรูปอื่น ๆ เพื่อประโยชน์ในการใช้งาน⁽¹⁴⁾

อุตสาหกรรมฟอกย้อมในกลุ่มอุตสาหกรรมสิ่งทอและเครื่องนุ่งห่ม จึงมีบทบาท สำคัญในการสร้างมูลค่าให้กับผ้าผืน โดยทำหน้าที่ในการเปลี่ยนวัตถุดิบสิ่งทอที่อยู่ในรูปเส้นด้าย หรือผ้าดิบให้เป็นวัสดุสำเร็จรูปที่สามารถนำไปใช้ในการผลิตหรือจำหน่ายให้แก่ผู้บริโภคโดยตรง ช่วยเพิ่มมูลค่าให้กับสินค้าผลิตภัณฑ์สิ่งทอ และลดปัญหาการนำเข้าวัตถุดิบในอุตสาหกรรมผลิต เสื้อผ้าสำเร็จรูป จากข้อมูล ณ สิ้นปี 2564 มีโรงงานอุตสาหกรรมฟอกย้อม (สะสม) รวม 199 โรงงาน คนงานประมาณ 20,554 คน ดังนั้นอุตสาหกรรมฟอกย้อมจึงเป็นอุตสาหกรรมที่มี ความสำคัญต่อระบบอุตสาหกรรมสิ่งทอ การพัฒนาเศรษฐกิจของประเทศ และเป็นแหล่งรองรับ แรงงานจำนวนมาก^(1, 15, 16)

1.2 กระบวนการผลิตในอุตสาหกรรมฟอกย้อม

กระบวนการฟอกย้อมเป็นขั้นตอนที่สำคัญในอุตสาหกรรมฟอกย้อม และเป็นกระบวนการที่ทำให้ผ้าหรือเส้นด้ายมีสีที่สวยงาม โดยกระบวนการผลิตในอุตสาหกรรมฟอกย้อมประกอบด้วยกระบวนการหลักที่สำคัญ 3 กระบวนการ^(16, 17)

1.2.1 การเตรียมผ้า (preparation)

เป็นขั้นตอนหนึ่งที่สำคัญต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์ก่อนการฟอกย้อมและการตกแต่งสำเร็จ เนื่องจากผ้าดิบหรือเส้นด้ายที่ออกจากโรงงานหรือทออาจมีเส้นด้ายที่เฝือออกมาบนผิวหน้าหรือมีการเคลือบแป้งให้เส้นด้ายแข็งเพื่อสะดวกในการทอผ้า ซึ่งเป็นอุปสรรคในการย้อมสี ทำให้ผ้าติดสีไม่สม่ำเสมอ หรือเห็นลวดลายไม่คมชัด ดังนั้นการเตรียมผ้าจึงประกอบด้วยขั้นตอนย่อย ๆ ดังนี้ 1) การเผาขน (singeing) เพื่อกำจัดปลายเส้นใยของผ้าที่เฝือออกมาบนผิวหน้าของผ้า 2) การลอกแป้ง (desizing) เพื่อกำจัดแป้งบนผ้าออก ช่วยให้ผ้าดูดซับสีและสารเคมีได้อย่างสม่ำเสมอทั่วทั้งผืน นอกจากนี้ยังช่วยให้ผ้านุ่ม ไม่แข็งกระด้าง 3) การขจัดสิ่งสกปรก (scouring) เพื่อกำจัดไขมันและสารปนเปื้อนต่าง ๆ ที่ปนมากับเส้นใยผ้า 4) การฟอกขาว (bleaching) เพื่อกำจัดสีเดิมที่มีอยู่บนเส้นใยผ้าซึ่งอาจส่งผลให้การย้อมสีได้สีผิดไปจากที่ต้องการ 5) การชุบมัน (mercerization) เพื่อเพิ่มความเงามัน ความเหนียวให้กับเส้นด้าย และผ้า ส่วนใหญ่มักทำกับเส้นใยฝ้าย เนื่องจากเส้นใยฝ้ายมีการปนเปื้อนของขี้ผึ้งและไขมัน จึงมีการดูดซับน้ำที่ไม่ดี ดังนั้นการชุบมันจะทำให้เส้นใยฝ้ายมีการดูดซับน้ำและสีย้อมได้ดีขึ้น

1.2.2 การย้อมสี (textile dyeing)

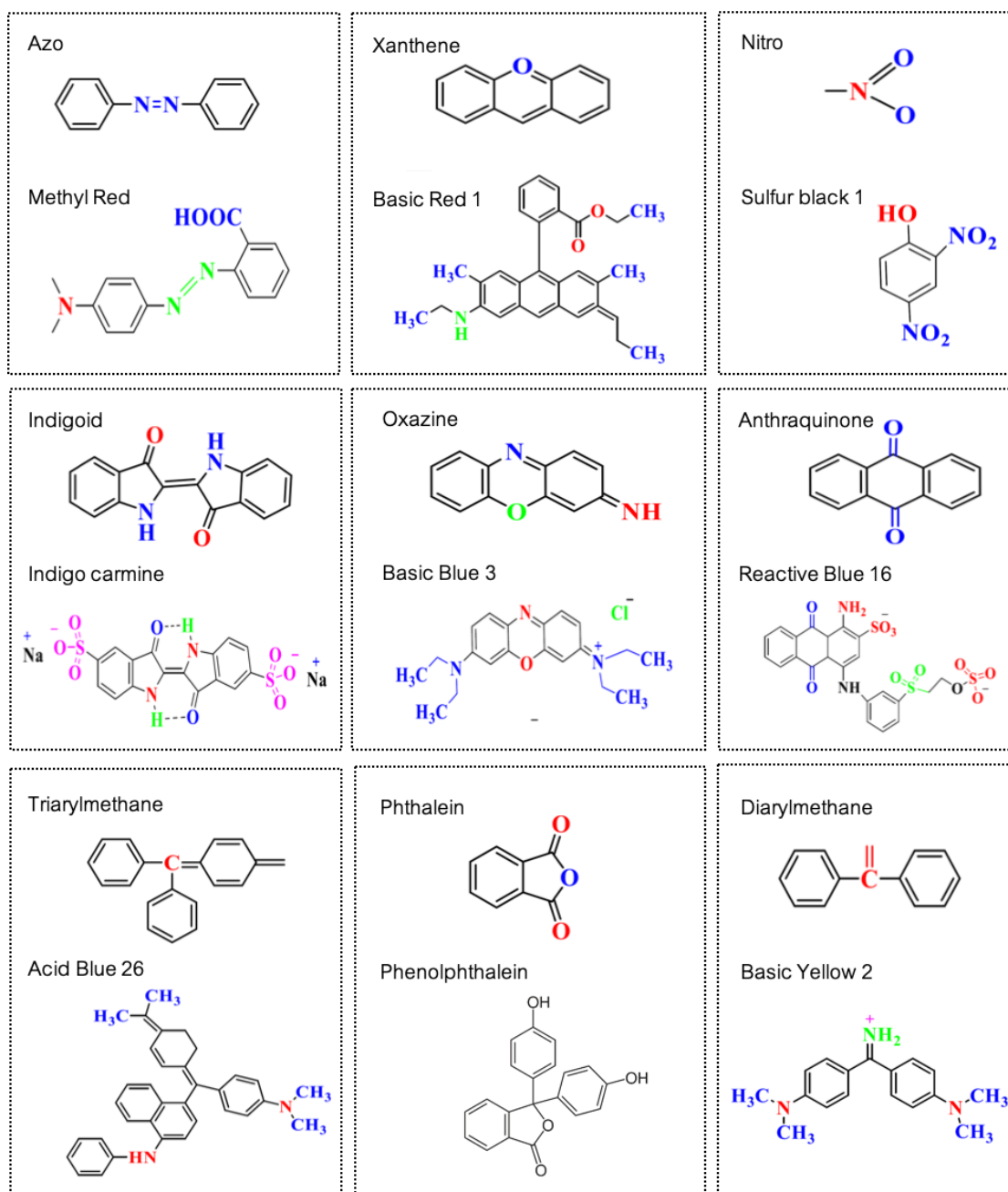
เป็นกระบวนการให้สี โดยการย้อมต้องคำนึงถึงองค์ประกอบทางเคมีของสีย้อมที่ทำให้เกิดสีบนวัสดุที่จะย้อม เช่น ใยฝ้าย ขนสัตว์ หรือไนลอน เป็นต้น เนื่องจากผ้าแต่ละชนิดมีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องเลือกชนิดของสีย้อมให้เหมาะสมกับชนิดของเส้นใยผ้า ซึ่งผ้าหรือเส้นด้ายที่ผ่านการเตรียมและทำความสะอาดแล้วจะถูกนำไปย้อมสีในเครื่องย้อม (dyeing machine) สีย้อมอยู่ในรูปของสารละลายเพื่อสามารถถูกดูดซึมและเกาะติดผิวของเส้นใยได้ พันธะทางเคมีที่ทำให้เกิดการดูดซึมและเกาะติดแน่นบนเส้นใย เช่น พันธะโควาเลนต์ (covalent bonds) และพันธะไอออนิก (ionic bonds) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องในการย้อม เช่น ระยะเวลาในการย้อม อุณหภูมิ ค่า pH และสารเคมีช่วยย้อมต่าง ๆ ซึ่งมีผลต่อประสิทธิภาพและความสม่ำเสมอของสีย้อมที่จะติดบนเส้นใยผ้าอีกด้วย

1.2.3 การตกแต่งสำเร็จ (textile finishing)

เป็นกระบวนการหนึ่งในการตกแต่งสิ่งทอ ซึ่งมักทำเป็นขั้นตอนสุดท้ายต่อจากการเตรียมและการย้อมสีสิ่งทอ เพื่อปรับปรุง เปลี่ยนแปลง หรือเพิ่มเติมคุณสมบัติบางอย่างให้กับผลิตภัณฑ์ให้ตรงตามความต้องการของลูกค้า เช่น การทำให้ผ้านุ่ม เป็นมันเงา สามารถทำได้โดยการใส่สารเคมีและวิธีทางเชิงกล

2. สีย้อมที่ใช้ในอุตสาหกรรมฟอกย้อม

สีย้อมเคมีสังเคราะห์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมฟอกย้อมทั่วไปมักเป็นสารประกอบเชิงซ้อนอะโรมาติก (aromatic compound) ที่ไม่อิ่มตัว มีคุณสมบัติในการละลายที่ดี และคงทน โดยทั่วไปผลิตจากผลพลอยได้ของน้ำมันปิโตรเลียมหรือน้ำมันถ่านหิน เมื่อผ่านการสกัดแล้วจะได้สารประกอบอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (aromatic hydrocarbon) ได้แก่ เบนซีน (benzene) โทลูอีน (toluene) แนฟทาลีน (naphthalene) และแอนทราซีน (anthracene) จากนั้นนำไปผ่านปฏิกิริยาไนเตรชัน (nitration) เพื่อเปลี่ยนสภาพให้เป็นสารตัวกลาง แล้วจึงเปลี่ยนเป็นสีย้อมด้วยเทคนิคต่าง ๆ ซึ่งสีย้อมสังเคราะห์มีโครงสร้างทางเคมีที่หลากหลาย^(2, 3, 18) โดยทั่วไปมักประกอบด้วยหมู่โครโมฟอร์ (dye chromophore group) ซึ่งเป็นส่วนที่ทำให้เกิดสีสามารถดูดกลืนแสงได้ในช่วงความยาวคลื่น 380-750 นาโนเมตร เมื่อโมเลกุลของสีย้อมกระทบกับแสง โครงสร้างโครโมฟอร์ของสีจะเกิดสั่นแล้วดูดกลืนแสงบางความยาวคลื่นไว้ ทำให้มองเห็นสีของความยาวคลื่นที่ไม่ถูกดูดกลืน มีโทนสีที่แตกต่างกันออกไป หมู่โครโมฟอร์ของสีย้อมมีหลายชนิด เช่น กลุ่มเอโซ (azo group, N=N) กลุ่มไนโตร (nitro group, NO₂) และกลุ่มไนโตรโซ (nitroso group, N=O) และหมู่ฟังก์ชันของสีย้อม (dye functional group) หรือที่เรียกว่า ออกโซโครม (auxochrome) เป็นกลุ่มอะตอมที่จับกับหมู่โครโมฟอร์ เพื่อสร้างพันธะระหว่างโมเลกุลสีกับเส้นใย ทำให้เกิดการยึดติดของสีย้อมกับเส้นใย เช่น SO³⁻, Na⁺, COO⁻, OH⁻ และ NH₂⁻ เป็นต้น^(2, 3)



ภาพประกอบ 1 ตัวอย่างการจัดจำแนกสีย้อมตามโครงสร้างทางเคมีหรือหมู่โครโมฟอร์

ที่มา : Benkhaya S, M' rabet S, El Harfi A. A review on classifications, recent synthesis and applications of textile dyes. Inorganic Chemistry Communications. 2020;115:107891.⁽²⁾

โดยทั่วไปสีย้อมที่ใช้ในอุตสาหกรรมฟอกย้อมสามารถจำแนกได้ตามสูตรโครงสร้างทางเคมี หรือหมู่โครโมฟอร์ หรือลักษณะการใช้งานในอุตสาหกรรม^(2, 3, 18) รวมทั้งคุณสมบัติในการละลายน้ำได้ ดังนี้

2.1 สีย้อมที่ละลายน้ำ

สีย้อมกลุ่มนี้บางชนิดมีประจุบวก บางชนิดมีประจุลบทำให้ละลายน้ำได้ดีและสะดวกในการใช้ ตัวอย่างเช่น

- สีย้อมไดเรกต์ (direct dye) เป็นสีที่ละลายน้ำได้ มีประจุลบ นิยมใช้ย้อมเส้นใยเซลลูโลส และสามารถใช้กับผ้าฝ้าย กระดาษ หนัง ขนสัตว์ ผ้าไหม และไนลอน โมเลกุลของสีจะติดเส้นใยได้โดยแทรกอยู่ระหว่างโมเลกุลของเส้นใย และยึดจับกันด้วยพันธะไฮโดรเจน ซึ่งมักไม่คงทนต่อการซักล้าง ดังนั้นในการย้อมจึงต้องย้อมร่วมกับสารละลายอิเล็กโทรไลต์ เช่น โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) เพื่อเพิ่มความสามารถในการยึดเกาะของผ้า โครงสร้างหลักทางเคมี คือ สารประกอบในกลุ่มเอโซ ออกซาซีน (oxazines) และพทาโลไซยานีน (phthalocyanines)^(2, 3, 7, 19)

- สีย้อมรีเอกทีฟ (reactive dye) เป็นสีที่ละลายน้ำได้ มีประจุลบ เหมาะกับการย้อมเส้นใยเซลลูโลส ขนสัตว์ และไนลอน โมเลกุลของสีจะยึดจับกับหมู่ไฮดรอกไซด์ (OH) ของเซลลูโลส และเชื่อมต่อกันด้วยพันธะโควาเลนต์ ทำให้เส้นใยที่ได้จากการย้อมสีกลุ่มนี้มีความคงทนต่อการซักล้างสูงมาก โครงสร้างหลักทางเคมี คือ สารประกอบในกลุ่มเอโซ และแอนทราควิโนน^(3, 7, 19)

- สีย้อมเบสิค (basic dye) เป็นสีที่มีประจุบวก ละลายน้ำได้ ส่วนใหญ่เป็นเกลือของเบสอินทรีย์ (organic base) มักใช้กับเส้นใยอะคริลิก แต่บางครั้งใช้ย้อมผ้าขนสัตว์ ผ้าฝ้าย และผ้าไหม โดยโมเลกุลของสีย้อมส่วนที่มีประจุลบจะยึดจับกับโมเลกุลของเส้นใย โครงสร้างหลักทางเคมี คือ สารประกอบในกลุ่มเอโซ แอนทราควิโนน ไตรเอริลมีเทน (triarylmethane) และไดเอริลมีเทน (diarylmethanes)^(3, 7, 19)

- สีย้อมเอซิด (acid dye) เป็นสีย้อมที่มีประจุลบ ละลายน้ำได้ ส่วนใหญ่มักใช้ในการย้อมผ้าไหม ไนลอน และขนสัตว์ สีย้อมจะย้อมติดเส้นใย โดยการเกิดเกลือระหว่างกลุ่มประจุบวกของสีย้อม และกลุ่มประจุบวกของเส้นใย โครงสร้างหลักทางเคมี คือ สารประกอบในกลุ่มเอโซ แอนทราควิโนน และไตรเอริลมีเทน⁽³⁾

2.2 สีย้อมที่ไม่ละลายน้ำ

สีย้อมกลุ่มนี้บางชนิดต้องอาศัยตัวพา (carrier) หรือการเร่งปฏิกิริยาด้วยวิธีทางกายภาพ เช่น ความร้อน ความดัน อุณหภูมิ หรือปฏิกิริยาเคมีช่วยในการย้อมสี ตัวอย่างเช่น

- สีย้อมเอโซ (azo dye) เป็นสีย้อมที่มีการใช้งานในอุตสาหกรรมฟอกย้อมมากที่สุด ประมาณ 60-70% เนื่องจากมีประสิทธิภาพดี ใช้งานง่าย มีความเสถียร และมีความเข้มของสีสูง โครงสร้างหลักทางเคมี คือ สารประกอบในกลุ่มเอโซ สามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มย่อย ตามจำนวนกลุ่มของเอโซในโครงสร้าง ได้แก่ โมโนเอโซ (monoazo) ไดเอโซ (diaz) และโพลีเอโซ (polyazo)^(2, 7)

- สีย้อมดิสเพอร์ส (disperse dye) เป็นสีที่ไม่ละลายน้ำหรือมีการละลายน้ำได้น้อย แต่มีสมบัติกระจายได้ดี ส่วนใหญ่จะใช้สำหรับการย้อมเส้นใยที่ประกอบด้วยเซลลูโลสอะซิเตท ไนลอน ไตรอะซิเตท โพลีเอสเตอร์ และอะคริลิก การย้อมต้องใช้อุณหภูมิ เพื่อช่วยเร่งอัตราการดูดซึมของสีเข้าสู่เส้นใยหรือย้อมโดยใช้อุณหภูมิ และความดันสูง โครงสร้างหลักทางเคมี คือ สารประกอบในกลุ่มเอโซ ไนโตร และแอนทราควิโนน (anthraquinone)^(2, 3, 7, 19)

- สีย้อมแวร์ต (vat dye) เป็นสีที่ไม่ละลายน้ำ ในการย้อมต้องทำปฏิกิริยากับสารรีดิวซ์และโซเดียมไฮดรอกไซด์ สีจะถูกรีดิวซ์ให้กลายเป็นเกลือ แล้วจึงซึมเข้าไปในเส้นใยได้ โครงสร้างหลักทางเคมี คือ สารประกอบในกลุ่มแอนทราควิโนน และอินดิโกออยด์ (indigoid)

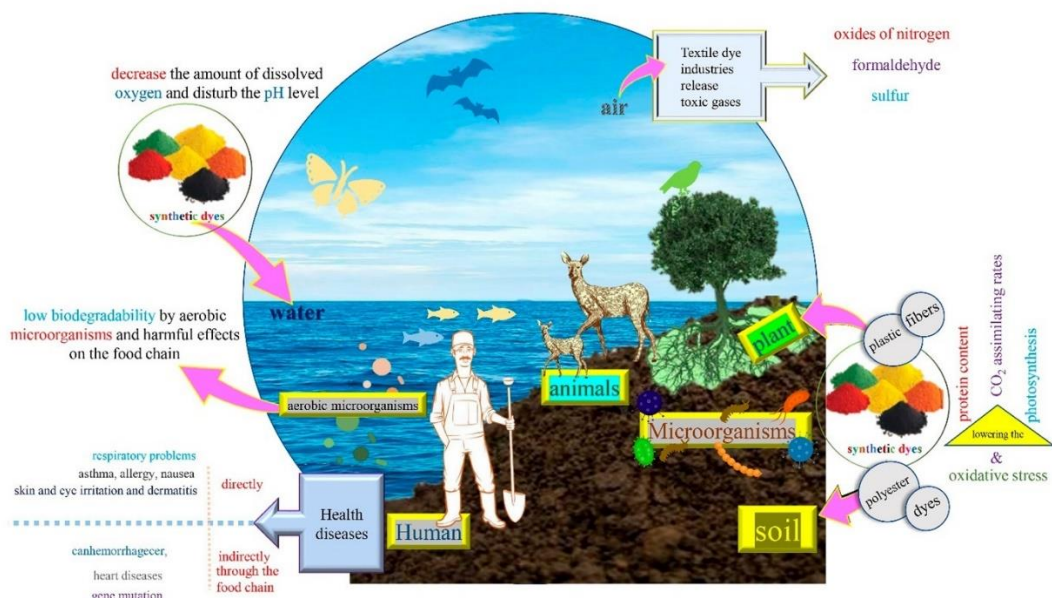
- สีย้อมซัลเฟอร์ (sulfur dye) เป็นสีที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ ในสภาพปกติไม่ละลายน้ำ แต่สามารถใช้สารรีดิวซ์เพื่อเปลี่ยนให้สีอยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้ สีซัลเฟอร์นิยมนำมาใช้ย้อมผ้าฝ้าย โครงสร้างหลักทางเคมี คือ พันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bridge; S-S)^(7, 18)

3. ผลกระทบของน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมฟอกย้อมต่อสิ่งแวดล้อมและมาตรฐานอุตสาหกรรม

เนื่องจากอุตสาหกรรมฟอกย้อมมีการใช้สารเคมี และน้ำจำนวนมาก ทำให้น้ำทิ้งมีการปนเปื้อนของเสียที่เป็นพิษจากกระบวนการฟอกย้อม เช่น กำมะถัน แนฟทอล สีสังเคราะห์ กรดเบส ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ สารลดแรงตึงผิว และโลหะหนัก เช่น ทองแดง ตะกั่ว สารหนู แคดเมียม ปรอท นิกเกิล และโคบอลต์ ทำให้น้ำทิ้งมีความเป็นพิษสูง⁽³⁾ นอกจากนี้ น้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมฟอกย้อมมีลักษณะเฉพาะตัว คือ มีสีที่มองเห็นได้ในปริมาณสูงประมาณ 3,000-4,500 หน่วย มีค่าความต้องการออกซิเจนทางเคมี (Chemical Oxygen Demand, COD) ประมาณ 800-1,600 มิลลิกรัมต่อลิตร ช่วงของค่า pH ที่เป็นด่าง คือ 9-11 ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายในน้ำประมาณ 6,000-7,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณสารอินทรีย์จำนวนมาก และมีความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพต่ำ⁽⁴⁾ แต่อย่างไรก็ตามลักษณะของน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมฟอกย้อมมักจะมีค่าแปรปรวนสูงในแต่ละโรงงาน ขึ้นอยู่กับชนิดของสีย้อม ประเภทของผ้า และความเข้มข้นของสารเติมแต่ง

3.1 ผลกระทบของน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมฟอกย้อมต่อสิ่งแวดล้อม

เนื่องจากสีย้อมสังเคราะห์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมฟอกย้อมมักมีคุณสมบัติคงทนต่อสภาวะต่าง ๆ ได้ดี เช่น ความร้อน แสงอาทิตย์ และสารเคมีในการซักล้าง อีกทั้งยังมีความเข้มข้นสูง บางชนิดมีความเป็นพิษ โดยทั่วไปร้อยละ 10-15 ของสีย้อมจะถูกปล่อยรวมกับน้ำทิ้งภายหลังจากการย้อม ซึ่งกระบวนการบำบัดส่วนใหญ่ไม่สามารถกำจัดสีย้อมได้อย่างสมบูรณ์ โดยเฉพาะสีย้อมรีเอกทีฟ สีย้อมไดเรกต์ สีย้อมเบสิค และสีย้อมเอซิด ซึ่งสามารถละลายน้ำได้ จึงยากต่อการกำจัด สีย้อมที่ปล่อยลงสู่แหล่งน้ำไม่เพียงแต่ทำลายธรรมชาติที่สวยงามแต่ยังส่งผลเสียกับสิ่งแวดล้อมทางน้ำอีกด้วย โดยสีย้อมที่เข้มข้นค่ามาตรฐานจะเพิ่มความขุ่นของน้ำ บดบังการส่องผ่านของแสงอาทิตย์ลงสู่แหล่งน้ำ ชัดขวางกระบวนการสังเคราะห์แสงของพืชน้ำ ส่งผลให้พืชตาย เกิดการเน่าเสียในแหล่งน้ำ สีย้อมยังรบกวนการถ่ายเทและการละลายของออกซิเจนในน้ำ ส่งผลกระทบกับสัตว์น้ำ และเพิ่มความต้องการออกซิเจนทั้งทางเคมีและทางชีวภาพ ทำให้เกิดความไม่สมดุลของระบบนิเวศ⁽³⁻⁶⁾ นอกจากนี้สีย้อมยังส่งผลกระทบต่อสุขภาพของมนุษย์และสัตว์ทำให้เกิดอาการแพ้ ระคายเคืองต่อผิวหนังและเยื่อเมือก หรืออาจก่อให้เกิดมะเร็งได้ในระยะยาว⁽²⁰⁾ อย่างไรก็ตามการปล่อยสีย้อมที่เกินมาตรฐานลงดินก็พบว่าส่งผลกระทบต่อประชากรของจุลินทรีย์ในดิน และการเจริญของพืชอีกด้วย (ภาพประกอบ 2)



ภาพประกอบ 2 ผลกระทบทางตรงและทางอ้อมของสีย้อมสิ่งทอต่อสิ่งแวดล้อม

ที่มา: Slama HB, Chenari Bouket A, Pourhassan Z, Alenezi FN, Silini A, Cherif-Silini H, et al. Diversity of Synthetic Dyes from Textile Industries, Discharge Impacts and Treatment Methods. *Applied Sciences*. 2021;11(14):6255-76.⁽⁷⁾

ตัวอย่างสีย้อม Azure-B ซึ่งมีใช้อย่างแพร่หลายในโรงงานอุตสาหกรรมฟอกย้อม มีความเป็นพิษต่อเซลล์สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ monoamine oxidase A ได้ในระดับห้องปฏิบัติการ ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาทส่วนกลางของมนุษย์⁽²¹⁾ สีย้อม Disperse Red 1 ที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมฟอกย้อมมีคุณสมบัติเป็นสารก่อกลายพันธุ์ (mutagen) เมื่อนำไปทดสอบกับเซลล์ลิมโฟไซต์ (lymphocyte) และเซลล์ตับ HepG2 ของมนุษย์ พบการเพิ่มขึ้นของนิวเคลียสจำนวนมาก ซึ่งบ่งบอกถึงการกลายพันธุ์ในระดับโครโมโซม⁽²²⁾ เช่นเดียวกับผลของการทดสอบของสีย้อม Disperse Orange 1 ให้ผลเหมือนกับ Red 1 ในการชักนำให้เกิดการทำลายของดีเอ็นเอ และผลของความเป็นพิษต่อเซลล์ตับ HepG2⁽²³⁾ นอกจากนี้สีย้อมกลุ่มเอโซหลายชนิด ยังมีรายงานว่าสามารถก่อให้เกิดมะเร็งได้อีกด้วย จากการศึกษาผลของสีย้อม Sudan 1 โดยการทดลองในหนู พบว่าชักนำให้เกิดก้อนเนื้ออกในตับได้ ส่วนสีย้อม Basic Red 9 ซึ่งนิยมใช้ในอุตสาหกรรมฟอกย้อมผ้า เครื่องหนัง และกระดาษ มีผลในการก่อมะเร็งในมนุษย์ และเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม โดยสีย้อมจะสลายตัวในสภาวะที่ไร้ออกซิเจนเปลี่ยนเป็นสารอะโรมาติกเอมีน (aromatic amines) ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง เมื่อปล่อยทิ้งในแหล่งน้ำอาจก่อให้เกิดโรคผิวหนังอักเสบจากภูมิแพ้ และผื่นคัน ผลการทดสอบในหนูพบการเกิดเนื้องอกในตับ กระเพาะปัสสาวะ และต่อมน้ำนม⁽²⁴⁾ อย่างไรก็ตามแม้ว่าสีย้อมจำนวนมากมีรายงานว่ามีความเป็นพิษแต่ก็ยังมีใช้อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมฟอกย้อมในปัจจุบัน

3.2 มาตรฐานน้ำทิ้งของอุตสาหกรรมฟอกย้อมและการวัดค่าสี

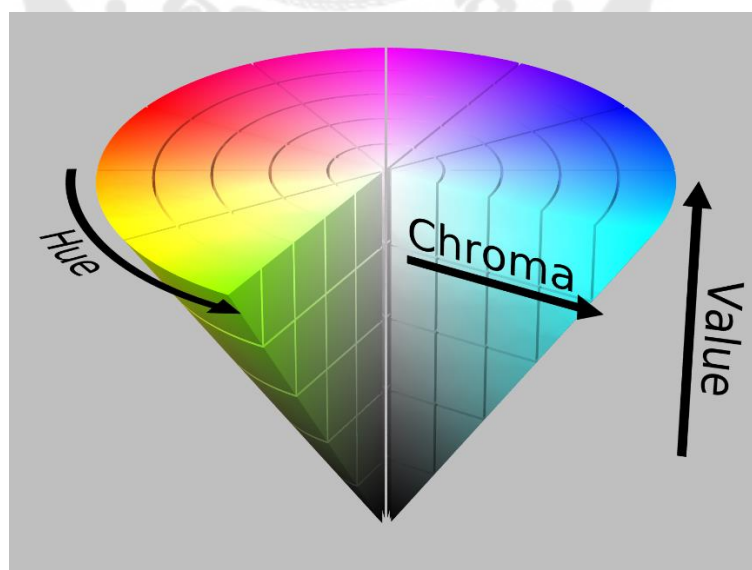
เนื่องจากสีย้อมสังเคราะห์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมฟอกย้อมส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมอย่างกว้างขวาง ทั้งด้านสิ่งแวดล้อมและสุขภาพของสิ่งมีชีวิตทั้งทางตรงและทางอ้อมกับชุมชนที่อยู่ใกล้เคียงและใช้แหล่งน้ำในการอุปโภคบริโภค รวมทั้งส่งผลกระทบต่อคนงานที่ทำงานเกี่ยวข้องกับสิ่งทออีกด้วย ปัจจุบันกฎหมายจึงมีความเข้มงวดมากขึ้นเกี่ยวกับการกำจัดสีย้อมที่ปนเปื้อนในน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม โดยประเทศไทยมีประกาศกระทรวงอุตสาหกรรมที่กำหนดมาตรฐานของน้ำทิ้งที่จะสามารถปล่อยลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติได้ รายละเอียดแสดงในตาราง 1 ตัวอย่างเช่น ค่า BOD และ COD ต้องไม่เกิน 20 และ 120 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่า pH อยู่ในช่วง 5-9 ปริมาณโลหะหนักมีค่าแตกต่างกันตามที่กำหนด^(25, 26)

ตาราง 1 มาตรฐานน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมตามประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม

พารามิเตอร์	มาตรฐานน้ำทิ้ง
ความเป็นกรดและด่าง (pH)	5-9
อุณหภูมิ (Temperature)	< 40 องศาเซลเซียส
ค่าหน่วยสี (Color)	< 300 ADMI
ค่า BOD (Biochemical Oxygen Demand)	< 20 มิลลิกรัมต่อลิตร
ค่า COD (Chemical Oxygen Demand)	< 120 มิลลิกรัมต่อลิตร
ซัลไฟด์ (Sulfide)	< 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
ไซยาไนด์ (Cyanides CN)	< 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร
ฟอร์มัลดีไฮด์ (Formaldehyde)	< 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
สารประกอบฟีนอล (Phenols)	< 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
คลอรีนอิสระ (Free Chlorine)	< 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
สารฆ่าศัตรูพืชและสัตว์ (Pesticide)	ต้องตรวจไม่พบ
สังกะสี (Zn)	< 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
โครเมียม (Chromium)	< 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร
สารหนู (As)	< 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร
ทองแดง (Cu)	< 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
ปรอท (Hg)	< 0.005 มิลลิกรัมต่อลิตร
แคดเมียม (Cd)	< 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร
แบเรียม (Ba)	< 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
ซีลีเนียม (Se)	< 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร
ตะกั่ว (Pb)	< 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร
นิกเกิล (Ni)	< 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
แมงกานีส (Mn)	< 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

ที่มา: ประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม. กำหนดมาตรฐานควบคุมการระบายน้ำทิ้งจากโรงงาน. 2018 [เข้าถึงเมื่อ 6 เม.ย. 2565]. เข้าถึงได้จาก: http://www.genco.co.th/Document/Inf_14.PDF.⁽²⁶⁾

ส่วนค่าความเข้มข้นของเม็ดสี (pigment) โดยรวมแสดงในหน่วยมาตรฐานของ American Dye Manufacturers Institute (ADMI) ใช้ในการวัดสีน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม ฟอกย้อม สิ่งทอ กระดาษ อาหาร และเครื่องสำอาง เป็นต้น หน่วยวัดสี ADMI นี้เป็นหน่วยที่เริ่มประกาศใช้เป็นค่ามาตรฐานในการวัดค่าสีน้ำทิ้งในประเทศไทยโดยเริ่มจากกระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมในปี 2559 และจากกระทรวงอุตสาหกรรมในปี 2560 เป็นต้นมา โดยกำหนดค่ามาตรฐานของสีน้ำทิ้งต้องไม่เกิน 300 ADMI ซึ่งหาได้จากการรวมค่าการดูดกลืนแสงทุกความยาวคลื่นที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าตั้งแต่เฉดสีม่วงจนถึงเฉดสีแดง ในช่วง 400-700 นาโนเมตร โดยไม่เน้นการวัดสีใดสีหนึ่ง ซึ่งค่าที่ได้จะเป็นค่าเม็ดสีรวมทั้งหมด นอกจากนี้ยังรวมค่าความเข้ม-ความอ่อน และความมืด-ความสว่าง ของสีอีกด้วย (ภาพประกอบ 3) การวัดสีในหน่วย ADMI นี้เป็นการวัดสีจริงของตัวอย่างน้ำที่ทดสอบไม่ใช่สีจากสารแขวนลอยที่ปนอยู่ในน้ำ ดังนั้นในการวัดจึงต้องกำจัดสารแขวนลอยทั้งหมดออกก่อนโดยการกรองด้วยเมมเบรนขนาด 0.45 ไมครอน เพื่อวัดค่าสีจริงจากน้ำเท่านั้น ปัจจุบันสามารถวัดได้โดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่มีโปรแกรมเฉพาะ เนื่องจากค่า ADMI ที่วัดได้เป็นค่ารวม ดังนั้นถ้าตัวอย่างน้ำที่วิเคราะห์ 2 ตัวอย่าง เช่น ตัวอย่าง A และ B มีค่าการดูดกลืนแสงรวมต่างจากน้ำที่ไม่มีสี (colourless) เท่ากันจะมีค่า ADMI เดียวกัน แม้ว่าสีที่ปรากฏของตัวอย่าง A และ B จะต่างกันก็ตาม



ภาพประกอบ 3 ลักษณะของเฉดสี (hue) ความเข้มอ่อนของเฉดสี (chroma) และความสว่างของสี (value) ที่ใช้ในการวิเคราะห์ค่า ADMI ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

ที่มา: Jacob Rus. (2010). Retrieved April 18, 2022 from https://en.wikipedia.org/wiki/HSL_and_HSV#/media/File:HSV_color_solid_cone_chroma_gray.png.⁽²⁷⁾

4. กระบวนการบำบัดน้ำทิ้งในอุตสาหกรรมฟอกย้อม

กระบวนการบำบัดน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมฟอกย้อมมีหลายวิธี ได้แก่ วิธีทางกายภาพ วิธีทางเคมี และวิธีทางชีวภาพ โดยทั่วไปวิธีทางกายภาพ ได้แก่ การดูดซับ และการกรอง เป็นต้น ส่วนวิธีทางเคมีเน้นการเกิดปฏิกิริยาเคมีกับโครงสร้างหรือหมู่ฟังก์ชันของสีย้อม และวิธีทางชีวภาพ โดยการใช้จุลินทรีย์มาช่วยในการดูดซับสีย้อม และ/หรือ ย่อยสลายสีย้อมด้วยเอนไซม์⁽²⁵⁾

4.1 การบำบัดทางกายภาพ (physical treatment)

เป็นวิธีการกำจัดสีย้อม สารพิษ และสารอื่น ๆ ที่มีอยู่ในน้ำทิ้ง โดยอาศัยแรงดึงดูดทางไฟฟ้า (electrical attraction) แรงโน้มถ่วง (gravity) แรงแวนเดอร์วาลส์ (Van der Waal forces) รวมทั้งการใช้สิ่งกีดขวางทางกายภาพ (physical barriers) การบำบัดด้วยวิธีนี้ไม่ได้ทำลายโครงสร้างทางเคมีของสารเคมีในน้ำทิ้ง แต่เป็นเพียงการแยกสารหรือการเปลี่ยนสถานะทางกายภาพของสารเท่านั้น ตัวอย่างเช่น การดูดซับ (adsorption) อาศัยตัวดูดซับ (adsorbent) ที่มีคุณสมบัติในการดูดซับสารประกอบอินทรีย์ต่าง ๆ รวมไปถึงสีย้อมที่ละลายน้ำ เช่น สีย้อมรีเอกทีฟ สีย้อมเบสิก และสีย้อมเอโซ แต่ไม่สามารถดูดซับสารแขวนลอยและสีย้อมที่ไม่ละลายน้ำได้ โดยสีย้อมหรือสารมลพิษจากน้ำเสียจะถูกสะสมอยู่ที่พื้นผิวของตัวดูดซับโดยอาศัยปฏิกิริยาของพันธะต่าง ๆ เช่น พันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) และแรงแวนเดอร์วาลส์ เป็นต้น ข้อดีของวิธีการดูดซับ คือ เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ ใช้งานง่ายเมื่อน้ำทิ้งที่ต้องการบำบัดมีสีย้อมที่หลากหลาย⁽⁷⁾ ส่วนข้อเสีย คือ ใช้เวลานาน และภาคตะกอนที่เกิดขึ้นกำจัดได้ยาก^(3, 28, 29) การกรองด้วยเมมเบรน (membrane filtration) เป็นวิธีที่ใช้เมมเบรนที่มีรูขนาดเล็กในการกรองเพื่อแยกสารตามขนาดโมเลกุล⁽²⁵⁾ โดยอาศัยแรงดันผ่านเมมเบรนเป็นหลัก เช่น อัลตราฟิลเตรชัน (ultrafiltration) นาโนฟิลเตรชัน (nanofiltration) และรีเวิร์สออสโมซิส (reverse osmosis) ข้อดีของวิธีนี้ คือ มีความทนทานต่ออุณหภูมิ มีประสิทธิภาพการแยกสารสูง ใช้พลังงานต่ำ และง่าย ส่วนข้อเสีย คือ เมมเบรนมีราคาค่อนข้างสูง และอาจเกิดการอุดตันได้ง่าย^(3, 29)

4.2 การบำบัดทางเคมี (chemical treatment)

เป็นวิธีการกำจัดสีโดยใช้สารเคมีในการทำปฏิกิริยา เช่น การตกตะกอนด้วยสารเคมี (chemical precipitation) เป็นวิธีที่นิยมในการบำบัดน้ำทิ้งสิ่งทอ เพื่อกำจัดโลหะที่เป็นพิษที่อยู่ในรูปสารละลายให้เกิดการตกตะกอนเป็นอนุภาคของแข็งโดยการเติมสารเคมีช่วยให้ตกตะกอน จากนั้นจะกำจัดออกด้วยวิธีการกรอง ตัวอย่างเช่น การตกตะกอนของไฮดรอกไซด์ สารที่ถูกใช้เป็น

วิธีเจเนตในการเปลี่ยนโลหะที่ละลายเป็นอนุภาคของแข็ง คือ โซเดียมหรือแคลเซียมไฮดรอกไซด์ เป็นต้น⁽³⁾ การสร้างตะกอนและการรวมตะกอน (coagulation and flocculation) เป็นวิธีทางเคมีที่ง่ายในการปรับสภาพน้ำทิ้งของเสียสิ่งทอ⁽⁷⁾ โดยการเติมสารที่ช่วยในการตกตะกอน เช่น อะลูมิเนียมซัลเฟต (aluminum sulfate, $Al_2(SO_4)_3$) และเฟอร์ริกคลอไรด์ (ferric chloride, $FeCl_3$) เพื่อช่วยทำให้อนุภาคขนาดเล็กเกิดการจับตัวกันเป็นตะกอนได้ ตะกอนที่เกิดขึ้นจะถูกแยกออกจากน้ำเสียด้วยวิธีการลอยตัว (flotation) การกรอง (filtration) และการตกตะกอน (settling) เป็นต้น จากนั้นจะมีการนำตะกอนที่แยกได้ไปกำจัดเพื่อลดความเป็นพิษด้วยวิธีที่เหมาะสมต่อไป ข้อเสียของวิธีนี้ คือ การเติมสารช่วยตกตะกอนที่เป็นสารเคมีอาจเป็นการเพิ่มความเป็นพิษของน้ำทิ้ง ค่าใช้จ่ายในการกำจัดตะกอนค่อนข้างสูง และวิธีการในการกำจัดตะกอนต้องมีความมั่นใจได้ว่าสามารถลดความเป็นพิษของตะกอนได้อย่างสมบูรณ์ก่อนปล่อยตะกอนออกสู่สิ่งแวดล้อม^(3, 8, 29) ที่สำคัญวิธีนี้สามารถใช้ในการกำจัดสีน้ำทิ้งที่มีการปนเปื้อนสีดีสเพอร์ส เท่านั้น แต่ไม่มีประสิทธิภาพในการกำจัดสีแฉด และสีรีเอกทีฟ ทำให้วิธีการสร้างและรวมตะกอนยังเป็นวิธีที่มีข้อจำกัด⁽³⁰⁾ การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันทางเคมี (chemical oxidation) เป็นวิธีทางเคมีที่ใช้กันอย่างแพร่หลายสำหรับการบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานสิ่งทอ โดยอาศัยปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation reaction) ปัจจุบันมี 2 วิธีที่นิยมใช้ ได้แก่ วิธีโอโซนออกซิเดชัน (ozone oxidation) และวิธีเฟนตันออกซิเดชัน (Fenton oxidation) โดยการใช้สารออกซิไดซ์ (oxidizing agents) ได้แก่ โอโซน (O_3) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ซึ่งสามารถชักนำให้เกิดไฮดรอกซิลเรดิคัล (hydroxyl radicals) แล้วเข้าทำลายพันธะคู่ของโครงสร้างสีโครโมฟอร์ และหมู่ฟังก์ชัน ซึ่งมักประกอบด้วยวงอะโรมาติกที่ซับซ้อน ให้เสียสภาพ ส่งผลให้ปริมาณสีของน้ำทิ้งลดลง^(3, 29) ข้อดีของวิธีโอโซนออกซิเดชัน คือ การบำบัดไม่เพิ่มปริมาณน้ำเสียหรือมวลตะกอน ในวิธีนี้โอโซนถูกใช้เป็นสารออกซิไดซ์ ที่มีประสิทธิภาพเนื่องจากมีอัตราการเกิดปฏิกิริยาสูง สามารถย่อยสลายฟีนอลและอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนได้ นอกจากนี้ยังสามารถย่อยสลายสีย้อมในกลุ่มเอโซที่ปนเปื้อนในน้ำทิ้งได้⁽⁷⁾ แต่โอโซนมีค่าครึ่งชีวิตสั้น สลายตัวภายใน 20 นาที ดังนั้นจึงต้องใช้โอโซนอย่างต่อเนื่องซึ่งมีราคาแพงมาก จึงไม่เหมาะสมสำหรับใช้บำบัดน้ำทิ้งในระดับอุตสาหกรรม^(3, 29) และข้อเสียของวิธีเฟนตันออกซิเดชัน คือ ต้องเติมกรดจำนวนมากเพื่อให้ได้ค่า pH ที่ต้องการในการเกิดปฏิกิริยา

(29, 31)

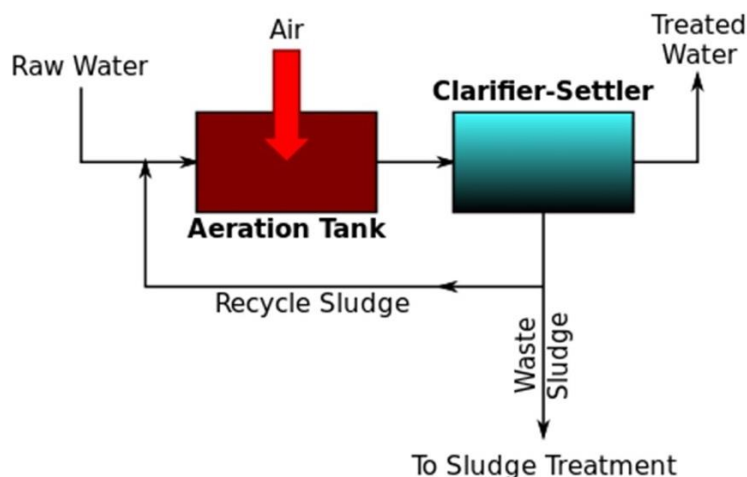
4.3 การบำบัดทางชีวภาพ (biological treatment)

การบำบัดทางชีวภาพหรือการย่อยสลายทางชีวภาพสามารถเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติโดยผ่านการทำงานของจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย เชื้อรา สาหร่าย และยีสต์ ที่มีอยู่ในน้ำทิ้ง

หรือบริเวณที่เป็นมลพิษ โดยวิธีการบำบัดทางชีวภาพสามารถพัฒนาให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุดได้ โดยการคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำทิ้งจากโรงงานสิ่งทอในระดับห้องปฏิบัติการ จากนั้นขยายขนาดเพื่อใช้ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป⁽⁷⁾ ในการบำบัดทางชีวภาพด้วยจุลินทรีย์โดยใช้เทคนิคต่าง ๆ เช่น การดูดซับทางชีวภาพ (biosorption) การสะสมทางชีวภาพ (bioaccumulation) หรือการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างสารทางชีวภาพ (biotransformation) โดยทำให้โมเลกุลของสารที่เป็นพิษกลายเป็นสารที่ไม่เป็นพิษหรือแม้แต่เป็นประโยชน์ และการย่อยสลายทางชีวภาพ (biodegradation) เป็นต้น ทั้งนี้ประสิทธิภาพการบำบัดทางชีวภาพด้วยจุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยโดยเฉพาะการย่อยสลายทางชีวภาพ เช่น ปริมาณของอินทรีย์วัตถุที่อยู่ในน้ำทิ้ง ปริมาณสีย้อมและจุลินทรีย์ อุณหภูมิ ค่า pH และความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายอยู่ในน้ำ นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับกลไกของจุลินทรีย์และกิจกรรมของเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยสี เมื่อเทียบกับวิธีทางกายภาพและทางเคมี กระบวนการบำบัดทางชีวภาพมีข้อดีหลายประการ เช่น เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ปลอดภัย ต้นทุนการดำเนินงานต่ำ สะอาด (ไม่มีกากตะกอน) ประหยัด และสามารถนำมาผสมผสานกับเทคโนโลยีอื่น ๆ ได้ เป็นต้น แบคทีเรีย และรา เป็นจุลินทรีย์ที่นิยมใช้ในการย่อยสลายสีจากน้ำทิ้ง เนื่องจากมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลายโครงสร้างทางเคมีที่ซับซ้อนของสีได้ ยกตัวอย่างเช่น เอนไซม์ออกซิโดเรดักเตส (oxidoreductases) ไฮโดรเลส (hydrolases) ลิกนินเนส (ligninases) เปอร์ออกซิเดส (peroxidases) และแลคเคส (laccases) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีความสามารถในการดูดซับสีย้อมสังเคราะห์ต่าง ๆ ได้อีกด้วย^(7, 32, 33)

กระบวนการบำบัดแบบเอเอส หรือระบบแอกทิเวเตดสลัดจ์ (activated sludge process) เป็นระบบบำบัดน้ำทิ้งทางชีวภาพแบบใช้ออกซิเจน โดยอาศัยจุลินทรีย์ในการย่อยสลายดูดซับ หรือเปลี่ยนรูปของสารอินทรีย์ต่าง ๆ ที่มีอยู่ในน้ำทิ้งให้มีค่าความสกปรกน้อยลง ซึ่งระบบแอกทิเวเตดสลัดจ์ ประกอบด้วย 3 ส่วนที่สำคัญ ได้แก่ ถังเติมอากาศ (aeration tank) ถังตกตะกอน (sedimentation tank) และระบบสูบตะกอนย้อนกลับ (sludge recycle) หลักการของระบบแอกทิเวเตดสลัดจ์ (ภาพประกอบ 4) คือ จุลินทรีย์จะใช้สารอินทรีย์ที่มีอยู่ในน้ำเป็นอาหารสำหรับการเจริญเติบโต ภายในถังจะมีการเติมอากาศเพื่อเพิ่มออกซิเจนให้แก่ น้ำเสียรวมทั้งเป็นเครื่องกวนน้ำเสียให้สัมผัสกับจุลินทรีย์ โดยการบำบัดสารอินทรีย์ต่าง ๆ ของระบบจะเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ภายในถังนี้ เมื่อจุลินทรีย์ใช้สารอินทรีย์และเจริญเติบโตจะเกิดการจับตัวกันเป็นก้อนตะกอนในถังเติมอากาศ ก้อนตะกอนเหล่านี้จะถูกแยกออกจากน้ำที่บำบัดแล้วด้วย

ถังตกตะกอน ส่วนตะกอนที่อยู่ก้นถังส่วนหนึ่งจะถูกนำกลับไปยังถังเติมอากาศอีกครั้ง เพื่อนำไปใช้ในการบำบัดน้ำทิ้งชุดใหม่ และตะกอนอีกส่วนหนึ่งที่เป็นตะกอนส่วนเกินจะถูกกำจัดต่อไป



ภาพประกอบ 4 การบำบัดน้ำเสียด้วยกระบวนการเอเอส หรือระบบแอกทีเวตเต็ดสลัดจ์

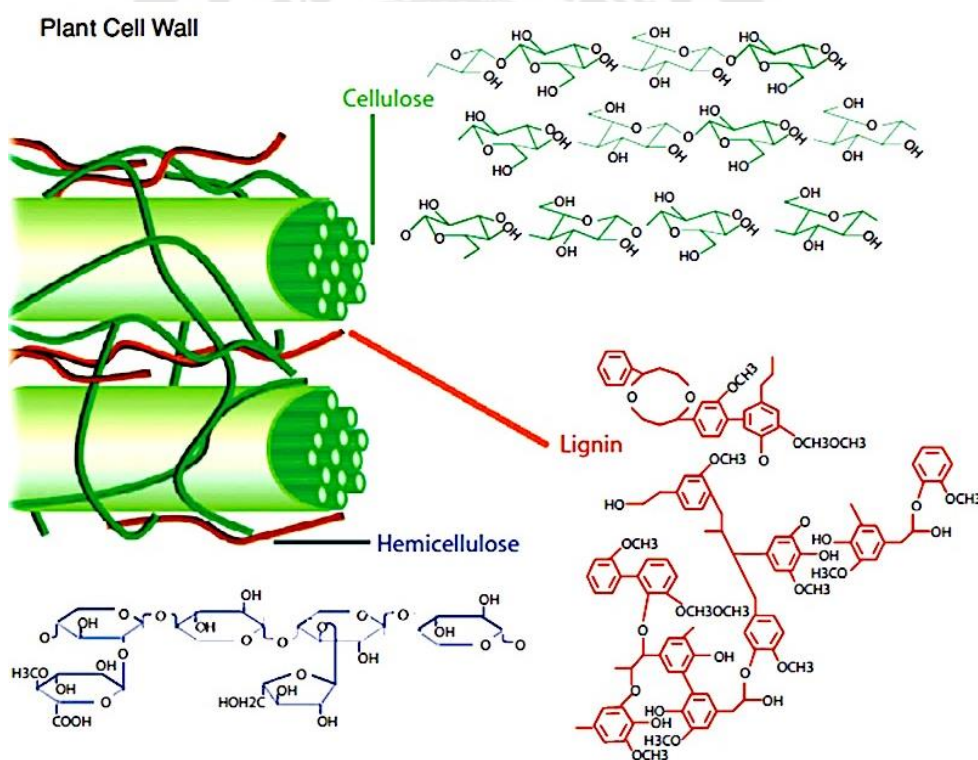
ที่มา: LennyCZ. (2008). Retrieved April 9, 2021 from https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Activated_Sludge_1.svg.⁽³⁴⁾

นอกจากนี้วิธีการบำบัดทางชีวภาพโดยใช้ราไทรอท ยังเป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่น่าสนใจเนื่องจากราไทรอทสามารถบำบัดสีย้อมได้โดยการดูดซับไว้ที่ผิวเซลล์ หรือการย่อยสลายทางชีวภาพโดยอาศัยเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ที่ราผลิตได้ ซึ่งทำให้เกิดกากตะกอนของเสียน้อยกว่าที่สำคัญเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม และไม่ก่อให้เกิดมลภาวะที่เป็นพิษ

5. ราไทรอทและเอนไซม์ในกลุ่มลิกนินโกลติก

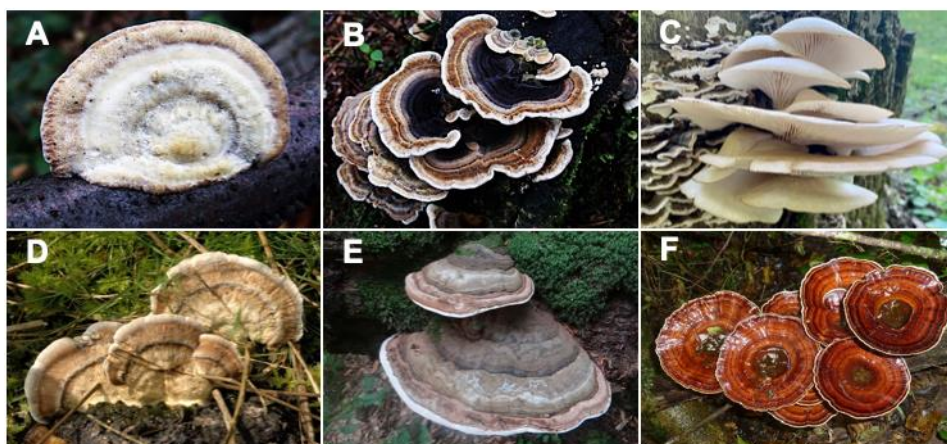
ราไทรอท (white-rot fungi) เป็นกลุ่มของราที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง ส่วนใหญ่จัดอยู่ในไฟลัมเบสิดิโอไมโคตา (Basidiomycota) พบการกระจายได้ทั่วไปในภูมิภาคแบบอบอุ่นไปจนถึงเขตร้อน สามารถเจริญได้บนต้นไม้เนื้อแข็งทั้งที่มีชีวิต และไม่มีชีวิต มีคุณสมบัติในการย่อยสลายลิกนิน (lignin) ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญของเนื้อไม้ ทำให้สีของเนื้อไม้เปลี่ยนจากสีน้ำตาลเป็นสีขาวหรือสีขาวเหลือง บางชนิดสามารถย่อยเซลลูโลส (cellulose) และเฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) ได้ด้วย (ภาพประกอบ 5) ต่างจากราในกลุ่มบราวน์รอต (brown-rot fungi) ที่ไม่สามารถย่อยสลายลิกนินได้จึงทำให้เนื้อไม้ที่ราเจริญมีสีน้ำตาลเข้มและเปรอะ^(35, 36)

ตัวอย่างของราไวร์รอตที่พบได้ในประเทศไทย เช่น *Trametes hirsuta*, *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus*, *Bjerkandera adusta*, *Ganoderma applanatum* และ *Microporus xanthopus* เป็นต้น (ภาพประกอบ 6) นอกจากนี้ราไวร์รอตยังเป็นจุลินทรีย์ที่มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่มีอุณหภูมิสูง ความเป็นพิษสูง และค่า pH ที่กว้าง ที่สำคัญสามารถผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโกลิติก (ligninolytic enzymes) ได้แก่ แลคเคส (laccase) แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (manganese peroxidase) และลิกนินเปอร์ออกซิเดส (lignin peroxidase) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายลิกนินที่มีโครงสร้างเป็นวงอะโรมาติก สารประเภทลิกโนเซลลูโลส ยาฆ่าแมลง สารเคมีสังเคราะห์ที่มีโครงสร้างอะโรมาติกที่ซับซ้อน รวมทั้งสีย้อมสังเคราะห์ได้อีกด้วย ทำให้เหมาะสำหรับใช้เพื่อจุดประสงค์ทางชีวภาพ และนำไปประยุกต์ใช้ในกระบวนการบำบัดทางชีวภาพ ยกตัวอย่างเช่น การกำจัดสีย้อมสังเคราะห์ และการกำจัดสารมลพิษ เป็นต้น^(35, 37)



ภาพประกอบ 5 องค์ประกอบของผนังเซลล์พืชที่ประกอบด้วยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน

ที่มา: Bamdad H, Hawboldt K, MacQuarrie S. A review on common adsorbents for acid gases removal: focus on biochar. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2018;81:1705-20.⁽³⁸⁾



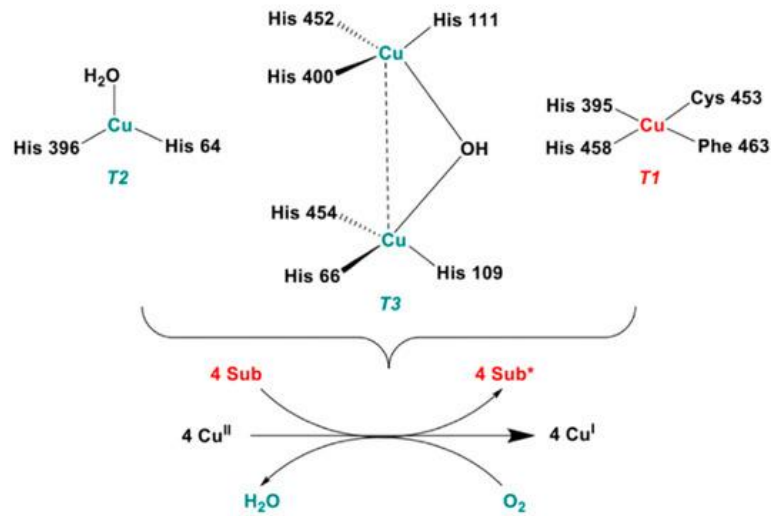
ภาพประกอบ 6 ตัวอย่างของราไทรอท (A) *Trametes hirsuta* (B) *Trametes versicolor* (C) *Pleurotus ostreatus* (D) *Bjerkandera adusta* (E) *Ganoderma applanatum* และ (F) *Microporus xanthopus*

ที่มา : (a) Jerzy Opiola. (2011) Retrieved October 28, 2021 from https://en.wikipedia.org/wiki/Trametes_hirsuta#/media/File:Trameteshirsuta_BS14.2.jpg.⁽³⁹⁾ (b) Jerzy Opiola. (2011) Retrieved October 28, 2021 from https://en.wikipedia.org/wiki/Trametes_hirsuta#/media/File:Trameteshirsuta_BS14.2.jpg.⁽³⁹⁾ (c) Tom Romeo. (2020) Retrieved October 28, 2021 from https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pleurotus_ostreatus_94246379.jpg.⁽⁴⁰⁾ (d) James Lindsey. (2005) Retrieved October 28, 2021 from <https://en.wikipedia.org/wiki/File:Bjerkandera.adusta.-.lindsey.jpg>.⁽⁴¹⁾ (e) Selso. (2012) Retrieved October 28, 2021 from https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Ganoderma_applanatum_G2.jpg.⁽⁴²⁾ (f) JMK. (2014) Retrieved October 28, 2021 from https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Microporus_xanthopus,_Krantzkloof_Natuurreservaat,_b.jpg.⁽⁴³⁾

เอนไซม์กลุ่มลิกนินโอไลติก เป็นเอนไซม์ที่ราไทรอทผลิตแล้วปล่อยออกมานอกเซลล์ (extracellular enzyme) เพื่อเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับสารตั้งต้นที่หลากหลาย โดยทั่วไปราไทรอทสามารถผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโอไลติกเหล่านี้ได้อย่างน้อยหนึ่งชนิด⁽²⁵⁾

5.1 เอนไซม์แลคเคส

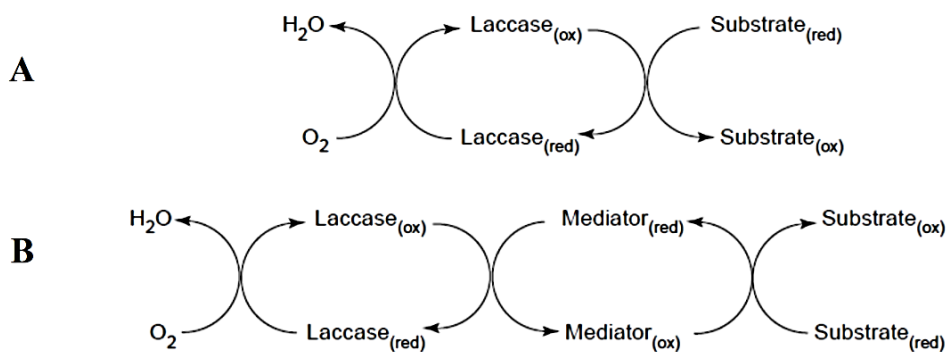
แลคเคส (laccases: E.C. 1.10.3.2) หรือที่รู้จักในชื่อพอลิฟีนอลออกซิเดส (polyphenol oxidase) เป็นเอนไซม์ในกลุ่มออกซิเดส (blue multicopper oxidase) สามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด ได้แก่ พืช แบคทีเรีย แมลง และเชื้อรา โดยโมเลกุลของแลคเคส ประกอบด้วยอะตอมของทองแดง (copper, Cu^{2+}) 4 อะตอมที่บริเวณแอคทีฟไซต์ (active site) กระจายอยู่ใน 3 บริเวณ ได้แก่ บริเวณ type-1 (T1) 1 อะตอม type-2 (T2) 1 อะตอม และ type-3 (T3) 2 อะตอม เพื่อเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารตั้งต้นที่หลากหลาย รวมถึงสารประกอบฟีนอล (phenolic compounds) และไม่ใช่สารประกอบฟีนอล (nonphenolic compounds)⁽⁴⁴⁻⁴⁶⁾ กระบวนการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์แลคเคสสามารถแบ่งได้เป็นสองประเภท คือ การออกซิเดชันโดยตรง (direct oxidation) และการออกซิเดชันโดยอาศัยสารตัวกลาง (in-direct oxidation) การออกซิเดชันโดยตรงสารตั้งต้นจะสามารถเข้าถึงบริเวณแอคทีฟไซต์ของเอนไซม์ได้ง่าย (ภาพประกอบ 7) เอนไซม์แลคเคสจะไปรับอิเล็กตรอน 4 ตัว ($4e^-$) จากสารตั้งต้น (reducing substrate) 4 โมเลกุล จากนั้นให้อิเล็กตรอน 4 ตัว กับโมเลกุลของออกซิเจนเกิดเป็นน้ำ 2 โมเลกุล โดยการเร่งปฏิกิริยาเริ่มจากอะตอมของทองแดง (Cu^{2+}) ที่บริเวณ T1 จะรับอิเล็กตรอนจากสารตั้งต้น ทำให้ Cu^{2+} เปลี่ยนเป็น Cu^+ ซึ่งเป็นตัวรับอิเล็กตรอนปฐมภูมิ (primary electron acceptor) จากนั้นอิเล็กตรอนที่ได้รับมาจากสารตั้งต้นจะถูกส่งต่อไปยังบริเวณ T2 และ T3 ทำให้เอนไซม์อยู่ในสถานะที่มีอิเล็กตรอนเกิน (fully oxidized) เมื่อมีอิเล็กตรอนเกินจึงจำเป็นต้องมีการถ่ายอิเล็กตรอน 2 ตัวจาก Cu ที่บริเวณ T3 ไปยังตัวรับอิเล็กตรอนก็คือออกซิเจน (O_2) ทำให้ได้น้ำ 2 โมเลกุลจากการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ และแลคเคสจะกลับสู่สภาวะเสถียรดังเดิม⁽⁴⁷⁾ (ภาพประกอบ 7) ส่วนสารตั้งต้นที่ถูกออกซิไดซ์จะเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์อย่างต่อเนื่องเพราะไม่เสถียร ทำให้โครงสร้างเกิดการสลายได้ โดยในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์แลคเคส 1 รอบจะสามารถย่อยสลายสารตั้งต้นได้ 4 โมเลกุล และเกิดน้ำ 2 โมเลกุล



ภาพประกอบ 7 กระจบวนกรเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์แลคเคส

ที่มา: Bassanini I, Ferrandi EE, Riva S, Monti D. Biocatalysis with laccases: an updated overview. *Catalysts*. 2020;11(1):26.⁽⁴⁸⁾

ส่วนการออกซิเดชันโดยอาศัยสารตัวกลาง สารตั้งต้นบางชนิดไม่สามารถถูกออกซิไดซ์โดยตรงด้วยเอนไซม์ เนื่องจากโครงสร้างของสารตั้งต้นมีขนาดใหญ่ จึงต้องอาศัยสารเคมีตัวกลาง (chemical mediator) ในการเกิดปฏิกิริยา ซึ่งเป็นกระบวนการสองขั้นตอน คือ เอนไซม์แลคเคสจะเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันกับสารตัวกลาง ทำให้สารตัวกลางมีความสามารถในการออกซิไดซ์ (oxidized mediator) จึงสามารถไปออกซิไดซ์กับสารตั้งต้นได้ (ภาพประกอบ 8)⁽⁴⁶⁾

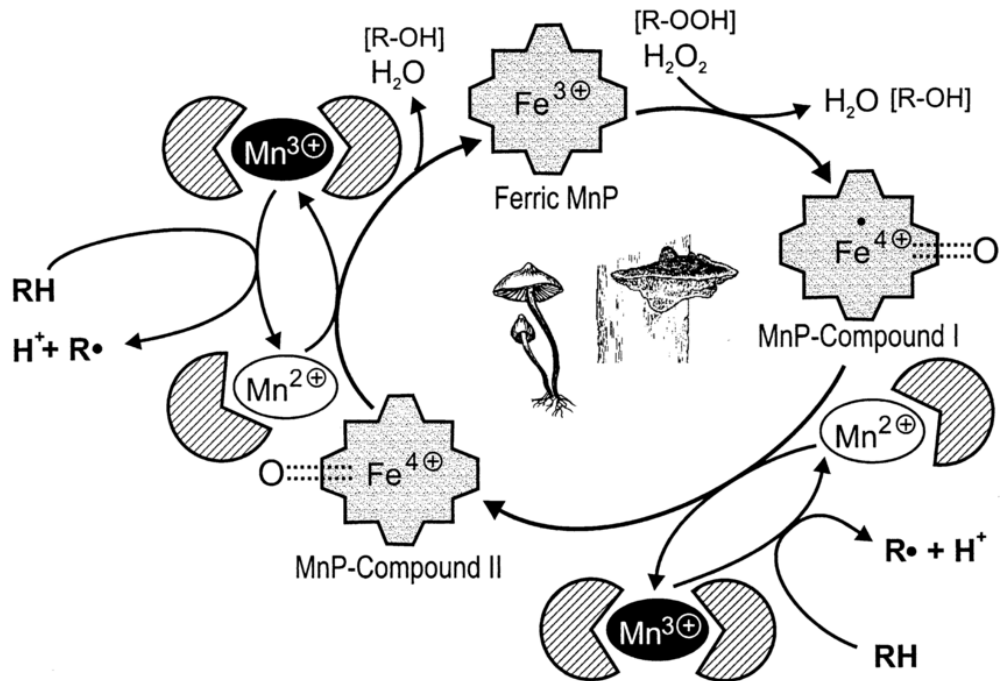


ภาพประกอบ 8 แผนภาพแสดงการเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ในการย่อยสลายสารตั้งต้นของเอนไซม์แลคเคส (A) การย่อยสารตั้งต้นโดยตรง (B) การย่อยสารตั้งต้นโดยผ่านสารตัวกลาง

ที่มา : Wang X, Liu J, Qu R, Wang Z, Huang Q. The laccase-like reactivity of manganese oxide nanomaterials for pollutant conversion: rate analysis and cyclic voltammetry. Scientific Reports. 2017;7(1):7756.⁽⁴⁹⁾

5.2 เอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส

แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (MnP: EC 1.11.1.13) เป็นไกลโคโปรตีนที่มี heme จัดอยู่ในกลุ่มออกซิโดเรดักเตส (oxidoreductase) สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยอาศัยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) และ Mn^{2+} ช่วยในการเร่งปฏิกิริยา ทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับสารประกอบต่าง ๆ⁽⁵⁰⁾ โดยกระบวนการเร่งปฏิกิริยาเริ่มจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไปจับกับบริเวณแอกทีฟไซต์ของเอนไซม์ที่มีอะตอมของเหล็ก Fe^{3+} จากนั้นจะเกิดการสร้างพันธะกับอะตอมของ O^{2-} แล้วปลดปล่อยโมเลกุลของน้ำ (H_2O) 1 โมเลกุล และเกิดโครงสร้างของสารประกอบ MnP compound I (หรือ Fe^{4+} -oxo-porphyrin-radical complex) จากนั้น MnP compound I จะไปออกซิไดซ์ Mn^{2+} เปลี่ยนเป็น Mn^{3+} แล้วเกิดสารประกอบ MnP compound II (Fe^{4+} -oxo-porphyrin complex) ต่อมาสารประกอบ MnP compound II จะไปออกซิไดซ์ Mn^{2+} อีกครั้งเพื่อสร้าง Mn^{3+} แล้วปลดปล่อยโมเลกุลของน้ำอีก 1 โมเลกุล ส่วนเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสก็จะกลับสู่สภาวะเสถียรตามเดิมซึ่งทำให้กระบวนการเร่งปฏิกิริยาเสร็จสิ้น (ภาพประกอบ 9)^(51, 52) โดย Mn^{3+} สามารถไปรวมกับกรดอินทรีย์ เช่น ออกซาเลต (oxalate) มาโลเนต (malonate) และแลคเตต (lactate) ได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อน Mn^{3+} -organic acid complex ที่มีคุณสมบัติเป็นตัวออกซิไดซ์ สามารถไปออกซิไดซ์สารประกอบอะโรมาติก รวมถึงลิกนิน สีย้อมในอุตสาหกรรม และสารปนเปื้อนอินทรีย์อื่น ๆ ได้⁽⁵³⁾



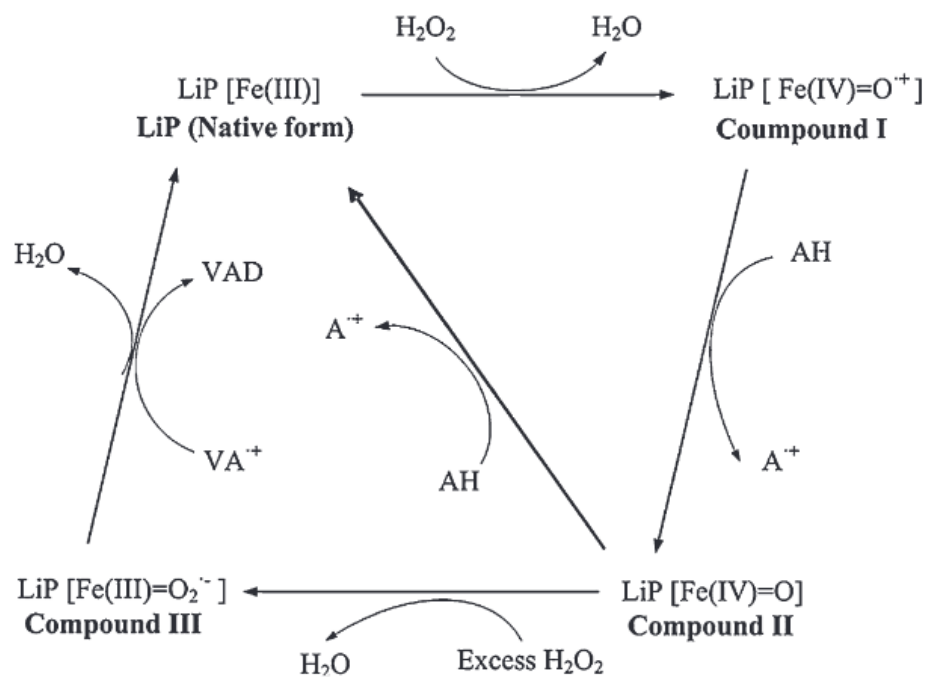
ภาพประกอบ 9 กระบวนการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส

ที่มา: Hofrichter M. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP).
Enzyme and Microbial Technology. 2002;30(4):454-66.⁽⁵²⁾

5.3 เอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส

ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (LiP: EC 1.11.1.14) เป็นเอนไซม์ที่มี heme จัดอยู่ในกลุ่มออกซิโดเรดักเตส (oxidoreductase) ซึ่งจะเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน ย่อยสลายลิกนิน และอนุพันธ์ของลิกนิน โดยอาศัยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ช่วยในการเร่งปฏิกิริยา (ภาพประกอบ 10) โดยเริ่มจากเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (LiP native form) ถูกออกซิไดซ์โดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้เป็นสาร LiP compound I ที่สูญเสียอิเล็กตรอน 2 ตัว และน้ำ 1 โมเลกุล ต่อมาสาร LiP compound I จะไปออกซิไดซ์สารตั้งต้น (electron-donor substrate, AH) และรับอิเล็กตรอน 1 ตัวจากสารตั้งต้น ได้เป็นสาร LiP compound II และสารตั้งต้นที่สูญเสียอิเล็กตรอน 1 ตัว (cation radical, A⁺) จากนั้นสาร LiP compound II สามารถไปออกซิไดซ์และรับอิเล็กตรอนจากสารตั้งต้นอีก 1 โมเลกุล ทำให้กลับสู่สภาวะเดิมที่เสถียร (LiP native form) แต่ในสภาวะที่มี H₂O₂ มากเกินไป สาร LiP compound II จะถูกรีดิวซ์ด้วยสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ได้เป็น LiP compound III ซึ่งเป็นรูปแบบของเอนไซม์ที่ไม่ไวในการเกิดปฏิกิริยา (inactive) แต่สาร veratryl alcohol (VA) มีบทบาทสำคัญในการเปลี่ยนรูปแบบของเอนไซม์ที่ไม่ไวในการเกิดปฏิกิริยา กลับสู่

สภาวะเดิมที่เสถียร โดย VA ที่ถูกออกซิไดซ์แล้วอยู่ในรูป VA^+ สามารถไปรีดิวซ์สาร LiP compound III ทำให้เปลี่ยนกลับไปเป็นสภาวะเดิมที่เสถียร (LiP native form)⁽³⁵⁾



ภาพประกอบ 10 กระบวนการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส

ที่มา: Wan C, Li Y. Solid-state biological pretreatment of lignocellulosic biomass. Green Biomass Pretreatment for Biofuels Production. SpringerBriefs in Molecular Science. 2013. p. 67-86.⁽⁵⁴⁾

เนื่องจากเอนไซม์กลุ่มลิกนินโอไลติก เป็นเอนไซม์ที่ไม่จำเพาะต่อชนิดของสารตั้งต้น สามารถย่อยสลายได้ทั้งสารประกอบพีนอล และไม่ใช้สารประกอบพีนอล ดังนั้นจึงมีการศึกษาจำนวนมากที่นำเอนไซม์กลุ่มลิกนินโอไลติกที่ผลิตโดยราไวท์รอกทไปประยุกต์ใช้ในงานด้านต่าง ๆ ได้แก่ การผลิตเชื้อกระดาษ การผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ การลดความเป็นพิษของน้ำเสีย การสังเคราะห์สารอินทรีย์ อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมยา และเครื่องสำอาง การปรับสภาพ (pretreatment) วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร รวมไปถึงการนำไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดทางชีวภาพของสารที่เป็นมลพิษ เช่น สีย้อมสังเคราะห์ เป็นต้น

5.4 การประยุกต์ใช้ราไวท์รอตและเอนไซม์กลุ่มลิกนินในไลติกในการกำจัดสีย้อมสังเคราะห์

เนื่องจากคุณสมบัติเฉพาะของราไวท์รอตที่กล่าวมาข้างต้นทำให้มีงานวิจัยทั้งในอดีตและปัจจุบันที่สนใจนำราไวท์รอตมาประยุกต์ใช้ในการกำจัดสีย้อมที่มีโครงสร้างซับซ้อน ย่อยสลายได้ยากในธรรมชาติ และมีความเป็นพิษสูง โดยวิธีการประยุกต์ใช้อาจใช้ตัวเซลล์โดยตรงที่มีชีวิตหรือใช้เอนไซม์ที่ราผลิต ตัวอย่างงานวิจัยในปี 2012 รา *Trametes versicolor* U97 ได้ถูกนำมาใช้ในการลดสีย้อมสังเคราะห์ Remazol Brilliant Blue R ที่ความเข้มข้น 100 ppm พบว่ามีประสิทธิภาพลดสีได้ถึง 85% ภายในเวลา 6 ชั่วโมง⁽⁵⁵⁾ ต่อมาในปี 2016 Asgher และคณะ ใช้รา *T. versicolor* IBL-04 มาลดสีย้อมสังเคราะห์ Remazol Brilliant Yellow 3-GL พบว่าลดสีได้อย่างสมบูรณ์ภายในเวลา 2 วัน⁽⁵⁶⁾ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Dayi และคณะ ในปี 2018 นำรา *T. versicolor* มาใช้ในการลดสีย้อมสังเคราะห์ Reactive Blue 220 และ Methyl Red ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าลดได้ 80 และ 91% ตามลำดับ⁽⁵⁷⁾ ยังมีการนำราสายพันธุ์อื่น ๆ มาใช้ ได้แก่ รา *Genoderma* sp. ที่นำมาใช้ลดสีย้อม Remazol Black 5 และ Reactive Blue 19 พบว่าลดสีได้ 89 และ 95% ตามลำดับ^(58, 59) ตัวอย่างงานวิจัยที่เกี่ยวข้องอื่น ๆ แสดงในตาราง 2

นอกจากการใช้ตัวราไวท์รอตที่มีชีวิตมาใช้ในการลดสีย้อมสังเคราะห์แล้ว ยังมีหลายงานวิจัยที่ใช้เอนไซม์ที่ผลิตจากรามาประยุกต์ใช้ในการลดสีย้อมสังเคราะห์ ตัวอย่างงานวิจัยของ Othman และคณะในปี 2018 ได้นำรา *Agaricus bisporus* CU13 มาผลิตเอนไซม์แลคเคสแล้วนำเอนไซม์ไปใช้ในการลดสีสังเคราะห์ Acid Blue พบว่าสามารถลดสีได้ในช่วง 19-25% ที่ความเข้มข้น 50-300 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายในเวลา 30 นาที⁽⁴⁵⁾ รวมถึงงานวิจัยในปี 2016 ที่ใช้เอนไซม์แลคเคสจากรา *T. troglia* มาใช้ลดสีย้อมสังเคราะห์ Reactive Black 5, Remazol Brilliant Blue R และ Reactive Violet 5⁽⁶⁰⁾ ต่อมางานวิจัยในปี 2018 รายงานว่าเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสที่ผลิตจากรา *Cerrena unicolor* BBP6 มีประสิทธิภาพในการลดสีสังเคราะห์ Remazol Brilliant Blue R ได้ 81% ภายในเวลา 5 ชั่วโมง ลดสี Congo Red, Methyl Orange, Bromophenol Blue และ Crystal Violet ได้ 53.9, 77.6, 62.2 และ 80.9% ภายในเวลา 12 ชั่วโมง ตามลำดับ และลดสี Azure Blue ได้ 63.1% ภายในเวลา 24 ชั่วโมง⁽⁶¹⁾ งานวิจัยในปี 2014 ผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสจากรา *Irpex lacteus* มาใช้ในการลดสีย้อม Remazol Brilliant Violet 5R, Remazol Brilliant Blue R, Indigo Carmine และ Direct Red 5B ความเข้มข้น 50% (v/v) มีประสิทธิภาพในการลดสีเท่ากับ 25-88% ภายในเวลา 72 ชั่วโมง⁽⁵⁰⁾ และงานวิจัยของ Sosa-Martínez และคณะ

ใช้เอนไซม์สกัดหยาบ (crude enzyme) มาลดสี Congo Red, Poly R-478 และ Methyl Green พบว่าสามารถลดสีได้ 42, 57 และ 70% ตามลำดับ⁽⁶²⁾

งานวิจัยในปัจจุบันได้มีการนำเทคโนโลยีการตรึงเซลล์บนวัสดุมาใช้ในการลดสี เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของราไวท์รอก ลดระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงรา และสามารถใช้งานราที่ตรึงบนวัสดุได้ซ้ำหลายครั้งเป็นต้น

ตาราง 2 ตัวอย่างงานวิจัยที่เกี่ยวข้องในการใช้ราไวท์รอกและเอนไซม์กลุ่มลิกนินโกลติกในการบำบัดสีย้อม

ราไวท์รอก	เอนไซม์	สีย้อมสังเคราะห์	อ้างอิง
<i>Agaricus bisporus</i> CU13	Laccase	Acid Blue	Othman et al. 2018 (45)
<i>Bjerkandera adusta</i> Dec 1	MnP	Amaranth	Gomi et al. 2011 ⁽⁶³⁾
<i>B. adusta</i> SWUSI4	-	Cotton Blue, Crystal Violet, Malachite Green และ Methyl Violet	Gao et al. 2020 ⁽⁶⁴⁾
<i>Cerrena unicolor</i> BBP6	MnP	Congo Red, Methyl Orange, Remazol Brilliant Blue R, Azure Blue, Bromophenol Blue และ Crystal Violet	Zhang et al. 2018 ⁽⁶¹⁾
<i>C. versicolour</i>	-	Orange 7	Hai et al. 2013 ⁽⁶⁵⁾
<i>Cerrena</i> sp. WICC F39	-	Methylene Blue และ Reactive Black 5	Hanapi et al. 2018 (66)
<i>Genoderma</i> sp.	-	Remazol Black 5 และ Reactive Blue 19	Sudiana et al. 2018, Fazli et al. 2010 ^(58, 59)
<i>Genoderma</i> sp. WR-1	LiP	Cibacron Brilliant Red 3B-A, Amaranth, Reactive Orange 16, Remazol Brilliant Blue R, Acid Red 106 และ Orange II	Revankar et al. 2007 (9)

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ราไวก์รอก	เอนไซม์	สีย้อมสังเคราะห์	อ้างอิง
<i>Irpex lacteus</i> CD2	MnP	Remazol Brilliant Violet 5R, Remazol Brilliant Blue R, Indigo Carmine และ Direct Red 5B	Qin et al. 2014 ⁽⁵⁰⁾
<i>Marasmius</i> sp. BBKAV79	-	Diazo Reactive dye (Green HE4BD)	Vantamuri et al. 2020 ⁽⁶⁷⁾
<i>Pleurotus ostreatus</i>	LiP	Disperse Orange 3, และ Disperse Yellow 3	Zhao et al. 2006, 2007 ^(68, 69)
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> CDBB 686	Crude enzyme	Congo Red, Poly R-478 และ Methyl Green	Sosa-Martínez et al. 2020 ⁽⁶²⁾
<i>Trametes ljubarkyi</i>	Laccase	Reactive Violet 5	Goh et al. 2017 ⁽⁷⁰⁾
<i>T. pubescens</i> I8	MnP	Remazol Brilliant Violet 5R, Remazol Brilliant Blue R, Cibacet Brilliant Blue BG, Direct Red 5B, Indigo Carmine, Poly R-478, Methyl Green และ Acid Blue 158	Rekik et al. 2018 ⁽⁷¹⁾
<i>Trametes</i> sp. F1635	Laccase	Eriochrome Black T, Evans Blue, Methyl Orange, Bromothymol Blue, Fuchsin Basic, Malachite Green, Remazol Brilliant Blue R และ Methylene Blue	Wang et al. 2018 ⁽⁷²⁾
<i>T. trogii</i>	Laccase	Reactive Black 5, Remazol Brilliant Blue R และ Reactive Violet 5	Sayahi et al. 2016 ⁽⁶⁰⁾

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ราไวท์รอก	เอนไซม์	สีย้อมสังเคราะห์	อ้างอิง
<i>T. versicolor</i>	-	Reactive Blue 220 และ Methyl Red	Dayi et al. 2018 (57)
<i>T. versicolor</i> IBL-04	-	Remazol Brilliant Yellow 3-GL	Asgher et al. 2016 ⁽⁵⁶⁾
<i>T. versicolor</i> U97	-	Remazol Brilliant Blue R	Sari et al. 2012 (55)

หมายเหตุ: Laccase = เอนไซม์แลคเคส, MnP = เอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส, LiP = เอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส

5.5. การศึกษาขนาดและน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์กลุ่มลิกนินโกลติก

การศึกษาขนาดและน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์กลุ่มลิกนินโกลติกสามารถทำได้โดยนำตัวอย่างเอนไซม์มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) โดยตัวกลางที่ใช้แยกโปรตีนเป็นการเชื่อมต่อกันของ acrylamide monomer จนเป็นสายโซ่ยาวประกอบกันเป็นแผ่นเจล โดยมี TEMED เป็นตัวเร่งการเกิดโครงสร้างตาข่ายของเจล ส่วนโปรตีนหรือเอนไซม์จะผสมอยู่ในบัฟเฟอร์ที่เป็นด่าง ประกอบด้วยสาร sodium dodecyl sulfate (SDS) ที่เป็นดีเทอร์เจนต์ (detergent) โดย SDS และ β -mercaptoethanol มีคุณสมบัติเป็น reducing agent เพื่อทำลายพันธะ disulfide ของโปรตีน และโปรตีนที่จับกับ SDS จะมีประจุลบ เมื่อให้กระแสไฟฟ้า โมเลกุลของโปรตีนที่มีประจุลบจะเคลื่อนที่เข้าหาขั้วบวก ซึ่งอัตราการเคลื่อนที่ของโปรตีนขึ้นอยู่กับน้ำหนักโมเลกุลและขนาดของรูพรุนของเจล โมเลกุลขนาดใหญ่เคลื่อนที่ช้ากว่าโมเลกุลขนาดเล็ก จากนั้นนำเจลไปย้อมสีด้วยคูแมสซี บรีลเลียนท์ บลู (Coomassie Brilliant Blue) หรือสารซิลเวอร์ไนเตรท (silver nitrate) เป็นต้น แล้วเทียบน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนกับโปรตีนมาตรฐาน⁽⁷³⁾

มีหลายงานวิจัยที่วิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ที่มีบทบาทในการลดสีย้อมสังเคราะห์ ยกตัวอย่างงานวิจัยในปี 2014 ผู้วิจัยทำบริสุทธิ์เอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสจากรา *Irpex lacteus* ที่มีบทบาทในการลดสีย้อม Remazol Brilliant Violet 5R, Direct Red 5B, Remazol Brilliant Blue R, Indigo Carmine และ Methyl Green แล้ววิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่าเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสจากรา *Irpex*

lacteus CD2 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 42 kDa⁽⁵⁰⁾ และงานวิจัยในปี 2016 ศึกษาการทำบริสุทธิ์ เอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสจากรา *Trametes versicolor* IBL-04 จากนั้นวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์พบว่าเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสจากรา *T. versicolor* IBL-04 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 43 kDa⁽⁵⁶⁾ นอกจากนี้ยังมีอีกหลายงานวิจัยที่รายงานถึงน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 38-53 kDa (*Ganoderma lucidum*; 38 และ 43 kDa, *Agrocybe praecox*; 42 kDa, *Cerrena unicolor*; 45 kDa, *Fomes sclerodermeus*; 47 kDa และ *Phanerochaete chrysosporium*; 53 kDa)^(74, 75) งานวิจัยในปี 2005 ได้มีการศึกษาขนาดของเอนไซม์แลคเคสจากรา *T. versicolor* พบว่ามีขนาดเท่ากับ 97 kDa⁽⁷⁶⁾ รวมถึงงานวิจัยของ Wang และคณะ ในปี 2018 ที่ศึกษาเอนไซม์แลคเคสจากรา *Trametes* sp. F1635 ที่มีบทบาทในการลดสี Eriochrome Black T, Evans Blue, Methyl Orange, Bromothymol Blue, Fuchsin basic, Malachite Green, Remazol Brilliant Blue R และ Methylene Blue พบว่าเอนไซม์แลคเคสจากรา *Trametes* sp. F1635 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 65 kDa⁽⁷²⁾ ซึ่งคล้ายกับงานวิจัยของ Schalchli และคณะ ที่พบว่าเอนไซม์แลคเคสจากรา *T. hirsuta* Ru-513 มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 56 และ 67 kDa⁽⁷⁷⁾ ส่วนการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส ตัวอย่างงานวิจัยของ Farrell และคณะ ที่พบว่าเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส จากรา *P. chrysosporium* มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 38 และ 43 kDa⁽⁷⁸⁾ สอดคล้องกับงานวิจัยในปี 2020 พบว่าเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส จากรา *P. chrysosporium* CDBB 686 มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 46 kDa⁽⁷⁹⁾

6. การตรึงเซลล์ (cell immobilisation)

การตรึงเซลล์ หมายถึง การจำกัดขอบเขตของเซลล์ แต่เซลล์ยังคงความสามารถในการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เป็นเทคนิคที่ทำได้ไม่ยาก และมีข้อดีกว่าการใช้เซลล์อิสระ (free cell) ที่สำคัญสามารถนำเซลล์กลับมาใช้ซ้ำ และต่อเนื่องได้ นอกจากนี้การตรึงเซลล์ยังช่วยรักษาความหนาแน่นของเซลล์ให้มีปริมาณสูงในระหว่างกระบวนการ ส่งผลทำให้ลดต้นทุนของกระบวนการทางชีวภาพ ซึ่งเซลล์ที่ถูกตรึงมักจะทนทานต่อแรงเฉือนมากกว่าเซลล์อิสระ เนื่องจากมีวัสดุพุงที่ปกป้องตัวเซลล์ เทคนิคที่ใช้ในการตรึงเซลล์ ได้แก่ การยึดเกาะหรือการดูดซับทางกายภาพ (physical adsorption) การกักขัง (entrapment) และการห่อหุ้ม (encapsulation) เป็นต้น⁽⁸⁰⁾

6.1 การยึดเกาะหรือการดูดซับทางกายภาพ (adsorption)

เป็นการตรึงเซลล์บนตัวพาที่เป็นของแข็งอาศัยกระบวนการดูดซับทางกายภาพ ด้วยแรงอ่อน ๆ เช่น แรงแวนเดอร์วาลส์ แรงดึงดูดระหว่างขั้ว (dipole-dipole forces) แรงดึงดูด

ระหว่างโมเลกุลที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic interactions) และพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bonds) เป็นต้น⁽⁸¹⁾ ตัวอย่างของวัสดุพองที่ใช้ในการตรึงประเภทนี้ ได้แก่ เรซิน โฟมโพลียูรีเทน ฟองน้ำไนลอน สแตนเลส ถ่านกัมมันต์ ซิลิกาเจล ดินเหนียว อะลูมิเนียมออกไซด์ ไททาเนียม เซรามิก ซีโอไลต์ หรือแก้วที่มีรูพรุน รวมถึงวัสดุธรรมชาติ เช่น ฟางข้าวสาลี ชี้อ้อย เศษไม้ ไม้สน และ ไบโอบบ เป็นต้น⁽⁸²⁾ แต่อย่างไรก็ตามแม้ว่าการใช้วัสดุทางธรรมชาติสำหรับตรึงเซลล์จะเป็นวิธีที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม แต่อาจทำให้เกิดปัญหาการเสื่อมสภาพของวัสดุตรึง เนื่องจากสามารถเกิดการย่อยสลายจากเอนไซม์ที่จุลินทรีย์ผลิต ทำให้เกิดปัญหาการอุดตันในระบบได้

การดูดซับทางกายภาพเป็นหนึ่งในเทคนิคที่ง่ายที่สุดที่ใช้สำหรับการตรึงในระดับอุตสาหกรรม รวมถึงเป็นเทคนิคที่มีต้นทุนต่ำ และยังคงกิจกรรมการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาสูง จึงมีความนิยมใช้มากกว่าวิธีอื่น ๆ นอกจากนี้ยังสามารถนำเอาวัสดุพองกลับมาใช้ใหม่ได้ ทำให้เกิดความได้เปรียบทางเศรษฐกิจสำหรับการผลิตภาคอุตสาหกรรม ในทางกลับกันแม้ว่าวิธีการนี้จะมีข้อดีหลายประการ แต่ก็มีข้อเสียมากมาย เช่น เทคนิคการดูดซับเซลล์จะใช้สำหรับงานในช่วงเวลาสั้น ๆ เนื่องจากแรงที่อ่อนระหว่างวัสดุพองกับตัวเซลล์หรือตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ การยึดเกาะไม่เสถียรจึงทำให้มีอัตราการรั่วไหลที่สูงในระหว่างการใช้งานหรือขั้นตอนการล้าง รวมถึงมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อม เช่น ค่า pH อุณหภูมิ และความแรงของไอออนิก เป็นต้น^(80, 81, 83, 84)

6.2 การกักขัง (entrapment)

เป็นวิธีการตรึงที่ไม่สามารถผันกลับได้ โดยการตรึงเซลล์ประเภทนี้เซลล์จะถูกกักขังอยู่ภายในเมทริกซ์ แต่สารอาหารและสารเมแทบอลิท์ยังสามารถผ่านเข้าและออกจากเมทริกซ์ได้ สำหรับการตรึงเซลล์ด้วยวิธีการกักขังมีการใช้เมทริกซ์ที่หลากหลาย เช่น เจลโพลีเมอร์จากธรรมชาติ ได้แก่ วุ้น คาราจีแนน อัลจิเนต ไคโตซาน และอนุพันธ์เซลลูโลส รวมถึงโพลีเมอร์ที่สังเคราะห์ขึ้นมา เช่น โพลีอะคริลาไมด์ โพลียูรีเทน และโพลีไวนิล เป็นต้น⁽⁸³⁾ ในปัจจุบันวิธีการกักขังในเจลโพลีเมอร์จากธรรมชาติ กลายเป็นวิธีที่นิยมมากขึ้นสำหรับการตรึงเซลล์เนื่องจากปัญหาความเป็นพิษที่เกี่ยวข้องกับวัสดุโพลีเมอร์สังเคราะห์ อย่างไรก็ตามการใช้โพลีเมอร์จากธรรมชาตินั้นมักถูกจำกัดด้วยความแข็งแรง และการขาดพื้นที่สำหรับการเจริญเติบโตของเซลล์ที่แตกที่ฟ ส่งผลให้เกิดการแตกของเจล และปล่อยเซลล์ภายในออกสู่อาหารเลี้ยงเชื้อ นอกจากนี้ประสิทธิภาพของโพลีเมอร์จากธรรมชาติยังมีข้อจำกัดในการแพร่กระจาย และเจลอัลจินตมักไม่เสถียรเมื่อสัมผัสกับสารเคเลตต่าง ๆ เช่น ฟอสเฟต และซิเตรต ที่มักใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ^(81, 83)

6.3 การห่อหุ้ม (encapsulation)

เป็นวิธีการที่ซึ่งไม่สามารถผันกลับได้ คล้ายกับวิธีการกักขัง ในกระบวนการนี้เซลล์จะถูกจำกัดโดยผนังเมมเบรน โดยปกติจะอยู่ในรูปของแคปซูล แต่จะสามารถปล่อยได้อย่างอิสระภายในแคปซูล สารตั้งต้นและสารอาหารสามารถซึมผ่านเข้าและออกจากเมมเบรนได้อย่างอิสระ โดยวิธีการห่อหุ้มขนาดรูพรุนของเมมเบรนต้องมีความเหมาะสมต่อเซลล์ ดังนั้นจึงสามารถป้องกันเซลล์หรือตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพอื่น ๆ ได้ เนื่องจากวิธีการที่ซึ่งส่วนใหญ่ จะป้องกันการรั่วไหลออกของเซลล์หรือตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพด้านในเท่านั้น จึงส่งผลทำให้ประสิทธิภาพของกระบวนการเพิ่มขึ้น โดยวิธีการห่อหุ้มเหมาะสำหรับจุลินทรีย์ เซลล์ที่มีชีวิต และระบบเอนไซม์ที่มีหลายชนิด เนื่องจากตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพหลายชนิดสามารถถูกรวมเข้าในแคปซูลได้ หากไม่มีผลกระทบเชิงลบต่อกันและกัน อย่างไรก็ตามวิธีนี้จำเป็นที่จะต้องมีการควบคุมขนาดรูพรุน ยิ่งไปกว่านั้นเทคนิคนี้ไม่สามารถใช้ได้กับตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ หรือเซลล์ที่มีขนาดใกล้เคียงกับสารตั้งต้นที่จะทำปฏิกิริยา เนื่องจากจะส่งผลให้เกิดการรั่วไหลของทั้งสอง เมื่อมีขนาดเล็กกว่ารูพรุนของเมมเบรน หรือแคปซูลแตก เมื่อทั้งเซลล์และสารตั้งต้นถูกกักอยู่ในเมมเบรน โพลีเมอร์ที่ใช้สำหรับการห่อหุ้ม ได้แก่ กรดแอลจินิก (แอลจินต) ไคโตซาน มอลโทเดกซ์ทริน และ เซลลูโลส เป็นต้น⁽⁸¹⁾

ในปัจจุบันมีแนวโน้มในการนำเซลล์ตรึงมาใช้บำบัดสีย้อมเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากการบำบัดสีย้อมด้วยเซลล์อิสระทำให้เซลล์ราได้รับผลกระทบต่อความเครียดจากสิ่งแวดล้อมมากกว่าเซลล์ตรึง ดังนั้น การตรึงเซลล์ราจึงช่วยปกป้องจากความเครียดของสิ่งแวดล้อม เช่น ในสภาวะที่มีสารพิษความเข้มข้นสูงมีรายงานว่า การตรึงเซลล์ราสามารถช่วยรักษาระดับการผลิตเอนไซม์ต่าง ๆ ให้อยู่ในระดับที่สูงกว่าเซลล์ราในรูปแบบแขวนลอยหรือเป็น pellet รวมไปถึงการตรึงเซลล์รายังช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการลดสีสังเคราะห์ได้ เนื่องจากเส้นใยมีความหนาแน่นน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับชีวมวลจากเซลล์ราอิสระ เป็นการเพิ่มการเข้าถึงของเอนไซม์กับสีย้อม และเซลล์ราจะมีพื้นที่ผิวที่ใหญ่ขึ้นสำหรับการดูดซับสีย้อมได้มากขึ้น นอกจากนี้การตรึงยังสามารถใช้ซ้ำได้ และสามารถแยกเซลล์ตรึงออกจากสีย้อมได้ง่ายขึ้น ซึ่งจะช่วยลดปัญหาการอุดตันได้⁽⁸²⁾ งานวิจัยที่มีการใช้ราตรึงในการบำบัดสีย้อมดังแสดงในตาราง 3 ตัวอย่างงานวิจัยของ Przystas และคณะ ใช้รา *Pleurotus ostreatus* BWPH, *Gleophyllum odoratum* DCa และ *Polyporus picipes* RWP17 มาตรึงบนวงแหวนโลหะแล้วนำมาลดสีสังเคราะห์ Evans Blue พบว่าสามารถลดสีได้อย่างสมบูรณ์ภายใน 24 ชั่วโมง⁽¹³⁾ ต่อมางานวิจัยของ Rodriguez-Couto และคณะ ในปี 2004 นำรา *Trametes hirsuta* มาตรึงร่วมกับ stainless steel sponge ในถัง bioreactor แล้วนำมาลดสี

สังเคราะห์ Indigo Carmine และ Lanset Marine พบว่าสามารถลดสี Indigo Carmine ได้อย่างสมบูรณ์ภายในเวลา 3 วัน และลดสี Lanset Marine ได้ 82% ภายในเวลา 15 ชั่วโมง⁽⁸⁵⁾ และงานวิจัยในปี 2006 ของ Rodriguez-Couto และคณะ ใช้รา *T. hirsuta* BT2566 มาตรึงร่วมกับเปลือกส้ม แล้วนำมาลดสีสังเคราะห์ Indigo Carmine, Bromophenol Blue, Methyl Orange และ Poly R-478 ใน expanded-bed reactors โดยใช้การเพาะเลี้ยงแบบ solid state fermentation พบว่าสามารถลดสี Indigo Carmine ได้อย่างสมบูรณ์ภายในเวลา 3 ชั่วโมง ลดสี Bromophenol Blue ได้ 85% ภายในเวลา 3 ชั่วโมง และลดสี Methyl Orange และ Poly R-478 ได้ 81 และ 47% ภายในเวลา 3 วัน ตามลำดับ⁽⁸⁶⁾ งานวิจัยของ Ottoni และคณะ นำรา *T. versicolor* MUM 04.100 มาตรึงร่วมกับโฟมโพลียูรีเทน และฟองน้ำไนลอน แล้วนำไปใช้ลดสีสังเคราะห์ Reactive Black 5 ในถังหมักแบบ fed-batch bioreactor พบว่ามีประสิทธิภาพในการลดสีมากถึง 85%⁽⁸⁷⁾

ตาราง 3 การประยุกต์ใช้ราตรึงในการบำบัดสีย้อม

วัสดุตรึง	ราไวท์รอก	สีย้อม	อ้างอิง
Stainless steel sponges	<i>Trametes pubescens</i>	Reactive Black 5	Enayatzamir et al. 2009 ⁽⁸⁸⁾
Orange peelings	<i>T. hirsuta</i> BT2566	Indigo Carmine, Methyl Orange, Bromophenol Blue และ Poly R-478	Rodríguez Couto et al. 2006 ⁽⁸⁶⁾
Polyurethane foam และ Pine wood	<i>Irpex lacteus</i>	Remazol Brilliant Blue R	Kasinath et al. 2003 ⁽⁸⁹⁾
Alginate beads	<i>T. hirsuta</i>	Indigo Carmine และ Phenol Red	Domínguez et al. 2005 ⁽⁹⁰⁾
Polyurethane foam และ Nylon sponges	<i>T. versicolor</i> MUM 04.100	Reactive Black 5	Ottoni et al. 2013 ⁽⁸⁷⁾
Alginate beads	<i>T. versicolor</i> U97	Reactive Green 19	Sari et al. 2015 ⁽⁹¹⁾

ตาราง 3 (ต่อ)

วัสดุตั้ง	ราไวทรอก	สีย้อม	อ้างอิง
Alginate beads	<i>Funalia trogii</i>	Acid black 52	Park et al. 2006 (92)
Luffa sponge และ Birch wood	<i>T. versicolor</i> PRL-572	Reactive Blue 4 และ Reactive Red 2	Nilsson et al. 2006 ⁽⁹³⁾
Stainless steel sponges	<i>T. hirsuta</i>	Indigo Carmine และ Lanset Marine	Rodriguez- Couto et al. 2004 ⁽⁸⁵⁾
Polyethylene foam, Polypropylene washer, Polystyrene fitting, Tile cross spacers, Brush, Grid และ Sawdust	<i>Pleurotus ostreatus</i> BWPH, <i>Polyporus</i> <i>picipes</i> RWP17 และ <i>Gleophyllum</i> <i>odoratum</i> DCa	Brilliant Green และ Evans Blue	Przystas et al. 2018 ⁽¹³⁾

7. ปัจจัยที่มีผลต่อการบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม

องค์ประกอบของน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมแต่ละแหล่งมีความแตกต่างกัน เช่น สารอาหาร ค่า pH อุณหภูมิ รวมทั้งชนิดสีย้อมที่ปนเปื้อน โดยจุลินทรีย์ที่ใช้ในการย่อยสลายทางชีวภาพมักมีความไวต่อความเข้มข้นของสีย้อมที่สูง การเปลี่ยนแปลงของค่า pH ชนิดและปริมาณของโลหะหนัก ดังนั้นจึงต้องมีการปรับพารามิเตอร์ต่าง ๆ ให้เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ และทำงานของจุลินทรีย์ เพื่อให้ได้ประสิทธิภาพในการลดสีย้อมสังเคราะห์สูงสุด⁽⁹⁴⁾ โดยปัจจัยที่มักส่งผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ และประสิทธิภาพในการบำบัดสีย้อมสังเคราะห์ ได้แก่ ค่า pH อุณหภูมิ ความเข้มข้นของสีย้อมตั้งต้น อัตราการเขย่า และสารอาหาร

7.1 สารอาหาร (nutrients)

ปริมาณสารอาหาร เช่น แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ที่เหมาะสมมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และช่วยส่งเสริมการกำจัดสีย้อมในน้ำทิ้ง เนื่องจากแหล่งคาร์บอนเป็นองค์ประกอบสำคัญในการเพิ่มจำนวนเซลล์และพลังงานของจุลินทรีย์ โดยทั่วไปจุลินทรีย์ที่ไม่ใช้อากาศจะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณ 10% ในการเพิ่มจำนวนเซลล์ ส่วนจุลินทรีย์

ใช้อากาศจะใช้แหล่งคาร์บอน ประมาณ 50-55% ในการเพิ่มจำนวนเซลล์ ส่วนไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการสังเคราะห์โปรตีนและกรดนิวคลีอิก นอกจากนี้จุลินทรีย์ส่วนใหญ่ไม่สามารถใช้สีย้อมเป็นแหล่งคาร์บอนหรือแหล่งไนโตรเจนสำหรับการเจริญเติบโตได้ ดังนั้นจึงต้องมีการเติมสารอาหารเพิ่มลงไป ในสีย้อมเพื่อส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์ มีหลายงานวิจัยที่ศึกษาหาแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการบำบัดสีย้อมสังเคราะห์ของจุลินทรีย์ ยกตัวอย่างงานวิจัยของ Asgher และคณะได้ทำการหาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการลดสีย้อม Solar Brilliant Red 80 ของรา *Schizophyllum commune* IBL-06 พบว่าน้ำตาลมอลโทสและแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมมากที่สุดมีความสามารถในการลดสีเท่ากับ 91.5% ภายใน 3 วัน⁽⁹⁵⁾ ส่วนงานวิจัยของ Gahlout ในปี 2013 พบว่าน้ำตาลแมนโนส และสารสกัดจากยีสต์ เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุดในการลดสีย้อม Reactive Violet-1 ด้วยรา *Ganoderma cupreum* AG-1 ซึ่งสามารถลดสีย้อมได้เท่ากับ 91 และ 96% ตามลำดับ⁽⁹⁶⁾

7.2 ค่า pH

ค่าพีเอชเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญสำหรับกิจกรรมทางสรีรวิทยาของเชื้อจุลินทรีย์และการลดสีของน้ำทิ้ง โดยมีบทบาทสำคัญในการเคลื่อนที่ของสารอาหารผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์จุลินทรีย์และกระบวนการทางชีวเคมี รวมทั้งเอนไซม์ต่าง ๆ ค่า pH ที่เหมาะสมของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน ยกตัวอย่างเช่น แบคทีเรียแสดงกิจกรรมการลดสีและการย่อยสลายทางชีวภาพที่ดีในช่วง pH ที่เป็นกลางถึงเบส ในขณะที่เชื้อรา และยีสต์มีประสิทธิภาพที่ดีในช่วง pH ที่เป็นกรดถึงกลาง โดยในงานวิจัยของ Asgher และคณะ ได้หาค่า pH ของอาหารที่เหมาะสมต่อการลดสีย้อมสังเคราะห์ของรา *S. commune* IBL-06 พบว่าเมื่อปรับค่า pH ของอาหารเท่ากับ 4.0 ทำให้ราสามารถลดสีย้อมได้สูงที่สุด 87.7% ภายในเวลา 6 วัน⁽⁹⁵⁾ และงานวิจัยในปี 2016 พบว่าค่า pH 4.0 เหมาะสมต่อการลดสีย้อมสังเคราะห์ของรา *Trametes versicolor* IBL-04 โดยมีประสิทธิภาพในการลดสี Remazol Brilliant Yellow 3-GL เท่ากับ 97.21%⁽⁹⁷⁾

7.3 อุณหภูมิ (temperature)

อุณหภูมิเป็นปัจจัยทางกายภาพที่สำคัญ ที่จะส่งผลต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์โดยตรง อุณหภูมิที่มีความเหมาะสมจะส่งผลให้จุลินทรีย์เจริญเติบโตได้รวดเร็ว ทำให้เพิ่มประสิทธิภาพการลดสีย้อม และที่อุณหภูมิไม่เหมาะสมกระบวนการลดสีจะลดลงเนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์เจริญเติบโตได้ช้าลง ซึ่งเซลล์จุลินทรีย์มักมีการตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของ

อุณหภูมิโดยการปรับตัวผ่านวิธีการทางชีวเคมีหรือเอนไซม์ จากงานวิจัยของ Asgher และคณะ พบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเหมาะสมต่อการลดสีย้อมสังเคราะห์ของรา *S. commune* IBL-06 สามารถลดสีย้อมได้สูงที่สุด 89.2% ภายในเวลา 4 วัน⁽⁹⁵⁾ เช่นเดียวกันงานวิจัยในปี 2016 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเหมาะสมต่อการลดสีย้อมสังเคราะห์ของรา *T. versicolor* IBL-04 โดยสามารถลดสีย้อม Remazol Brilliant Yellow 3-GL ได้ดีที่สูงสุดเท่ากับ 97.21%⁽⁹⁷⁾

7.4 ความเข้มข้นของสีย้อม (dye concentration)

ประสิทธิภาพของการลดสีย้อมในน้ำทิ้งส่วนใหญ่ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นเริ่มต้นของสีย้อมนอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นร่วมอยู่ด้วย เช่น ความเป็นพิษของสีย้อม ความเข้มข้นของสารปนเปื้อนในน้ำทิ้ง และความสามารถของเอนไซม์ในการจดจำสารตั้งต้น (substrate) โดยอัตราการลดสีจะลดลงตามความเข้มข้นของสีย้อมที่เพิ่มขึ้น เนื่องจากความเป็นพิษจากสีย้อมที่มีผลต่อการย่อยสลายของจุลินทรีย์หรือการรบกวนบริเวณแอคทีฟไซต์ (active site) ของเอนไซม์ด้วยโมเลกุลของสีย้อม งานวิจัยในปี 2015 ใช้รา *Mucor hiemalis* MV04 มาลดสีย้อมสังเคราะห์ Remazol Brilliant Blue R, Malachite Green และ Congo Red ที่ความเข้มข้น 50-200 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร รมีประสิทธิภาพในการลดสีสูงที่สุดเท่ากับ 39, 31 และ 33% ตามลำดับ แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสีย้อมพบว่าความสามารถในการลดสีลดลงเหลือ 33, 24 และ 26% ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร⁽¹²⁾ และงานวิจัยของ Vantamuri และคณะในปี 2020 พบว่ารา *Marasmius* sp. BBKAV79 สามารถลดสีย้อม Diazo Reactive dye ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตรได้ดีที่สุดถึง 93% ตามมาด้วยความเข้มข้น 100, 150 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่สามารถลดได้ 58, 35 และ 19% ตามลำดับ⁽⁶⁷⁾

7.5 อัตราการกวน (agitation)

มีรายงานจำนวนมากที่รายงานถึงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการกวนหรือการเขย่าและสภาวะที่ไม่เขย่ากับประสิทธิภาพการลดสีย้อมสังเคราะห์ในน้ำเสียด้วยจุลินทรีย์ อัตราการกำจัดสีจะสูงขึ้นภายใต้สภาวะการเขย่า เนื่องจากมีการถ่ายเทออกซิเจนและมีการกระจายของสารอาหารที่ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับภาวะเฉื่อยแบบไม่เขย่า เนื่องจากการเขย่าเป็นการเพิ่มปริมาณออกซิเจนให้กับจุลินทรีย์ที่ต้องใช้อากาศ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับราที่เป็นจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศในการเจริญเติบโต โดยออกซิเจนจะเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายในกระบวนการหายใจระดับเซลล์ ดังนั้นการเขย่าให้อากาศอย่างต่อเนื่องจึงจำเป็นต่อจุลินทรีย์ที่ใช้อากาศ ยกตัวอย่างงานวิจัยของ Gao และคณะ ใช้รา *Bjerkandera adusta* SWUS14 มาลดสีย้อมสังเคราะห์ Cotton Blue, Crystal Violet และ Methyl Violet ในสภาวะที่ไม่มีการเขย่า และในสภาวะที่มีการเขย่า 150

รอบต่อหน้าที่ พบว่าเราสามารถลดสีย้อม Cotton Blue, Crystal Violet และ Methyl Violet ได้ถึง 70, 72 และ 81% ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงกว่าการเลี้ยงในสภาวะที่ไม่มีการเขย่าซึ่งสามารถลดสีย้อมได้เพียง 58, 27 และ 47% ตามลำดับ⁽⁶⁴⁾ รวมถึงงานวิจัยในปี 2013 ผู้วิจัยทดลองลดสีย้อม Reactive Violet-1 ด้วยรา *G. cupreum* AG-1 ในสภาวะที่ไม่มีการเขย่า และมีการเขย่า 150 รอบต่อหน้าที่ พบว่าเราสามารถลดสีย้อมสังเคราะห์ในสภาวะที่มีการเขย่าได้ดีกว่าสภาวะที่ไม่มีการเขย่า เท่ากับ 90 และ 73% ตามลำดับ⁽⁹⁶⁾ และงานวิจัยของ Megha ในปี 2015 ได้ทดลองหาความเร็วรอบในการเขย่าที่เหมาะสมต่อการลดสี Remazol Brilliant Blue R ด้วยรา *M. hiemalis* MV04 พบว่าความเร็วรอบ 130 รอบต่อหน้าที่เหมาะสมต่อการลดสีมากที่สุดลดสีได้ถึง 43% ภายในเวลา 8 วัน⁽¹²⁾

8. การศึกษาหมู่ฟังก์ชันสารเคมีด้วยเทคนิค Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

เป็นเทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของสารอินทรีย์หรืออนินทรีย์ สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้ทั้งของแข็งและของเหลว โดยอาศัยหลักการดูดกลืนแสงอินฟราเรด เมื่อโมเลกุลของสารได้รับพลังงานจากแสงอินฟราเรดในช่วง $400-4,000\text{ cm}^{-1}$ และมีความถี่ตรงกับความถี่ของการสั่นหรือการหมุนของพันธะโคเวเลนต์ในโมเลกุล จะทำให้โมเลกุลดังกล่าวเกิดการดูดกลืนแสงอินฟราเรดบางส่วน และแสงบางส่วนจะถูกส่งผ่านไปยังเครื่องวัดค่าความเข้มแสง ซึ่งผลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคนี้แสดงเป็นกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการส่องผ่านของแสง (% transmittance) กับค่าความยาวคลื่น (wavenumbers) ที่เรียกว่าอินฟราเรดสเปกตรัม (infrared spectrum) โดยในแต่ละโมเลกุลของหมู่ฟังก์ชันมีโครงสร้างที่แตกต่างกันทำให้เกิดสเปกตรัมที่แตกต่างกันของสารแต่ละชนิดจึงสามารถใช้ในการสันนิษฐานหมู่ฟังก์ชันของสารได้ โดยเปรียบเทียบรูปร่างของพีค และค่าความยาวคลื่นของแต่ละพีคกับฐานข้อมูล ทำให้ทราบถึงโครงสร้างของสารที่วิเคราะห์ได้⁽⁹⁸⁾ แต่การเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลไม่สามารถยืนยันได้ว่าสารที่วิเคราะห์เป็นสารอะไร แต่จะสามารถบอกได้จากการเปรียบเทียบอินฟราเรดสเปกตรัมของสารประกอบมาตรฐานกับตัวอย่างที่วัดในตัวกลางชนิดเดียวกัน เมื่อนำมาเปรียบเทียบกัน พีคต่อพีค ถ้าตรงกันและเหมือนกันก็สามารถยืนยันได้ว่าเป็นสารชนิดเดียวกัน ในหลายงานวิจัยได้นำเอาเทคนิค FTIR มาใช้ในการวิเคราะห์โครงสร้างของสีย้อม หรือโครงสร้างของสีย้อมหลังจากการบำบัดทางชีวภาพเพื่อวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของสารหลังจากการบำบัด ยกตัวอย่างงานวิจัยของ Ayed และคณะในปี 2011 ได้มีการนำเทคนิค FTIR มาใช้ในการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างสีจากการย่อยสลายสี Methyl Red เมื่อเปรียบเทียบกับอินฟราเรดสเปกตรัมของ

ชุดควบคุมและตัวอย่างหลังจากการย่อย พบว่าตำแหน่งของพีคมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยจาก 1,604, 1,384, 1,124 (C-C) และ 535 cm^{-1} เปลี่ยนไปเป็น 1,603, 1,383 (-CHO), 1,114 และ 530 cm^{-1} ⁽⁹⁹⁾ รวมไปถึงงานวิจัยของ Maniyam ที่ได้ใช้เทคนิค FTIR มาใช้ในการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างสีจากย่อยสลายสี Methyl Red พบว่าชุดควบคุมมีพีคสูงที่สุดที่ความยาวคลื่น $1,617\text{ cm}^{-1}$ ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของพันธะเอโซ แต่หลังจากบำบัดโดยใช้ *Rhodococcus* สายพันธุ์ UCC 0016 พบว่าพีคที่สูงที่สุดอยู่ที่ความยาวคลื่น $3,232\text{ cm}^{-1}$ ที่เป็นหมู่ฟังก์ชันของกลุ่มอะมิโน ($-\text{NH}_2$) แสดงให้เห็นว่าหลังจากการบำบัดทางชีวภาพทำให้พันธะเอโซเกิดการย่อยสลายไปเป็นสารในกลุ่มอะมิโน ⁽¹⁰⁰⁾



บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และเครื่องมือ

ตาราง 4 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	บริษัท	ประเทศ
กระดาษกรอง whatman No.1 (filter paper)	GE healthcare	UK
เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (rotary evaporator)	Buchi	Switzerland
เครื่องเขย่าสาร (vortex)	IKA Works	Malaysia
เครื่องเขย่าสารแบบควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker)	New brunswick scientific	USA
เครื่องควบคุมอุณหภูมิหลอดทดลอง (heating block)	Wisd	Korea
เครื่องชั่งดิจิทัล ทศนิยม 4 ตำแหน่ง	Denver instrument	USA
เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (high speed refrigerated microcentrifuge)	Tomy	Japan
เครื่องวัด pH (pH meter)	Extech instrument	China
เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer)	Hach	Germany
ชุดเครื่องแก้วกรองสารละลาย (funnel)	Pyrex	USA
ชุดอุปกรณ์ทำ SDS-PAGE	Cleaver scientific	UK
ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำ (-20 องศาเซลเซียส)	Panasonic	Japan
ตู้ดูดไอระเหยสารเคมี (Fume hood)	Wizard	Thailand
ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิต่ำ (low temperature incubator)	Sheldon	USA
ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow)	Shal-lab	Germany
ตู้อบลมร้อน (hot air oven)	Atmosafe	Germany
โถดูดความชื้น (desiccator)	Simax	Germany
หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave)	Tomy	Japan
หัวกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร	Alwsci	China

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

ตาราง 5 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง	บริษัท	ประเทศ
Acetic acid (CH ₃ COOH)	Merck	Germany
Acrylamide/ Bis (30%T, 2.7%C)	Bio-rad	USA
Agar	Marine chemical	India
Ammonium persulfate (APS)	Bio-rad	USA
Ammonium sulfate ((NH ₄) ₂ SO ₄)	Merck	Germany
Ammonium nitrate (NH ₄ NO ₃)	Qrec	New Zealand
Bovine serum albumin (BSA)	Thermo Scientific	Germany
Bradford reagent	Bio-rad	USA
Bromophenol Blue	Loba chemie	India
Calcium chloride (CaCl ₂)	Ajax Finechem	Australia
Coomassie Brilliant Blue R-250	Panreac	Spain
Copper (II) sulphate pentahydrate (CuSO ₄ ·5H ₂ O)	Ajax Finechem	Australia
D-glucose	Kemaus	Australia
Di-sodium hydrogen orthophosphate (Na ₂ HPO ₄)	Ajax Finechem	Australia
Ethanol	RCI Labscan	Ireland
Ethyl acetate (CH ₃ COOC ₂ H ₅)	Pwai	Thailand
Ferrous sulphate heptahydrate (FeSO ₄ ·7H ₂ O)	Carlo Erba Reagents	Italy
Fructose	Himedia	India
Galactose	Himedia	India
Glycerol	Kemaus	Australia
Glycine	Bio-rad	USA
Hydrochloric acid (HCl)	Qrec	New Zealand
Hydrogen peroxide 30% (H ₂ O ₂)	Merck	Germany

ตาราง 5 (ต่อ)

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง	บริษัท	ประเทศ
Lactose	Ajax Finechem	Australia
L-tartaric acid (C ₄ H ₆ O ₆)	Fluka	Switzerland
Manganese sulfate monohydrate (MnSO ₄ ·H ₂ O)	Ajax Finechem	Australia
Magnesium sulphate heptahydrate (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	Ajax Finechem	Australia
Monosodium phosphate (NaH ₂ PO ₄)	Ajax Finechem	Australia
N,N,N',N'-tetramethylethane-1,2-diamine (TEMED) (C ₆ H ₁₆ N ₂)	Bio-rad	USA
Palm sugar	Mitrphol	Thailand
Peptone	Himedia	India
Potassium dihydrogen orthophosphate (KH ₂ PO ₄)	Ajax Finechem	Australia
Sodium acetate (CH ₃ COONa·3H ₂ O)	Ajax Finechem	Australia
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Bio-rad	USA
Sodium hydroxide (NaOH)	Merck	Germany
Sodium L-tartrate dibasic dihydrate (C ₄ H ₄ Na ₂ O ₆ ·2H ₂ O)	Loba Chemie	India
Sodium nitrate (NaNO ₃)	Kemaus	Australia
Soluble starch	Qrec	New Zealand
Sucrose	Mitrphol	Thailand
Sulfuric acid (H ₂ SO ₄)	Qrec	New Zealand
Tris Base	Bio-rad	USA
Urea (CH ₄ N ₂ O)	Qrec	New Zealand
Yeast extract	Himedia	India
Zinc sulphate (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	Ajax Finechem	Australia
2-Mercaptoethanol (C ₂ H ₆ OS)	Sigma-aldrich	USA
2,2'-Azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid (ABTS)	Roche Diagnostics	Germany

ตาราง 5 (ต่อ)

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง	บริษัท	ประเทศ
2,6-Dimethoxyphenol (C ₈ H ₁₀ O ₃)	Aldrich	India
3,4-Dimethoxybenzyl alcohol (veratryl alcohol)	Aldrich	Germany

วิธีดำเนินการทดลอง

1. ตัวอย่างน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมฟอกย้อม และการวัดคุณสมบัติเบื้องต้น

ตัวอย่างน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมฟอกย้อม ได้รับความอนุเคราะห์จากโรงงาน ธนไพศาล จังหวัดสมุทรปราการ ในช่วงเดือน สิงหาคม ปี พ.ศ. 2563 จำนวน 2 ตัวอย่าง คือ 1) ตัวอย่างสีย้อมเหลือทิ้งจากกระบวนการย้อมที่ยังไม่ผ่านระบบบำบัด มีสีน้ำเงินเข้ม (navy blue) ประกอบด้วยสีผสมของ Novacron Navy EC-R (NEC-R), Novacron Ruby S3B (NR-S3B) และ Novacron Super Black G (NSB-G) และ 2) ตัวอย่างสีน้ำทิ้งภายหลังการบำบัด (effluent) โดยบรรจุในแกลลอนสีดำ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาตรวจสอบคุณภาพโดยการวัดค่า pH, COD (Chemical Oxygen Demand), BOD (Biochemical Oxygen Demand), ความเข้มสีซึ่งแสดงในหน่วยของ ADMI (American Dye Manufacturers Institute) และปริมาณโลหะหนักจำนวน 11 ชนิด ตามมาตรฐานน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม ได้แก่ สังกะสี (Zinc, Zn) ทองแดง (Copper, Cu) แมงกานีส (Manganese, Mn) นิกเกิล (Nickel, Ni) แบเรียม (Barium, Ba) โครเมียม (Chromium, Cr) แคดเมียม (Cadmium, Cd) ตะกั่ว (Lead, Pb) สารหนู (Arsenic, As) ปรอท (Mercury, Hg) และซีลีเนียม (Selenium, Se) โดยค่า COD วิเคราะห์ด้วยวิธี Open reflux method 5220 B ส่วนค่า BOD วิเคราะห์ด้วยวิธี Days BOD test 5210 B และปริมาณโลหะหนักวิเคราะห์ด้วยวิธี Inductively coupled plasma โดยส่งวิเคราะห์ที่สถาบันวิจัยสภาวะแวดล้อม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การวัดค่า ADMI วัด 2 ค่า คือ วัดที่ pH ตั้งต้นของน้ำทิ้ง และวัดที่ pH 7 โดยการปรับค่า pH ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 1N หรือสารละลายกรดซัลฟิวริก (H₂SO₄) ความเข้มข้น 1N จนมีค่า pH เท่ากับ 7 จากนั้นกรองด้วยเมมเบรนขนาด 0.45 ไมครอน ก่อนนำไปวัดค่า ADMI ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์โปรแกรม color ADMI 10 mm และวัดค่าการดูดกลืนแสงของสีน้ำทิ้งด้วยวิธีการสแกนความยาวคลื่นตั้งแต่ 320 ถึง 700 นาโนเมตร เพื่อบันทึกข้อมูลของสีน้ำทิ้งเบื้องต้นอีกด้วย

2. การคัดเลือกสายพันธุ์ราไวท์รอตที่สามารถลดสีน้ำตาลจากโรงงานอุตสาหกรรมฟอกย้อม

ราไวท์รอตจำนวน 16 ไอโซเลท ที่สามารถผลิตเอนไซม์แลคเคส และ/หรือ แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสได้ คัดเลือกจากงานวิจัยของ Thamvithayakorn และคณะ⁽¹⁰¹⁾ เพื่อนำมาใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพการลดสีน้ำตาลจากโรงงานอุตสาหกรรม รายละเอียดแสดงในตาราง 6

ตาราง 6 สายพันธุ์ราไวท์รอตที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

ชนิดของราไวท์รอต	ไอโซเลท	ชนิดของราไวท์รอต	ไอโซเลท
<i>Amauroderma subresinosum</i>	NP17-12	<i>G. mastoporum</i>	PW17-154
<i>Corioloopsis aspera</i>	NP17-02	<i>Microporus vernicipes</i>	PW17-173
<i>C. aspera</i>	NP17-08	<i>M. xanthopus</i>	PP17-17
<i>C. retropicta</i>	PW17-134	<i>M. xanthopus</i>	PP17-20
<i>Dentipellis parmastoi</i>	PW17-136	<i>Pseudolagarobasidium</i> sp.	PP17-33
<i>Ganoderma fornicatum</i>	PW17-145	<i>Trametes elegans</i>	PP17-06
<i>G. lingzhi</i>	PW17-43	<i>Trametes hirsuta</i>	PW17-41
<i>G. mastoporum</i>	PW17-06	<i>Trametes sanguinea</i>	PP17-18

ตัวอย่างราไวท์รอตทั้ง 16 ไอโซเลท นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง potato dextrose agar (PDA) (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน จากนั้นตัดเส้นใยด้วย cork borer เบอร์ 5 ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8.75 มิลลิเมตร จำนวน 5 ชิ้น ใส่ลงในพลาสติก ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีส่วนผสมของอาหาร basal medium⁽⁹⁾ (ภาคผนวก ก) และสีย้อมเหลืองที่จากโรงงานอุตสาหกรรมโดยปรับให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 4% (v/v) ในปริมาตรรวมเท่ากับ 50 มิลลิลิตร ปรับค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 จากนั้นเลี้ยงเชื้อในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker) ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน โดยชุดควบคุม (control) เป็นอาหาร basal medium (pH 5.5) ที่เติมสีย้อมแต่ไม่ใส่เส้นใยรา เก็บผลวันที่ 7 โดยนำมารองแยกส่วนของเส้นใยด้วยกระดาษกรอง whatman no.1 แล้วนำส่วนน้ำไปวัดค่าต่าง ๆ ดังนี้ 1) ค่า ADMI ตามวิธีที่อธิบายในข้อ 1 2) ค่าการดูดกลืนแสงปกติซึ่งตัวอย่างสีย้อมเหลืองที่ได้จากการผสมสี 3 ชนิด จึงวัดที่ความยาวคลื่น 545 (NR-S3B), 600 (NSB-G) และ 608 (NEC-R) นาโนเมตร ตามลำดับ^(102, 103) 3) ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร ซึ่ง

ได้จากการสแกนค่าการดูดกลืนแสงที่สูงที่สุดในวิธีการทดลองข้อ 1 จากนั้นคำนวณประสิทธิภาพการลดสี (% decolourisation) ตามสมการดังนี้

$$\% \text{ Decolourisation} = (\text{OD}_{\text{control}} - \text{OD}_{\text{sample}}) / \text{OD}_{\text{control}} \times 100$$

หมายเหตุ: $\text{OD}_{\text{control}}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม และ $\text{OD}_{\text{sample}}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของชุดทดลอง

$$\% \text{ Decolourisation} = (\text{ADMI}_{\text{control}} - \text{ADMI}_{\text{sample}}) / \text{ADMI}_{\text{control}} \times 100$$

หมายเหตุ: $\text{ADMI}_{\text{control}}$ คือ ค่า ADMI ของชุดควบคุม และ $\text{ADMI}_{\text{sample}}$ คือ ค่า ADMI ของชุดทดลอง

3. การทดสอบหาวัสดุรีงที่เหมาะสมต่อราที่คัดเลือก

นำวัสดุรีง 5 ชนิด ได้แก่ ฟองน้ำไนลอน (สก็อตซีบอร์ด) โปสับปะรด ไยบวบ กากเมล็ดกาแฟ และกะลากาแฟ ซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งมาใช้ในการรีงราบริสุทธิ์ที่คัดเลือก โดยนำมาล้างให้สะอาดด้วยน้ำประปาและน้ำกลั่นก่อนนำมาใช้ โดยฟองน้ำไนลอนนำมาแช่ในน้ำประปาข้ามคืน ต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วล้างซ้ำด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง นำมาผึ่งให้แห้ง จากนั้นตัดฟองน้ำไนลอน โปสับปะรด และไยบวบ ให้มีขนาดเท่ากับ 1×1 ตารางเซนติเมตร ส่วนเปลือกเมล็ดกาแฟ และกะลากาแฟ ใช้ทั้งเมล็ด โดยอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเก็บในโถดูดความชื้น (desiccator) เป็นเวลา 8 วัน หรือจนกว่าน้ำหนักคงที่ จากนั้นเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose broth (PDB) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใส่ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ใส่วัสดุรีงจำนวน 15 ชิ้น สำหรับฟองน้ำไนลอน โปสับปะรด และไยบวบ ส่วนเปลือกผลกาแฟใช้ปริมาณ 2 กรัม และกะลากาแฟปริมาณ 1 กรัม ก่อนทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการสเตอริไรเซชันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นใส่เส้นใยบริสุทธิ์ที่คัดเลือกอายุ 7 วัน จำนวน 3 ชิ้น ตัดด้วย cork borer เบอร์ 5 ลงในพลาสติก เลี้ยงในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน แล้วนำวัสดุรีงที่มีการเจริญของเส้นใยรามาล้างด้วยน้ำกลั่นปริมาณ 100 มิลลิลิตร 2 รอบ อบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บในโถดูดความชื้น นาน 8 วัน หรือจนกว่าน้ำหนักคงที่ บันทึกผลน้ำหนักแห้งของวัสดุรีงก่อนและหลังการทดลอง โดยในแต่ละชุดการทดลอง ทำซ้ำ 3 ครั้ง

4. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการลดสีย้อมเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมโดยใช้รา ตริง

4.1 การเตรียมราตริง

นำราไวท์รอตที่คัดเลือกอายุ 7 วัน มาตัดเส้นใยด้วย cork borer เบอร์ 5 ใส่ลงใน
พลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร จำนวน 3 ชิ้น ที่มีอาหาร PDB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และวัสดุตริง
ที่คัดเลือก (ฟองน้ำไนลอน) จำนวน 15 ชิ้นต่อพลาสติก ที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อด้วยวิธี
สเตอริไรเซชัน จากนั้นเลี้ยงในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ ความเร็ว 120 รอบต่อนาที
อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน แล้วนำวัสดุตริงมาล้างด้วยน้ำกลั่น ก่อนนำไปใช้
ทดสอบการลดสีน้ำทิ้งต่อไป

4.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการลดสีย้อมเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม

การหาสภาวะที่เหมาะสมนี้ใช้การทดสอบทีละปัจจัย (one factor at a time) โดย
ปัจจัยที่เลือกมาพิจารณา ได้แก่ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ค่า pH เริ่มต้น และอัตราการเขย่า
โดยมีตัวแปรตาม คือ % decolourisation

4.2.1 แหล่งคาร์บอน (carbon source) ที่เหมาะสม

เตรียมอาหาร basal medium (pH 5.5) ที่ใช้แหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน ได้แก่
กลูโคส ซูโครส ฟรักโทส แลคโทส กาแลคโทส น้ำตาลบีบ เบ้ง และชุดควบคุมที่ไม่เติมแหล่ง
คาร์บอน ผสมกับสีย้อมเหลือทิ้งโดยปรับให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 4% (v/v) ทำให้ปราศจาก
เชื้อด้วยวิธีสเตอริไรเซชัน แล้วทดสอบโดยใส่ราตริงจำนวน 5 ชิ้น บ่มในเครื่องเขย่าแบบควบคุม
อุณหภูมิ ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน บันทึกผลวันที่ 2
โดยนำมารองแยกส่วนของราตริงผ่านกระดาษกรอง whatman no.1 แล้วนำส่วนน้ำไปวัดค่า
ADMI ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่าง ๆ ได้แก่ 545, 590, 600 และ 608 นาโนเมตร
คำนวณประสิทธิภาพการลดสีในรูปของ % decolourisation ตามวิธีการทดลองในข้อที่ 2

4.2.2 แหล่งไนโตรเจน (nitrogen source) ที่เหมาะสม

เตรียมอาหาร basal medium (pH 5.5) ที่ใช้แหล่งคาร์บอนที่ให้ค่าการลดสี
สูงสุด ได้แก่ น้ำตาลบีบ จากผลการทดลองในข้อที่ 4.2.1 ส่วนแหล่งไนโตรเจนจะใช้แตกต่างกัน
ได้แก่ เปปโตน ยีสต์สกัด แอมโมเนียมซัลเฟต โซเดียมไนเตรท แอมโมเนียมไนเตรท ยูเรีย และ
ชุดควบคุมที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจน ผสมกับสีย้อมเหลือทิ้งโดยปรับให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ
4% (v/v) จากนั้นทำให้ปราศจากเชื้อด้วยวิธีสเตอริไรเซชัน แล้วทดสอบโดยใส่ราตริงจำนวน
5 ชิ้น นำไปบ่มในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ

30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน บันทึกผลวันที่ 2 คำนวณค่า % decolourisation เช่นเดียวกับการทดลองในข้อที่ 4.2.1

4.2.3 ค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม

เตรียมอาหาร basal medium ที่ใช้แหล่งคาร์บอน คือ น้ำตาลปี๊บ และไนโตรเจน คือ แอมโมเนียมไนเตรทที่ให้ค่าการลดสีสูงสุดจากผลการทดลองในข้อ 4.2.2 ปรับค่า pH ของอาหารที่แตกต่างกัน ได้แก่ 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 ผสมกับสีย้อมเหลืองซึ่งโดยปรับให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 4% (v/v) จากนั้นทำให้ปราศจากเชื้อด้วยวิธีสเตอริไลเซชัน แล้วทดสอบโดยใส่ราตรีงจำนวน 5 ขึ้น นำไปป่มในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน คำนวณค่า % decolourisation บันทึกผลวันที่ 2 เช่นเดียวกับการทดลองในข้อที่ 4.2.1

4.2.4 ความเร็วรอบในการเขย่าที่เหมาะสม

เตรียมอาหาร basal medium ที่ใช้แหล่งคาร์บอน คือ น้ำตาลปี๊บ ไนโตรเจน คือ แอมโมเนียมไนเตรท และปรับค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 5 ที่ให้ค่าการลดสีสูงสุดจากผลการทดลองในข้อ 4.2.3 ผสมกับสีย้อมเหลืองซึ่งโดยปรับให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 4% (v/v) จากนั้นทำให้ปราศจากเชื้อด้วยวิธีสเตอริไลเซชัน แล้วทดสอบโดยใส่ราตรีงจำนวน 5 ขึ้น นำไปป่มในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ โดยปรับความเร็วรอบที่ต่างกัน ได้แก่ 0, 50, 100 และ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน คำนวณค่า % decolourisation บันทึกผลวันที่ 2 เช่นเดียวกับการทดลองในข้อที่ 4.2.1

5. การศึกษากลไกในการดูดซับ (adsorption) และการย่อยสลาย (degradation) สีย้อมเหลืองจากโรงงานอุตสาหกรรมโดยใช้ราตรีง

5.1 ความสามารถในการดูดซับสีย้อมเหลือง

เตรียมอาหาร basal medium ที่ใช้แหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน และปรับค่า pH เริ่มต้นที่ให้ค่าการลดสีสูงสุดจากการทดลองในข้อ 4 ผสมกับสีย้อมเหลืองซึ่งโดยปรับให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 4% (v/v) ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยวิธีสเตอริไลเซชัน จากนั้นทดสอบโดยใส่ราตรีงที่ผ่านการนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จำนวน 5 ขึ้น นำไปป่มในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ ความเร็ว 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน บันทึกผลวันที่ 2 โดยนำมากรองแยกส่วนของราตรีงผ่านกระดาษกรอง whatman no.1 แล้วนำส่วนน้ำไปวัดค่า ADMI ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่าง ๆ ได้แก่ 545, 590, 600 และ

608 นาโนเมตร คำนวณ % decolourisation ตามวิธีการทดลองในข้อที่ 2 และวัดกิจกรรมของเอนไซม์กลุ่มลิกนินโพลิติกตามวิธีการทดลองในข้อ 5.2.1

5.2 ความสามารถในการย่อยสลายสีย้อมเหลือทิ้ง

เตรียมอาหาร basal medium ที่ใช้แหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน และปรับค่า pH เริ่มต้นที่ให้ค่าการลดสีสูงสุดจากการทดลองในข้อ 4 ผสมกับสีย้อมเหลือทิ้งโดยปรับให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 4% (v/v) ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยวิธีสเตอริไรเซชัน จากนั้นทดสอบโดยใส่ราตรีงจำนวน 5 ชี้น นำไปบ่มในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ ความเร็ว 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน บันทึกผลวันที่ 2 โดยนำมากรองแยกส่วนของราตรีงผ่านกระดาษกรอง whatman no.1 แล้วนำส่วนน้ำไปวัดค่า ADMI ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่าง ๆ ได้แก่ 545, 590, 600 และ 608 นาโนเมตร คำนวณ % decolourisation ตามวิธีการทดลองในข้อที่ 2 และวัดกิจกรรมของเอนไซม์กลุ่มลิกนินโพลิติกตามวิธีการทดลองในข้อ 5.2.1

5.2.1 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์กลุ่มลิกนินโพลิติก

5.2.1.1 กิจกรรมของเอนไซม์แลคเคส

ผสมสารละลาย 2,2'-Azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid (ABTS) ความเข้มข้น 0.5 mM ในสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเตท ความเข้มข้น 100 mM (pH 4) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร กับตัวอย่างทดสอบปริมาตร 600 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร บันทึกค่าที่เวลา 0 และ 60 วินาที นำค่าที่วัดได้ไปคำนวณหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์โดยกำหนดให้ 1 ยูนิตของเอนไซม์แลคเคส คือ ปริมาณเอนไซม์แลคเคสที่ใช้ในการเปลี่ยนสาร ABTS 1 μmol ภายในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด (ค่าคงที่ของการดูดกลืนแสง (Extinction coefficient; ϵ) เท่ากับ $36,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)⁽¹⁰¹⁾

5.2.1.2 กิจกรรมของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส

ผสมสารละลาย 2,6-dimethoxyphenol (DMP) ความเข้มข้น 10 mM ปริมาตร 120 ไมโครลิตร สารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมทาร์เทรต ความเข้มข้น 250 mM (pH 4) ปริมาตร 240 ไมโครลิตร แมงกานีสซัลเฟต ความเข้มข้น 10 mM ปริมาตร 120 ไมโครลิตร และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 4 mM ปริมาตร 120 ไมโครลิตร จากนั้นเติมเอนไซม์สกัดหยาบปริมาตร 600 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 469 นาโนเมตร บันทึกค่าที่ 0 และ 60 วินาที นำค่าที่วัดได้ไปคำนวณหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์โดยกำหนดให้ 1 ยูนิตของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส คือ

ปริมาณเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสที่ใช้ในการเปลี่ยนสาร 2,6-dimethoxyphenol 1 μmol ภายในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด โดยค่าคงที่ของการดูดกลืนแสงเท่ากับ $10,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ⁽¹⁰¹⁾

5.2.1.3 กิจกรรมของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส

ผสมสารละลาย veratryl alcohol ความเข้มข้น 20 mM ปริมาตร 240 ไมโครลิตร สารละลายบัพเฟอร์โซเดียมทาร์เตรต ความเข้มข้น 250 mM (pH 4) ปริมาตร 240 ไมโครลิตร และ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 4 mM ปริมาตร 120 ไมโครลิตร จากนั้นเติมเอนไซม์สกัดหยาบปริมาตร 600 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร บันทึกค่าที่ 0 และ 60 วินาที นำค่าที่วัดได้ไปคำนวณหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์โดยกำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส คือ ปริมาณเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสที่ใช้ในการเปลี่ยนสาร veratryl alcohol 1 μmol ภายในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด โดยค่าคงที่ของการดูดกลืนแสงเท่ากับ $9,300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ⁽¹⁰¹⁾ ซึ่งสูตรการคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ มีดังนี้

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)} = (\Delta\text{Abs} \times V \times D) / \epsilon \times v \times t$$

หมายเหตุ: ΔAbs = ความแตกต่างระหว่างค่าการดูดกลืนแสงก่อนและหลังทำปฏิกิริยา
 V = ปริมาตรรวมของสารทั้งหมดในปฏิกิริยา (มิลลิลิตร) D = ระดับความเจือจาง ϵ = ค่าคงที่ของการดูดกลืนแสง (Extinction coefficient) v = ปริมาตรของเอนไซม์สกัดหยาบ (มิลลิลิตร) และ t = เวลาที่ใช้ในการบ่ม (นาที)

5.3 การศึกษาข้อมูลของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสเบื้องต้น

เตรียมอาหาร basal medium ที่ใช้แหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน และปรับค่า pH เริ่มต้นที่ได้จากการทดลองในข้อ 4 ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยวิธีสเตอริไลเซชัน ใส่ราตรีงจำนวน 5 ช้อน บ่มในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ ความเร็ว 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำมากรองแยกส่วนของราตรีงผ่านกระดาษกรอง whatman no.1 แล้วนำส่วนน้ำมาวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสตามวิธีการทดลองในข้อ 5.2.1.2 ก่อนนำไปตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ 80% ที่งัวข้ามคืน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ส่วนของน้ำ (supernatant) นำมาวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์เพื่อตรวจสอบว่ายังมีเอนไซม์เหลืออยู่หรือไม่ ส่วนของตะกอน

(pellet) นำมาละลายด้วยสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (sodium phosphate buffer) (pH 6) (ภาคผนวก ข) จากนั้นนำไปไดอะไลซิส (dialysis) โดยใส่ถุงไดอะไลซิสที่มีขนาดรูเท่ากับ 8 kDa แห้ในสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 6) จากนั้นนำส่วนเอนไซม์ในถุงไปวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส ตามวิธีการทดลองในข้อที่ 5.2.1.2 และวัดปริมาณโปรตีนรวม นอกจากนี้ได้นำส่วนของเอนไซม์ที่ได้ไปวิเคราะห์หาขนาดของเอนไซม์ด้วยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) และ native-PAGE

5.3.1 การวัดปริมาณโปรตีนรวม (total protein content) ด้วยวิธี Bradford assay

ผสมเอนไซม์สกัดหยาบปริมาตร 200 ไมโครลิตร กับสาร Bradford reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร นำค่าที่วัดได้ไปคำนวณหาค่าปริมาณโปรตีนรวม โดยเปรียบเทียบกับกราฟโปรตีนมาตรฐาน (standard curve) ของ bovine serum albumin โดยสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของ BSA กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

5.3.2 การศึกษาขนาดของเอนไซม์ด้วยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

การศึกษาขนาดของเอนไซม์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE สามารถทำได้โดยการแยกแถบโปรตีนผ่านเจลโพลีอะคริลาไมด์ (polyacrylamide gel) ใน running buffer (ภาคผนวก ข) โดยเตรียมเจลเป็น 2 ชั้น ได้แก่ ชั้นบน คือ 5% stacking gel และชั้นล่าง คือ 12% resolving gel (ภาคผนวก ข) จากนั้นผสมตัวอย่างเอนไซม์กับ sample buffer (ภาคผนวก ข) ในอัตราส่วน 1:1 (v/v) ปริมาตรรวม 30 ไมโครลิตร นำไปต้มเป็นเวลา 5 นาที แล้วหยอดลงในช่องเจลโดยใช้แถบโปรตีนมาตรฐาน (250 kDa protein standard) ในการเปรียบเทียบขนาด จากนั้นตั้งค่ากระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 120 โวลต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำเจลไปย้อมด้วย staining solution (ภาคผนวก ข) โดยใช้สี Coomassie Brilliant Blue R-250 และแช่ใน destain solution (ภาคผนวก ข) แล้วบันทึกภาพเจล

5.3.3 การศึกษาเอนไซม์ด้วยเทคนิค native-PAGE

การศึกษาเอนไซม์ด้วยเทคนิค native-PAGE สามารถทำได้โดยเตรียมเจลโพลีอะคริลาไมด์ใน running buffer เช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 5.3.2 จากนั้นผสมตัวอย่างเอนไซม์กับ sample buffer ที่ไม่ได้เติม β -mercaptoethanol ในอัตราส่วน 1:1 (v/v) ปริมาตรรวม 30 ไมโครลิตร และหยอดลงในช่องเจลโดยใช้แถบโปรตีนมาตรฐาน (250 kDa protein standard) ในการเปรียบเทียบขนาด จากนั้นตั้งค่ากระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 120 โวลต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

นำเจลไปทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสโดยแช่ใน solution A (ภาคผนวก ข) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และ solution B (ภาคผนวก ข) เป็นเวลา 30 นาที แล้วบันทึกภาพเจล ถ้าแถบแบบใด คือ เอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสจะทำปฏิกิริยากับสารละลายตั้งต้นเกิดเป็นแถบสีส้ม

6. การศึกษาความสัมพันธ์ของการลดสีข้อม การผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโอไลติกของราตริง และการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีของสีข้อม

6.1 ความสัมพันธ์ของการลดสีข้อมและการผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโอไลติก

เตรียมอาหาร basal medium ที่ใช้แหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน และปรับค่า pH เริ่มต้นที่ได้จากการทดลองในข้อ 4 ผสมกับสีข้อมเหลืองทิ้งโดยปรับให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 33% (v/v) จากนั้นทำให้ปราศจากเชื้อด้วยวิธีสเตอริไรเซชัน ทดสอบโดยใส่ราตริงจำนวน 5 ชี้น บ่มในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ ความเร็ว 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วัน บันทึกผลวันที่ 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 และ 20 วัน โดยนำมากรองแยกส่วนของราตริงผ่านกระดาษกรอง whatman no.1 แล้วนำส่วนน้ำไปวัดค่าต่าง ๆ ดังนี้ ค่า ADMI ค่าความ % decolourisation ตามวิธีการทดลองในข้อที่ 2 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลุ่มลิกนินโอไลติกตามวิธีการทดลองในข้อ 5.2.1 และค่า pH ส่วนของราตริงนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร 2 ครั้ง แล้ว อบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บในโถดูดความชื้น นาน 8 วัน หรือจนกว่าน้ำหนักคงที่ บันทึกผลน้ำหนักแห้ง จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างการลดสีข้อมเหลืองทิ้ง และการผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโอไลติก โดยใช้สถิติ correlation

6.2 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างสีข้อมด้วยเทคนิค UV-visible และ Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

ตัวอย่างน้ำภายหลังการย่อยสีข้อมด้วยราตริงในวันที่ 0, 4, 12 และ 20 นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยวิธีการสแกนความยาวคลื่นตั้งแต่ 320 ถึง 700 นาโนเมตร จากนั้นสกัดสารด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทในอัตราส่วน 1: 1 (v: v) จำนวน 3 รอบ แล้วระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง rotary evaporator นำไปวิเคราะห์สารสกัดโดยใช้เทคนิค Fourier Transform Infrared Spectroscopy ด้วยเครื่อง Shimadzu IR spectrometer (Model: Prestige 21)⁽⁹⁹⁾

7. การศึกษาประสิทธิภาพของราตรีงในการลดสีย้อมที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

เตรียมอาหาร basal medium ที่ใช้แหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน และปรับค่า pH เริ่มต้น ที่ให้ค่าการลดสีสูงสุดจากการทดลองในข้อ 4 ผสมกับสีย้อมเหลือทิ้งโดยปรับให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 4, 8, 17, 25, 33, 42, 50, 66, 83 และ 100% (v/v) ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยวิธีสเตอริไรเซชัน ทดสอบโดยใส่ราตรีงจำนวน 5 ช้อน นำไปบ่มในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ ความเร็ว 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 วัน บันทึกผลวันที่ 2, 4, 6 และ 8 โดยนำมากรองแยกส่วนของราตรีงผ่านกระดาษกรอง whatman no.1 แล้วนำส่วนน้ำไปวัดค่า ADMI คำนวณ % decolourisation ตามวิธีการทดลองในข้อที่ 2

8. การประเมินประสิทธิภาพของราตรีงในการนำกลับมาใช้ซ้ำเพื่อลดสีย้อมเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม

เตรียมอาหาร basal medium ที่ใช้แหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน และปรับค่า pH เริ่มต้น ที่ได้จากการทดลองในข้อ 4 ผสมกับสีย้อมเหลือทิ้งโดยปรับให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 4% (v/v) จากนั้นทำให้ปราศจากเชื้อด้วยวิธีสเตอริไรเซชัน ทดสอบโดยใส่ราตรีงจำนวน 5 ช้อน บ่มในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ ความเร็ว 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน บันทึกผลวันที่ 2 จากนั้นย้ายราตรีงมาใส่ในอาหาร basal medium ที่ผสมสีชุดใหม่ บ่มเป็นเวลา 2 วัน บันทึกผลวันที่ 2 ทำซ้ำจนกระทั่งประสิทธิภาพการลดสีของราตรีงลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยนำมากรองแยกส่วนของราตรีงผ่านกระดาษกรอง whatman no.1 แล้วนำส่วนน้ำไปวัดค่า ADMI คำนวณ % decolourisation ตามวิธีการทดลองในข้อที่ 2 วัดกิจกรรมของเอนไซม์กลุ่มลิกไนโนไลติกตามวิธีการทดลองในข้อ 5.2.1

9. การประเมินความสามารถของราตรีงในการลดสีย้อมเหลือทิ้งภายใต้สภาวะที่ไม่ปราศจากเชื้อ

เตรียมอาหาร basal medium ที่ใช้แหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน และปรับค่า pH เริ่มต้น ที่ได้จากการทดลองในข้อ 5 ผสมกับสีย้อมเหลือทิ้งโดยปรับให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 4, 8, 17 และ 25% (v/v) และเตรียมน้ำสีย้อมเหลือทิ้งที่ไม่เติมอาหาร basal medium ปรับให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 4, 8, 17 และ 25% (v/v) ทดสอบโดยใส่ราตรีงจำนวน 5 ช้อน บ่มในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ ความเร็ว 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 วัน บันทึกผลวันที่ 2, 4, 6 และ 8 โดยนำมากรองแยกส่วนของราตรีงผ่านกระดาษกรอง whatman no.1 แล้วนำส่วนน้ำไปวัดค่า ADMI คำนวณ % decolourisation ตามวิธีการทดลองในข้อที่ 2

10. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลทั้งหมดเกี่ยวกับการลดสีข้ม (% decolourisation) และกิจกรรมของเอนไซม์ (Enzyme activity) เป็นข้อมูลที่ทดสอบ 3 ซ้ำ วิเคราะห์ผลโดยใช้โปรแกรม SPSS statistics software เวอร์ชัน 25 โดยทดสอบค่าความแตกต่างทางสถิติด้วยเทคนิควิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับร้อยละ 95 ส่วนในหัวข้อความสัมพันธ์ระหว่างการลดสีข้มเหลือทิ้ง และความสามารถในการผลิตเอนไซม์กลุ่ม ลิกนินโอไลติกใช้สถิติ correlation



บทที่ 4

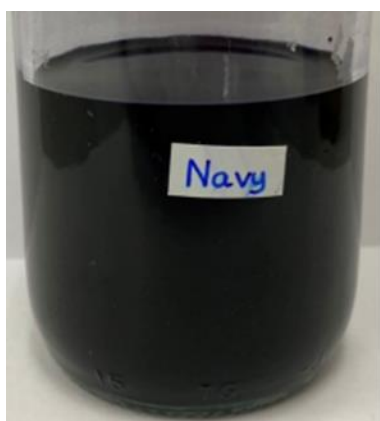
ผลการทดลอง

1. การคัดเลือกสายพันธุ์ราไวโรทที่สามารถลดสีน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมฟอกย้อม

1.1 คุณลักษณะเบื้องต้นของตัวอย่างน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมฟอกย้อม

ตัวอย่างน้ำทิ้งที่ใช้ในการศึกษาจำนวน 2 ตัวอย่าง ได้จากโรงงานอุตสาหกรรมฟอกย้อมจังหวัด สมุทรปราการ ได้แก่ ตัวอย่างสีย้อมเหลือทิ้งจากกระบวนการย้อมที่ยังไม่ผ่านระบบบำบัด และตัวอย่างสีน้ำทิ้งภายหลังจากการบำบัด (effluent) (ภาพประกอบ 11) โดยเลือกเฉพาะตัวอย่างสีย้อมเหลือทิ้งมาวิเคราะห์คุณลักษณะเบื้องต้นตามรายละเอียดที่อธิบายในบทที่ 3 ผลการวิเคราะห์พบว่าสีย้อมเหลือทิ้งมีสีน้ำเงินเข้ม ประกอบด้วยสีผสมของ Novacron Ruby S3B (NR-S3B), Novacron Navy EC-R (NEC-R) และ Novacron Super Black G (NSB-G) ซึ่งเป็นสีสังเคราะห์ในกลุ่มสีรีเอกทีฟในอัตราส่วน 0.52, 1.20 และ 0.96% มีค่า pH เท่ากับ 10 ค่าความเข้มข้นรวมเท่ากับ 60,100 ADMI ซึ่งเกินกว่าค่ามาตรฐานตามที่กระทรวงอุตสาหกรรมกำหนด (300 ADMI) ถึง 200 เท่า ปริมาณโลหะหนักที่ส่งวิเคราะห์จำนวน 11 ชนิด ได้แก่ สังกะสี (Zn) ทองแดง (Cu) แมงกานีส (Mn) นิกเกิล (Ni) แบเรียม (Ba) โครเมียม (Cr) แคดเมียม (Cd) ตะกั่ว (Pb) สารหนู (As) ปรอท (Hg) และซีลีเนียม (Se) ค่า BOD (Biochemical Oxygen Demand) ค่า COD (Chemical Oxygen Demand) รวมถึงสารเคมีอื่น ๆ ได้แก่ โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) และ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ผลแสดงในตาราง 7 ส่วนน้ำทิ้งภายหลังจากการบำบัดมีสีเหลือง มีตะกอนขนาดเล็กสีดำ ค่า pH เท่ากับ 8 และค่าความเข้มข้นรวมเท่ากับ 372 ADMI ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสีน้ำทิ้งด้วยวิธีการสแกนความยาวคลื่นตั้งแต่ 320 ถึง 700 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ พบว่าสีย้อมเหลือทิ้งมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร ส่วนน้ำทิ้งภายหลังจากการบำบัดไม่สามารถสแกนหาค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดได้ (ภาคผนวก ค ภาพประกอบ 1)

จากผลการวิเคราะห์ พบว่าตัวอย่างสีย้อมเหลือทิ้งมีค่าความเข้มข้นเกินค่ามาตรฐานตามที่กระทรวงอุตสาหกรรมกำหนดให้มีค่าไม่เกิน 300 ADMI สูงถึง 200 เท่า ค่า pH เกินค่ามาตรฐานที่กำหนดไว้ คือ pH 5-9 เมื่อเทียบกับค่ามาตรฐาน (ตาราง 7) นอกจากนี้ปริมาณ NaOH ยังมีมากถึง 0.85 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่ตัวอย่างน้ำทิ้งภายหลังจากการบำบัดมีเพียงค่าความเข้มข้นเท่านั้นที่เกินค่ามาตรฐานเพียงเล็กน้อย



A



B

ภาพประกอบ 11 ตัวอย่างน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมฟอกย้อม (A) สีย้อมเหลือทิ้งจากกระบวนการย้อมที่ยังไม่ผ่านระบบบำบัด (B) น้ำทิ้งภายหลังการบำบัดจากโรงงานอุตสาหกรรม

ตาราง 7 ลักษณะของน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมฟอกย้อม

พารามิเตอร์	สีย้อมเหลือทิ้ง	น้ำทิ้งหลังบำบัด	ค่ามาตรฐาน
ค่า pH	10	8	5-9
ค่าความเข้มข้นสีรวม (ADMI)	60,100	372	< 300
Novacron Ruby S3B (%)	0.52	-	-
Novacron Navy EC-R (%)	1.20	-	-
Novacron Super Black G (%)	0.96	-	-
โซเดียมคลอไรด์ (กรัมต่อลิตร)	70	-	-
โซเดียมคาร์บอเนต (กรัมต่อลิตร)	5	-	-
50% โซเดียมไฮดรอกไซด์ (มิลลิลิตรต่อลิตร)	0.85	-	-
ค่า BOD (มิลลิกรัมต่อลิตร)	29	-	< 20
ค่า COD (มิลลิกรัมต่อลิตร)	199	-	< 120
สังกะสี (มิลลิกรัมต่อลิตร)	0.052	-	< 5.0
โครเมียม (มิลลิกรัมต่อลิตร)	< 0.005	-	< 0.25
สารหนู (มิลลิกรัมต่อลิตร)	< 0.005	-	< 0.25

พารามิเตอร์	สีย้อมเหลือทิ้ง	น้ำทิ้งหลังบำบัด	ค่ามาตรฐาน
ทองแดง (มิลลิกรัมต่อลิตร)	0.091	-	< 2.0
ปรอท (มิลลิกรัมต่อลิตร)	< 0.001	-	< 0.005
แคดเมียม (มิลลิกรัมต่อลิตร)	< 0.005	-	< 0.03
แบเรียม (มิลลิกรัมต่อลิตร)	0.048	-	< 1.0
ซีลีเนียม (มิลลิกรัมต่อลิตร)	< 0.005	-	< 0.02
ตะกั่ว (มิลลิกรัมต่อลิตร)	< 0.005	-	< 0.2
นิกเกิล (มิลลิกรัมต่อลิตร)	0.005	-	< 1.0
แมงกานีส (มิลลิกรัมต่อลิตร)	0.017	-	< 5.0

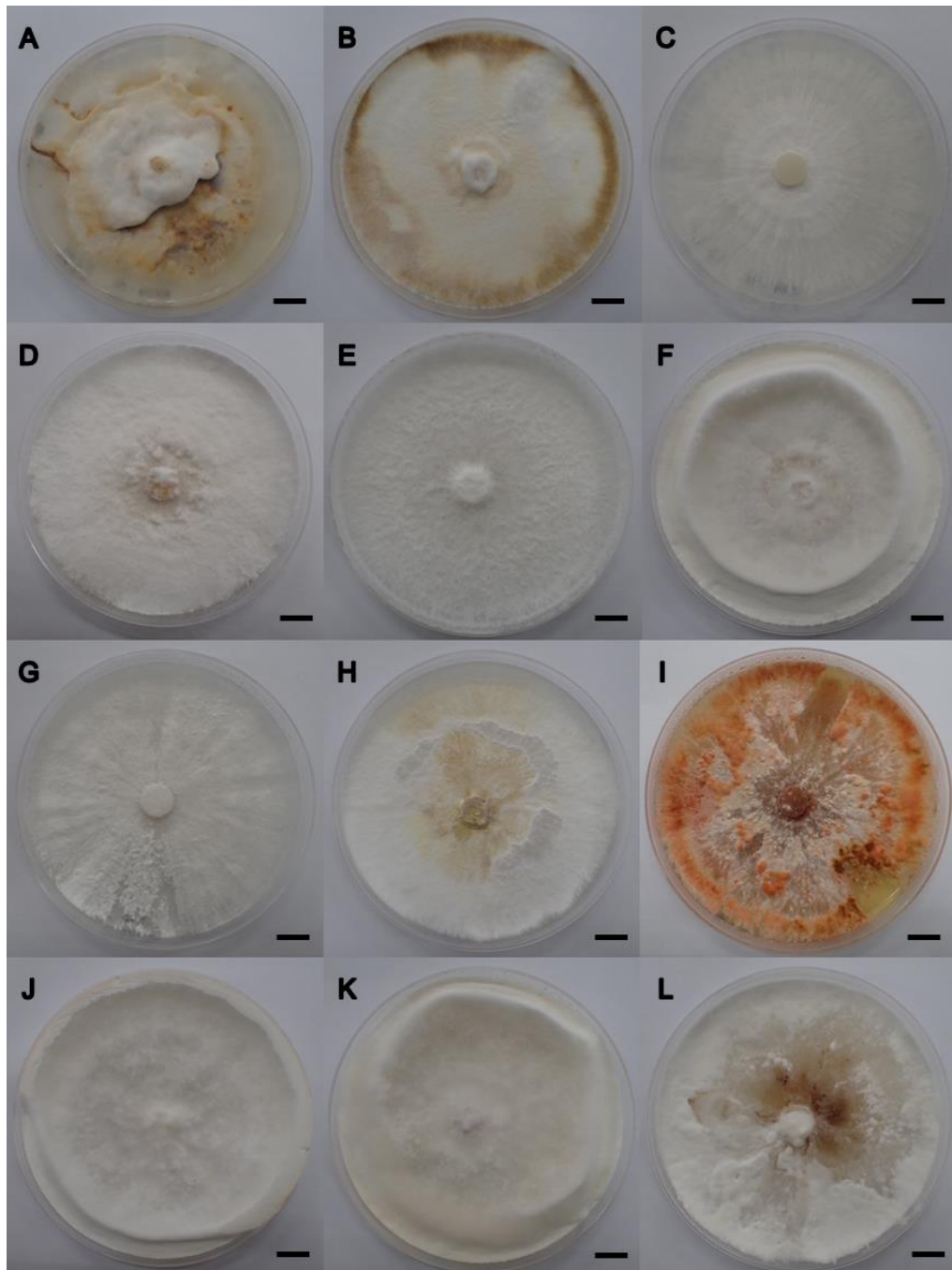
1.2 การคัดเลือกสายพันธุ์ราไวท์รอกที่สามารถลดสีน้ำทิ้ง

จากราไวท์รอกจำนวน 16 ไอโซเลท สามารถจัดจำแนกตามอนุกรมวิธานได้ 7 จีนัส 13 สปีชีส์ ได้แก่ *Amauroderma subresinosum*, *Corioloopsis aspera*, *C. retropecta*, *Dentipellis parmastoi*, *Ganoderma fornicatum*, *G. lingzhi*, *G. mastoporum*, *Microporus vernicipes*, *M. xanthopus*, *Pseudolagarobasidium* sp., *Trametes elegans*, *T. hirsuta* และ *T. sanguinea* (ภาพประกอบ 12) รายละเอียดและแหล่งที่มาของเชื้อแสดงในตาราง 6 ของบทที่ 2 นำมาทดสอบความสามารถในการลดสีย้อมเหลือทิ้งที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 4% (v/v) ซึ่งสามารถวัดค่า ADMI เริ่มต้นได้เท่ากับ 2,475 ADMI และน้ำทิ้งหลังผ่านการบำบัด พบว่าราไวท์รอกทั้ง 16 ไอโซเลท มีความสามารถในการลดสีย้อมเหลือทิ้งได้แตกต่างกันมีค่าอยู่ในช่วง 29.31-73.98% ดังแสดงในภาพประกอบ 13 และภาคผนวก ค ตาราง 1 โดย *T. hirsuta* PW17-41 และ *Pseudolagarobasidium* sp. PP17-33 สามารถลดสีย้อมได้สูงสุดเท่ากับ 73.98 และ 70.88% ตามลำดับ รองลงมาเป็น *T. sanguinea* PP17-18 ที่สามารถลดสีย้อมได้ 60.18% ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยราทั้ง 3 ไอโซเลท สามารถลดความเข้มข้นจากการเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และมีค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 นอกจากนี้เมื่อพิจารณาเฉพาะค่าความเข้มข้นสีแต่ละสี พบว่าราทั้ง 3 ไอโซเลท สามารถลดสีชนิดต่าง ๆ ที่ผสมรวมอยู่ในสีย้อมเหลือทิ้งได้ โดยลดสี NR-S3B ได้ 81.95, 78.58 และ 60.15% ลดสี NEC-R ได้ 94.76, 92.59 และ 59.86% ลดสี NSB-G ได้ 93.84, 91.84 และ 58.49% เมื่อวัด

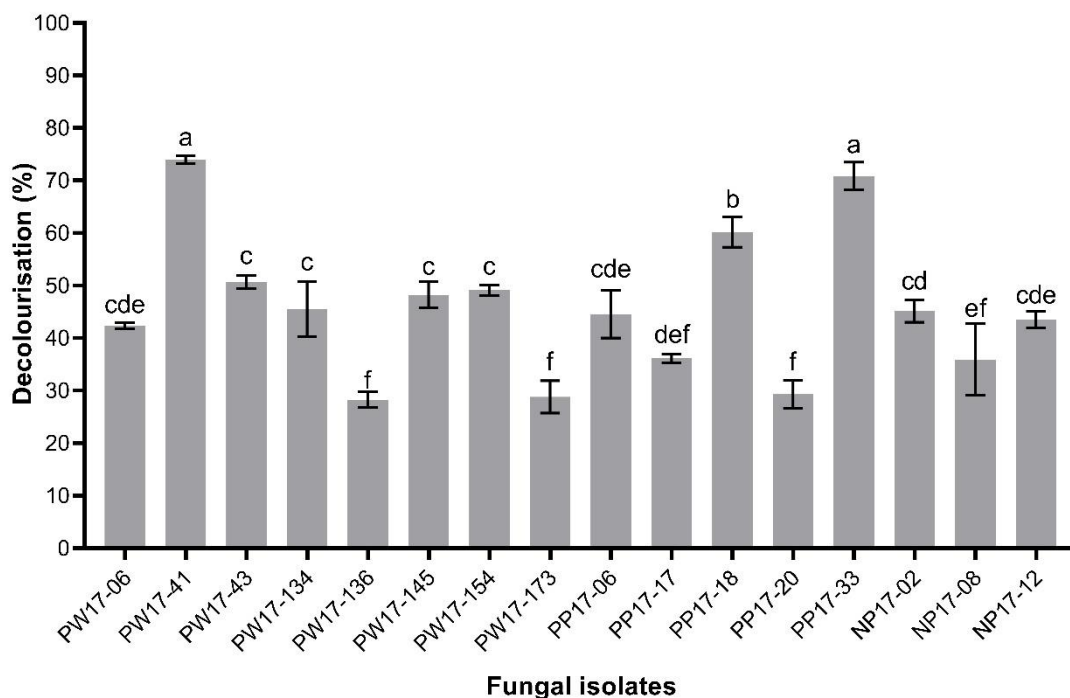
ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 545, 600 และ 608 นาโนเมตร ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ค่าความเข้มข้นรวมภายหลังการทดสอบยังมีค่าเกินมาตรฐานทุกไอโซเลท

ส่วนผลการทดสอบความสามารถในการลดสีน้ำทิ้งหลังผ่านการบำบัด 100% (v/v) พบว่ามีราไทรอทจำนวน 12 ไอโซเลท ได้แก่ *C. aspera* NP17-08, *C. retropecta* PW17-134, *G. fornicatum* PW17-145, *G. mastoporum* PW17-06, PW17-154, *M. vernicipes* PW17-173, *M. xanthopus* PP17-17, PP17-20, *Pseudolagarobasidium* sp. PP17-33, *T. elegans* PP17-06, *T. hirsuta* PW17-41 และ *T. sanguinea* PP17-18 ที่สามารถลดสีน้ำทิ้งได้โดยมีค่าอยู่ในช่วง 1.88-21.77% (ภาคผนวก ค ภาพประกอบ 2) และมีเพียง 2 ไอโซเลท ได้แก่ *T. hirsuta* PW17-41 และ *T. sanguinea* PP17-18 ที่สามารถลดค่าความเข้มข้น จาก 372 ADMI ให้เหลือเท่ากับ 291 (21.77%) และ 299 (19.62%) ADMI ซึ่งผ่านมาตรฐานน้ำทิ้งที่สามารถปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อมได้ ภายในเวลา 7 วัน ภายใต้สภาวะการเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

จากผลการทดลองจึงเลือก *T. hirsuta* PW17-41 ที่สามารถลดความเข้มข้นของน้ำทิ้งทั้งสองตัวอย่างได้สูงที่สุดมาใช้ในการทดลองต่อไป เพื่อบำบัดน้ำเสียที่เหลือทิ้งที่ยังไม่ผ่านมาตรฐาน



ภาพประกอบ 12 ตัวอย่างราบริสุทธิ์ที่เจริญบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน (A) *C. aspera* NP17-02 (B) *A. subresinosum* NP17-12 (C) *T. elegans* PP17-06 (D) *M. xanthopus* PP17-17 (E) *Pseudolagarobasidium* sp. PP17-33 (F) *G. mastoporum* PW17-06 (G) *T. hirsuta* PW17-41 (H) *G. lingzhi* PW17-43 (I) *T. sanguinea* PP17-18 (J) *G. fornicatum* PW17-145 (K) *G. mastoporum* PW17-154 (L) *M. vernicipes* PW17-173 บาร์ (Bars) ของรูป A-L เท่ากับ 1 เซนติเมตร



ภาพประกอบ 13 ประสิทธิภาพการลดสีย้อมเหลือทิ้ง (% decolourisation) ที่ความเข้มข้น 4% (v/v) โดยราไวท์รอตจำนวน 16 ไอโซเลท ภายในเวลา 7 วัน ภายใต้สภาวะการเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5

หมายเหตุ: ข้อมูลแสดง mean \pm standard deviation และวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้ one-way ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับร้อยละ 95 ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็ก (a-f) คือ ค่าทางสถิติของประสิทธิภาพการลดสีย้อมเหลือทิ้ง

2. การทดสอบหาวัสดุตรึงที่เหมาะสมต่อราไวท์รอต *T. hirsuta* PW17-41

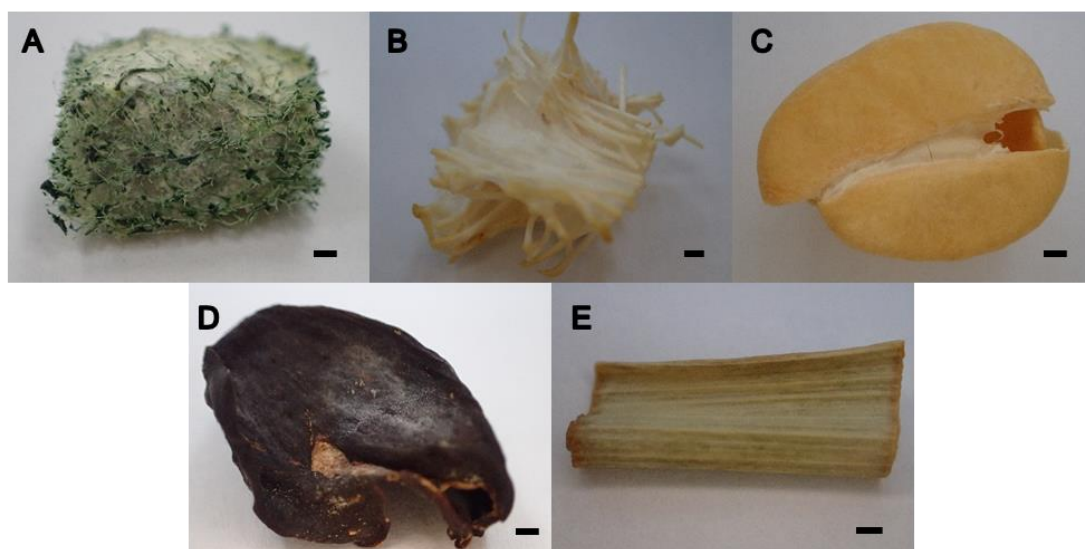
เนื่องจากงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการเพิ่มประสิทธิภาพการลดความเข้มข้นของน้ำทิ้งโดยใช้เทคนิคการตรึงเซลล์ จึงได้คัดเลือกหาวัสดุตรึงที่เหมาะสมต่อสายพันธุ์ราที่คัดเลือก คือ *T. hirsuta* PW17-41 โดยใช้วัสดุตรึงจำนวน 5 ชนิด ได้แก่ ฟองน้ำไนลอน ไบโสบัปเปอร์ ไบโบบบ เปลือกเมล็ดกาแฟ และกะลากาแฟ ภายใต้สภาวะการตรึงแบบเขย่าในอาหาร PDB ที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ผลการทดสอบแสดงในตาราง 8 และภาพประกอบ 14 พบว่าฟองน้ำไนลอนเป็นวัสดุตรึงที่มีความเหมาะสมมากที่สุดสำหรับการตรึงเซลล์ของ *T. hirsuta* PW17-41 เนื่องจากมีค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งของเส้นใยรามากที่สุดเท่ากับ 0.375 ± 0.013 กรัม ภายหลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน รองลงมาเป็นไบโบบบที่มีค่าเฉลี่ยน้ำหนัก

แห้งของเส้นใยราเท่ากับ 0.255 ± 0.021 กรัม ส่วนเปลือกเมล็ดกาแฟ และใบสับปะรด มีค่าเฉลี่ย น้ำหนักแห้งของเส้นใยราน้อยที่สุด จากภาพประกอบ 14 แสดงให้เห็นว่าเมื่อตริง *T. hirsuta* PW17-41 ด้วยฟองน้ำไนลอน และใยบวบ เส้นใยราสามารถเจริญแทรกเข้าไปในช่องว่างต่าง ๆ ของวัสดุตริงทั้งสองชนิดได้อย่างทั่วถึง เพราะประกอบด้วยรูพรุน ซึ่งฟองน้ำไนลอนมีรูพรุนมากกว่า ใยบวบ จากนั้นเส้นใยราเจริญคลุมทั้งวัสดุตริง ส่วนกะลากาแฟ และเปลือกเมล็ดกาแฟมีเส้นใยราเจริญยึดเกาะอยู่รอบ ๆ พื้นผิวเล็กน้อย ในขณะที่ใบสับปะรดไม่พบเส้นใยราบนวัสดุตริงเมื่อศึกษา ภายใต้กล้องสเตอริโอไมโครสโคป ดังนั้นจึงเลือกฟองน้ำไนลอนมาใช้ในการตริงเซลล์ของ *T. hirsuta* PW17-41 ในการทดลองต่อไป

ตาราง 8 มวลชีวภาพของ *T. hirsuta* PW17-41 บนวัสดุตริงทั้ง 5 ชนิด ภายหลังจากการตริงเซลล์

วัสดุตริง	น้ำหนักแห้งของรา <i>T. hirsuta</i> (กรัม)
ฟองน้ำไนลอน	0.375 ± 0.013^a
ใยบวบ	0.255 ± 0.021^b
กะลากาแฟ	0.099 ± 0.007^c
เปลือกผลกาแฟ	-0.432 ± 0.002^e
ใบสับปะรด	-0.161 ± 0.002^d

หมายเหตุ: ข้อมูลแสดง mean \pm standard deviation และวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้ one-way ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับร้อยละ 95 ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็ก (a-e) คือ ค่าทางสถิติของน้ำหนักแห้งของรา *T. hirsuta* PW17-41



ภาพประกอบ 14 การเจริญของเส้นใย *T. hirsuta* PW17-41 บนวัสดุตั้งทิ้ง 5 ชนิด ในอาหาร PDB นาน 5 วัน ภายใต้สภาวะการเขย่าที่ 120 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (A) ฟองน้ำไนลอน (B) ไยบวบ (C) กะลากาแฟ (D) เปลือกเมล็ดกาแฟ และ (E) ไม้สับปะรด บาร์ (Bars) ของรูป A-E เท่ากับ 1 มิลลิเมตร

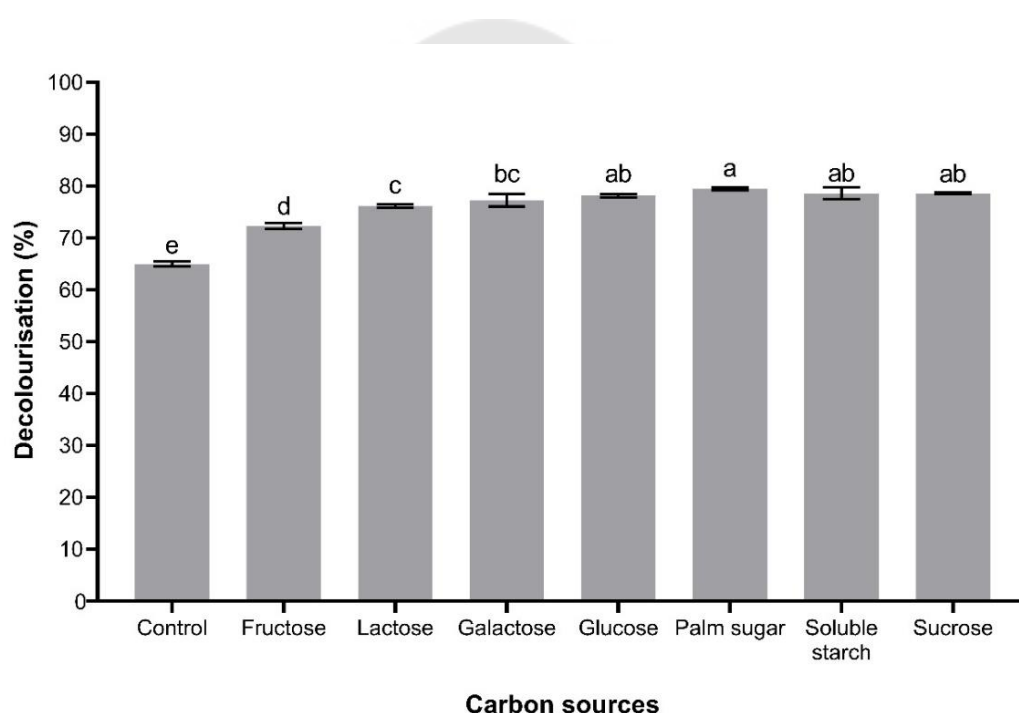
3. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการลดสีย้อมเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมโดยใช้ราตริง

จากผลการทดลองก่อนหน้า *T. hirsuta* PW17-41 ที่ถูกตรึงบนฟองน้ำไนลอน นำมาใช้ในการหาสภาวะที่สามารถลดความเข้มของสีย้อมเหลือทิ้งได้ดีที่สุดโดยพิจารณาจากผลของปัจจัยต่าง ๆ ดังนี้ แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ค่า pH เริ่มต้น และความเร็วรอบในการเขย่า

3.1 ผลของแหล่งคาร์บอน

ผลของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการลดความเข้มของสีย้อมด้วยราตริง *T. hirsuta* PW17-41 โดยใช้แหล่งคาร์บอนจำนวน 7 ชนิด ได้แก่ กลูโคส ซูโครส ฟรักโทส แลคโทส กาแลคโทส น้ำตาลปี๊บ และแป้ง ผลแสดงในภาพประกอบ 15 และภาคผนวก ค ตาราง 2 พบว่าเมื่อใช้กลูโคส ซูโครส น้ำตาลปี๊บ และแป้ง เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสีย้อมความเข้มข้น 4% (v/v) ที่มีค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 ภายใต้สภาวะแบบเขย่า 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน พบว่าราตริงสามารถลดสีย้อมได้สูงสุดเท่ากับ 78.19, 78.61, 79.47 และ 79.28% ซึ่งไม่แตกต่างกันมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยสามารถลดค่าความเข้มสีรวมจาก 2,475 ADMI เหลือเท่ากับ 547, 545, 519 และ 525 ADMI ตามลำดับ ภายในระยะเวลา 2 วัน ภายใต้สภาวะการเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ

30 องศาเซลเซียส ค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 และราตรีงสามารถลดความเข้มของสีข้อมได้ น้อยที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอน คือฟรักโทส โดยสามารถลดสีได้ 72.34% ส่วน ชูดควบคุมที่ไม่เติมแหล่งคาร์บอน พบว่าราตรีงสามารถลดสีข้อมได้เพียง 64.98% โดยลดค่า ความเข้มสีรวมจาก 2,475 ADMI เหลือเท่ากับ 907 ADMI อย่างไรก็ตามยังไม่มีสภาวะใดที่ สามารถลดความเข้มสีข้อมให้ต่ำกว่ามาตรฐานได้ ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงเลือกใช้น้ำตาลบีบ ซึ่งมีความถูกและมีค่าเฉลี่ยในการลดความเข้มสีที่สูงที่สุดมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการลด สีข้อมด้วยราตรีงในการทดลองต่อไป



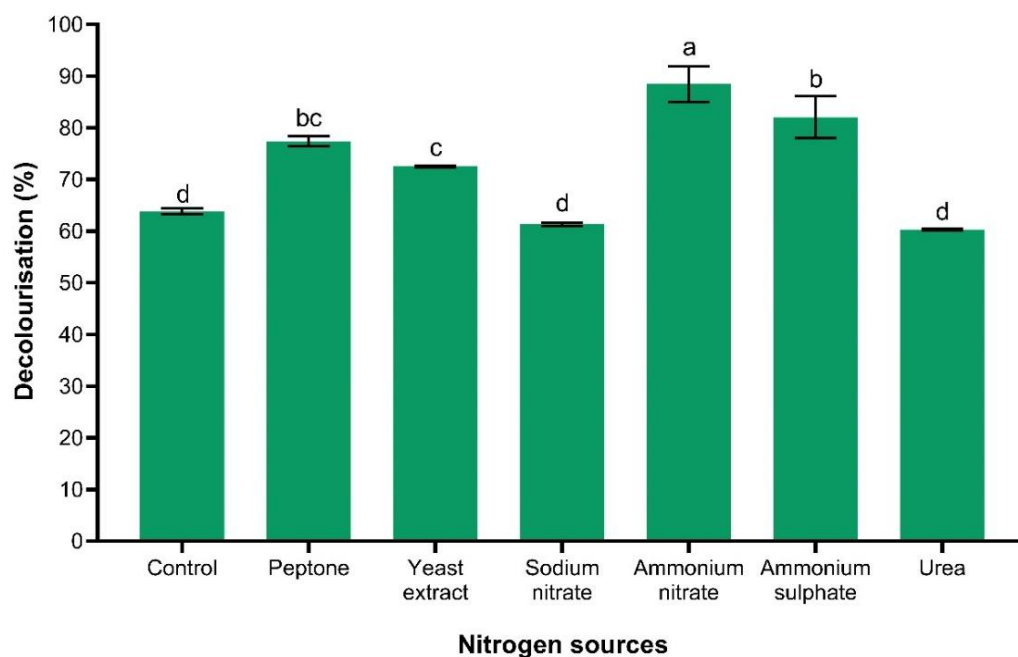
ภาพประกอบ 15 ประสิทธิภาพการลดสีข้อมเหลือทิ้ง (% decolourisation) ที่ความเข้มข้น 4% (v/v) โดยราตรีง *T. hirsuta* PW17-41 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ (กลูโคส ซูโครส ฟรักโทส แลคโทส กาแลคโทส น้ำตาลบีบ แป้ง และ ชูดควบคุมที่ไม่เติมแหล่งคาร์บอน) ในระยะเวลา 2 วัน ภายใต้สภาวะแบบเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ

5.5

หมายเหตุ: ข้อมูลแสดง mean \pm standard deviation และวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้ one-way ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับร้อยละ 95 ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็ก (a-e) คือ ค่าทางสถิติของประสิทธิภาพการลดสีข้อมเหลือทิ้ง

3.2 ผลของแหล่งไนโตรเจน

ผลของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการลดความเข้มข้นของสีด้วยราตริง *T. hirsuta* PW17-41 โดยใช้แหล่งคาร์บอน คือ น้ำตาลปี๊บ และแหล่งไนโตรเจนจำนวน 6 ชนิด ได้แก่ เปปโติน ยีสต์สกัด แอมโมเนียมซัลเฟต โซเดียมไนเตรท แอมโมเนียมไนเตรท และยูเรีย โดยปรับค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 ภายใต้สภาวะแบบเขย่า 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน ผลแสดงในภาพประกอบ 16 และภาคผนวก ค ตาราง 3 เมื่อใช้แอมโมเนียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสีย้อมความเข้มข้น 4% (v/v) พบว่าราตริงสามารถลดความเข้มข้นสีย้อมได้สูงสุดเท่ากับ 87.81% โดยลดค่าความเข้มข้นสีรวมจาก 2,475 ADMI เหลือเท่ากับ 270 ADMI ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 นอกจากนี้จากผลการทดลองยังพบว่าเมื่อใช้โซเดียมไนเตรท และยูเรีย เป็นแหล่งไนโตรเจน จะส่งผลให้การลดความเข้มข้นของสีย้อมได้น้อยที่สุดเท่ากับ 61.33 และ 60.30% ตามลำดับ ไม่ต่างจากชุดควบคุมที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจน ซึ่งราตริงสามารถลดความเข้มข้นของสีย้อมได้เพียง 63.79% ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงเลือกใช้แอมโมเนียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับการลดสีย้อมด้วยราตริง



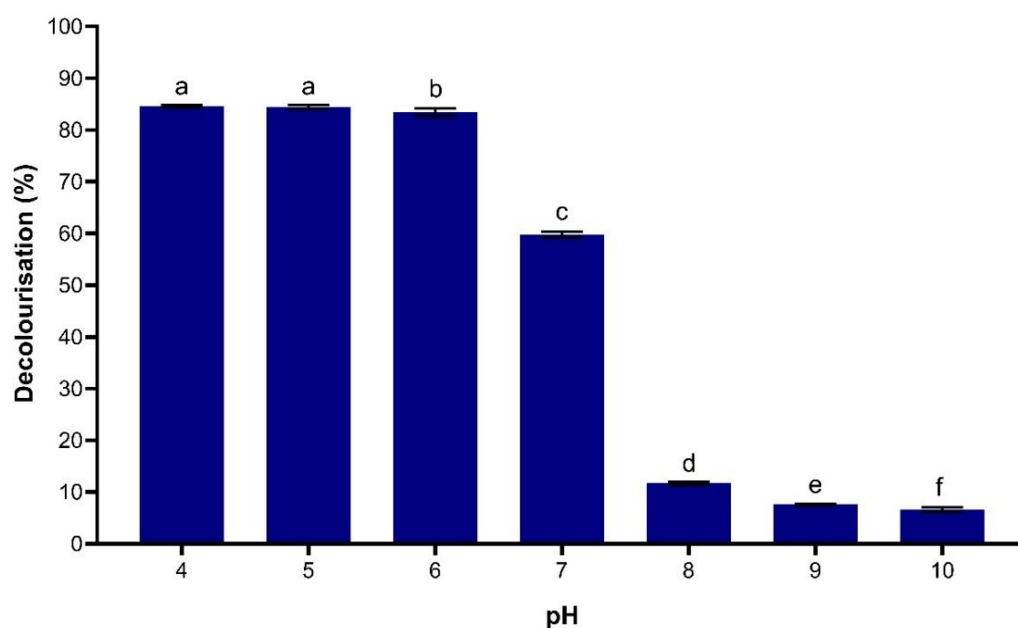
ภาพประกอบ 16 ประสิทธิภาพการลดสีข้อมเหลืองทิ้ง (% decolourisation) ที่ความเข้มข้น 4% (v/v) โดยราตรีง *T. hirsuta* PW17-41 เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ (เปปโตเน ยีสต์สกัด แอมโมเนียมซัลเฟต โซเดียมไนเตรท แอมโมเนียมไนเตรท ยูเรีย และชุดควบคุมที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจน) ในระยะเวลา 2 วัน ภายใต้สภาวะแบบเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5

หมายเหตุ: ข้อมูลแสดง mean \pm standard deviation และวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้ one-way ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับร้อยละ 95 ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็ก (a-d) คือ ค่าทางสถิติของประสิทธิภาพการลดสีข้อมเหลืองทิ้ง

3.3 ผลของค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

ผลของค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสีข้อมความเข้มข้น 4% (v/v) ที่เหมาะสมต่อการลดความเข้มของสีข้อมด้วยราตรีง *T. hirsuta* PW17-41 โดยใช้แหล่งคาร์บอนคือน้ำตาลปีบ แหล่งไนโตรเจนคือ แอมโมเนียมไนเตรท และปรับค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อจำนวน 7 ค่า ได้แก่ 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 เลี้ยงภายใต้สภาวะแบบเขย่า 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน ผลแสดงในภาพประกอบ 17 และภาคผนวก ค ตาราง 4 เมื่อปรับค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีค่าเท่ากับ 4 และ 5 พบว่าราตรีงสามารถลดความเข้ม

ของสีย้อมได้สูงสุดเท่ากับ 84.57 และ 84.40% โดยลดค่าความเข้มของสีย้อมจาก 2,475 ADMI ให้เหลือเท่ากับ 375 และ 377 ADMI ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกันมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เมื่อเพิ่มค่า pH เริ่มต้นให้สูงขึ้น พบว่าประสิทธิภาพในการลดความเข้มของสีย้อมมีค่าลดลง ตัวอย่างเช่นที่ pH เริ่มต้นเท่ากับ 7 ราตรีงสามารถลดความเข้มของสีย้อมได้เท่ากับ 59.79% และเมื่อค่า pH เพิ่มขึ้นเท่ากับ 8 และ 9 ประสิทธิภาพในการลดความเข้มของสีย้อมเหลือเพียง 11.72 และ 7.60% ตามลำดับ และที่ค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 10 ราตรีงสามารถลดความเข้มของสีย้อมได้น้อยที่สุดเท่ากับ 6.58% ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงทำการปรับค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสีย้อมเท่ากับ 5 เนื่องจาก pH 5 อยู่ในช่วงมาตรฐานของน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมสิ่งทอซึ่งต้องมีค่า pH อยู่ในช่วง 5-9

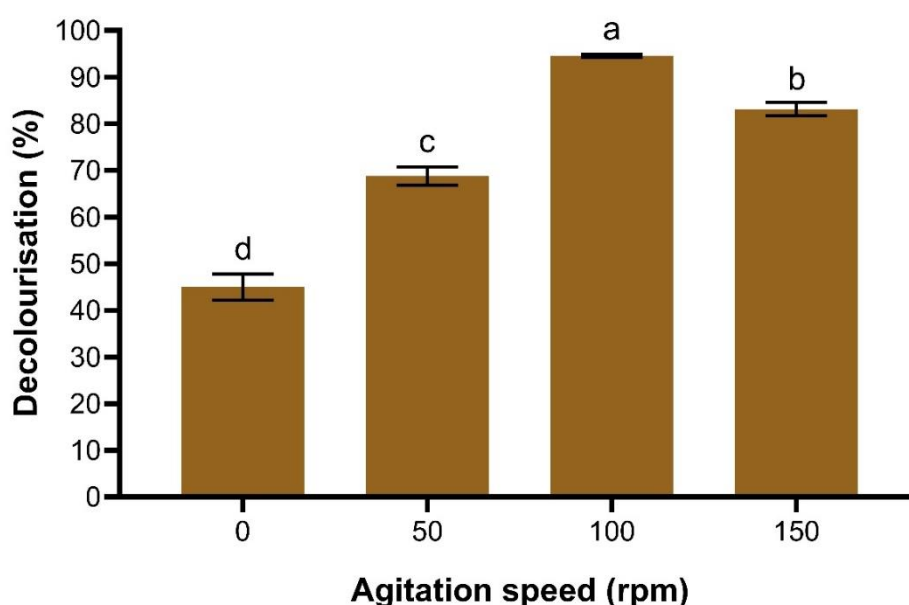


ภาพประกอบ 17 ประสิทธิภาพการลดสีย้อมเหลือทิ้ง (% decolourisation) ที่ความเข้มข้น 4% (v/v) โดยราตรีง *T. hirsuta* PW17-41 เมื่อปรับค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ (4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10) ในระยะเวลา 2 วัน ภายใต้สภาวะแบบเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

หมายเหตุ: ข้อมูลแสดง mean \pm standard deviation และวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้ one-way ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับร้อยละ 95 ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็ก (a-f) คือ ค่าทางสถิติของประสิทธิภาพการลดสีย้อมเหลือทิ้ง

3.4 ผลของความเร็วยกวนในการเขย่า

ผลของความเร็วยกวนในการเขย่าที่เหมาะสมต่อการลดความเข้มของสีข้อมด้วยราตรีง *T. hirsuta* PW17-41 โดยใช้แหล่งคาร์บอน คือ น้ำตาลปี๊บ แหล่งไนโตรเจน คือ แอมโมเนียมไนเตรท ปรับค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5 และนำไปเลี้ยงในสภาวะแบบเขย่าที่ความเร็วยกวน 0, 50, 100 และ 150 รอบต่อนาที ผลแสดงในภาพประกอบ 18 และภาคผนวก ค ตาราง 5 พบว่าเมื่อนำราตรีงไปเลี้ยงในสภาวะที่มีการเขย่าที่ความเร็วยกวน 100 รอบต่อนาที ราตรีงมีความสามารถในการลดความเข้มของสีข้อมสูงสุดเท่ากับ 94.60% โดยลดค่าความเข้มของสีข้อมจาก 2,475 ADMI ให้เหลือเท่ากับ 114 ADMI ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ในขณะที่เมื่อนำไปเลี้ยงในสภาวะที่ไม่มีการเขย่าราตรีงจะมีความสามารถในการลดสีข้อมน้อยที่สุดเท่ากับ 45.01% ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมต่อการลดความเข้มของสีข้อมด้วยราตรีง *T. hirsuta* PW17-41 คือการใช้แหล่งคาร์บอน คือ น้ำตาลปี๊บ แหล่งไนโตรเจน คือ แอมโมเนียมไนเตรท ปรับค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5 และเลี้ยงในสภาวะแบบเขย่าที่ความเร็วยกวน 100 รอบต่อนาที ซึ่งสามารถลดความเข้มของสีข้อมโดยรวมได้ต่ำกว่าค่ามาตรฐานตามที่กระทรวงอุตสาหกรรมกำหนด



ภาพประกอบ 18 ประสิทธิภาพการลดสีข้อมเหลือทิ้ง (% decolourisation) ที่ความเข้มชั้น 4% (v/v) โดยราตรีง *T. hirsuta* PW17-41 เมื่อเลี้ยงในสภาวะแบบเขย่าที่ความเร็วยกวนต่าง ๆ (0, 50, 100 และ 150 รอบต่อนาที) ในระยะเวลา 2 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

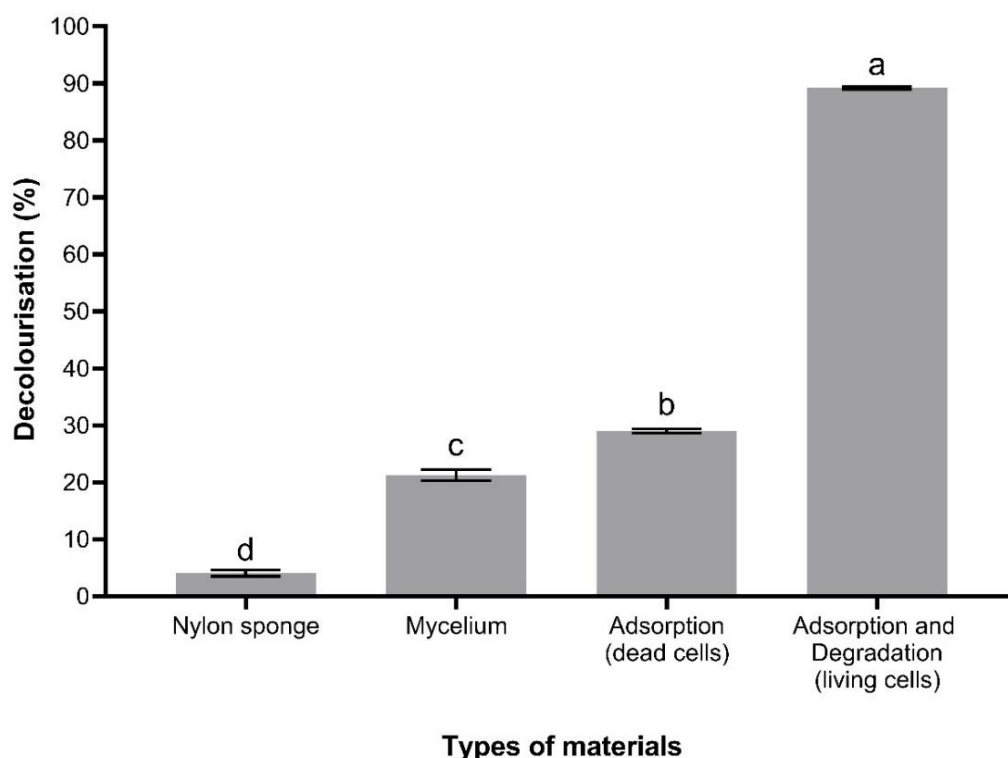
หมายเหตุ: ข้อมูลแสดง mean \pm standard deviation และวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้ one-way ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับร้อยละ 95 ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็ก (a-d) คือ ค่าทางสถิติของประสิทธิภาพการลดสีย้อมเหลือทิ้ง

4. กลไกการลดความเข้มของสีย้อมโดยการดูดซับ และการย่อยสลายทางชีวภาพด้วย เอนไซม์ของราตริง *T. hirsuta* PW17-41

เนื่องจากผลการทดลองก่อนหน้า พบว่าในสภาวะควบคุมที่ไม่เติมแหล่งคาร์บอน หรือ ไนโตรเจน หรือการเลี้ยงภายใต้สภาวะที่ไม่เขย่า ราตริง *T. hirsuta* PW17-41 สามารถลดความเข้มของสีย้อมได้แม้ว่าสภาวะดังกล่าวไม่ได้ส่งเสริมการเจริญของเส้นใยก็ตาม ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากกลไกของราตริงในการดูดซับสี และ/หรือ การย่อยสลายสีด้วยเอนไซม์ ดังนั้นในหัวข้อนี้จึงทำการศึกษากลไกการลดสีย้อมจากราตริงดังกล่าว

4.1 กลไกการลดความเข้มของสีย้อมโดยใช้ราตริง *T. hirsuta* PW17-41

จากการทดสอบเพื่อศึกษากลไกในการลดความเข้มของสีย้อมโดยใช้ราตริง *T. hirsuta* PW17-41 ที่ผ่านการนิ่งฆ่าเชื้อและไม่นิ่งฆ่าเชื้อ รวมทั้งวัสดุตั้งฟองน้ำไนลอน และเส้นใยที่ไม่ได้ตรึงบนวัสดุ นำมาลดสีย้อมที่ความเข้มข้น 4% (v/v) ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม คือ ใช้น้ำตาลปี๊บ และแอมโมเนียมไนเตรท เป็นแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจน ตามลำดับ มีค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 5 ภายใต้สภาวะแบบเขย่า 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน พบว่าราตริงที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว สามารถดูดซับสีย้อมได้โดยลดความเข้มสีได้เท่ากับ 28.98% (ภาพประกอบ 19 และภาคผนวก ค ตาราง 6) ส่วนฟองน้ำไนลอนที่ไม่ได้ตรึงรา พบว่าสามารถดูดซับสีย้อมได้เท่ากับ 4.04% แสดงให้เห็นว่าเฉพาะเส้นใยเฉพาะเส้นใยบนวัสดุตั้งสามารถดูดซับสีย้อมได้ประมาณ 24.94% ในขณะที่ราตริงที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อสามารถลดความเข้มของสีย้อมได้สูงที่สุดเท่ากับ 89.21% ทำให้สามารถลดความเข้มสีย้อมจาก 2,475 ADMI เหลือเพียง 267 ADMI ซึ่งผ่านค่ามาตรฐานกระทรวงอุตสาหกรรม ซึ่งแสดงให้เห็นว่ากลไกหลักในการลดสีย้อม คือการย่อยสลายทางชีวภาพด้วยเอนไซม์ซึ่งลดความเข้มสีได้ประมาณ 60.23% ร่วมกับการดูดซับสี นอกจากนี้เมื่อนำเฉพาะเส้นใยที่ไม่ได้ตรึงมาใช้ในการลดสีย้อม พบว่าสามารถลดความเข้มสีได้เท่ากับ 21.28% ซึ่งเป็นการยืนยันว่าราตริงมีประสิทธิภาพในการลดสีดีกว่าเส้นใยที่ไม่ตรึงอีกด้วย



ภาพประกอบ 19 ประสิทธิภาพการลดสีย้อม (% decolourisation) ที่ความเข้มข้น 4% (v/v) ของฟองน้ำไนลอนที่ไม่ได้ตรึงรา เส้นใยราที่ไม่ได้ตรึงบนวัสดุ ราตรึงที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ และราตรึงที่ไม่ได้ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ ภายในระยะเวลา 2 วัน ภายใต้สภาวะแบบเขย่าที่ 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และปรับค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 5

หมายเหตุ: ข้อมูลแสดง mean \pm standard deviation และวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้ one-way ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับร้อยละ 95 ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็ก (a-d) คือ ค่าทางสถิติของประสิทธิภาพการลดสีย้อมเหลือทิ้ง

4.2 การวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลุ่มลิกนินโกลติกของราตรึง *T. hirsuta* PW17-41

จากผลการทดลองในหัวข้อ 4.1 พบว่ากลไกหลักของราตรึง *T. hirsuta* PW17-41 ในการลดความเข้มของสีย้อม คือ การย่อยสลายสีย้อมด้วยเอนไซม์ ดังนั้นในหัวข้อนี้ได้ทำการทดลองเพื่อยืนยัน โดยการวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลุ่มลิกนินโกลติก 3 ชนิด ได้แก่ เอนไซม์แลคเคส แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส และลิกนินเปอร์ออกซิเดส ผลแสดงในตาราง 9 พบว่าราตรึงที่ไม่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ สามารถผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสได้สูงที่สุดเท่ากับ 532.09 หน่วยต่อลิตร

รองลงมาเป็นเอนไซม์แลคเคสเท่ากับ 137.80 ยูนิตต่อลิตร เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 2 วัน ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจากผลการทดลองหัวข้อ 3 และไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส ส่วนราตริงที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ และฟองน้ำในลอนที่ไม่ได้ตริงราไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด ในขณะที่เส้นใยราที่ไม่ได้ตริงบนวัสดุมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์น้อยกว่าราตริง โดยพบกิจกรรมของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส และแลคเคส เท่ากับ 202.80 และ 35.26 ยูนิตต่อลิตรตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับประสิทธิภาพในการลดความเข้มข้นของสีย้อมในการทดลองหัวข้อ 3 อีกด้วย

ตาราง 9 กิจกรรมของเอนไซม์กลุ่มลิกนินโอไลติก (แลคเคส และแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส) ของฟองน้ำในลอนที่ไม่ได้ตริงรา เส้นใยราที่ไม่ได้ตริงบนวัสดุ ราตริงที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ และราตริงที่ไม่ได้ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ

ชนิดของวัสดุ	กิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิตต่อลิตร)	
	แลคเคส	แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส
ฟองน้ำในลอนที่ไม่ได้ตริงรา	0.00±0.00 ^C	0.00±0.00 ^C
เส้นใยราที่ไม่ได้ตริงบนวัสดุ	35.26±1.64 ^B	202.80±10.03 ^b
ราตริงที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ	0.00±0.00 ^C	0.00±0.00 ^C
ราตริงที่ไม่ได้ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ	137.80±24.44 ^A	532.09±52.77 ^a

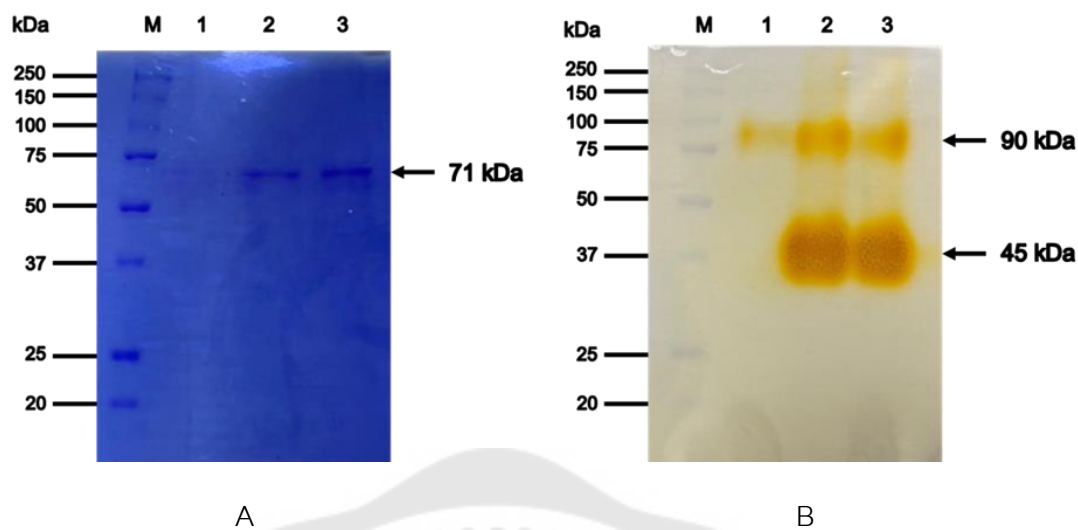
หมายเหตุ: ข้อมูลแสดง mean ± standard deviation และวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้ one-way ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับร้อยละ 95 ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ (A-C) คือ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์แลคเคส ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็ก (a-c) คือ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส

4.3 การหาน้ำหนักมวลโมเลกุลของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสด้วยวิธี SDS-PAGE และ native-PAGE

จากผลการทดลองในหัวข้อ 4.2 พบว่าเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส เป็นเอนไซม์หลักที่มีบทบาทในการย่อยสลายสีย้อม จึงศึกษาหาน้ำหนักมวลโมเลกุลของเอนไซม์ดังกล่าวด้วยวิธี SDS-PAGE และ native-PAGE โดยนำตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อของราตริง *T. hirsuta* PW17-41 ที่เลี้ยงในอาหาร basal medium ปริมาตร 1 ลิตร ภายใต้สภาวะแบบเขย่าที่ 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มากรองผ่านกระดาษกรอง whatman no.1 เพื่อแยกส่วนของเส้นใยรา

ออก แล้วนำส่วนน้ำมาตกตะกอนเอนไซม์ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 80% (w/v) จากนั้นนำมา
กำจัดเกลือด้วยการไดอะไลซิสแล้วหาน้ำหนักมวลดโมเลกุลของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิ
เดสด้วยวิธี SDS-PAGE โดยนำไปย้อมสี Coomassie Brilliant Blue R-250 ผลการทดลองแสดง
ในภาพประกอบ 20A พบแถบแบนโปรตีนจำนวน 1 แถบ ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 71 kDa เมื่อ
เทียบเคียงขนาดกับแถบแบนโปรตีนมาตรฐาน จากนั้นยืนยันชนิดของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออก
ซิเดส ด้วยวิธี native-PAGE โดยนำแผ่นเจลไปทำปฏิกิริยาการสารตั้งต้นของเอนไซม์ คือ 2,6-
Dimethoxyphenol (DMP) ผลการทดลองแสดงในภาพประกอบ 20B คือพบแถบแบนสีส้มอม
เหลืองจำนวน 2 แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 45 และ 90 kDa ซึ่งเกิดจากการทำปฏิกิริยากับ
สารตั้งต้น โดยเฉพาะแถบแบนขนาด 45 kDa ที่เกิดเป็นแบนหนาขนาดใหญ่ ที่มีขนาดตรงกับ
เอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสที่มีรายงานก่อนหน้าว่ามีขนาดอยู่ในช่วง 38-53 kDa

เมื่อนำตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อมาวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส
และปริมาณโปรตีนทั้งหมด พบว่ามีค่าเท่ากับ 429 ยูนิต และ 5.15 มิลลิกรัม คิดเป็นค่ากิจกรรม
จำเพาะของเอนไซม์ (specific activity) เท่ากับ 83.31 ยูนิตต่อมิลลิกรัม (ตาราง 10) และเมื่อ
ตกตะกอนโปรตีนของเอนไซม์ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 80% (w/v) พบว่าเอนไซม์มีค่า
กิจกรรมของเอนไซม์ และปริมาณโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 400.80 ยูนิต และ 1.02 มิลลิกรัม ทำให้ค่า
กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เพิ่มขึ้นเป็น 391.97 ยูนิตต่อมิลลิกรัม และเอนไซม์มีความบริสุทธิ์
เพิ่มขึ้นเท่ากับ 4.71 เท่า มีค่า %Yield เท่ากับ 93.43 จากนั้นนำเอนไซม์มาทำไดอะไลซิสเพื่อกำจัด
เกลือ พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเหลือ 360.07 ยูนิต และมีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 0.89
มิลลิกรัม โดยมีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เพิ่มขึ้นเป็น 404.25 ยูนิตต่อลิตร และเอนไซม์มี
ความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 4.85 เท่า (ตาราง 10)



ภาพประกอบ 20 ผล SDS-PAGE และ native-PAGE ของตัวอย่างเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสที่ได้จากรา *T. hirsuta* PW17-41 (M) protein ladder (1) น้ำเลี้ยงเชื้อ *T. hirsuta* PW17-41 (2) เอนไซม์ที่ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต (3) เอนไซม์ที่ผ่านการกำจัดเกลือด้วยการไดอะไลซิส

ตาราง 10 การทำให้เอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์บางส่วน (partial purification)

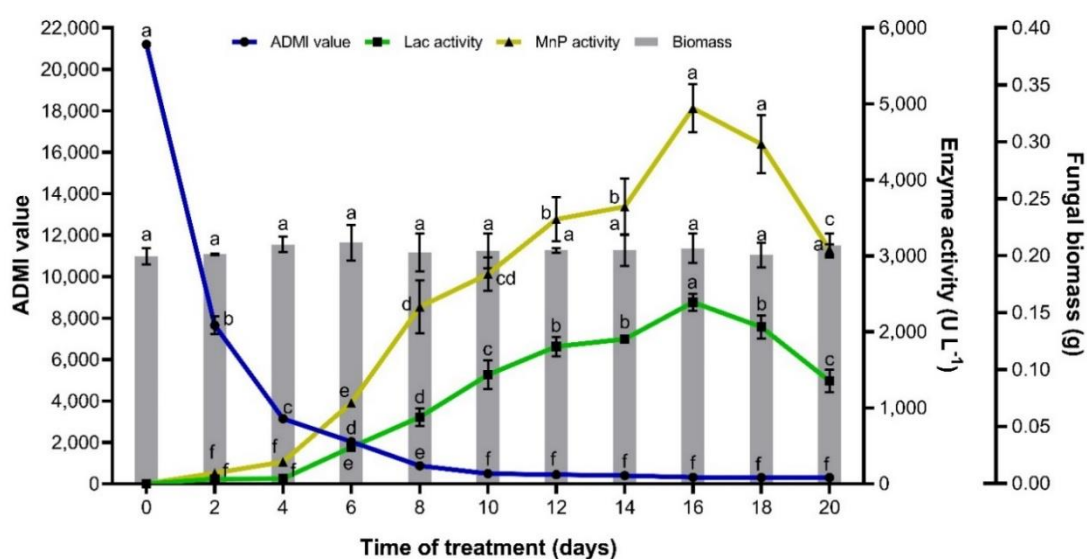
Purification step	Total protein (mg)	Total enzyme activity (U)	Specific activity (U mg ⁻¹)	Purification fold	Yield (%)
Crude extract	5.15	429.00	83.314	1	100
(NH ₄) ₂ SO ₄ precipitation	1.02	400.80	391.97	4.71	93.43
Dialysis	0.89	360.07	404.25	4.85	83.93

5. ความสัมพันธ์ของการลดสีย้อม และการผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโกลติกของราตริง *T. hirsuta* PW17-41

5.1 ความสัมพันธ์ของการลดสีย้อม และการผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโกลติก

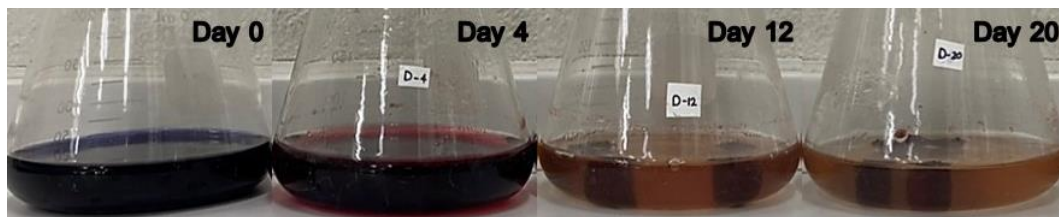
จากผลการทดลองในหัวข้อ 4 พบว่ากลไกหลักในการลดสีย้อมของราตริง *T. hirsuta* PW17-41 คือการย่อยสลายสีย้อมด้วยเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส และแลคเคส จึงทำการศึกษาความสัมพันธ์ของการลดความเข้มของสีย้อม และการผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส และแลคเคสด้วยราตริง โดยใช้สีย้อมที่ความเข้มข้นเท่ากับ 33% (v/v) ซึ่งมีค่าความเข้มสีรวมเท่ากับ 21,200 ADMI ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมใช้น้ำตาลปี๊บ และแอมโมเนียมไนเตรท เป็นแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจน ตามลำดับ โดยปรับค่า pH เริ่มต้นให้มีค่าเท่ากับ 5 เลี้ยงในสภาวะแบบเขย่าที่ 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วัน โดยเก็บผลทุก 2 วัน พบว่าความเข้มของสีลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 2 เท่ากับ 79.22% (ภาพประกอบ 21 และตาราง 11) จากนั้นค่อย ๆ ลดลงจนเริ่มคงที่ในวันที่ 10 ซึ่งสามารถลดความเข้มของสีได้เท่ากับ 97.67% โดยมีค่าความเข้มสีเหลือเท่ากับ 493 ADMI และในวันที่ 20 สามารถลดความเข้มของสีได้เท่ากับ 98.59% และมีค่าความเข้มสีสุดท้ายเท่ากับ 300 ADMI ส่วนผลการวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส และแลคเคส ตรวจพบได้ในวันที่ 2 และมีค่าเพิ่มขึ้นเป็นลำดับ โดยพบว่าปริมาณของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสมีค่าสูงกว่าเอนไซม์แลคเคส และมีค่าสูงที่สุดในวันที่ 16 มีค่าเท่ากับ 4,942 และ 2,389 ยูนิตต่อลิตร ตามลำดับ สอดคล้องกับความเข้มของสีย้อมที่ลดลงและเริ่มคงที่ ซึ่งค่ากิจกรรมของเอนไซม์ก็เริ่มลดลงด้วยเช่นกัน นอกจากนี้ผลของค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสีย้อมเริ่มต้นที่ pH เท่ากับ 5 ลดลงเหลือ 2.59 ในวันที่ 20 ของการบ่ม สอดคล้องกับช่วง pH ที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าว ส่วนน้ำหนักแห้งของเส้นใยราตลอด 20 วันในการบ่ม พบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตาราง 11) และจากภาพประกอบ 22 พบว่าสีของสีย้อมมีการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจนหลังจากบำบัดสีด้วยราตริงเป็นเวลา 20 วัน โดยสีย้อมเริ่มต้นในวันที่ 0 มีสีน้ำเงินเข้ม หลังจากบำบัดด้วยราตริงเป็นเวลา 2 วัน สีเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเข้มเป็นสีแดง หลังจากนั้นวันที่ 12 เปลี่ยนเป็นสีส้ม และวันที่ 20 ซึ่งเป็นวันสุดท้ายของการเก็บผลการทดลองพบว่าสีย้อมถูกเปลี่ยนไปเป็นสีส้มอ่อน

จากการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของการลดความเข้มข้นของสีย้อม และการผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโกลติกของราตรีง *T. hirsuta* PW17-41 ด้วยสถิติ correlation ที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับร้อยละ 95 พบว่าการลดสีย้อม และการผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสมีความสัมพันธ์กันในทางบวก มีขนาดความสัมพันธ์เท่ากับ 0.661 เช่นเดียวกับการลดความเข้มข้นของสีย้อม และการผลิตเอนไซม์แลคเคสที่ที่มีความสัมพันธ์กันในทางบวก มีขนาดความสัมพันธ์เท่ากับ 0.639



ภาพประกอบ 21 ความสัมพันธ์ของการลดความเข้มข้นของสีย้อม การผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโกลติก และการเจริญของราตรีง *T. hirsuta* PW17-41 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสีย้อมเข้มข้น 33% (v/v) ภายใต้สภาวะแบบเขย่าที่ 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 5 ในระยะเวลา 20 วัน

หมายเหตุ: ข้อมูลแสดง mean \pm standard deviation และวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้ one-way ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับร้อยละ 95 ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็ก (a-f) คือ ค่าทางสถิติของค่าความเข้มข้นสีที่เหลือหลังจากการลดสีย้อมเหลือทิ้ง กิจกรรมของเอนไซม์ และน้ำหนักแห้งของเส้นใยรา โดยเปรียบเทียบภายในปัจจัยเดียวกัน



ภาพประกอบ 22 การเปลี่ยนแปลงของสีขี้อมในระหว่างการบำบัดด้วยราตริ่ง *T. hirsuta* PW17-41 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสีขี้อมเข้มข้น 33% (v/v) ภายใต้สภาวะแบบเขย่าที่ 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 5 ในระยะเวลา 0, 4, 12 และ 20 วัน



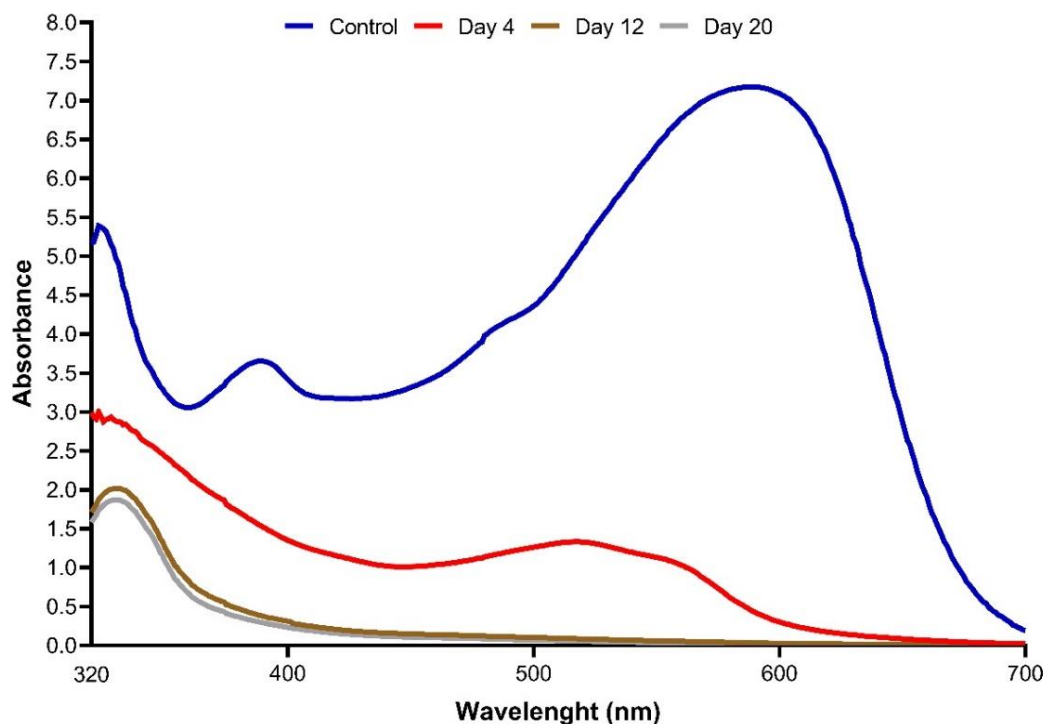
ตาราง 11 ตารางแสดงค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสีย้อมเข้มข้น 33% (v/v) เมื่อบำบัดด้วยราจริง *T. hirsuta* PW17-41 ระยะเวลา 20 วัน

เวลา (วัน)	ค่าความเข้มข้น (ADMI)	ประสิทธิภาพการลดสี (%)	กิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิตต่อลิตร)		น้ำหนักแห้งของรา <i>T. hirsuta</i> (มิลลิกรัม)	ค่า pH
			แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส	แลคเคส		
0	21,200±0 ^f	0.00±0.00 ^f	0.00±0.00 ^f	0.00±0.00 ^f	199.63±7.42 ^a	5.00±0.00 ^a
2	7,653±444 ^e	63.90±1.98 ^e	141.04±16.79 ^f	63.75±6.56 ^f	201.43±0.59 ^a	3.37±0.03 ^b
4	3,142±74 ^d	85.18±0.51 ^d	288.18±42.26 ^f	67.38±2.23 ^f	210.07±6.85 ^a	3.19±0.04 ^c
6	2,032±19 ^c	90.42±0.16 ^c	1,026.89±21.30 ^e	481.48±7.61 ^e	211.80±15.55 ^a	3.19±0.01 ^c
8	866±38 ^b	95.91±0.22 ^b	2,328.89±306.23 ^d	876.67±101.30 ^d	203.00±16.40 ^a	3.16±0.01 ^c
10	493±21 ^a	97.67±0.10 ^{ab}	2,759.56±191.84 ^{cd}	1,433.33±164.08 ^c	204.20±15.36 ^a	3.09±0.02 ^c
12	444±5 ^a	97.91±0.03 ^a	3,481.78±283.23 ^b	1,806.42±110.85 ^b	204.87±1.97 ^a	2.81±0.1 ^d
14	398±45 ^a	98.12±0.20 ^a	3,645.33±323.93 ^b	1,902.72±24.81 ^b	205.10±14.20 ^a	2.73±0.04 ^{de}
16	313±2 ^a	98.52±0.01 ^a	4,942.22±285.65 ^a	2,389.14±102.59 ^a	206.67±12.96 ^a	2.63±0.1 ^{de}
18	305±3 ^a	98.56±0.01 ^a	4,472.89±331.82 ^a	2,062.96±139.91 ^b	200.73±10.31 ^a	2.63±0.1 ^e
20	300±1 ^a	98.59±0.01 ^a	3,082.22±74.00 ^{bc}	1,353.09±131.63 ^c	209.07±10.31 ^a	2.59±0.06 ^e

หมายเหตุ: ข้อมูลแสดง mean ± standard deviation และวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้ one-way ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับร้อยละ 95 ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็ก (a-f) คือ ค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ โดยเทียบในบัจฉัยเดียวกัน

5.2 การตรวจสอบโครงสร้างทางเคมีของสีย้อมด้วยเทคนิค UV-visible และ Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

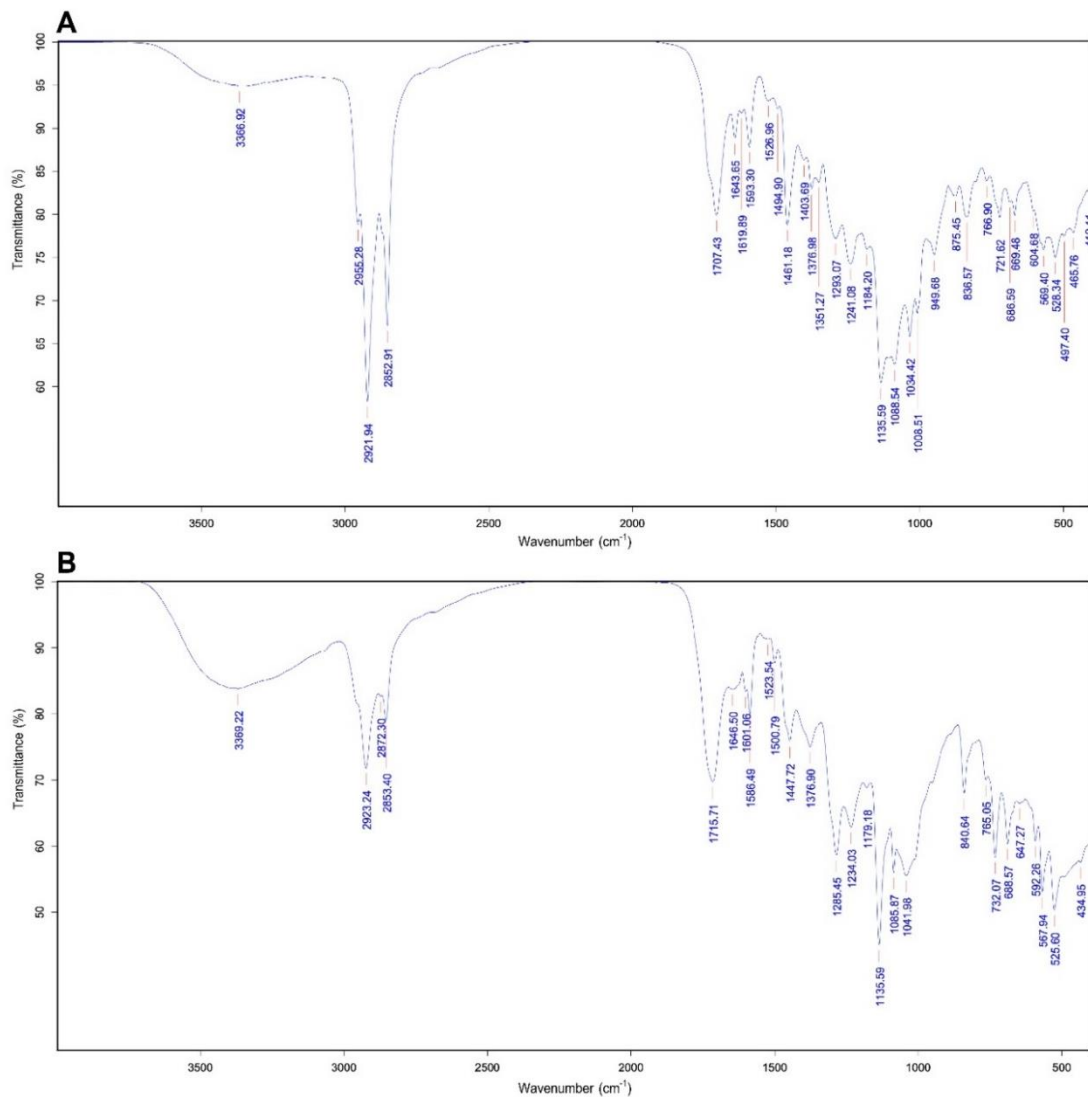
จากผลการทดลองก่อนหน้าในหัวข้อ 4 และ 5.1 พบว่ากลไกหลักในการลดความเข้มของสีย้อมคือการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ ร่วมกับการดูดซับสี โดยเอนไซม์หลักที่มีบทบาทสำคัญคือ เอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส และเอนไซม์แลคเคส ดังนั้นจึงทำการทดลองเพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงของสีย้อมด้วยเทคนิค UV-visible Spectroscopy โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบสแกนช่วงความยาวคลื่น 320-700 นาโนเมตร พบว่าสีย้อมเริ่มต้นก่อนการบำบัดด้วยราตรีง *T. hirsuta* PW17-41 จากผลการทดลองในหัวข้อ 5.1 พบพีคหลักที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร (ภาพประกอบ 23) ซึ่งสีย้อมที่ใช้ในการศึกษาประกอบด้วยสี 3 ชนิด ได้แก่ Novacron Ruby S3B (NR-S3B), Novacron Super Black G (NSB-G) และ Novacron Navy EC-R (NEC-R) ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 545, 600 และ 608 นาโนเมตรตามลำดับ ซึ่งจากกราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงที่สูงในช่วงความยาวคลื่นดังกล่าว จากนั้นเมื่อนำราตรีงมาบำบัด และตรวจติดตามผลในวันที่ 4, 12 และ 20 พบว่ามีค่าการดูดกลืนแสงลดลงในทุกความยาวคลื่น โดยในวันที่ 20 พบค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 330 นาโนเมตร ซึ่งเป็นช่วงความยาวคลื่นของแสงสีส้มแดง สอดคล้องกับผลการทดลองในภาพประกอบ 22 อย่างไรก็ตามค่าความเข้มของสีรวมมีค่าต่ำกว่าค่ามาตรฐานตามที่กระทรวงอุตสาหกรรมกำหนด และเป็นการยืนยันได้ว่าสีย้อมได้ถูกย่อยสลาย และ/หรือ เปลี่ยนโครงสร้างไปจากเดิม



ภาพประกอบ 23 UV-visible สเปกตรัมของสีย้อมที่ไม่ผ่านการบำบัดด้วยราตริ่ง *T. hirsuta* PW17-41 (วันที่ 0) และหลังจากการบำบัดด้วยราตริ่งที่ความเข้มข้นของสีย้อมเท่ากับ 33% (v/v) ในวันที่ 4, 12 และ 20 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

ดังนั้นจึงได้ศึกษาติดตามการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีของสีย้อมก่อนการบำบัดในวันที่ 0 และหลังการบำบัดไปแล้ว 12 วัน ด้วยเทคนิค Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) พบว่าสเปกตรัมของสีย้อมก่อนการบำบัด ปรากฏตำแหน่งพีดจำนวน 34 พีด (ภาพประกอบ 24) ที่บ่งบอกถึงพันธะทางเคมีต่าง ๆ เช่น ตำแหน่งพีดที่ $3,366.92\text{ cm}^{-1}$ คือพันธะของ O-H ตำแหน่งพีดที่ $2,955.28\text{ cm}^{-1}$, $2,921.94\text{ cm}^{-1}$ และ $2,852.91\text{ cm}^{-1}$ คือพันธะของ C-H ตำแหน่งพีดที่ $1,707.43\text{ cm}^{-1}$ คือพันธะของ C=O ตำแหน่งพีดที่ $1,643.65\text{ cm}^{-1}$ คือพันธะของ C=N ตำแหน่งพีดที่ $1,135.59\text{ cm}^{-1}$ คือพันธะของ S=O และตำแหน่งพีดที่ $1,088.57\text{ cm}^{-1}$ คือพันธะของ C-N (ตาราง 12) แต่เมื่อสีย้อมถูกบำบัดด้วยราตริ่งเป็นเวลา 12 วัน พบว่าค่าการส่องผ่านของแสงมีการเปลี่ยนแปลง ทั้งตำแหน่งและจำนวนพีด บางตำแหน่งหายไป ซึ่งอาจเกิดจากการย่อยสลายทำให้เหลือจำนวนพีดเพียง 27 พีด ยกตัวอย่างเช่น ตำแหน่งพีดที่ $3,369.22\text{ cm}^{-1}$ คือพันธะของ O-H ที่มีการเปลี่ยนตำแหน่งมาจากตำแหน่งเดิมที่ $3,366.92\text{ cm}^{-1}$ ของวันที่ 0 ตำแหน่งพีดที่ $2,923.24\text{ cm}^{-1}$ และ $2,853.40\text{ cm}^{-1}$ คือพันธะของ C-H ที่เปลี่ยนตำแหน่งมาจาก

ตำแหน่งพีคที่ $2,921.94\text{ cm}^{-1}$ และ $2,852.91\text{ cm}^{-1}$ ของวันที่ 0 รวมถึงมีบางตำแหน่งพีคที่หายไป ได้แก่ ตำแหน่งพีคที่ $2,955.28\text{ cm}^{-1}$ และ $1,403.69\text{ cm}^{-1}$ คือพันธะ C-H และตำแหน่งพีคที่ $1,351.27\text{ cm}^{-1}$ คือพันธะ S=O เป็นต้น จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสีย้อมถูกย่อยด้วย เอนไซม์ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของพันธะและโครงสร้างเคมีของสี จำนวนพันธะลดลง สอดคล้องกับผลการทดลองก่อนหน้า



ภาพประกอบ 24 FTIR สเปกตรัมของสีย้อมที่ไม่ผ่านการบำบัดด้วยราตรีง *T. hirsuta* PW17-41 (วันที่ 0) และหลังจากการบำบัดด้วยราตรีง ในวันที่ 12 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

ตาราง 12 FTIR สเปกตรัมของสีย้อมที่ไม่ผ่านการบำบัดด้วยยราตริง *T. hirsuta* PW17-41 (วันที่ 0) และหลังจากการบำบัดด้วยยราตริง ในวันที่ 12 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

FTIR สเปกตรัมของสีย้อม		ค่าการส่องผ่านของแสง (% transmittance)	
วันที่ 0	วันที่ 12	วันที่ 0	วันที่ 12
3,366.92	3,369.22	94.89	83.83
2,955.28	ND	78.85	ND
2,921.94	2,923.24	58.36	71.80
ND	2,872.30	ND	82.67
2,852.91	2,853.40	67.09	79.05
1,707.43	1,715.71	79.93	69.72
1,643.65	1,646.50	88.85	83.73
1,619.89	1,601.06	91.75	83.43
1,593.30	1,586.49	87.81	80.00
1,526.96	1,523.54	93.22	91.33
1,494.90	1,500.79	92.29	87.70
1,461.18	1,447.72	78.81	75.83
1,403.69	ND	86.31	ND
1,376.98	1,376.90	82.92	75.02
1,351.27	ND	83.76	ND
1,293.07	1,285.45	77.24	58.62
1,241.08	1,234.03	74.28	62.89
1,184.20	1,179.18	75.97	68.84
1,135.59	1,135.59	60.44	45.00
1,088.54	1,085.87	62.52	56.02
1,034.42	1,041.98	65.81	55.55
1,008.51	ND	68.50	ND
949.68	ND	75.29	ND
875.45	ND	82.16	ND
836.57	840.64	79.67	68.00

ตาราง 12 (ต่อ)

FTIR สเปกตรัมของสีย้อม		ค่าการส่องผ่านของแสง (% transmittance)	
Day 0	Day 12	Day 0	Day 12
766.90	765.05	83.91	70.07
721.62	732.07	79.64	58.43
686.59	688.57	81.40	60.38
669.48	647.27	79.93	66.50
604.68	592.26	80.36	60.80
569.40	567.94	75.83	53.04
528.34	525.60	75.04	50.33
497.40	ND	77.46	ND
465.76	434.95	77.89	57.57
412.11	ND	82.66	ND

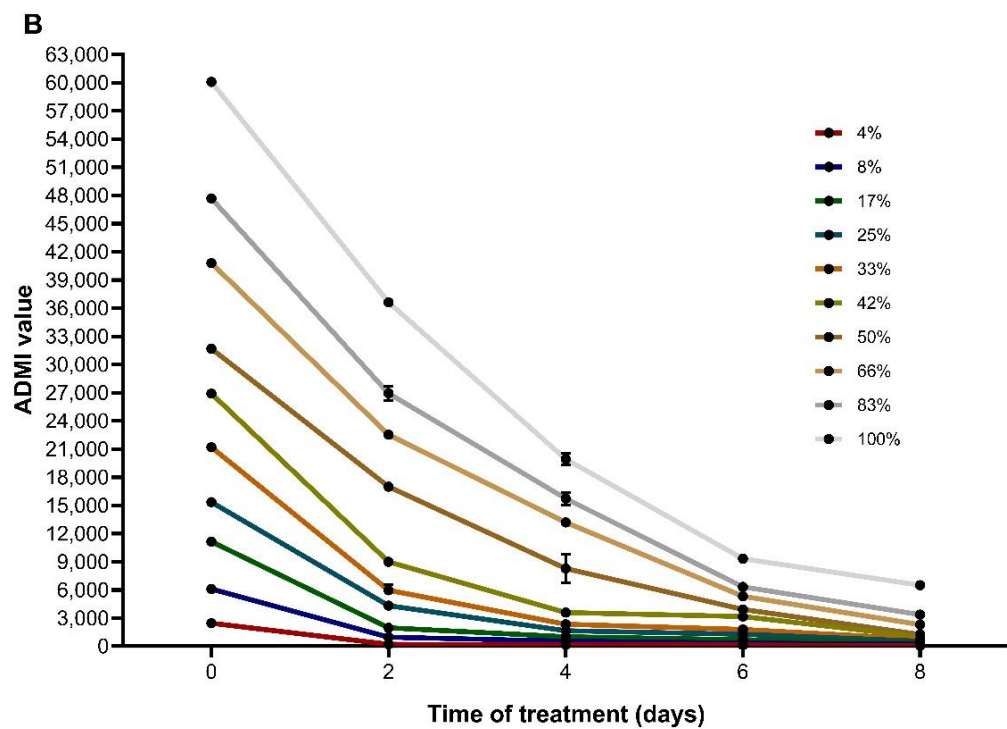
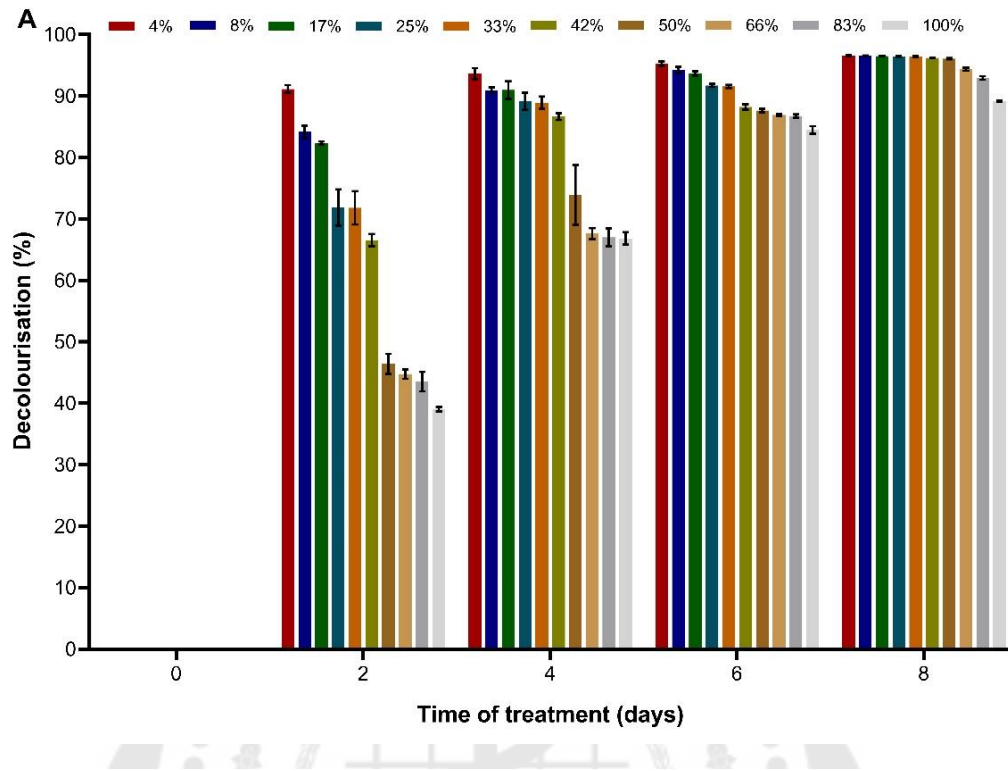
หมายเหตุ: ND หมายถึง ไม่พบความยาวคลื่นดังกล่าวใน FTIR สเปกตรัมของสีย้อม

6. ประสิทธิภาพของราตรีง *T. hirsuta* PW17-41 ในการลดความเข้มข้นของสีย้อมภายใต้สภาวะต่าง ๆ

ตัวอย่างราตรีง *T. hirsuta* PW17-41 ได้นำมาทดสอบประสิทธิภาพในการลดสีย้อมที่ความเข้มข้นต่าง ๆ การนำมาใช้ซ้ำ และการลดความเข้มข้นของสีย้อมภายใต้สภาวะที่ไม่ปราศจากเชื้อ เป็นต้น เพื่อเป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้

6.1 ประสิทธิภาพของราตรีง *T. hirsuta* PW17-41 ในการลดสีย้อมที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

จากการทดสอบประสิทธิภาพของราตรีง *T. hirsuta* PW17-41 ในการลดความเข้มข้นของสีย้อมที่ความเข้มข้น 4, 8, 17, 25, 33, 42, 50, 66, 83 และ 100% (v/v) ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม เป็นเวลา 8 วัน โดยเก็บผลทุก 2 วัน (ภาพประกอบ 25 และภาคผนวก ค ตาราง 7) พบว่าราตรีงมีประสิทธิภาพในการลดความเข้มข้นของสีย้อมที่ความเข้มข้น 4-42% (v/v) เท่ากับ 96.20-96.54% ภายในระยะเวลา 8 วัน ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับร้อยละ 95 และราตรีงสามารถลดความเข้มข้นของสีย้อมที่ความเข้มข้น 100% (v/v) ได้เท่ากับ 89.17% (ภาพประกอบ 25A) แต่เมื่อพิจารณาจากค่าความเข้มข้นสีในหน่วย ADMI พบว่าราตรีงสามารถลดค่า ADMI ของสีย้อมที่ความเข้มข้น 4% (v/v) ให้ผ่านมาตรฐานภายในระยะเวลา 2 วัน โดยลดค่าความเข้มข้นสีจาก 2,475 ADMI เหลือเท่ากับ 217 ADMI และเหลือ 85 ADMI ภายในระยะเวลา 8 วัน ส่วนที่ความเข้มข้น 8% (v/v) ราตรีงสามารถลดสีให้ผ่านมาตรฐานภายในระยะเวลา 8 วัน โดยลดค่าความเข้มข้นสีจาก 6,100 ADMI เหลือเท่ากับ 212 ADMI ส่วนสีย้อมที่ความเข้มข้น 17-100% ราตรีงไม่สามารถลดสีย้อมให้ผ่านมาตรฐานได้ภายในระยะเวลา 8 วัน โดยเหลือค่า ADMI เท่ากับ 389, 544, 757, 1,022, 1,245, 2,294, 3,365 และ 6,508 ADMI ตามลำดับ (ภาพประกอบ 25B) เนื่องจากค่าความเข้มข้นสีเริ่มต้นมีค่าที่สูงมาก อาจต้องใช้ปริมาณราตรีงที่เพิ่มขึ้นให้เหมาะสมกับความเข้มข้นของสีย้อมที่สูงขึ้น



ภาพประกอบ 25 ประสิทธิภาพการลดความเข้มของสีข้อม (A) และค่าความเข้มสีในหน่วย ADM I ที่เหลือ (B) เมื่อทดสอบกับสีข้อมที่ความเข้มข้น 4, 8, 17, 25, 33, 42, 50, 66, 83 และ 100% (v/v) ด้วยราตรีง *T. hirsuta* PW17-41 เป็นเวลา 2, 4, 6 และ 8 วัน ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

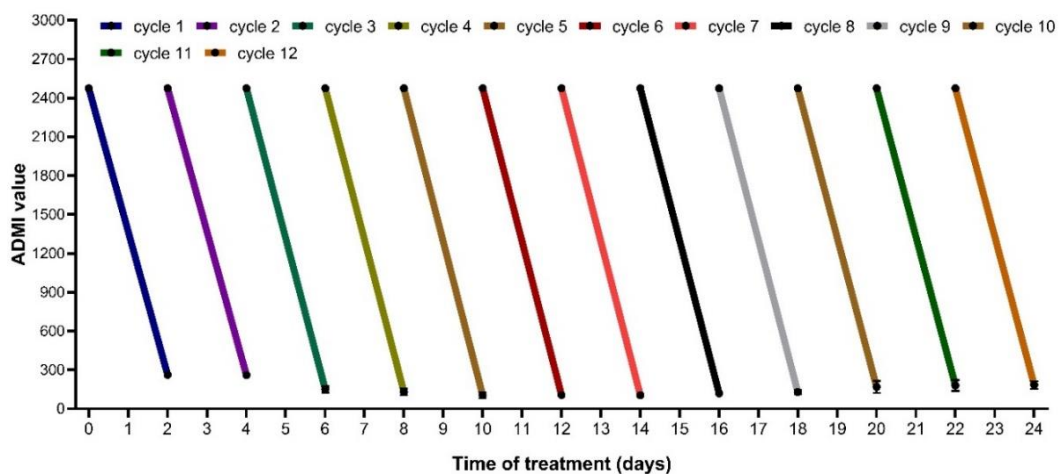
6.2 ประสิทธิภาพของราตริ่ง *T. hirsuta* PW17-41 ในการนำกลับมาใช้ซ้ำ

จากผลการศึกษาประสิทธิภาพของราตริ่งในการนำกลับมาใช้ซ้ำเพื่อลดความเข้มข้นของสีย้อมที่ความเข้มข้น 4% (v/v) โดยเปลี่ยนอาหารที่มีสีย้อมใหม่ทุก ๆ 2 วัน ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม จนกว่าประสิทธิภาพในการลดสีย้อมของราตริ่งจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับร้อยละ 95 จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าราตริ่ง *T. hirsuta* PW17-41 มีประสิทธิภาพในการลดสีย้อมได้อย่างน้อย 12 รอบ โดยในแต่ละรอบสามารถลดสีได้อยู่ในช่วง 89.39-95.81% โดยลดค่าความเข้มของสีจาก 2,475 ADMI เหลือเท่ากับ 104-263 ADMI (ภาพประกอบ 26 และตาราง 13) โดยในรอบที่ 1 ราตริ่งสามารถลดความเข้มของสีย้อมได้เท่ากับ 89.39% มีความเข้มของสีย้อมเหลือเท่ากับ 263 ADMI และราตริ่งมีประสิทธิภาพในการลดสีสูงที่สุดในรอบที่ 5 โดยมีประสิทธิภาพในการลดความเข้มของสีย้อมได้เท่ากับ 95.81% แต่เมื่อวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้ one-way ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับร้อยละ 95 แสดงให้เห็นว่าราตริ่งมีประสิทธิภาพในการลดสีเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญตั้งแต่ว่ารอบที่ 1 และสูงที่สุดในรอบที่ 5-7 ซึ่งสามารถลดความเข้มของสีย้อมให้เหลือเท่ากับ 104, 106 และ 105 ADMI ตามลำดับ แต่เมื่อใช้ราตริ่งในรอบที่ 8 ประสิทธิภาพในการลดสีของราตริ่งเริ่มลดลงอย่างมีนัยสำคัญโดยเฉพาะในรอบที่ 11 และ 12 โดยมีประสิทธิภาพในการลดความเข้มของสีเท่ากับ 92.74 และ 92.02% และมีค่าความเข้มของสีย้อมเหลือเท่ากับ 180 และ 183 ADMI ตามลำดับ เมื่อวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ในทุก ๆ รอบของการใช้ราตริ่งซ้ำ พบว่าราตริ่งผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส และแลคเคส ออกมาตั้งแต่ว่ารอบที่ 1 ซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 508 และ 176 ยูนิตต่อลิตร ตามลำดับ และสูงสุดในรอบที่ 6 โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงถึง 7,151 และ 2,221 ยูนิตต่อลิตร ตามลำดับ แต่หลังจากรอบที่ 6 ราตริ่งมีการผลิตเอนไซม์ลดลงเหลือ 5,591 ยูนิตต่อลิตรสำหรับเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส และ 1,499 ยูนิตต่อลิตรสำหรับเอนไซม์แลคเคสในรอบที่ 7 จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าราตริ่ง *T. hirsuta* PW17-41 สามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้หลายรอบ ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส และแลคเคสที่สูง โดยสามารถนำไปประยุกต์ใช้ต่อไปได้

ตาราง 13 ตารางแสดงค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ เมื่อนำราตรีง *T. hirsuta* PW17-41 กลับมาใช้ซ้ำใน การบำบัดสีย้อมเข้มข้น 4% (v/v) เป็นจำนวน 12 รอบ

จำนวน รอบ	ค่าความเข้มข้น (ADMI)	ประสิทธิภาพ การลดสีย้อม (%)	กิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิตต่อลิตร)	
			แมงกานีสเปอร์ออก ซิเดส	แลคเคส
1	259±6 ^e	89.39±0.20 ^e	508.00±122.00 ^e	175.85±10.80 ^f
2	255±6 ^e	89.48±0.29 ^e	1,634.67±268.57 ^{de}	532.59±80.86 ^{def}
3	147±23 ^{bcd}	93.91±0.96 ^{bcd}	4,888.89±763.30 ^{bc}	1,608.40±207.05 ^{abc}
4	122±23 ^{abc}	94.76±0.99 ^{abc}	6,548.89±1,293.30 ^{ab}	1,925.31±85.87 ^{ab}
5	99±19 ^a	95.81±0.92 ^a	6,822.22±697.74 ^{ab}	1,908.03±242.23 ^{ab}
6	103±5 ^a	95.70±0.23 ^a	7,151.11±1,276.80 ^a	2,220.99±387.65 ^a
7	100±8 ^a	95.77±0.44 ^a	5,591.11±692.76 ^{abc}	1498.77±384.26 ^{bcd}
8	115±1 ^{ab}	95.21±0.05 ^{ab}	4,842.44±434.18 ^{bc}	1,218.83±142.11 ^{cde}
9	120±12 ^{ab}	94.79±0.57 ^{ab}	4,796.67±547.02 ^{bc}	1,198.46±14.44 ^{cde}
10	157±43 ^{cd}	93.20±1.83 ^{cd}	4,000.00±213.78 ^c	935.80±49.39 ^{cde}
11	169±37 ^d	92.74±1.69 ^d	3,840.00±231.79 ^{cd}	875.62±21.95 ^{de}
12	174±29 ^d	92.61±1.21 ^d	3,850±306.68 ^{cd}	844.14±36.60 ^e

หมายเหตุ: ข้อมูลแสดง mean ± standard deviation และวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้ one-way ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับร้อยละ 95 ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็ก (a-f) คือ ค่าทางสถิติของประสิทธิภาพการลดสีย้อมเหลือทั้ง ค่าความเข้มข้นที่เหลือหลังจากการลดสีย้อมเหลือทั้ง และกิจกรรมของเอนไซม์ โดยเปรียบเทียบภายใน ปัจจัยเดียวกัน

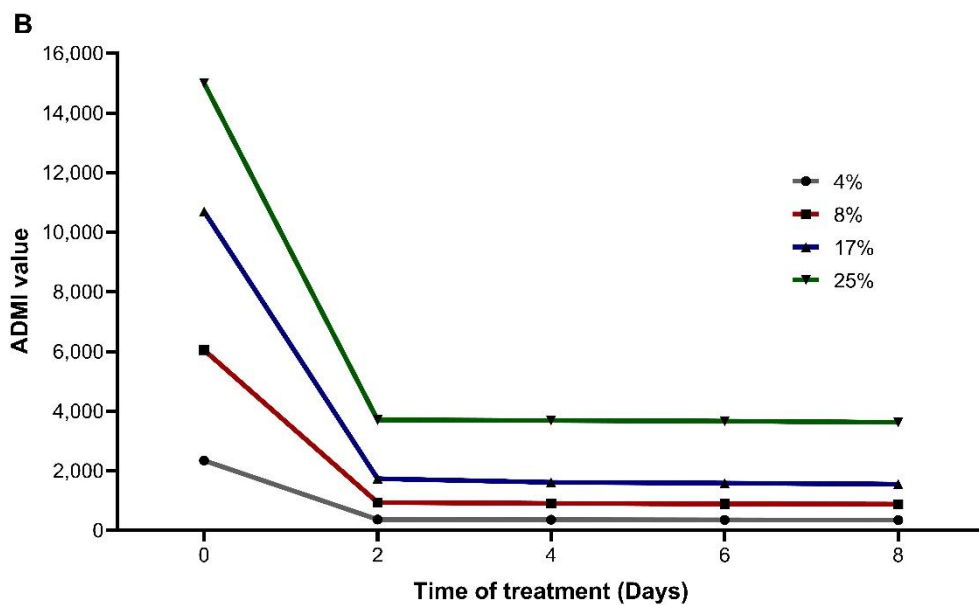
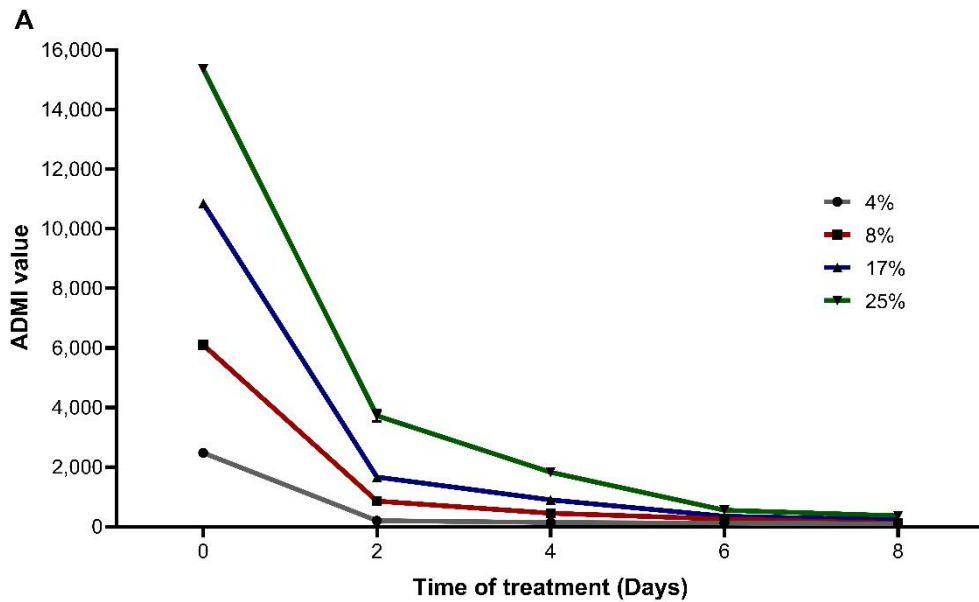


ภาพประกอบ 26 ประสิทธิภาพของราตรีง *T. hirsuta* PW17-41 ในการนำกลับมาใช้ซ้ำเพื่อลดความเข้มข้นของสีย้อมที่ความเข้มข้น 4% (v/v) จำนวน 12 รอบ

6.3 ประสิทธิภาพของราตรีง *T. hirsuta* PW17-41 ในการลดความเข้มข้นของสีย้อมภายใต้สภาวะที่ไม่ปราศจากเชื้อ

จากการศึกษาประสิทธิภาพของราตรีง *T. hirsuta* PW17-41 ในการลดความเข้มข้นของสีย้อมภายใต้สภาวะที่ไม่ปราศจากเชื้อที่ความเข้มข้น 4, 8, 17 และ 25% (v/v) โดยเปรียบเทียบระหว่างสภาวะที่เติมอาหาร basal medium โดยใช้แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่ให้ประสิทธิภาพการลดสีสูงสุด คือน้ำตาลปีบ และแอมโมเนียมไนเตรท กับสภาวะที่ไม่เติมอาหาร โดยปรับ pH เริ่มต้นให้มีค่าเท่ากับ 5 ความเร็วรอบในการเขย่าเท่ากับ 100 รอบต่อนาที ผลแสดงในภาพประกอบ 27 และภาคผนวก ค ตาราง 8 พบว่าในสภาวะที่เติมอาหารราตรีงสามารถลดความเข้มข้นของสีย้อมที่ความเข้มข้น 4, 8 และ 17% (v/v) ให้ผ่านมาตรฐานน้ำทิ้ง (ไม่เกิน 300 ADMI) โดยลดค่าความเข้มข้นของสีในหน่วย ADMI ให้เหลือเท่ากับ 200, 253 และ 228 ADMI ภายในระยะเวลา 2, 6 และ 8 วัน ตามลำดับ ซึ่งมีประสิทธิภาพในการลดสีได้เท่ากับ 91.93, 95.86 และ 97.90% ในขณะที่ที่ความเข้มข้นของสี 25% (v/v) ราตรีงสามารถลดความเข้มข้นของสีย้อมได้เท่ากับ 97.66% โดยลดค่าความเข้มข้นของสีย้อมเริ่มต้นจาก 15,350 ADMI ให้เหลือเท่ากับ 360 ADMI แต่ในสภาวะที่ไม่เติมอาหาร ราตรีงสามารถลดสีย้อมที่ความเข้มข้น 4, 8, 17 และ 25% (v/v) ได้สูงที่สุดในวันที่ 8 โดยมีประสิทธิภาพในการลดความเข้มข้นของสีเท่ากับ 85.12, 85.35, 85.48 และ 75.33% ตามลำดับ โดยลดความเข้มข้นของสีย้อมเหลือเท่ากับ 349, 886, 1,554 และ 3,625 ADMI ตามลำดับ แต่เมื่อวิเคราะห์หิววิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้ one-way ANOVA และ

เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับร้อยละ 95 พบว่าประสิทธิภาพการลดสีทั้ง 4 ความเข้มข้นในวันที่ 2-8 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



ภาพประกอบ 27 ประสิทธิภาพการลดความเข้มของสีของสีย้อมที่ไม่ปราศจากเชื้อความเข้มข้น 4, 8, 17 และ 25% (v/v) โดยราตรีง *T. hirsuta* PW17-41 ในสถานะที่เต็มอาหาร (A) และสถานะที่ไม่เต็มอาหาร (B) ภายใต้สภาวะแบบเขย่าที่ 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และปรับค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 5 เป็นเวลา 8 วัน

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

ราไวท์รอตเป็นราที่สามารถย่อยสลายโครงสร้างสารลิกนินซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญของเนื้อไม้ เนื่องจากสามารถผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโนโลติกซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ไม่จำเพาะสามารถย่อยสลายโครงสร้างสารที่มีวงอะโรมาติกได้ ดังนั้นจึงนิยมนำราไวท์รอตมาใช้ในการฟอกสีกระดาษ กำจัดสารพิษ และสีย้อมสังเคราะห์ได้ โดยการศึกษาครั้งนี้ได้นำราไวท์รอตบริสุทธิ์ที่คัดแยกจากดอกเห็ดที่ผ่านการพิสูจน์เอกลักษณ์แล้ว และมีรายงานว่าสามารถผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโนโลติกได้จากการศึกษาก่อนหน้า มาศึกษาประสิทธิภาพในการลดสีย้อมจากน้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรมฟอกย้อม โดยตัวอย่างน้ำทิ้งที่ศึกษามี 2 ตัวอย่าง ได้แก่ ตัวอย่างสีย้อมเหลือทิ้งจากกระบวนการย้อมที่ยังไม่ผ่านระบบบำบัดมีสีน้ำเงินเข้ม ซึ่งเป็นสีผสมของ Novacron Ruby S3B (NR-S3B), Novacron Navy EC-R (NEC-R) และ Novacron Super Black G (NSB-G) ในกลุ่มรีเอกทีฟ และตัวอย่างน้ำทิ้งภายหลังจากการบำบัดด้วยวิธีแอกติเวตเต็ดสลัดจ์ (effluent) นำมาตรวจวัดคุณสมบัติเบื้องต้น ได้แก่ ค่าความเข้มข้นในหน่วย ADMI (American Dye Manufacturers Institute) ซึ่งเป็นหน่วยมาตรฐานในการวัดค่าสี เพื่อตรวจสอบว่ามีการปนเปื้อนของสีย้อมและเม็ดสีในน้ำทิ้งมากน้อยแค่ไหน โดยการวัดแบบสแกนความยาวคลื่นตั้งแต่ 400-700 นาโนเมตร ทำให้สามารถวัดสีทั้งหมดที่มีอยู่ในน้ำทิ้งได้⁽¹⁰⁴⁾ ค่า COD (Chemical Oxygen Demand) เป็นค่าปริมาณออกซิเจนที่สารเคมีใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำ ค่า BOD (Biochemical Oxygen Demand) เป็นค่าปริมาณออกซิเจนที่จุลินทรีย์ต้องการใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำ โดยค่า COD และ BOD เป็นพารามิเตอร์ที่บ่งบอกถึงคุณภาพของน้ำทิ้งและปริมาณสารอินทรีย์ในน้ำทิ้ง⁽¹⁰⁵⁾ ค่า pH (ความเป็นกรด-ด่าง) และปริมาณโลหะหนักในน้ำเสีย เนื่องจากโลหะหนักส่วนใหญ่เป็นสารอินทรีย์ที่เป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตสามารถก่อให้เกิดปัญหาด้านสุขภาพต่าง ๆ กับคนที่นำน้ำมาใช้ในการอุปโภค และ/หรือ บริโภค ส่วนใหญ่โลหะหนักมักจะมีการปนเปื้อนกับน้ำทิ้งแล้วปล่อยออกสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ และสะสมอยู่ตามดินรวมถึงแหล่งน้ำ⁽¹⁰⁶⁾ จากผลการวิเคราะห์พบว่าตัวอย่างน้ำทิ้ง 2 ชนิดมีค่า ADMI เท่ากับ 60,100 และ 372 ADMI ตามลำดับ ซึ่งเกินมาตรฐานน้ำทิ้งตามประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม ปี พ.ศ. 2560 (ไม่เกิน 300 ADMI) มีค่า pH เท่ากับ 10 และ 8 ค่า COD เท่ากับ 199 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่า BOD เท่ากับ 29 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเกินค่ามาตรฐานที่กำหนดให้ค่า pH, COD และ BOD ของน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมมีค่าเท่ากับ 5-9, ไม่เกิน 120 และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ก่อนปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อม ส่วนปริมาณโลหะหนัก 11 ชนิด มีค่าผ่านมาตรฐาน⁽²⁶⁾ เนื่องจากกระบวนการย้อมผ้ามีการใช้สารเคมี

จำนวนมากในการย่อย ได้แก่ สีย้อม สารเคมีช่วยย่อย และสารอัลคาไลน์ เป็นต้น โดยเฉพาะ สีย้อมรีเอกทีฟที่พบในงานวิจัยนี้ นิยมใช้เกลือโซเดียมคลอไรด์ช่วยในการย่อยเพื่อให้สีสามารถ ดูดซับเข้าไปในเส้นใยผ้าได้ดีขึ้น และใช้ต่างเป็นสารช่วยในการตรึงสีให้ติดคงทนอีกด้วย ต่างที่ใช้ ได้แก่ โซเดียมคาร์บอเนต และโซเดียมไฮดรอกไซด์ ด้วยเหตุนี้จึงทำให้ลักษณะของสีย้อมเหลือทิ้งมี ค่า pH, COD และ BOD สูง รวมถึงน้ำมีสีที่เข้ม⁽¹⁷⁾ ส่วนตัวอย่างน้ำทิ้งภายหลังจากการบำบัดเป็นน้ำทิ้ง ที่รวมจากทุกขั้นตอนในโรงงานอุตสาหกรรมฟอกย้อม และผ่านระบบบำบัดของโรงงานด้วยวิธี แอคติเวตเต็ดสลัดจ์ จึงทำให้น้ำทิ้งภายหลังจากการบำบัดมีค่า ADMI ที่น้อยกว่าสีย้อมเหลือทิ้ง เนื่องจากถูกเจือจางด้วยน้ำล้างในส่วนต่าง ๆ และมีค่า pH ที่อยู่ในช่วงกลางไปจนถึงด่างอ่อน ๆ จากรายงานในอดีต พบว่าน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมฟอกย้อมมีค่าสีที่มองเห็นได้ในปริมาณที่สูง ประมาณ 3,000-4,500 ADMI ค่า COD ประมาณ 800-1,600 มิลลิกรัมต่อลิตร ช่วงของค่า pH ที่เป็นด่าง คือ 9-11⁽⁴⁾ แต่อย่างไรก็ตามลักษณะของน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมฟอกย้อมมักจะมี ความแปรปรวนสูงในแต่ละโรงงาน ขึ้นอยู่กับชนิดของสีย้อม ประเภทของผ้า และความเข้มข้นของ สารเติมแต่ง แต่อย่างไรก็ตามขั้นตอนการลดค่าความเข้มสีน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมยังไม่มี กระบวนการบำบัดที่ชัดเจน

จากการคัดเลือกราไวท์รอกจำนวน 16 ไอโซเลท จากงานวิจัยของ Thamvithayakorn และคณะ ที่สามารถในการผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโกลติก ได้แก่ แลคเคส และแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสได้ ประกอบด้วย 7 จีเนัส 13 สปีชีส์ ได้แก่ *Amauroderma subresinosum* NP17-12, *Coriopsis aspera* NP17-02, NP17-08, *C. retropecta* PW17-134, *Dentipellis parmastoi* PW17-136, *Ganoderma fornicatum* PW17-145, *G. lingzhi* PW17-43, *G. mastoporum* PW17-06, PW17-154, *Microporus vernicipes* PW17-173, *M. xanthopus* PP17-17, PP17-20, *Pseudolagarobasidium* sp. PP17-33, *Trametes elegans* PP17-06, *T. hirsuta* PW17-41 และ *T. sanguinea* PP17-18 เมื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการลดความเข้มสี (% decolourisation) ในหน่วย ADMI พบว่ามีรา 12 ไอโซเลท ที่สามารถลดสีน้ำทิ้งภายหลังจากการบำบัดได้อยู่ในช่วง 0.5-22% โดยรา *T. hirsuta* PW17-41 และรา *T. sanguinea* PP17-18 สามารถลดสีน้ำทิ้งได้สูงที่สุดและผ่านมาตรฐานน้ำทิ้งที่สามารถปล่อยลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติได้ โดยน้ำทิ้งที่สามารถปล่อยลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติได้ จะต้องมีความเข้มสีไม่เกิน 300 ADMI⁽²⁶⁾ ในขณะที่ราไวท์รอกที่ศึกษาทั้ง 16 ไอโซเลท สามารถลดสีย้อมเหลือทิ้งได้ในช่วง 28-74% โดยรา *Pseudolagarobasidium* sp. PP17-33 และรา *T. hirsuta* PW17-41 มีประสิทธิภาพในการลดสีย้อมเหลือทิ้งได้สูงที่สุด รองลงมาเป็นรา *T. sanguinea* PP17-18 แต่อย่างไรก็ตามค่าความเข้มสี

ภายหลังการบำบัดยังไม่ผ่านมาตรฐานน้ำทิ้งตามที่กระทรวงอุตสาหกรรมกำหนด นอกจากนี้ผลการวัดค่าความเข้มข้นสีแต่ละสี ได้แก่ NR-S3B (OD₅₄₅), NSB-G (OD₆₀₀) และ NEC-R (OD₆₀₈) พบว่ามีค่าลดลงสอดคล้องกับค่าสีในหน่วย ADMI ดังนั้นการวัดค่าสีในหน่วย ADMI จึงเป็นการวัดค่าสีโดยรวมที่ครอบคลุมทุกสีที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า เหมาะสำหรับการวัดค่าสีจากน้ำทิ้งที่มีสีผสมมากกว่า 1 ชนิด โดยเฉพาะสีน้ำทิ้งในโตนสีเหลืองน้ำตาลที่ไม่สามารถวัดได้ด้วยความยาวคลื่นเดียว แม้ว่าการนำวิธีนี้มาใช้ในการนำวิธีการวัดสีโดยเปรียบเทียบแพลทตินัมโคบอลต์ (Platinum-Cobalt) มาใช้ในการวัดค่าสีน้ำทิ้ง แต่พบว่ามีความยุ่งยากซับซ้อนกว่าการวัดค่าสีในหน่วย ADMI จากงานวิจัยในปี 2008 ผู้วิจัยทดสอบความสามารถในการลดสี Congo Red, Methylene Blue และ Malachite Green ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยราไวท์รอก 9 จีเนส 10 สปีชีส์ ได้แก่ *Fomes fomentarius*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Pleurotus pulmonarius*, *Ganoderma lucidum*, *Naematoloma fasciculare*, *Coriolus versicolor*, *Trametes suaveolens*, *Stereum ostrea*, *Fomitopsis rosea* และ *Pycnoporus coccineus* จากผลการคัดเลือกสายพันธุ์ราไวท์รอก พบว่าราในจีเนส *Pleurotus*, *Ganoderma* และ *Trametes* มีประสิทธิภาพสูงในการลดสี Methylene Blue⁽¹⁰⁷⁾ งานวิจัยของ Sudiana ในปี 2018 และงานวิจัยของ Fazli ในปี 2010 นำราจีเนส *Ganoderma* มาลดสีย้อม Remazol Black 5 และ Reactive Blue 19 พบว่าลดสีได้ 89 และ 95% ตามลำดับ งานวิจัยของ Zhao ในปี 2006 และ 2007 นำรา *Pleurotus ostreatus* มาใช้ลดสี Disperse Orange 3 และ Disperse Yellow 3 พบว่าสามารถลดสีได้มากกว่า 50% ภายใน 5 วัน และงานวิจัยที่นำราในจีเนส *Trametes* มาประยุกต์ใช้ในการลดสีได้แก่ งานวิจัยของ Dayi และคณะ ในปี 2018 ใช้รา *Trametes versicolor* มาใช้ลดสีย้อม Reactive Blue 220 และ Methyl Red ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าลดสีได้ 80 และ 91% ตามลำดับ⁽⁵⁷⁾ นอกจากนี้รา *T. versicolor* ยังถูกนำมาใช้สำหรับการลดสีสังเคราะห์ Remazol Brilliant Blue R และ Remazol Brilliant Yellow 3-GL^(55, 97) งานวิจัยของ Ting-ting ในปี 2020 แยกรา *T. sanguinea* H1 มาลดสีย้อม Congo Red, Malachite Green และ Methylene Blue พบว่าสามารถลดสีได้ 65.4%, 47.5% และ 31.3% ตามลำดับ⁽¹⁰⁸⁾ งานวิจัยของ Abadulla ในปี 2000 ใช้รา *T. hirsuta* BT2566 มาลดสีย้อมสิ่งทอในกลุ่มแอนทราควิโนน ได้แก่ สี Reactive Blue 19 และ Acid Blue 225 สีย้อมกลุ่มเอโซ ได้แก่ สี Reactive Blue 221, Reactive Black 5 และ Direct Blue 71 สีย้อมกลุ่มไตรเอริลมีเทน ได้แก่ สี Basic Red 9 และสีย้อมกลุ่มอินดิโกยด์ ได้แก่ สี Acid Blue 74 ผลการทดลองพบว่ารา *T. hirsuta* BT2566 สามารถลดสีย้อมกลุ่มแอนทราควิโนนได้ดีที่สุด โดยมีประสิทธิภาพการลดสีสูงถึง 80%⁽¹⁰⁹⁾ ในอีกหลายงานวิจัยได้ใช้รา *T. hirsuta* มาประยุกต์ใช้ในการ

ลดสีย้อม Indigo Carmine, Phenol Red, Methyl Orange, Bromophenol Blue, Lanset Marine และ Poly R-478^(85, 86, 90) นอกเหนือจากที่กล่าวมาในจีนัส *Trametes* ยังถูกนำมาใช้ในการลดสีย้อมที่หลากหลาย ได้แก่ สี Reactive Violet 5, Eriochrome Black T, Evans Blue, Methyl Orange, Bromothymol Blue, Fuchsin Basic และ Malachite Green เป็นต้น^(60, 70-72)

ในงานวิจัยนี้เลือก *T. hirsuta* PW17-41 ที่มีประสิทธิภาพในการลดสีจากตัวอย่างน้ำทิ้งทั้ง 2 ตัวอย่างได้ดีที่สุด โดยเฉพาะตัวอย่างน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดแล้วสามารถให้ลดค่าสีให้ผ่านมาตรฐานได้ ดังนั้นในการศึกษาต่อไปจึงเลือกศึกษาเฉพาะตัวอย่างน้ำทิ้งของสีย้อมเหลือทิ้งเท่านั้น โดยนำมาตรึงร่วมกับวัสดุตรึง 5 ชนิด ได้แก่ ฟองน้ำไนลอน ไบโสบัประรด ไยบวบ เปลือกเมล็ดคาแฟ และกะลาคาแฟ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการลดสี เนื่องจากการตรึงเซลล์จะช่วยปกป้องจากสภาวะที่มีสารพิษความเข้มข้นสูง ช่วยรักษาระดับการผลิตเอนไซม์ต่าง ๆ ให้อยู่ในระดับที่สูง นอกจากนี้ยังสามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้ และสามารถแยกสารตรึงออกจากสีย้อมได้ง่ายซึ่งช่วยลดปัญหาการอุดตันในระบบบำบัดได้อีกด้วย⁽⁸²⁾ จากผลการทดลองพบว่า *T. hirsuta* PW17-41 สามารถตรึงบนฟองน้ำไนลอนได้ดีที่สุด มีน้ำหนักมวลรวมของเส้นใยราเท่ากับ 0.375 กรัม เนื่องจากประกอบด้วยรูพรุนขนาดเล็กจำนวนมาก ทำให้เส้นใยสามารถเจริญแทรกไปยังรูพรุนดังกล่าวได้อย่างทั่วถึง ประกอบกับฟองน้ำไนลอนมีความคงตัวสูง จึงคงรูปร่างภายหลังการตรึงอีกด้วย รองลงมาเป็นไยบวบที่มีพื้นผิวเป็นรูพรุนเช่นกัน แต่รูพรุนของไยบวบมีขนาดใหญ่กว่าและมีจำนวนที่น้อยกว่าทำให้เส้นใยที่มีขนาดเล็ก เมื่อเจริญเข้าไปในรูพรุนแล้วหลุดออกมาได้ง่ายโดยเฉพาะขั้นตอนการล้างวัสดุตรึง ส่วนกะลาคาแฟ เปลือกเมล็ดคาแฟ และไบโสบัประรดไม่เหมาะสมต่อการตรึง เนื่องจากพื้นผิวมีลักษณะเรียบ ทำให้ราไม่สามารถยึดเกาะได้ นอกจากนี้ราไวท์รอตยังสามารถย่อยสลายวัสดุตรึงที่เป็นลิกโนเซลลูโลสได้ ทำให้น้ำหนักมวลรวมภายหลังการตรึงลดลง ตัวอย่างเช่น เปลือกเมล็ดคาแฟ และไบโสบัประรด ซึ่งมีน้ำหนักมวลรวมติดลบเมื่อเทียบกับน้ำหนักวัสดุก่อนตรึง^(35, 36) จากงานวิจัยในปี 2010 โดย Siddiqui และคณะได้นำสก็อตไบรต์มาใช้ในการตรึงรา *Aspergillus niger* SA1 พบว่าสามารถลดค่าความเข้มข้นสี Drimarene Blue K2RL ได้ดีเท่ากับ 75%⁽¹¹⁰⁾ และงานวิจัยของ Ottoni และคณะ พบว่าเมื่อนำรา *T. versicolor* MUM 04.100 มาตรึงร่วมกับฟองน้ำไนลอนแล้วนำไปใช้ลดสีสังเคราะห์ Reactive Black 5 ในถังหมักแบบ fed-batch bioreactor พบว่ามีประสิทธิภาพในการลดสีมากถึง 85%⁽⁸⁷⁾

เมื่อได้ราตรึงบนวัสดุที่เหมาะสมแล้วนำมาหาสภาวะที่เหมาะสมในการลดความเข้มข้นของสีย้อมโดยพิจารณาปัจจัยของแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน ค่า pH และอัตราการเขย่า พบว่าแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่ส่งผลให้การลดค่าความเข้มข้นของสีย้อมสูงที่สุด คือ กลูโคส ซูโครส น้ำตาลปีบ

และแป้ง ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่การใช้น้ำตาลฟรักโทส ส่งผลให้การลดความเข้มข้นของสีย้อมน้อยลง แต่อย่างไรก็ตามยังมีค่าการลดสีสูงกว่าสภาวะที่ไม่เติมแหล่งคาร์บอน ผลจากการทดลองสอดคล้องกับรายงานของ Maryani และคณะ ในปี 2021 ที่ได้วิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำตาลปีบด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) พบว่าประกอบด้วยน้ำตาลหลายชนิด ได้แก่ ซูโครส กลูโคส และฟรักโทส ในอัตราส่วน 89.94, 3.61 และ 3.50% (w/w) ตามลำดับ⁽¹¹¹⁾ ซึ่งมีน้ำตาลซูโครสเป็นองค์ประกอบหลัก อาจเป็นเหตุผลที่น้ำตาลปีบและซูโครสให้ผลการลดความเข้มข้นของสีย้อมไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนกลูโคสเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เชื่อว่าสามารถนำไปใช้ได้ทันที อาจส่งผลให้ราผลิตเอนไซม์ย่อยสีได้ดีขึ้น เป็นต้น ตัวอย่างเช่น งานวิจัยของ Nilsson และคณะ ในปี 2006 รายงานว่าเมื่อเติมกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการลดสีย้อม Reactive Blue 4 และ Reactive Red 2 ด้วยรา *T. versicolor* PRL-572 สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการลดสีได้มากขึ้น⁽⁹³⁾ และงานวิจัยของ Asgher และคณะ ในปี 2009 และ 2010 พบว่าแป้งเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุดในการลดสีย้อมที่ปนเปื้อนอยู่ในน้ำทิ้งหลังบำบัดจากโรงงานอุตสาหกรรมย้อมผ้าด้วยรา *Coriolus versicolor* IBL-04 และ *Ganoderma lucidum* IBL-05^(10, 112) ขณะที่เมื่อใช้ฟรักโทสเป็นแหล่งคาร์บอนจะให้ประสิทธิภาพการลดสีที่ต่ำ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Asgher และคณะ ในปี 2013 ที่ใช้ฟรักโทสเป็นแหล่งคาร์บอนในการลดสี Solar Brilliant Red 80 ด้วยรา *Schizophyllum commune* IBL-06 พบว่าราสามารถลดสีได้เพียง 32.3% เมื่อเทียบกับแหล่งคาร์บอนชนิดอื่น ๆ⁽⁹⁵⁾ นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมแหล่งคาร์บอน กับชุดทดลองที่เติมแหล่งคาร์บอน แสดงให้เห็นว่าการเติมแหล่งคาร์บอนมีความจำเป็นต่อการเพิ่มประสิทธิภาพของราไวท์รอทในการลดสีย้อม เนื่องจากแหล่งคาร์บอนเป็นองค์ประกอบสำคัญในการเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์และเมแทบอลิซึมต่าง ๆ ของจุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์ใช้อากาศ เช่น ราไวท์รอทจะใช้แหล่งคาร์บอน ประมาณ 50-55% ในการเพิ่มจำนวนเซลล์ เป็นต้น

ส่วนผลของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการลดสีย้อมด้วยราตรีง *T. hirsuta* PW17-41 พบว่าการใช้อินทรีย์ไนโตรเจน ได้แก่ แอมโมเนียมไนเตรท และแอมโมเนียมซัลเฟต เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ให้ประสิทธิภาพในการลดสีย้อมที่ดีกว่าการใช้อินทรีย์ไนโตรเจน ได้แก่ เปปโตน และยีสต์สกัด ส่วนยูเรีย และโซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ให้ประสิทธิภาพในการลดสีย้อมต่ำที่สุด อาจเนื่องจากแอมโมเนียมไนเตรท ประกอบด้วยไนโตรเจน 2 อะตอม ในขณะที่สารชนิดอื่น มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบแค่ 1 อะตอม ผลจากการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Asgher และคณะ พบว่าการใช้แอมโมเนียมไนเตรท และแอมโมเนียมซัลเฟต เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับ

การลดสี Solar Brilliant Red 80 ด้วยรา *S. Commune* IBL-06 ให้ผลการลดสีที่ดีกว่าการใช้เปปโตน และจากงานวิจัยเดียวกัน เมื่อใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนให้ประสิทธิภาพการลดสีต่ำที่สุด⁽⁹⁵⁾ เช่นเดียวกับงานวิจัยในปี 2007 ผู้วิจัยใช้อินทรีย์ไนโตรเจน ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต และแอมโมเนียมคลอไรด์ เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับการลดสีน้ำทิ้งหลังบำบัดที่มีการปนเปื้อนสี ย้อมกลุ่มรีเอกทีฟด้วยรา *Aspergillus fumigatus* XC6 พบว่าสามารถลดสีได้สูงกว่าการใช้อินทรีย์ไนโตรเจน ได้แก่ เปปโตน และยีสต์สกัด⁽¹¹³⁾

ผลการศึกษาค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการลดสีย้อมด้วยราตริง *T. hirsuta* PW17-41 พบว่าเมื่อปรับค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 4 และ 5 ให้ประสิทธิภาพในการลดสีสูงสุด รองลงมาเป็นค่า pH 6 และ 7 แต่เมื่อปรับค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อสูงกว่า 7 พบว่าราไม่มีความสามารถในการลดสี แสดงให้เห็นว่าราไวท์รอสสามารถลดสีได้ดีในช่วง pH ที่เป็นกรดถึงกลาง แต่ประสิทธิภาพการลดสีจะลดลงอย่างมากเมื่อค่า pH เริ่มต้นอยู่ในช่วงที่เป็นด่าง จากผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Asgher และคณะ ที่ศึกษาค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการลดสีย้อมสังเคราะห์ของรา *S. commune* IBL-06 พบว่าเมื่อปรับค่า pH ของอาหารเท่ากับ 4 ทำให้ราสามารถลดสีย้อมได้สูงที่สุด⁽⁹⁵⁾ งานวิจัยของ Chakraborty และคณะ ในปี 2013 หาค่า pH ที่เหมาะสมต่อการลดสี Congo Red ด้วยรา *Alternaria alternata* CMERI F6 พบว่าที่ pH 5 มีความเหมาะสมต่อการลดสีมากที่สุด รองลงมาคือ pH 4 ส่วนที่ pH สูงสุดของการทดลองคือ 8 มีประสิทธิภาพการลดสีต่ำที่สุด⁽¹¹⁴⁾ และงานวิจัยในปี 2016 พบว่าค่า pH ที่ 4 เหมาะสมต่อการลดสีย้อมสังเคราะห์ของรา *T. versicolor* IBL-04 มีประสิทธิภาพในการลดสี Remazol Brilliant Yellow 3-GL เท่ากับ 97.21%⁽⁹⁷⁾ โดยค่า pH เป็นปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และกระบวนการทางชีวเคมี รวมทั้งเอนไซม์ต่าง ๆ ค่า pH ที่เหมาะสมของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน ยกตัวอย่างเช่น แบคทีเรียแสดงกิจกรรมการลดสีและการย่อยสลายทางชีวภาพที่ดีในช่วง pH ที่เป็นกลางถึงเบส ในขณะที่เชื้อราและยีสต์มีสภาพที่ที่ดีในช่วง pH ที่เป็นกรดถึงกลาง

ผลการศึกษาอัตราการขยายที่เหมาะสมต่อการลดสีย้อมด้วยราตริง *T. hirsuta* PW17-41 พบว่าเมื่อเลี้ยงราบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที ให้ประสิทธิภาพการลดสีสูงสุด รองลงมาเป็นการเลี้ยงที่ความเร็วรอบ 150 และ 50 รอบต่อนาที ตามลำดับ แต่การเลี้ยงราในสถานะที่ไม่มีการเขย่า รมีประสิทธิภาพการลดสีต่ำที่สุด เนื่องจากการเขย่าเป็นการเพิ่มปริมาณอากาศที่จำเป็นต่อจุลินทรีย์ที่ใช้อากาศ ได้แก่ รา เป็นต้น รวมถึงการเขย่ายังช่วยเพิ่มการสัมผัสระหว่างสีย้อมกับราตริง ทำให้การลดสีย้อมด้วยราในสถานะที่มีการเขย่าดีกว่าสถานะที่ไม่มีการ

เขย่า ผลจากการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Megha และคณะ ในปี 2015 ได้ทดลองหาความเร็วรอบในการเขย่าที่เหมาะสมต่อการลดสี Remazol Brilliant Blue R ด้วยรา *Mucor hiemalis* MV04 โดยทดสอบที่ความเร็วรอบ 110, 120, 130, 140 และ 150 รอบต่อนาที พบว่าความเร็วรอบ 130 รอบต่อนาที มีความเหมาะสมมากที่สุดในการลดสีย้อม⁽¹²⁾ งานวิจัยของ Chakraborty และคณะ ในปี 2013 หาความเร็วรอบในการเขย่าที่เหมาะสมในการลดสี Congo Red ด้วยรา *A. alternata* CMERI F6 พบว่าความเร็วรอบในการเขย่าที่ 120 และ 150 รอบต่อนาที มีความเหมาะสมมากที่สุด รองลงมาเป็นความเร็วรอบ 90 และ 180 รอบต่อนาที ตามลำดับ⁽¹¹⁴⁾ รวมถึงงานวิจัยของ Gao และคณะ ใช้รา *Bjerkandera adusta* SWUSI4 มาลดสีย้อมสังเคราะห์ Cotton Blue, Crystal Violet และ Methyl Violet ในสภาวะที่ไม่มีกรเขย่า และสภาวะการเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที พบว่าราสามารถลดสีย้อมในสภาวะการเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ได้ดีกว่าสภาวะที่ไม่มีกรเขย่า⁽⁶⁴⁾ และงานวิจัยในปี 2013 ผู้วิจัยทดลองลดสีย้อม Reactive Violet-1 ในสภาวะที่ไม่มีกรเขย่า และมีกรเขย่า 150 รอบต่อนาที ด้วยรา *Ganoderma cupreum* AG-1 พบว่าราสามารถลดสีย้อมสังเคราะห์ในสภาวะที่มีกรเขย่าได้ ดีกว่าสภาวะที่ไม่มีกรเขย่า⁽⁹⁶⁾ อย่างไรก็ตามอัตราเร็วในการเขย่าของราแต่ละสายพันธุ์ ส่งผลต่อการลดค่าสีย้อมแตกต่างกันออกไป ขึ้นกับชนิดของสายพันธุ์และระบบในการบำบัด เช่น การใช้ราตริง หรือราเส้นใย เป็นต้น จากการหาสภาวะที่เหมาะสมของราตริง *T. hirsuta* PW17-41 ในการลดสีย้อม คือ ใช้น้ำตาลปีบ และแอมโมเนียมไนเตรทเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ตามลำดับ ปรับค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 5 และเลี้ยงราในสภาวะที่มีกรเขย่า 100 รอบต่อนาที ซึ่งราตริงสามารถลดสีย้อมได้สูงสุดเท่ากับ 94.60% โดยลดค่าความเข้มของสีย้อมจาก 2,475 ADMI ให้เหลือเท่ากับ 114 ADMI ภายในระยะเวลา 2 วัน

ราไวท์รอตเป็นราที่สามารถบำบัดสีย้อมได้โดยการดูดซับไว้ที่ผิวเซลล์ หรือการย่อยสลายทางชีวภาพโดยอาศัยเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ เอนไซม์แลคเคส แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส และลิกนินเปอร์ออกซิเดส เป็นต้น⁽¹¹⁵⁾ โดยเอนไซม์กลุ่มลิกนินโอไลติก เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายลิกนินที่มีโครงสร้างเป็นวงอะโรมาติก สารประเภทลิกนินเซลลูโลส ยาฆ่าแมลง สารเคมีสังเคราะห์ที่มีโครงสร้างอะโรมาติกที่ซับซ้อน รวมทั้งสีย้อมสังเคราะห์ ทำให้เหมาะสำหรับใช้เพื่อจุดประสงค์ทางชีวภาพและนำไปประยุกต์ใช้ในกระบวนการบำบัดทางชีวภาพ ยกตัวอย่าง เช่น การกำจัดสีย้อมสังเคราะห์ และการกำจัดสารมลพิษ เป็นต้น^(35, 37) ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้ศึกษากลไกในการลดสีย้อมเหลือทิ้งด้วยราตริง *T. hirsuta* PW17-41 พบว่ากลไกหลัก คือ การย่อยสลายด้วยเอนไซม์ ซึ่งสามารถลดสีย้อมได้เท่ากับ 60.23% รวมกับการดูดซับสีของราตริงที่ผ่านการนึ่งฆ่า

เชื้อ สามารถลดสีย้อมได้เท่ากับ 28.98% ซึ่งวัสดุตรึงอย่างเดียวยังสามารถดูดซับสีได้เท่ากับ 4.04% นอกจากนี้ยังตรวจไม่พบค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลุ่มลิกนินโพลิติกในชุดการทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แสดงให้เห็นว่าสีย้อมที่ลดลงมาจากการดูดซับของเส้นใยรา ประกอบกับเส้นใยราตรึงเปลี่ยนจากสีขาวไปเป็นสีน้ำตาลอีกด้วย และเมื่อใช้ราตรึงที่ไม่ได้ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ พบว่ามีประสิทธิภาพการลดสีสูงถึง 89.21% เมื่อนำมาวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลุ่มลิกนินโพลิติก พบกิจกรรมของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส และแลคเคส แสดงให้เห็นว่าราตรึงที่มีชีวิตสามารถลดสีย้อมโดยใช้กลไกการดูดซับ และการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ โดยเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสเป็นเอนไซม์หลัก เนื่องจากพบค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด โดยในงานวิจัยนี้ไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส สอดคล้องกับงานวิจัยของ Thamvithayakorn และคณะ ที่ตรวจสอบการสร้างเอนไซม์กลุ่มลิกนินโพลิติกจากราไทรอทโดยใช้กากตะกอนดีแคนเตอร์ (oil palm decanter cake) เป็นสารตั้งต้น พบว่ารา *T. hirsuta* PW17-41 สามารถผลิตเอนไซม์แลคเคส และแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส แต่ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส⁽¹⁰¹⁾ ต่อมาศึกษาหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสด้วยวิธี SDS-PAGE พบแถบโปรตีน 1 แถบ ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 71 kDa จากนั้นยืนยันด้วยวิธี native-PAGE และทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส พบแถบแบนสีส้มเข้มมีขนาด 45 kDa และสีส้มอ่อนที่ขนาด 90 kDa ซึ่งคาดว่าเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสที่รา *T. hirsuta* PW17-41 ผลิตมีขนาดประมาณ 45 kDa สอดคล้องกับงานวิจัยของ Asgher ในปี 2016 พบว่าเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสที่ผลิตจากรา *T. versicolor* IBL-04 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 43 kDa⁽⁵⁶⁾ นอกจากนี้ยังมีอีกหลายงานวิจัยที่รายงานถึงน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสของราไทรอท พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 38-53 kDa ได้แก่ งานวิจัยของ Zhang ในปี 2018 รายงานว่าเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสที่ผลิตจากรา *Cerrena unicolor* BBP6 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 45 kDa⁽⁶¹⁾ ส่วนเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสที่ผลิตจากรา *Ganoderma lucidum*, *Agrocybe praecox* และ *Phanerochaete chrysosporium* มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 38, 42 และ 53 kDa ตามลำดับ⁽⁷⁴⁾ เมื่อนำน้ำเลี้ยงรา *T. hirsuta* PW17-41 มาตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต แสดงให้เห็นว่าค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์และความบริสุทธิ์ของเอนไซม์เพิ่มขึ้น มีค่าเท่ากับ 4.71 เท่า ซึ่งอาจนำไปศึกษาต่อยอดถึงความเสถียร และคุณสมบัติต่าง ๆ เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ต่อไป

ผลการศึกษาค่าความสัมพันธ์ของการลดสีย้อม และการผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโพลิติก พบว่าเมื่อบำบัดสีย้อมเป็นเวลา 20 วัน ราตรึงมีประสิทธิภาพในการลดสีเพิ่มขึ้น สอดคล้องกับ

กิจกรรมของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส และแลคเคสที่เพิ่มสูงขึ้น และสวนทางกับค่า pH ที่ลดลงจนอยู่ในช่วงที่เป็นกรดสูงประมาณ 2.5 เมื่อสิ้นสุดการบำบัด ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า เอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส และแลคเคสเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทในการย่อยสลายสีย้อม และจากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของการลดสีย้อม และการผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโกลติกด้วยสถิติ correlation พบว่าการลดสีย้อมมีความสัมพันธ์กับการผลิตเอนไซม์แลคเคส และแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสในทิศทางที่เป็นบวก มีขนาดความสัมพันธ์เท่ากับ 0.661 และ 0.639 ตามลำดับ ที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับร้อยละ 95 ผลจากการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยหลาย ๆ งานวิจัยที่พบว่า เอนไซม์กลุ่มลิกนินโกลติกมีบทบาทสำคัญในการกำจัดสีย้อม งานวิจัยของ Othman และคณะในปี 2018 พบว่าเอนไซม์แลคเคสที่ผลิตจากรา *Agaricus bisporus* CU13 มีบทบาทสำคัญในการลดสีสังเคราะห์ Acid Blue⁽⁴⁵⁾ รวมถึงเอนไซม์แลคเคสที่ผลิตจากรา *T. troglia* เป็นเอนไซม์ที่สำคัญต่อการกำจัดสี Reactive Black 5, Remazol Brilliant Blue R และ Reactive Violet 5⁽⁶⁰⁾ และอีกหลายงานวิจัยที่ใช้เอนไซม์แลคเคสจากรา *T. ljubarkyi* และ *Trametes* sp. F1635 สำหรับการกำจัดสีสังเคราะห์^(70, 72) ตัวอย่างงานวิจัยที่ใช้เอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสสำหรับกำจัดสีย้อม ได้แก่ งานวิจัยในปี 2018 ใช้เอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสที่ผลิตจากรา *C. unicolor* BBP6 ในการลดสีสังเคราะห์ Azure Blue, Remazol Brilliant Blue R, Congo Red, Methyl Orange, Bromophenol Blue และ Crystal Violet⁽⁶¹⁾ งานวิจัยในปี 2014 ได้ผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสจากรา *Irpex lacteus* CD2 มาใช้ในการลดสีย้อม Remazol Brilliant Violet 5R, Remazol Brilliant Blue R, Indigo Carmine และ Direct Red 5B⁽⁵⁰⁾ รวมถึงอีกหลาย ๆ งานวิจัยที่ใช้เอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสจากรา *P. chrysosporium*, *Trametes* sp. 48424, *A. terreus* GS28 และ *S. commune* IBL-06 ในการลดสีสังเคราะห์^(95, 116-118) อย่างไรก็ตาม งานวิจัยที่ศึกษาเอนไซม์กลุ่มลิกนินโกลติกจากราสกุล *Trametes* sp. ในการลดสีย้อม พบว่าส่วนใหญ่ผลิตเอนไซม์แลคเคสเป็นหลัก รองลงมาคือแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส ในขณะที่งานวิจัยนี้ *T. hirsuta* PW17-41 ผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสเป็นหลัก รองลงมาคือแลคเคส ทั้งนี้ อาจเนื่องจากความหลากหลายของสายพันธุ์รา สภาพแวดล้อม และชนิดของสีย้อม เป็นต้น

เนื่องจากกลไกหลักในการลดสีย้อม คือ การย่อยสลายด้วยเอนไซม์จึงได้ศึกษายืนยันโดยการติดตามการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีของสีย้อมก่อนและหลังการบำบัดด้วยเทคนิค 2 เทคนิค ได้แก่ 1) การสแกนค่าการดูดกลืนแสงของสีย้อมด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ 2) การศึกษาพันธะทางเคมีที่เปลี่ยนแปลงของสีย้อมด้วย FTIR ผลการสแกนความยาวคลื่นตั้งแต่ 320-700 นาโนเมตรของสารทั้งหมดในน้ำสีย้อมพบว่า ก่อนการบำบัดด้วยราตริงมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด

ที่ 590 นาโนเมตรที่เป็นค่าการดูดกลืนแสงสีน้ำเงินสอดคล้องกับสีที่มองเห็นด้วยตาเปล่าเป็นสีน้ำเงินเข้ม หลังจากการบำบัดด้วยราตรีงเป็นเวลา 12 และ 20 วัน มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 330 นาโนเมตร ซึ่งเป็นค่าการดูดกลืนแสงของสีแดง และค่าการดูดกลืนแสงโดยรวมมีค่าลดลง ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่สียอมเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเข้มเป็นสีส้ม และชมพูอ่อน เมื่อสิ้นสุดการบำบัด จากค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลง และความยาวคลื่นของสีที่เปลี่ยนแปลงไปเป็นผลมาจากการย่อยสลายสียอมของราตรีงโดยอาจเกิดการย่อยสลายพันธะและโมเลกุลโครงสร้างของสียอมให้เกิดการเปลี่ยนแปลง คือ สลายไป เป็นต้น สอดคล้องกับงานวิจัยของ Maniyam ในปี 2020 พบว่าหลังจากการบำบัดสียอม Methyl Red มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดอยู่ในช่วง 200-300 นาโนเมตร ซึ่งเปลี่ยนแปลงมาจากค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของชุดควบคุมก่อนการบำบัด คือ 435 นาโนเมตร⁽¹⁰⁰⁾ ส่วนผลการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสียอมก่อนและหลังบำบัดด้วยเทคนิค FTIR พบว่าหลังจากบำบัดสียอม ตำแหน่งพีคของ FTIR spectrum มีการเปลี่ยนแปลงไป และบางตำแหน่งพีคหายไปเมื่อเทียบกับชุดควบคุมหรือตัวอย่างสีก่อนการบำบัด ได้แก่ ตำแหน่งพีคที่ $3,369.22\text{ cm}^{-1}$ คือพันธะของ O-H เปลี่ยนตำแหน่งมาจากพีคที่ $3,366.92\text{ cm}^{-1}$ ของชุดควบคุม ตำแหน่งพีคที่ $2,923.24\text{ cm}^{-1}$ และ $2,853.40\text{ cm}^{-1}$ คือพันธะของ C-H เปลี่ยนตำแหน่งมาจากพีคที่ $2,921.94\text{ cm}^{-1}$ และ $2,852.91\text{ cm}^{-1}$ ของชุดควบคุม บางตำแหน่งพบพีคที่หายไป ได้แก่ ตำแหน่งพีคที่ $2,955.28\text{ cm}^{-1}$ และ $1,403.69\text{ cm}^{-1}$ คือพันธะของ C-H และตำแหน่งพีคที่ $1,351.27\text{ cm}^{-1}$ คือพันธะของ S=O เป็นต้น แสดงให้เห็นว่าตำแหน่งพีคที่เปลี่ยนแปลงไป หรือตำแหน่งพีคที่หายไปอาจเกิดจากการย่อยสลายสียอมด้วยราตรีง โดยการย่อยสลายพันธะของโครงสร้างสียอม เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Ayed และคณะ เมื่อเปรียบเทียบอินฟราเรดสเปกตรัมของชุดควบคุมและตัวอย่างหลังจากการย่อยสี Methyl Red พบว่าตำแหน่งของพีคมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยจาก $1,604\text{ cm}^{-1}$, $1,384\text{ cm}^{-1}$, $1,124\text{ cm}^{-1}$ (C-C) และ 535 cm^{-1} เปลี่ยนไปเป็น $1,603\text{ cm}^{-1}$, $1,383\text{ cm}^{-1}$ (-CHO), $1,114\text{ cm}^{-1}$ และ 530 cm^{-1} ⁽⁹⁹⁾

จากข้อมูลราตรีง *T. hirsuta* PW17-41 และสภาวะที่เหมาะสมในการลดสียอม ได้นำมาศึกษาประสิทธิภาพของราตรีงภายใต้สภาวะต่าง ๆ ดังนี้ 1) การลดสียอมที่ความเข้มข้นต่าง ๆ 2) การทดสอบประสิทธิภาพของราตรีงในการนำกลับมาใช้ซ้ำ และ 3) การใช้ราตรีงในการลดสียอมภายใต้สภาวะที่ไม่ปราศจากเชื้อ ผลการศึกษาประสิทธิภาพของราตรีงในการลดสียอมที่ความเข้มข้น 4-100% (v/v) พบว่าราตรีงมีประสิทธิภาพในการลดสีที่ความเข้มข้น 4% (2,475 ADMI) ให้ผ่านมาตรฐานได้ภายใน 2 วัน ส่วนที่ความเข้มข้น 8% (6,100 ADMI) สามารถลดสีให้ผ่านมาตรฐานได้ภายใน 8 วัน ในขณะที่ความเข้มข้นสีที่ 17-100% (11,150-60,100 ADMI) ราตรีงไม่

สามารถลดสีให้ผ่านมาตรฐานได้ภายในระยะเวลา 8 วัน แต่อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพในการลดสีมีค่าสูงถึง 89.17-96.51%

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสีย้อมสูงขึ้นประสิทธิภาพในการลดสีลดลง โดยอัตราการลดสีจะลดลงตามความเข้มข้นของสีย้อมที่เพิ่มขึ้น อาจเนื่องจากความเป็นพิษจากสีย้อมต่อเซลล์รา ส่งผลต่อการย่อยสลายของสี หรือการรบกวนบริเวณแอกทีฟไซต์ (active site) ของเอนไซม์ ดังนั้นในการบำบัดสีด้วยราตรึงควรมีปริมาณของความเข้มข้นสีให้เหมาะสมต่อราตรึง เพื่อการลดสีที่มีประสิทธิภาพสูงสุด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัย Vantamuri และคณะ พบว่ารา *Marasmius* sp. BBKAV79 สามารถลดสีย้อมรีเอกทีฟ Diazo ที่ความเข้มข้นต่ำที่สุด คือ 50 มิลลิกรัมต่อลิตรได้ดีที่สุด รองลงมาคือ 100 และ 150 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนความเข้มข้นสูงที่สุดคือ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ราสามารถลดสีย้อมได้ต่ำที่สุด⁽⁶⁷⁾ งานวิจัยของ Chen และ Ting รายงานว่ารา *Corioloopsis* sp. 1C3 สามารถลดสีสังเคราะห์ Methyl Violet, Crystal Violet และ Malachite Green ได้ดีที่ความเข้มข้นของสีเริ่มต้นต่ำที่สุด และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสีพบว่าประสิทธิภาพในการลดสีลดลง⁽¹¹⁹⁾ รวมถึงงานวิจัยของ Khan และ Fulekar ทดสอบความสามารถของรา *Aspergillus bombycis* ในการลดสีย้อมผ้า Reactive Red 31 ที่ความเข้มข้น 5-25 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าราสามารถลดสีย้อมความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตรได้ดีที่สุด และความสามารถในการลดสีลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นสูงขึ้นจนถึง 25 มิลลิกรัมต่อลิตร⁽¹²⁰⁾

ผลการศึกษาประสิทธิภาพของราตรึง *T. hirsuta* PW17-41 ในการนำกลับมาใช้ซ้ำ พบว่าราตรึงมีประสิทธิภาพในการนำกลับมาใช้ซ้ำได้สูงถึง 10 รอบภายใต้สภาวะที่เหมาะสม โดยที่ประสิทธิภาพการลดสีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และในรอบที่ 11 และ 12 พบว่าราตรึงมีประสิทธิภาพการลดสีลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และผลจากการลดสีในแต่ละรอบของการนำกลับมาใช้ซ้ำพบว่าสอดคล้องกับการผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสของราตรึงที่มีกิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้นสูงสุดในรอบที่ 6 และค่อย ๆ ลดลง แสดงให้เห็นว่าราตรึงมีประสิทธิภาพในการนำกลับมาใช้ซ้ำได้หลายรอบ ซึ่งส่งผลดีต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากไม่จำเป็นต้องทำการตรึงราหลาย ๆ รอบสำหรับการลดสี เพราะสามารถนำราตรึงชุดเดิมกลับมาใช้ซ้ำได้ และให้ประสิทธิภาพการลดสีที่สูงขึ้นอีกด้วย ผลจากการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Srikanlayanukul พบว่าการใช้รา *Coriolus versicolor* RC3 ที่ตรึงร่วมกับโคมโพสิทีวีน มาลดน้ำทิ้งที่ปนเปื้อนสีย้อมจากโรงงานย้อมผ้า โดยราตรึง *C. versicolor* RC3 สามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้ถึง 14 รอบ โดยมีประสิทธิภาพการลดสี 80-90% เมื่อมีการเติมซูโครส 3 กรัมต่อลิตร⁽¹²¹⁾ รวมถึงงานวิจัยของ Krastanov พบว่าราตรึง *T. versicolor* สามารถนำ

กลับมาใช้บำบัดสีสังเคราะห์ Orange II และ Reactive Blue 4 ได้สูงสุด 5 รอบ โดยประสิทธิภาพในการลดสีเริ่มลดลงในรอบที่ 3 และลดลงต่ำกว่า 50% หลังจากรอบที่ 5 ของการนำกลับมาใช้ซ้ำ (122)

เมื่อนำราตรีง *T. hirsuta* PW17-41 มาใช้ในการลดสีย้อมภายใต้สภาวะที่ไม่ปราศจากเชื้อ พบว่าในสภาวะที่มีการเติมอาหาร ราตรีงมีประสิทธิภาพในการลดสีที่ความเข้มข้น 4-25% (v/v) (หรือ 2,475-15,350 ADMI) ได้สูงถึง 96.39-98.15% เมื่อเทียบกับสภาวะที่ไม่ได้เติมอาหาร ซึ่งสามารถลดสีได้เพียง 75.83-85.48% ภายใน 8 วัน เนื่องจากสารอาหาร ได้แก่ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และสารอาหารอื่น ๆ มักจะจำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์ หรือการสร้างสารต่าง ๆ รวมถึงเอนไซม์ นอกจากนี้ภายใต้สภาวะที่ไม่ปราศจากเชื้อที่มีการเติมอาหารยังพบการเจริญของแบคทีเรียซึ่งอาจจะช่วยส่งเสริมประสิทธิภาพในการลดสีได้ดียิ่งขึ้น แต่ในสภาวะที่ไม่มีการเติมอาหารไม่พบการเจริญของแบคทีเรีย ผลจากการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยในปี 2006 รายงานว่าในสภาวะที่ไม่เติมอาหาร ราตรีง *C. versicolor* RC3 มีประสิทธิภาพในการนำกลับมาใช้ลดสีได้เพียง 3 รอบ แต่เมื่อมีการเติมซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้ราตรีงมีประสิทธิภาพในการนำกลับมาใช้ซ้ำได้เพิ่มขึ้นเป็น 14 รอบ⁽¹²¹⁾ ในขณะที่งานวิจัยของ Gao และคณะ พบว่าการใช้ราไวท์รอปที่ยังไม่เจริญเติบโตเต็มที่มาลดสีสังเคราะห์ Reactive Brilliant Red K-2BP ในสภาวะที่ไม่ปราศจากเชื้อ พบว่าราไม่มีประสิทธิภาพในการลดสี แต่เมื่อเลี้ยงราให้เจริญเต็มที่ในสภาวะที่ปราศจากเชื้อก่อน แล้วนำรามาย้อมในสภาวะที่ไม่ปราศจากเชื้อ พบว่ารามมีประสิทธิภาพในการลดสีได้มากกว่า 90% ซึ่งเทียบเท่ากับการลดสีในสภาวะที่ปราศจากเชื้อ เนื่องจากในสภาวะที่ไม่ปราศจากเชื้อ มักมีการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ยีสต์ ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่เจริญได้ไวกว่ารา ทำให้ราไม่มีการเจริญเติบโตและไม่มีประสิทธิภาพในการลดสี⁽¹²³⁾ แต่ในงานวิจัยนี้ได้มีขั้นตอนการตรึงราที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของราให้เจริญเต็มที่ก่อน ดังนั้นเชื้อจุลินทรีย์ที่มีการปนเปื้อนในระหว่างการทดลอง จึงไม่ได้ส่งผลทำให้ราตรีงมีประสิทธิภาพในการลดสีลดลง แต่อาจจะช่วยส่งเสริมให้มีประสิทธิภาพในการลดสีที่สูงขึ้นได้อีกด้วย

บรรณานุกรม

1. สถาบันพัฒนาอุตสาหกรรมสิ่งทอ. อุตสาหกรรมสิ่งทอและเครื่องนุ่งห่ม ฐานข้อมูลสถิติสิ่งทอและเครื่องนุ่งห่ม. 2022 [เข้าถึงเมื่อ 6 เม.ย. 2565]. เข้าถึงได้จาก: <https://www.thaitextile.org/th/fiu/index.g002.200.html#1>.
2. Benkhaya S, M' rabet S, El Harfi A. A review on classifications, recent synthesis and applications of textile dyes. *Inorganic Chemistry Communications*. 2020;115:107891.
3. Mani S, Bharagava RN. Textile industry wastewater: environmental and health hazards and treatment approaches. *Recent advances in environmental management: CRC Press*; 2018. p. 47-69.
4. Abid MF, Zablouk MA, Abid-Alameer AM. Experimental study of dye removal from industrial wastewater by membrane technologies of reverse osmosis and nanofiltration. *Iranian Journal of Environmental Health Science & Engineering*. 2012;9(1):17-25.
5. Bilal M, Asgher M, Iqbal M, Hu H, Zhang X. Chitosan beads immobilized manganese peroxidase catalytic potential for detoxification and decolorization of textile effluent. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2016;89:181-9.
6. Sarkar S, Banerjee A, Halder U, Biswas R, Bandopadhyay R. Degradation of Synthetic Azo Dyes of Textile Industry: a Sustainable Approach Using Microbial Enzymes. *Water Conservation Science and Engineering*. 2017;2(4):121-31.
7. Slama HB, Chenari Bouket A, Pourhassan Z, Alenezi FN, Silini A, Cherif-Silini H, et al. Diversity of Synthetic Dyes from Textile Industries, Discharge Impacts and Treatment Methods. *Applied Sciences*. 2021;11(14):6255-76.
8. Siddique K, Rizwan M, Shahid MJ, Ali S, Ahmad R, Rizvi H. Textile Wastewater Treatment Options: A Critical Review. *Enhancing Cleanup of Environmental Pollutants*. 2017. p. 183-207.
9. Revankar MS, Lele SS. Synthetic dye decolorization by white rot fungus, *Ganoderma sp. WR-1*. *Bioresource Technology*. 2007;98(4):775-80.
10. Asgher M, Azim N, Bhatti HN. Decolorization of practical textile industry effluents by white rot fungus *Coriolus versicolor* IBL-04. *Biochemical Engineering Journal*.

2009;47(1-3):61-5.

11. Attéké C, MOUNGUENGUI S, TCHINDA J-BS, NDIKONTAR MK, GELHAYE E, GÉRARDIN P. Biodegradation of reactive blue 4 and orange G by *Pycnoporus sanguineus* strain isolated in Gabon. *Journal of Bioremediation & Biodegradation*. 2013;4(7):1000206.
12. Megha V, Meenakshi SA. Optimization of different parameters on synthetic dye decolorization by free and immobilized *Mucor hiemalis* MV04 (KR078215). *Research Journal of Chemical Sciences*. 2015;5(6):20-7.
13. Przystas W, Zablocka-Godlewska E, Grabinska-Sota E. Efficiency of decolorization of different dyes using fungal biomass immobilized on different solid supports. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2018;49(2):285-95.
14. สำนักงานส่งเสริมวิสาหกิจขนาดกลางและขนาดย่อม. แผนปฏิบัติการส่งเสริมวิสาหกิจขนาดกลางและขนาดย่อมรายสาขาอุตสาหกรรมสิ่งทอและเครื่องนุ่งห่ม. 2018 [เข้าถึงเมื่อ 6 เม.ย. 2565]. เข้าถึงได้จาก: https://www.sme.go.th/upload/mod_download/อุตสาหกรรมสิ่งทอและเครื่องนุ่งห่ม.pdf.
15. ขนิษฐา. อุตสาหกรรมฟอกย้อม. 2007 [เข้าถึงเมื่อ 6 เม.ย. 2565]. เข้าถึงได้จาก: https://www.tpa.or.th/writer/read_this_book_topic.php?bookID=370&pageid=4&read=true&count=true.
16. กรมควบคุมมลพิษ. แนวปฏิบัติที่ดีด้านการป้องกันและลดมลพิษอุตสาหกรรมฟอกย้อม. 2022 [เข้าถึงเมื่อ 6 เม.ย. 2565]. เข้าถึงได้จาก: http://infofile.pcd.go.th/water/water_fokyom.pdf.
17. สำนักอนามัยสิ่งแวดล้อม. แนวทางการประกอบกิจการที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพประเภทสถานประกอบการการย้อม การกัดสีผ้าหรือสิ่งทออื่น ๆ. 2011 [เข้าถึงเมื่อ 6 เม.ย. 2565]. เข้าถึงได้จาก: http://203.157.109.15/nont/file_upload/subforms/2019_5c579d8daba6196a783b8e5be7de6d2/แนวทางการประกอบกิจการ%20ที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพ%20ประเภทย้อม%20กัดสีผ้าและสิ่งทออื่น%20_201902150743.pdf.
18. ศูนย์บริการวิชาการแห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. คู่มือแนวทางการจัดการสีน้ำทิ้งของโรงงานฟอกย้อมสิ่งทอ. 2011 [เข้าถึงเมื่อ 6 เม.ย. 2565]. เข้าถึงได้จาก: <https://readgur.com/doc/2225579/คู่มือแนวทางการจัดการสีน้ำทิ้งของโรงงานฟอก>.
19. Hunger KD. *Industrial dyes: chemistry, properties, applications*. 2003. p. 13-112.

20. Berradi M, Hsissou R, Khudhair M, Assouag M, Cherkaoui O, El Bachiri A, et al. Textile finishing dyes and their impact on aquatic environs. *Heliyon*. 2019;5(11):e02711.
21. Petzer A, Harvey BH, Wegener G, Petzer JP. Azure B, a metabolite of methylene blue, is a high-potency, reversible inhibitor of monoamine oxidase. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2012;258(3):403-9.
22. Duarte MC, Rai M. *Therapeutic medicinal plants: from lab to the market*: CRC Press; 2015.
23. Ferraz ERA, Grando MD, Oliveira DP. The azo dye Disperse Orange 1 induces DNA damage and cytotoxic effects but does not cause ecotoxic effects in *Daphnia similis* and *Vibrio fischeri*. *Journal of Hazardous Materials*. 2011;192(2):628-33.
24. Sivarajasekar N, Baskar R. Adsorption of Basic Magenta II onto H₂SO₄ activated immature *Gossypium hirsutum* seeds: Kinetics, isotherms, mass transfer, thermodynamics and process design. *Arabian Journal of Chemistry*. 2019;12(7):1322-37.
25. Jebapriya GR, Gnanadoss JJ. Bioremediation of textile dye using white rot fungi: A review. *International Journal of Current Research and Review*. 2013;5:1-13.
26. ประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม. กำหนดมาตรฐานควบคุมการระบายน้ำทิ้งจากโรงงาน. 2018 [เข้าถึงเมื่อ 6 เม.ย. 2565]. เข้าถึงได้จาก: http://www.genco.co.th/Document/Inf_14.PDF.
27. Jacob Rus. (2010). Retrieved April 18, 2022 from https://en.wikipedia.org/wiki/HSL_and_HSV#/media/File:HSV_color_solid_cone_chroma_gray.png.
28. Jadhav AC, Jadhav NC. Treatment of textile wastewater using adsorption and adsorbents. *Sustainable Technologies for Textile Wastewater Treatments*. 2021. p. 235-73.
29. Wang Z-p, Xue M, Huang K, Liu Z, editors. *Textile Dyeing Wastewater Treatment*. 2011.
30. Holkar CR, Jadhav AJ, Pinjari DV, Mahamuni NM, Pandit AB. A critical review on textile wastewater treatments: possible approaches. *Journal of Environmental Management*. 2016;182:351-66.
31. D. Patil A, Raut PDPD. Treatment of textile wastewater by Fenton's process as a Advanced Oxidation Process. *IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology and*

Food Technology. 2014;8(10):29-32.

32. Adane T, Adugna AT, Alemayehu E, Rehman R. Textile Industry Effluent Treatment Techniques. Journal of Chemistry. 2021;2021:1-14.

33. Bhatia D, Sharma NR, Singh J, Kanwar RS. Biological methods for textile dye removal from wastewater: A review. Critical Reviews in Environmental Science and Technology. 2017;47(19):1836-76.

34. LennyCZ. (2008). Retrieved April 9, 2021 from https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Activated_Sludge_1.svg.

35. Peralta RM, da Silva BP, Gomes Côrrea RC, Kato CG, Vicente Seixas FA, Bracht A. Enzymes from Basidiomycetes—Peculiar and Efficient Tools for Biotechnology. Biotechnology of Microbial Enzymes. 2017. p. 119-49.

36. Li K, Xu F, Eriksson KE. Comparison of fungal laccases and redox Mediators in oxidation of a nonphenolic lignin model compound. Applied and Environmental Microbiology. 1999;65:2654-60.

37. Plácido J, Capareda S. Ligninolytic enzymes: a biotechnological alternative for bioethanol production. Bioresources and Bioprocessing. 2015;2(1):23-34.

38. Bamdad H, Hawboldt K, MacQuarrie S. A review on common adsorbents for acid gases removal: focus on biochar. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 2018;81:1705-20.

39. Jerzy Opiola. (2011) Retrieved October 28, 2021 from https://en.wikipedia.org/wiki/Trametes_hirsuta#/media/File:Trametes_hirsuta_BS14.2.jpg.

40. Tom Romeo. (2020) Retrieved October 28, 2021 from https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pleurotus_ostreatus_94246379.jpg.

41. James Lindsey. (2005) Retrieved October 28, 2021 from <https://en.wikipedia.org/wiki/File:Bjerkandera.adusta.-.lindsey.jpg>.

42. Selso. (2012) Retrieved October 28, 2021 from https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Ganoderma_applanatum_G2.jpg.

43. JMK. (2014) Retrieved October 28, 2021 from https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Microporus_xanthopus,_Krantzkloof_Natuurreservaat,_b.jpg.

44. Chowdhary P, More N, Yadav A, Bharagava RN. Ligninolytic enzymes: an introduction and applications in the food industry. *Enzymes in Food Biotechnology*. 2019. p. 181-95.
45. Othman AM, Elsayed MA, Elshafei AM, Hassan MM. Purification and biochemical characterization of two isolated laccase isoforms from *Agaricus bisporus* CU13 and their potency in dye decolorization. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018;113:1142-8.
46. Agrawal K, Chaturvedi V, Verma P. Fungal laccase discovered but yet undiscovered. *Bioresources and Bioprocessing*. 2018;5(1):4-15.
47. Wong DW. Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2009;157(2):174-209.
48. Bassanini I, Ferrandi EE, Riva S, Monti D. Biocatalysis with laccases: an updated overview. *Catalysts*. 2020;11(1):26.
49. Wang X, Liu J, Qu R, Wang Z, Huang Q. The laccase-like reactivity of manganese oxide nanomaterials for pollutant conversion: rate analysis and cyclic voltammetry. *Scientific Reports*. 2017;7(1):7756.
50. Qin X, Zhang J, Zhang X, Yang Y. Induction, purification and characterization of a novel manganese peroxidase from *Irpex lacteus* CD2 and its application in the decolorization of different types of dye. *PLoS One*. 2014;9(11):e113282.
51. Chang Y, Yang D, Li R, Wang T, Zhu Y. Textile dye biodecolorization by manganese peroxidase: a review. *Molecules*. 2021;26(15):4403-17.
52. Hofrichter M. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and Microbial Technology*. 2002;30(4):454-66.
53. Wang N, Ren K, Jia R, Chen W, Sun R. Expression of a fungal manganese peroxidase in *Escherichia coli*: a comparison between the soluble and refolded enzymes. *BMC Biotechnology*. 2016;16(1):87.
54. Wan C, Li Y. Solid-state biological pretreatment of lignocellulosic biomass. *Green Biomass Pretreatment for Biofuels Production*. SpringerBriefs in Molecular Science. 2013. p. 67-86.

55. Sari AA, Tachibana S, Muryanto. Correlation of ligninolytic enzymes from the newly-found species *Trametes versicolor* U97 with RBBR decolorization and DDT degradation. *Water, Air, & Soil Pollution*. 2012;223(9):5781-92.
56. Asgher M, Ramzan M, Bilal M. Purification and characterization of manganese peroxidases from native and mutant *Trametes versicolor* IBL-04. *Chinese Journal of Catalysis*. 2016;37(4):561-70.
57. Dayi B, Duishemambet Kyzy A, Akdogan HA. Characterization of recuperating talent of white-rot fungi cells to dye-contaminated soil/water. *Chinese Journal of Chemical Engineering*. 2019;27(3):634-8.
58. Sudiana IK, Sastrawida IDK, Sukarta IN. Decolorization study of Remazol Black B textile dye using local fungi of *Ganoderma* sp. and their ligninolytic enzymes. *Journal of Environmental Science and Technology*. 2017;11(1):16-22.
59. Fazli MM, Mesdaghinia A, Naddafi K, Nasseri S, Yunesian M, Assadi MM, et al. Optimization of Reactive Blue 19 decolorization by *Ganoderma* sp. using response surface methodology. *Iranian Journal of Environmental Health Science & Engineering*. 2010;7:35-42.
60. Sayahi E, Ladhari N, Mechichi T, Sakli F. Azo dyes decolourization by the laccase from *Trametes trogii*. *the Journal of The Textile Institute*. 2016;107(11):1478-82.
61. Zhang H, Zhang J, Zhang X, Geng A. Purification and characterization of a novel manganese peroxidase from white-rot fungus *Cerrena unicolor* BBP6 and its application in dye decolorization and denim bleaching. *Process Biochemistry*. 2018;66:222-9.
62. Sosa-Martinez JD, Balagurusamy N, Montanez J, Peralta RA, Moreira R, Bracht A, et al. Synthetic dyes biodegradation by fungal ligninolytic enzymes: process optimization, metabolites evaluation and toxicity assessment. *Journal of Hazardous Materials*. 2020;400:123254.
63. Gomi N, Yoshida S, Matsumoto K, Okudomi M, Konno H, Hisabori T, et al. Degradation of the synthetic dye Amaranth by the fungus *Bjerkandera adusta* Dec 1: inference of the degradation pathway from an analysis of decolorized products. *Biodegradation*. 2011;22(6):1239-45.

64. Gao T, Qin D, Zuo S, Peng Y, Xu J, Yu B, et al. Decolorization and detoxification of triphenylmethane dyes by isolated endophytic fungus, *Bjerkandera adusta* SWUSI4 under non-nutritive conditions. *Bioresources and Bioprocessing*. 2020;7(1):53-64.
65. Hai FI, Yamamoto K, Nakajima F, Fukushi K, Nghiem LD, Price WE, et al. Degradation of azo dye acid Orange 7 in a membrane bioreactor by pellets and attached growth of *Coriolus versicolour*. *Bioresource Technology*. 2013;141:29-34.
66. Hanapi SZ, Abdelgalil SA, Hatti-Kaul R, Aziz RA, Enshasy HAE, editors. Isolation of a New Efficient Dye Decolorizing White Rot Fungus *Cerrena* Sp. WICC F392018.
67. Vantamuri AB, Shettar AK. Biodegradation of Diazo Reactive dye (Green HE4BD) by *Marasmius* sp. BBKAV79. *Chemical Data Collections*. 2020;28:100422.
68. Zhao X, Hardin IR, Hwang H-M. Biodegradation of a model azo disperse dye by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2006;57(1):1-6.
69. Zhao X, Hardin IR. HPLC and spectrophotometric analysis of biodegradation of azo dyes by *Pleurotus ostreatus*. *Dyes and Pigments*. 2007;73(3):322-5.
70. Goh SM, Chan MY, Ong LGA. Degradation potential of basidiomycetes *Trametes ljubarskyion* Reactive Violet 5 (RV 5) using urea as optimum nitrogen source. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 2017;31:1-6.
71. Rekik H, Zarai Jaouadi N, Bouacem K, Zenati B, Kourdali S, Badis A, et al. Physical and enzymatic properties of a new manganese peroxidase from the white-rot fungus *Trametes pubescens* strain I8 for lignin biodegradation and textile-dyes biodecolorization. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019;125:514-25.
72. Wang SN, Chen QJ, Zhu MJ, Xue FY, Li WC, Zhao TJ, et al. An extracellular yellow laccase from white rot fungus *Trametes* sp. F1635 and its mediator systems for dye decolorization. *Biochimie*. 2018;148:46-54.
73. Enzsmart Biotech. SDS-PAGE. 2022 [Retrieved April 13, 2022]. Available from: <https://www.enzsmart.com/sds.php#>.
74. Chowdhary P, Shukla G, Raj G, Ferreira LFR, Bharagava RN. Microbial manganese peroxidase: a ligninolytic enzyme and its ample opportunities in research. *SN Applied*

Sciences. 2018;1(1):45-56.

75. Papinutti L, Martínez MJ. Production and characterization of laccase and manganese peroxidase from the ligninolytic fungus *Fomes sclerodermeus*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*. 2006;81(6):1064-70.
76. Han M-J, Choi H-T, Song H-G. Purification and characterization of laccase from the white rot fungus *Trametes versicolor*. *Journal of Microbiology*. 2005;43(6):555-60.
77. Schalchli H, Hormazabal E, Rubilar O, Briceno G, Mutis A, Zocolo GJ, et al. Production of ligninolytic enzymes and some diffusible antifungal compounds by white-rot fungi using potato solid wastes as the sole nutrient source. *Journal of Applied Microbiology*. 2017;123(4):886-95.
78. Farrell RL, Murtagh KE, Tien M, Mozuch MD, Kirk TK. Physical and enzymatic properties of lignin peroxidase isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*. *Enzyme and microbial technology*. 1989;11(6):322-8.
79. Sadaqat B, Khatoon N, Malik AY, Jamal A, Farooq U, Ali MI, et al. Enzymatic decolorization of melanin by lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Scientific Reports*. 2020;10(1):20240.
80. Es I, Vieira JD, Amaral AC. Principles, techniques, and applications of biocatalyst immobilization for industrial application. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2015;99(5):2065-82.
81. Górecka E, Jastrzebska M. Immobilization techniques and biopolymer carriers. *Biotechnology and Food Science*. 2011;75(1):65-86.
82. Mazmanci MA. Decolorization of azo dyes by immobilized fungi. *Biodegradation of Azo Dyes. The Handbook of Environmental Chemistry*. 2010. p. 169-81.
83. Rodriguez Couto S. Dye removal by immobilised fungi. *Biotechnology Advances*. 2009;27(3):227-35.
84. Kourkoutas Y, Bekatorou A, Banat IM, Marchant R, Koutinas AA. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. *Food Microbiology*. 2004;21(4):377-97.

85. Rodríguez Couto S, Sanroman MA, Hofer D, Gubitz GM. Stainless steel sponge: a novel carrier for the immobilisation of the white-rot fungus *Trametes hirsuta* for decolourization of textile dyes. *Bioresource Technology*. 2004;95(1):67-72.
86. Couto SR, Rosales E, Sanroman MA. Decolourization of synthetic dyes by *Trametes hirsuta* in expanded-bed reactors. *Chemosphere*. 2006;62(9):1558-63.
87. Ottoni C, Lima L, Santos C, Lima N. Effect of different carbon sources on decolourisation of an industrial textile dye under alkaline-saline conditions. *Current Microbiology*. 2014;68(1):53-8.
88. Enayatzamir K, Alikhani HA, Rodríguez Couto S. Simultaneous production of laccase and decolouration of the diazo dye Reactive Black 5 in a fixed-bed bioreactor. *Journal of Hazardous Materials*. 2009;164(1):296-300.
89. Kasinath A, Novotný C, Svobodová K, Patel KC, Sasek V. Decolorization of synthetic dyes by *Irpex lacteus* in liquid cultures and packed-bed bioreactor. *Enzyme and Microbial Technology*. 2003;32:167-73.
90. Domínguez A, Couto SR, Sanromán MÁ. Dye decolorization by *Trametes hirsuta* immobilized into alginate beads. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2005;21(4):405-9.
91. Sari AA, Tachibana S, Muryanto, Hadibarata T. Development of bioreactor systems for decolorization of Reactive Green 19 using white rot fungus. *Desalination and Water Treatment*. 2015;57(15):7029-39.
92. Park C, Lee B, Han E-J, Lee J, Kim S. Decolorization of acid black 52 by fungal immobilization. *Enzyme and Microbial Technology*. 2006;39(3):371-4.
93. Nilsson I, Möller A, Mattiasson B, Rubindamayugi MST, Welander U. Decolorization of synthetic and real textile wastewater by the use of white-rot fungi. *Enzyme and Microbial Technology*. 2006;38(1-2):94-100.
94. Singh RP, Singh PK, Gupta R, Singh RL. Treatment and recycling of wastewater from textile industry. *Advances in Biological Treatment of Industrial Waste Water and their Recycling for a Sustainable Future. Applied Environmental Science and Engineering for a Sustainable Future 2019*. p. 225-66.

95. Asgher M, Yasmeen Q, Iqbal HM. Enhanced decolorization of Solar Brilliant Red 80 textile dye by an indigenous white rot fungus *Schizophyllum commune* IBL-06. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2013;20(4):347-52.
96. Gahlout M, Gupte S, Gupte A. Optimization of culture condition for enhanced decolorization and degradation of azo dye Reactive Violet 1 with concomitant production of ligninolytic enzymes by *Ganoderma cupreum* AG-1. *3 Biotech*. 2013;3(2):143-52.
97. Asgher M, Shah SA, Iqbal HM. Statistical Correlation between Ligninolytic Enzymes Secretion and Remazol Brilliant Yellow-3GL Dye Degradation Potential of *Trametes versicolor* IBL-04. *Water Environment Research*. 2016;88(4):338-45.
98. Merck. What is FTIR Spectroscopy?. 2022 [Retrieved April 17, 2022]. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/TH/en/technical-documents/technical-article/analytical-chemistry/photometry-and-reflectometry/ftir-spectroscopy>.
99. Ayed L, Mahdhi A, Cheref A, Bakhrouf A. Decolorization and degradation of azo dye Methyl Red by an isolated *Sphingomonas paucimobilis*: biotoxicity and metabolites characterization. *Desalination*. 2011;274(1-3):272-7.
100. Maniyam MN, Ibrahim AL, Cass AEG. Decolourization and biodegradation of azo dye Methyl Red by *Rhodococcus* strain UCC 0016. *Environmental Technology*. 2020;41(1):71-85.
101. Thamvithayakorn P, Phosri C, Pisutpaisal N, Krajangsang S, Whalley AJS, Suwannasai N. Utilization of oil palm decanter cake for valuable laccase and manganese peroxidase enzyme production from a novel white-rot fungus, *Pseudolagarobasidium* sp. PP17-33. *3 Biotech*. 2019;9(11):417.
102. Dheenathayalan L, Thiyagarajan V. Kinetics and isotherm study of adsorption of industrial dyes Novacron Blue ECR and Reactive Yellow 145 by PANI-Emeraldine salt. *International Journal of Research and Analytical Reviews*. 2019;6(2):698-705.
103. Hossen MZ, Hussain ME, Hakim A, Islam K, Uddin MN, Azad AK. Biodegradation of reactive textile dye Novacron Super Black G by free cells of newly isolated *Alcaligenes faecalis* AZ26 and *Bacillus* spp obtained from textile effluents. *Heliyon*. 2019;5(7):e02068.
104. Suwanboriboon J, Meesiri W, Wongkokua W, editors. An application of

- spectrophotometer for ADMI color measurement. *Journal of Physics: Conference Series*; 2018: IOP Publishing.
105. Prapulla SG, Karanth NG. FERMENTATION (INDUSTRIAL) | Recovery of Metabolites. *Encyclopedia of Food Microbiology*. 2014. p. 822-33.
106. Atkovska K, Lisichkov K, Ruseska G, Dimitrov AT, Grozdanov A. Removal of heavy metal ions from wastewater using conventional and nanosorbents: a review. *Journal of Chemical Technology & Metallurgy*. 2018;53(2):202-19.
107. Jayasinghe C, Imtiaj A, Lee GW, Im KH, Hur H, Lee MW, et al. Degradation of three aromatic dyes by white rot fungi and the production of ligninolytic enzymes. *Mycobiology*. 2008;36(2):114-20.
108. Ting-ting Y, Jian-fen Z, Hong C. Isolation and identification of a *Trametes sanguinea*, and its laccase production conditions and decolorization research. *Science and Technology of Food Industry*. 2020;41(20):104-8.
109. Abadulla E, Tzanov T, Costa S, Robra K-H, Cavaco-Paulo A, Gubitz GM. Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000;66(8):3357-62.
110. Siddiqui MF, Andleeb S, Ali N, Ghumro PB, Ahmed S. Biotreatment of anthraquinone dye Drimarene Blue K2RL. *African Journal of Environmental Science and Technology*. 2010;4(1):45-50.
111. Maryani Y, Rochmat A, Khastini RO, Kurniawan T, Saraswati I, editors. Identification of Macro Elements (Sucrose, Glucose and Fructose) and Micro Elements (Metal Minerals) in the Products of Palm Sugar, Coconut Sugar and Sugar Cane. 2nd and 3rd International Conference on Food Security Innovation (ICFSI 2018-2019); 2021: Atlantis Press.
112. Asgher M, Noreen S, Bhatti HN. Decolorization of dye-containing textile industry effluents using *Ganoderma lucidum* IBL-05 in still cultures. *Water Environment Research*. 2010;82(4):357-61.
113. Jin XC, Liu GQ, Xu ZH, Tao WY. Decolorization of a dye industry effluent by *Aspergillus fumigatus* XC6. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2007;74(1):239-43.

114. Chakraborty S, Basak B, Dutta S, Bhunia B, Dey A. Decolorization and biodegradation of congo red dye by a novel white rot fungus *Alternaria alternata* CMERI F6. *Bioresource Technology*. 2013;147:662-6.
115. Hadibarata T, Adnan LA, Yusoff ARM, Yuniarto A, Rubiyatno, Zubir MMFA, et al. Microbial decolorization of an azo dye Reactive Black 5 using white-rot fungus *Pleurotus eryngii* F032. *Water, Air, & Soil Pollution*. 2013;224(6).
116. Zhang H, Zhang S, He F, Qin X, Zhang X, Yang Y. Characterization of a manganese peroxidase from white-rot fungus *Trametes* sp. 48424 with strong ability of degrading different types of dyes and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Hazardous Materials*. 2016;320:265-77.
117. Singh G, Dwivedi S. Decolorization and degradation of Direct Blue-1 (Azo dye) by newly isolated fungus *Aspergillus terreus* GS28, from sludge of carpet industry. *Environmental Technology & Innovation*. 2020;18:100751.
118. Li H, Zhang R, Tang L, Zhang J, Mao Z. Manganese peroxidase production from cassava residue by *Phanerochaete chrysosporium* in solid state fermentation and its decolorization of indigo carmine. *Chinese Journal of Chemical Engineering*. 2015;23(1):227-33.
119. Chen SH, Yien Ting AS. Biodecolorization and biodegradation potential of recalcitrant triphenylmethane dyes by *Corioloopsis* sp. isolated from compost. *Journal of Environmental Management*. 2015;150:274-80.
120. Khan R, Fulekar MH. Mineralization of a sulfonated textile dye Reactive Red 31 from simulated wastewater using pellets of *Aspergillus bombycis*. *Bioresources and Bioprocessing*. 2017;4(1):23.
121. Srikanlayanukul M, Khanongnuch C, Lumyong S. Decolorization of textile wastewater by immobilized *Coriolus versicolor* RC3 in repeated-batch system with the effect of sugar addition. *CMU J*. 2006;5(3):301.
122. Krastanov A, Koleva R, Alexieva Z, Stoilova I. Decolorization of industrial dyes by immobilized mycelia of *Trametes versicolor*. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 2014;27(6):4263-8.

123. Gao D-w, Wen X-h, Qian Y. Decolorization of Reactive Brilliant Red K-2BP by white rot fungus under sterile and non-sterile conditions. *Journal of Environmental Sciences*. 2006;18(3):428-32.







ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

1. Potato dextrose agar (PDA)

Potato	200	กรัม
Dextrose	20	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

เตรียมมันฝรั่งขนาด 1 ตารางเซนติเมตร นำไปต้มจนมันฝรั่งสุกแล้วกรองสารสกัดจากมันฝรั่งมาผสมกับ dextrose และ agar ต้มจน agar ละลายแล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. Potato dextrose broth (PDB)

Potato	200	กรัม
Dextrose	20	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

เตรียมมันฝรั่งขนาด 1 ตารางเซนติเมตร นำไปต้มจนมันฝรั่งสุกแล้วกรองสารสกัดจากมันฝรั่งมาผสมกับ dextrose ละลายแล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. Basal medium

Glucose	10	กรัม
Peptone	1	กรัม
KH_2PO_4	1	กรัม
Na_2HPO_4	0.05	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5	กรัม
CaCl_2	0.01	กรัม
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.01	กรัม
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.001	กรัม
$\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.001	กรัม
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.002	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	กรัม

ผสมสารต่าง ๆ ให้เข้ากัน ปรับ pH ให้เท่ากับ 5 ด้วย 1N NaOH แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อ
นึ่งความดันไอน้ำที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15
นาที

หมายเหตุ: สูตรอาหารที่ใช้ดัดแปลงจาก Revankar และคนอื่นๆ (2007)⁽⁹⁾



ภาคผนวก ข
สารเคมีและบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทดลอง

ภาคผนวก ข

สารเคมีและบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทดลอง

1. 5% Stacking gel

0.5 M Tris-HCl buffer (pH 6.8)	1.25	มิลลิลิตร
10% SDS	0.05	มิลลิลิตร
Acrylamide/Bis (30%T, 2.7%C)	0.65	มิลลิลิตร
10% ammonium persulfate (APS)	0.005	มิลลิลิตร
TEMED	0.0005	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	3.05	มิลลิลิตร

นำมาผสมกันโดยมีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปใช้งานทันที และควรเตรียมใหม่ทุกครั้งเมื่อใช้งาน

2. 12% Resolving gel

1.5 M Tris-HCl buffer (pH 6.8)	1.75	มิลลิลิตร
10% SDS	0.07	มิลลิลิตร
Acrylamide/Bis (30%T, 2.7%C)	2.80	มิลลิลิตร
10% ammonium persulfate (APS)	0.005	มิลลิลิตร
TEMED	0.0005	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	2.38	มิลลิลิตร

นำมาผสมกันโดยมีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 7 มิลลิลิตร แล้วนำไปใช้งานทันที และควรเตรียมใหม่ทุกครั้งเมื่อใช้งาน

3. Running buffer

Tris base	3.03	กรัม
Glycine	14.4	กรัม
SDS	1	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

นำมาผสมกันแล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน

4. Sample buffer

0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	0.12	มิลลิลิตร
10% SDS	0.20	มิลลิลิตร
Glycerol	0.10	มิลลิลิตร
0.5% Bromophenol blue	0.05	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	0.48	มิลลิลิตร

นำมาผสมกันโดยมีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 0.8 มิลลิลิตร แล้วนำไปใช้งานทันที และควรเตรียมใหม่ทุกครั้งเมื่อใช้งาน

5. Staining solution

Coomassie brilliant blue R-250	1	กรัม
Methanol	300	มิลลิลิตร
Acetic acid	100	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	600	มิลลิลิตร

นำมาผสมกันโดยมีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปกรองด้วยกระดาษกรอง whatman no.1 แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน

6. Destaining solution

Methanol	300	มิลลิลิตร
Acetic acid	100	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	600	มิลลิลิตร

นำมาผสมกันโดยมีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศา

เซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน

7. Solution A

250 mM Sodium tartrate buffer	20	มิลลิลิตร
10 mM $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	10	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	70	มิลลิลิตร

นำมาผสมกันโดยมีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปใช้งานทันที และควร

เตรียมใหม่ทุกครั้งเมื่อใช้งาน

8. Solution B

250 mM Sodium tartrate buffer	20	มิลลิลิตร
10 mM $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	10	มิลลิลิตร
4 mM H_2O_2	10	มิลลิลิตร
10 mM 2,6-Dimethoxyphenol	10	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	50	มิลลิลิตร

นำมาผสมกันโดยมีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปใช้งานทันที และควร

เตรียมใหม่ทุกครั้งเมื่อใช้งาน

9. 0.05 M Sodium phosphate buffer (pH 6.0)

Na_2HPO_4	0.96	กรัม
NaH_2PO_4	7.81	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

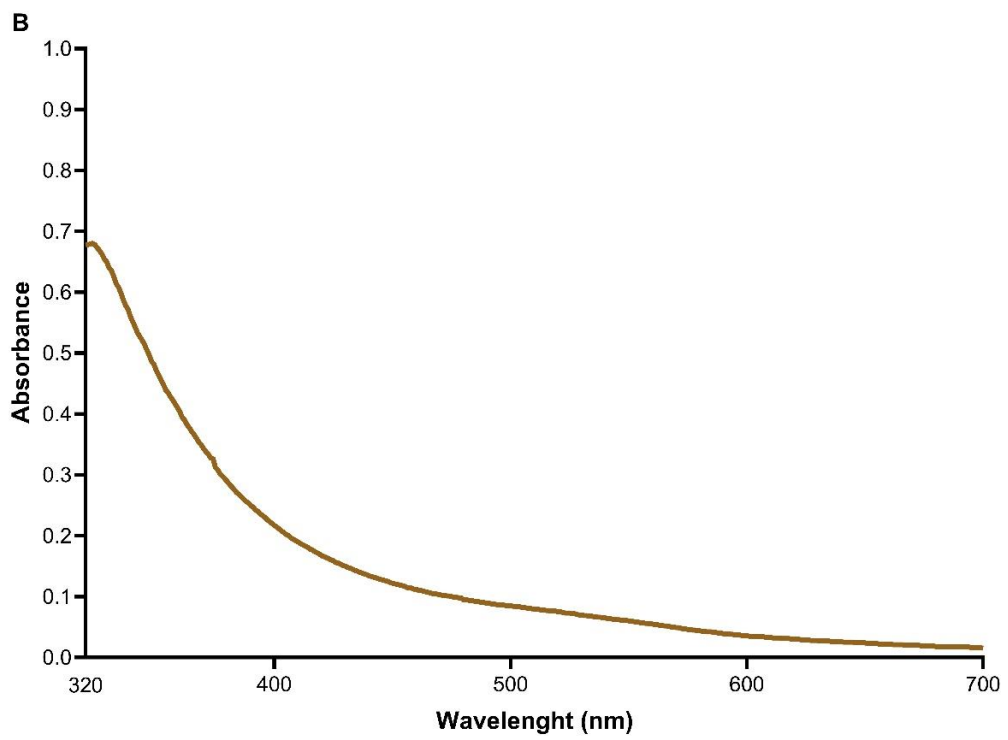
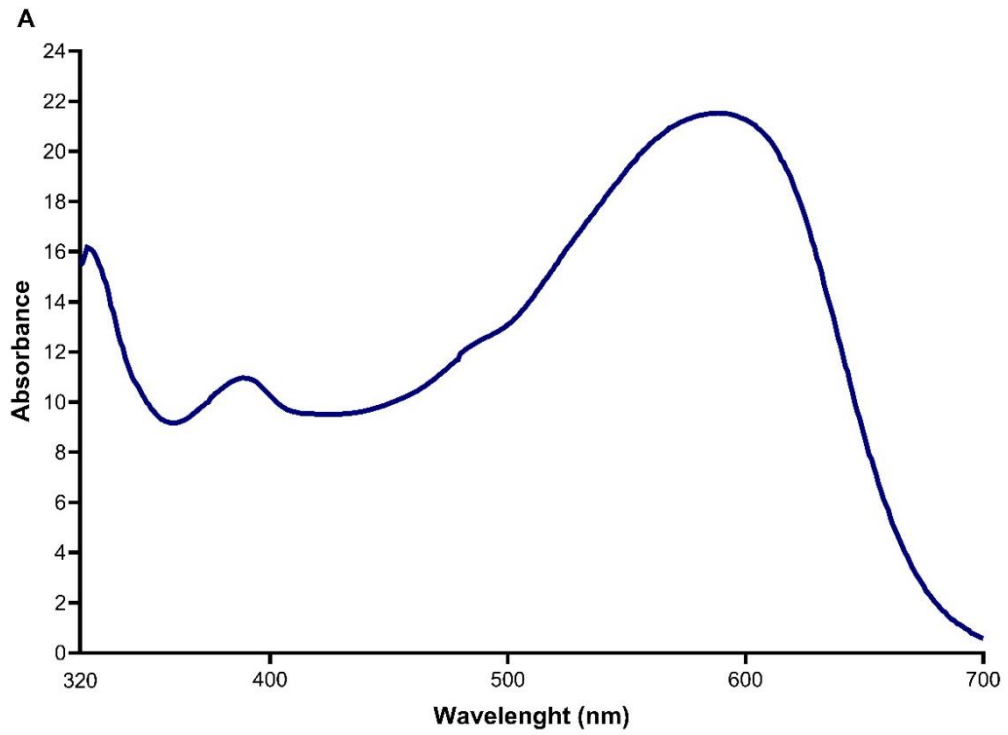
นำมาผสมกันแล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน



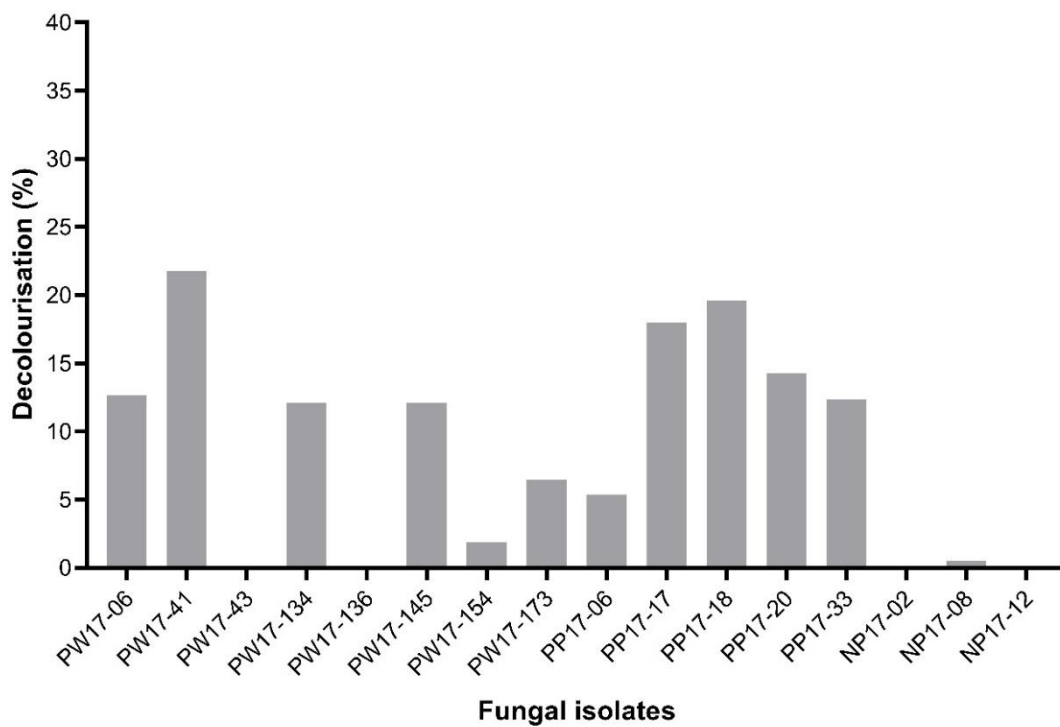


ภาคผนวก ค
ข้อมูลทางสถิติ

ภาคผนวก ค



ภาพประกอบ 1 UV-visible สเปกตรัมของสีย้อมเหลือทิ้ง (A) และน้ำทิ้งภายหลังการบำบัด (B)



ภาพประกอบ 2 ประสิทธิภาพการลดสีน้ำทิ้งหลังการบำบัด (% decolourisation) โดยราไวท์รอกท จำนวน 16 ไอโซเลท ภายในเวลา 7 วัน ภายใต้สภาวะการเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5

ตาราง 1 ประสิทธิภาพการลดสีของเห็ดขี้ผึ้ง (% decolourisation) ที่ความเข้มข้น 4% (v/v) โดยราไวทรัพจำนวน 16 โยโคเขต ภายในเวลา 7 วัน

ราไวทรัพ	โยโคเขต	ประสิทธิภาพการลดสี (% decolourisation)				ค่าความเข้มข้น (ADMI)	
		OD ₅₄₅	OD ₅₉₀	OD ₆₀₀	OD ₆₀₈		
<i>Amauroderma subresinosum</i>	NP17-12	40.90±2.57 ^{defg}	39.63±2.75 ^{efg}	39.90±2.51 ^{efg}	42.30±1.78 ^{efg}	43.51±1.57 ^{cde}	1,398±39 ^{cde}
	NP17-02	37.22±2.35 ^g	42.16±1.59 ^{def}	42.90±1.43 ^{def}	45.46±0.91 ^{def}	45.12±2.09 ^{cd}	1,358±52 ^{cd}
<i>C. aspera</i>	NP17-08	32.93±5.71 ^{gh}	36.41±7.08 ^{efg}	36.81±7.30 ^{efg}	38.65±7.31 ^{efg}	35.93±6.83 ^{ef}	1,586±169 ^{ef}
<i>C. retropicta</i>	PW17-134	48.47±4.13 ^{cde}	40.07±5.34 ^{efg}	39.62±5.46 ^{efg}	41.32±6.01 ^{efg}	45.51±5.27 ^c	1,349±131 ^c
<i>Dentipellis parmastoi</i>	PW17-136	24.74±0.42 ^h	21.56±0.37 ^h	21.24±0.38 ^h	24.25±0.24 ^h	28.26±1.50 ^f	1,776±37 ^f
<i>Ganoderma fornicatum</i>	PW17-145	48.31±4.58 ^{cde}	55.43±3.22 ^{cd}	56.01±2.96 ^{cd}	58.15±3.05 ^{cd}	48.24±2.52 ^c	1,281±62 ^c
<i>G. lingzhi</i>	PW17-43	53.51±2.93 ^{bc}	73.27±6.00 ^b	75.31±6.21 ^b	77.10±5.90 ^b	50.73±1.25 ^c	1,219±31 ^c
<i>G. mastoporum</i>	PW17-06	38.06±1.43 ^{efg}	49.23±1.24 ^{cde}	49.86±1.83 ^{cde}	51.63±1.50 ^{cde}	42.33±0.55 ^{cde}	1,427±14 ^{cde}
<i>G. mastoporum</i>	PW17-154	50.77±3.19 ^{bcd}	59.25±3.57 ^{bc}	60.51±4.31 ^{bc}	61.90±4.86 ^{bc}	49.12±1.03 ^c	1,259±26 ^c
<i>Microporus vernicipes</i>	PW17-173	30.31±2.72 ^{gh}	26.37±1.89 ^{gh}	26.14±1.71 ^{gh}	27.80±1.94 ^{gh}	28.81±3.09 ^f	1,762±77 ^f
<i>M. xanthopus</i>	PP17-17	39.74±0.96 ^{efg}	31.89±0.89 ^{gh}	31.28±0.95 ^{gh}	33.38±0.40 ^{gh}	36.13±0.82 ^{def}	1,581±20 ^{def}
<i>M. xanthopus</i>	PP17-20	32.45±2.51 ^{gh}	26.25±2.10 ^{gh}	25.41±2.95 ^{gh}	27.40±1.85 ^{gh}	29.31±2.69 ^f	1,750±67 ^f

ตาราง 1 (ต่อ)

ราไวก์รอก	ไอโซเลข	ประสิทธิภาพการลดสี (% decolourisation)				ค่าความเข้มสี (ADMI)	
		OD ₅₄₅	OD ₅₉₀	OD ₆₀₀	OD ₆₀₈		
<i>Pseudolagarobasidium</i> sp.	PP17-33	78.58±2.15 ^a	90.13±0.51 ^a	91.84±0.35 ^a	92.59±0.47 ^a	70.88±2.59 ^a	721±64 ^a
<i>Trametes elegans</i>	PP17-06	44.72±1.40 ^{cdef}	51.19±8.62 ^{cde}	52.02±9.40 ^{cde}	54.99±9.05 ^{cde}	44.58±4.56 ^{cde}	1,372±113 ^{cde}
<i>T. hirsuta</i>	PP17-41	81.95±0.66 ^a	92.43±0.20 ^a	93.84±0.29 ^a	94.76±0.36 ^a	73.98±0.74 ^a	644±18 ^a
<i>T. sanguinea</i>	PP17-18	60.15±4.07 ^b	58.49±5.44 ^c	58.49±5.57 ^c	59.86±5.63 ^c	60.18±2.86 ^b	986±71 ^b

หมายเหตุ: ข้อมูลแสดง mean ± standard deviation และวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้ one-way ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับร้อยละ 95 ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็ก (a-h) คือ ค่าทางสถิติของประสิทธิภาพการลดสีของเชื้อราแต่ละสายพันธุ์ โดยเปรียบเทียบภายในแต่ละสายพันธุ์

ตาราง 2 ประสิทธิภาพการลดสีของเชื้อรา ($\%$ decolourisation) ที่ความเข้มข้น 4% (v/v) โดยราจริง *T. hirsuta* PW17-41 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ (กลูโคส ซูโครส ฟรักโทส แลคโตส กาแลคโตส น้ำตาลปีบ แป้ง และ ชุดควบคุมที่ไม่เติมแหล่งคาร์บอน) ในระยะเวลา 2 วัน

แหล่งคาร์บอน	ประสิทธิภาพการลดสี ($\%$ decolourisation)				ค่าความเข้มสี (ADMI)
	OD ₅₄₅	OD ₅₉₀	OD ₆₀₀	OD ₆₀₈	
ไม่เติมแหล่งคาร์บอน	60.87±1.23 ^f	82.61±1.24 ^d	84.50±1.33 ^c	85.31±1.05 ^c	64.98±0.47 ^e
ฟรักโทส	72.42±0.43 ^e	91.64±0.15 ^c	93.42±0.10 ^b	93.79±0.10 ^b	72.33±0.56 ^d
แลคโตส	76.64±0.24 ^d	93.05±0.09 ^b	94.73±0.08 ^{ab}	95.04±0.05 ^{ab}	76.16±0.36 ^c
กาแลคโตส	78.49±0.36 ^c	93.31±0.18 ^{ab}	94.74±0.17 ^{ab}	95.24±0.10 ^{ab}	77.30±1.22 ^{bc}
กลูโคส	80.33±0.20 ^{ab}	93.75±0.09 ^{ab}	94.91±0.10 ^{ab}	95.42±0.05 ^{ab}	78.19±0.31 ^{ab}
น้ำตาลปีบ	81.27±0.14 ^a	94.62±0.05 ^a	95.65±0.09 ^a	95.97±0.05 ^a	79.47±0.25 ^a
แป้ง	81.55±0.34 ^a	94.37±0.13 ^{ab}	95.56±0.08 ^a	95.79±0.06 ^a	79.28±0.36 ^{ab}
ซูโครส	79.85±0.65 ^b	93.57±0.10 ^{ab}	95.10±0.11 ^a	95.37±0.06 ^a	78.61±0.16 ^{ab}

หมายเหตุ: ข้อมูลแสดง mean ± standard deviation และวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้ one-way ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับร้อยละ 95 ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็ก (a-f) คือ ค่าทางสถิติของประสิทธิภาพการลดสีของเชื้อรา และค่าความเข้มสี โดยเปรียบเทียบภายในปัจจัยเดียวกัน

ตาราง 3 ประสิทธิภาพการลดสีของเชื้อยีสต์ (% decolourisation) ที่ความเข้มข้น 4% (v/v) โดยยีสต์ *T. hirsuta* PW17-41 เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ (เปปโตน ยีสต์สกัด แอมโมเนียมซัลเฟต โซเดียมไนเตรท แอมโมเนียมไนเตรท ยูเรีย และชุดควบคุมที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจน) ในระยะเวลา 2 วัน

แหล่งไนโตรเจน	ประสิทธิภาพการลดสี (% decolourisation)				ค่าความเข้มข้น	
	OD ₅₄₅	OD ₅₉₀	OD ₆₀₀	OD ₆₀₈	ADMI	(ADMI)
ไม่เติมแหล่งไนโตรเจน	62.75±2.07 ^c	89.17±1.12 ^b	91.59±1.02 ^b	91.97±0.93 ^b	63.79±0.58 ^d	824±13 ^d
เปปโตน	81.43±1.29 ^b	94.28±0.39 ^a	95.44±0.28 ^a	95.69±0.30 ^a	77.37±0.98 ^{bc}	523±23 ^c
ยีสต์สกัด	79.63±0.46 ^b	93.80±0.18 ^a	95.14±0.15 ^a	95.26±0.17 ^a	72.54±0.18 ^c	603±4 ^c
โซเดียมไนเตรท	60.15±0.61 ^c	89.64±0.07 ^b	92.27±0.06 ^b	92.57±0.06 ^b	61.33±0.31 ^d	822±7 ^d
แอมโมเนียมไนเตรท	86.13±2.86 ^a	94.54±0.47 ^a	95.50±0.23 ^a	95.68±0.16 ^a	87.81±4.58 ^a	256±77 ^a
แอมโมเนียมซัลเฟต	80.32±3.23 ^b	93.83±0.24 ^a	95.22±0.07 ^a	95.30±0.06 ^a	82.05±4.03 ^b	398±89 ^b
ยูเรีย	55.97±0.93 ^d	75.71±1.99 ^c	77.63±2.15 ^c	77.62±2.30 ^c	60.30±0.20 ^d	895±5 ^d

หมายเหตุ: ข้อมูลแสดง mean ± standard deviation และวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้ one-way ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับร้อยละ 95 ตัวอักษรภาษาอังกฤษเล็ก (a-e) คือ ค่าทางสถิติของประสิทธิภาพการลดสีของเชื้อยีสต์ และค่าความเข้มข้น โดยเปรียบเทียบภายในปัจจัยเดียวกัน

ตาราง 4 ประสิทธิภาพการลดสีของเชื้อรา (% decolourisation) ที่ความเข้มข้น 4% (v/v) โดยราครั้ง *T. hirsuta* PW17-41 เมื่อปรับค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ (4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10) ในระยะเวลา 2 วัน

ค่า pH	ประสิทธิภาพการลดสี (% decolourisation)				ค่าความขุ่น (ADMI)
	OD ₅₄₅	OD ₅₉₀	OD ₆₀₀	OD ₆₀₈	
4.0	82.52±0.45 ^a	95.05±0.48 ^a	95.90±0.30 ^a	96.15±0.33 ^a	84.57±0.21 ^a
5.0	82.38±0.50 ^a	94.61±0.17 ^a	95.87±0.26 ^a	96.12±0.28 ^a	84.40±0.43 ^a
6.0	80.74±0.56 ^b	94.37±0.11a	95.67±0.18 ^a	95.98±0.18 ^a	82.69±0.55 ^b
7.0	61.50±0.21 ^c	87.60±0.49 ^b	91.89±0.85 ^b	92.22±0.87 ^b	59.79±0.60 ^c
8.0	10.39±1.54 ^d	8.92±0.89 ^c	8.97±1.03 ^c	8.84±0.89 ^c	11.72±0.29 ^d
9.0	8.08±0.48 ^e	4.72±0.59 ^d	5.03±0.41 ^d	5.15±0.29 ^d	7.60±0.12 ^e
10.0	5.21±0.20 ^f	4.01±0.87 ^d	4.31±0.49 ^d	4.34±0.47 ^d	6.58±0.41 ^f

หมายเหตุ: ข้อมูลแสดง mean ± standard deviation และวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้ one-way ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับร้อยละ 95 ตัวอักษรภาษาอังกฤษต่างกันแสดงถึงประสิทธิภาพการลดสีของเชื้อราที่แตกต่างกัน และค่าความขุ่นโดยเปรียบเทียบภายในปัจจัยเดียวกัน

ตาราง 5 ประสิทธิภาพการลดสีของเมล็ดขี้ผึ้ง (% decolourisation) ที่ความเข้มข้น 4% (v/v) โดยราตรีง *T. hirsuta* PW17-41 เมื่อเลี้ยงในสภาวะแบบเปียกที่ ความเร็วรอบต่าง ๆ (0, 50, 100 และ 150 รอบต่อนาที) ในระยะเวลา 2 วัน

อัตราความเร็วรอบ (รอบต่อนาที)	ประสิทธิภาพการลดสี (% decolourisation)				ค่าความเข้มสี (ADMI)	
	OD ₅₄₅	OD ₅₉₀	OD ₆₀₀	OD ₆₀₈		ADMI
0	42.89±1.41 ^d	42.33±3.29 ^d	43.43±3.28 ^d	44.75±3.01 ^d	45.01±2.79 ^d	1161±59 ^d
50	64.37±1.78 ^c	82.45±0.88 ^c	84.46±0.81 ^c	84.88±0.74 ^c	68.80±1.98 ^c	659±42 ^c
100	92.88±0.33 ^a	96.32±0.17 ^a	96.79±0.09 ^a	96.91±0.07 ^a	94.60±0.31 ^a	114±7 ^a
150	81.43±2.99 ^b	93.67±0.84 ^b	94.19±1.10 ^b	94.42±1.05 ^b	83.18±1.43 ^b	355±30 ^b

หมายเหตุ: ข้อมูลแสดง mean ± standard deviation และวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้ one-way ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับร้อยละ 95 ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็ก (a-d) คือ ค่าทางสถิติของประสิทธิภาพการลดสีของเมล็ดขี้ผึ้ง และค่าความเข้มสี โดยเปรียบเทียบภายในปัจจัยเดียวกัน

ตาราง 7 ประสิทธิภาพการลดความเข้มข้นของสีเขียว และค่าความเข้มข้นสีในหน่วย ADMI ที่เหลือ เมื่อทดสอบกับสีเขียวที่ความเข้มข้น 4, 8, 17, 25, 33, 42, 50, 66, 83 และ 100% (v/v) ด้วยราตรีง *T. hirsuta* PW17-41 เป็นเวลา 8 วัน

ความเข้มข้นของสีเขียว (%) (v/v)	ประสิทธิภาพการลดสี (% decolourisation)						ค่าความเข้มข้น (ADMI)
	OD ₅₄₅	OD ₅₉₀	OD ₆₀₀	OD ₆₀₈	ADMI	(ADMI)	
4	97.40±0.14 ^a	98.54±0.15 ^a	98.76±0.12 ^a	98.80±0.06 ^a	96.54±0.10 ^a	85±3 ^a	
8	97.24±0.14 ^a	98.41±0.07 ^{ab}	98.55±0.07 ^{ab}	98.65±0.06 ^{ab}	96.53±0.05 ^a	212±3 ^a	
17	97.22±0.04 ^a	98.39±0.04 ^{ab}	98.51±0.10 ^{ab}	98.59±0.08 ^{ab}	96.51±0.05 ^a	389±6 ^b	
25	97.15±0.13 ^a	98.04±0.18 ^{abc}	98.35±0.17 ^{bc}	98.52±0.18 ^{ab}	96.46±0.07 ^{ab}	544±10 ^b	
33	97.13±0.11 ^a	97.93±0.10 ^{bc}	98.23±0.04 ^{bcd}	98.43±0.05 ^{bc}	96.43±0.12 ^{ab}	757±26 ^c	
42	96.51±0.36 ^a	97.75±0.18 ^{cd}	97.97±0.17 ^{cde}	98.10±0.12 ^{cd}	96.20±0.06 ^{ab}	1,022±16 ^d	
50	94.63±0.14 ^b	97.38±0.08 ^d	97.82±0.08 ^{de}	98.09±0.10 ^{cd}	96.07±0.09 ^b	1,245±27 ^e	
66	94.02±0.30 ^b	97.33±0.17 ^d	97.79±0.11 ^e	97.89±0.16 ^d	94.38±0.26 ^c	2,294±105 ^f	
83	91.72±0.20 ^c	96.48±0.19 ^e	97.16±0.09 ^f	97.29±0.05 ^e	92.95±0.30 ^d	3,365±142 ^g	
100	85.41±0.76 ^d	94.59±0.23 ^f	95.98±0.19 ^g	96.62±0.07 ^f	89.17±0.09 ^e	6,508±57 ^h	

หมายเหตุ: ข้อมูลแสดง mean ± standard deviation และวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้ one-way ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับร้อยละ 95 ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็ก (a-h) คือ ค่าทางสถิติของประสิทธิภาพการลดสีเขียวที่ต่างกัน และค่าความเข้มข้นสีเขียวเปรียบเทียบภายในปัจจัยเดียวกัน

ตาราง 8A ประสิทธิภาพการลดความเข้มข้นของสีของ และค่าความเข้มข้นในหน่วย ADMI ที่เหลือ เมื่อบำบัดสีย้อมที่ความเข้มข้น 4, 8, 17 และ 25% (v/v) ในสภาวะไม่ปราศจากเชื้อที่มีการเติมอาหาร ด้วยราตรีง *T. hirsuta* PW17-41 เป็นเวลา 8 วัน

ความเข้มข้นของสีย้อม (%) (v/v)	ประสิทธิภาพการลดสี (% decolourisation)				ค่าความเข้มข้น (ADMI)
	OD ₅₄₅	OD ₅₉₀	OD ₆₀₀	OD ₆₀₈	
4	91.20±0.07 ^b	98.36±0.12 ^b	98.53±0.06 ^b	98.49±0.06 ^b	96.39±0.10 ^b
8	98.51±0.12 ^a	99.08±0.03 ^a	99.19±0.03 ^a	99.17±0.03 ^a	98.15±0.07 ^a
17	98.69±0.08 ^a	99.13±0.04 ^a	99.19±0.03 ^a	99.23±0.03 ^a	97.90±0.03 ^a
25	98.61±0.06 ^a	99.05±0.06 ^a	99.10±0.06 ^a	99.14±0.05 ^a	97.66±0.07 ^a

หมายเหตุ: ข้อมูลแสดง mean ± standard deviation และวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้ one-way ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับร้อยละ 95 ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็ก (a-d) คือ ค่าทางสถิติของประสิทธิภาพการลดสีย้อมเหลือทิ้ง และค่าความเข้มข้น โดยเปรียบเทียบภายในปัจจัยเดียวกัน

ตาราง 8B ประสิทธิภาพการลดความเข้มข้นของสีของเชื้อ ADMI ที่เหลือ เมื่อบำบัดสีย้อมที่ความเข้มข้น 4, 8, 17 และ 25% (v/v) ในสภาวะไม่ปราศจากเชื้อที่ไม่มีการเติมอาหาร ด้วยราตรีง *T. hirsuta* PW17-41 เป็นเวลา 8 วัน

ความเข้มข้นของ สีย้อม (%) (v/v)	ประสิทธิภาพการลดสี (% decolourisation)				ค่าความเข้มข้น (ADMI)
	OD ₅₄₅	OD ₅₉₀	OD ₆₀₀	OD ₆₀₈	
4	84.22±0.49 ^a	90.75±0.93 ^a	91.31±0.76 ^a	91.71±0.51 ^a	85.12±0.68 ^a 349±16 ^a
8	80.19±0.09 ^b	88.10±0.10 ^b	88.10±0.13 ^b	88.00±0.19 ^b	85.35±0.07 ^a 886±4 ^b
17	79.99±0.46 ^b	86.98±0.18 ^b	87.97±0.27 ^b	87.76±0.37 ^b	85.48±0.20 ^a 1,554±21 ^c
25	73.18±0.89 ^c	81.28±0.23 ^c	81.17±0.15 ^c	80.87±0.10 ^c	75.83±0.21 ^b 3,625±31 ^d

หมายเหตุ: ข้อมูลแสดง mean ± standard deviation และวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้ one-way ANOVA และเปรียบเทียบด้วยวิธี Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับร้อยละ 95 ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวอักษรภาษาอังกฤษเพิ่มเติม (a-d) คือ ค่าทางสถิติของประสิทธิภาพการลดสีย้อมเหลือที่ และค่าความเข้มข้น โดยเปรียบเทียบภายในปัจจัยเดียวกัน

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	บัญชา ธรรมประภาพร
วัน เดือน ปี เกิด	5 พฤศจิกายน 2541
สถานที่เกิด	ประจวบคีรีขันธ์
วุฒิการศึกษา	พ.ศ. 2562 วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา (เกียรตินิยมอันดับ 1) มหาวิทยาลัย ศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพมหานคร พ.ศ. 2564 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาประยุกต์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพมหานคร
ที่อยู่ปัจจุบัน	113/1 หมู่ 2 ตำบลสามกระชาย อำเภอกุยบุรี จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ 77150
ผลงานตีพิมพ์	Thampraphaphon B, Phosri C, Pisutpaisal N, Thamvithayakorn P, Chotelersak K, Sarp S, Suwannasai N. High potential decolourisation of textile dyes from wastewater by manganese peroxidase production of newly immobilised <i>Trametes hirsuta</i> PW17-41 and FTIR Analysis. <i>Microorganisms</i> . 2022;10(5):992. Thampraphaphon B, Phosri C, Thamvithayakorn P, Suwannasai N. Efficiency of dye decolourisation from industrial wastewater by immobilised fungus <i>Trametes hirsuta</i> PW17-41 under non-sterile condition. <i>Proceeding of the 5th CRU-National Conference in Science and Technology</i> . 16 June 2022, Chandrakasem Rajabhat University, Bangkok, Thailand (in Thai).
รางวัลที่ได้รับ	พ.ศ. 2563-2565 ทุนการศึกษาจากโครงการ 70 ปี 70 ทุน มศว คีนส์สู่สังคม มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพมหานคร (Grant no. 633/2563) พ.ศ. 2565 รางวัลบทความดีเด่นด้านสิ่งแวดล้อมในการประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัย ระดับชาติ ด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏจันทรเกษม ครั้งที่ 5