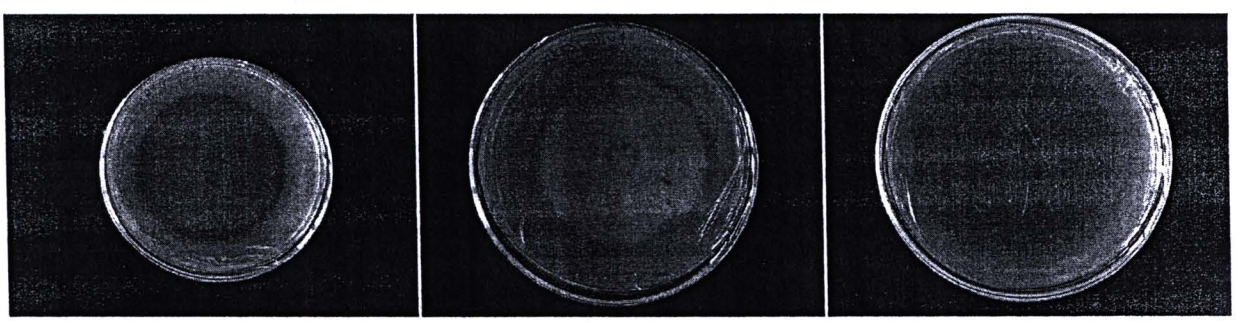
บทที่ 2



SU-1 SU-2 SU-3

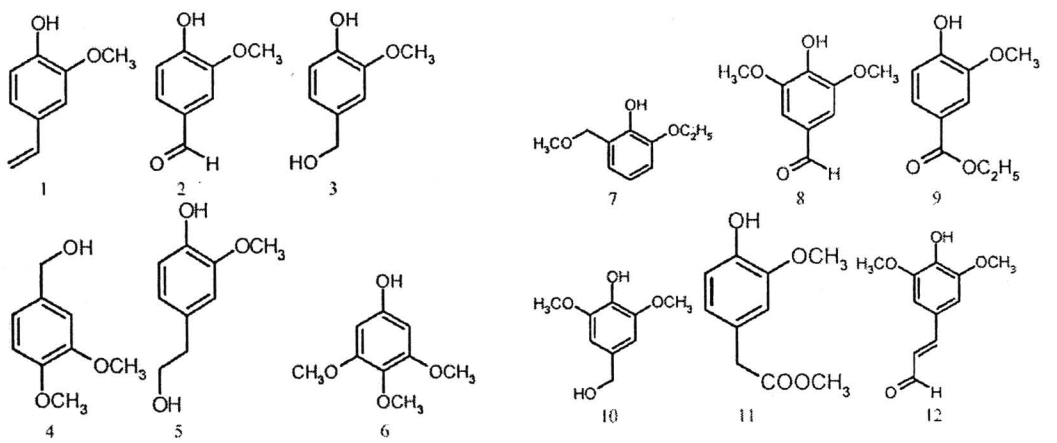
การศึกษาการลดสีน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มด้วยวิธีทางชีวภาพ

(Study of biological decolorization of palm oil mill effluent)

บทที่ 2

ทบทวนเอกสาร

โดยทั่วไป สีของน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มดิบเกิดจากองค์ประกอบของสารฟีนอลิกที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการผลิต (Agustin *et al.*, 2008) สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารที่พบทั่วไปในอุตสาหกรรมการเกษตร เช่น ยาฆ่าแมลง น้ำยาเคลือบไม้ และของเสียจากอุตสาหกรรมการผลิตกระดาษ ตลอดจนอุตสาหกรรมปิโตรเคมีและสีย้อม (Duran and Esposito, 2000, Hardin *et al.*, 2000) จากการศึกษาของ Nang และคณะ (2007) ซึ่งทำการศึกษาองค์ประกอบของฟีนอลิกที่ตรวจพบในเส้นปาล์มด้วยวิธีการสกัดแบบ supercritical carbon dioxide (SC-CO_2) แสดงดังภาพ 2.1



ภาพที่ 2.1 สารฟีนอลิกที่ละลายน้ำได้พบในเส้นใยปาล์ม
ที่มา : Nang และคณะ (2007)

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

ตารางที่ 2.1 ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกต่างๆ ที่พบในผลปาล์มสด

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

ที่มา : Yun Ping et al. (2008)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ตารางที่ 2.2 คุณสมบัติของเอนไซม์แลคเคสจากจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆ

Organism	Number of isozymes	M_r (Da)	Reference
Podospora anserina	3	70 000	Thurston, 1994
		80 0000	
		390 000	
Neurospora crassa	1	65 000	Germann *et al.*, 1988
Agaricus bisporus	2	100 000	Perry *et al.*, 1993b
		65 000	
Botrytis cinerea	2	72 000	Thurston, 1994
		72 000	
Phlebia radiata	1	64 000	Saloheimo *et al.*, 1991
Armillaria mellea	1	80 000	Curir *et al.*, 1997
Monocillium indicum	1	72 00	Thakker *et al.*, 1992
Pleurotus ostreatus	2	54 000	Palmieri *et al.*, 1997;
		59 000	
		57 000	
Phanerochaete flavido-albans	1	94 000	Perez *et a*l., 1996
Rhizoctonia solani	4	50 000	Wahleitner *et al.*, 1996
		to100	
		000	
Pleurotus ostreatus RK 36	1	67 000	Giardina *et al.*, 1999
Ceriporiopsis subvermispora	2	71 000	Fukishima and Kirk, 1995
		68 000	
Pycnoporus cinnabarinus (a)	1	81 000	Eggert *et al.*, 1996
Coriolus hirsutus	1	80 000	Shin and Kim, 1998
Pycnoporus cinnabarinus (b)	1	63 000	Schliephake *et al.*, 2000
Trametes villosa	1	63 000	Yaver *et al.*, 1996
Trichoderma	1	71 000	Assavanig *et al.*, 1992
Marasmius quercophilus	2	61 000	Farnet *et al.*, 2000

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

1) Type I (T1)

มีสีฟ้าเข้ม ตรวจพบได้ที่ความยาวคลื่น 600 nm และสามารถตรวจพบได้ด้วยวิธี ERP

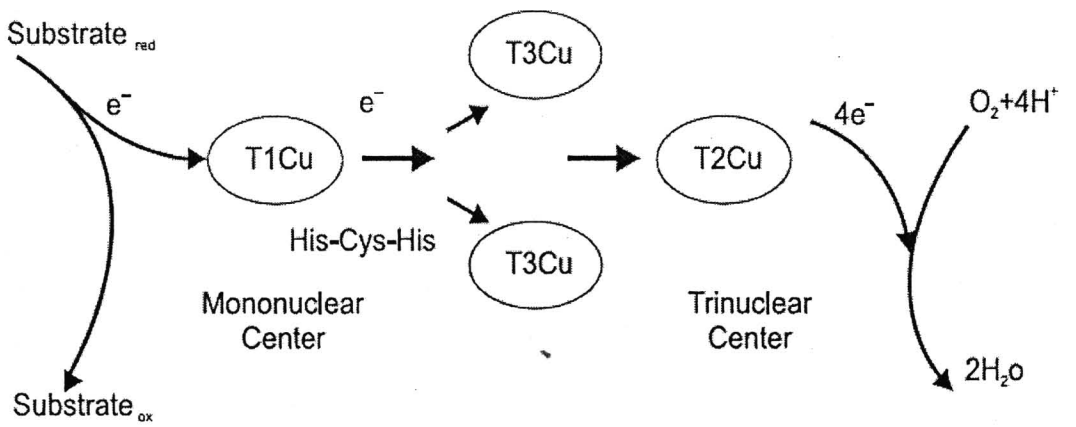
2) Type II (T2)

ไม่มีสีและตรวจพบได้ด้วยวิธี ERP

3) Type III (T3)

ประกอบด้วยทองแดงอะตอมคู่ ดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่นใกล้ช่วงแสง UV แต่ไม่สามารถตรวจพบได้ด้วยวิธี ERP

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

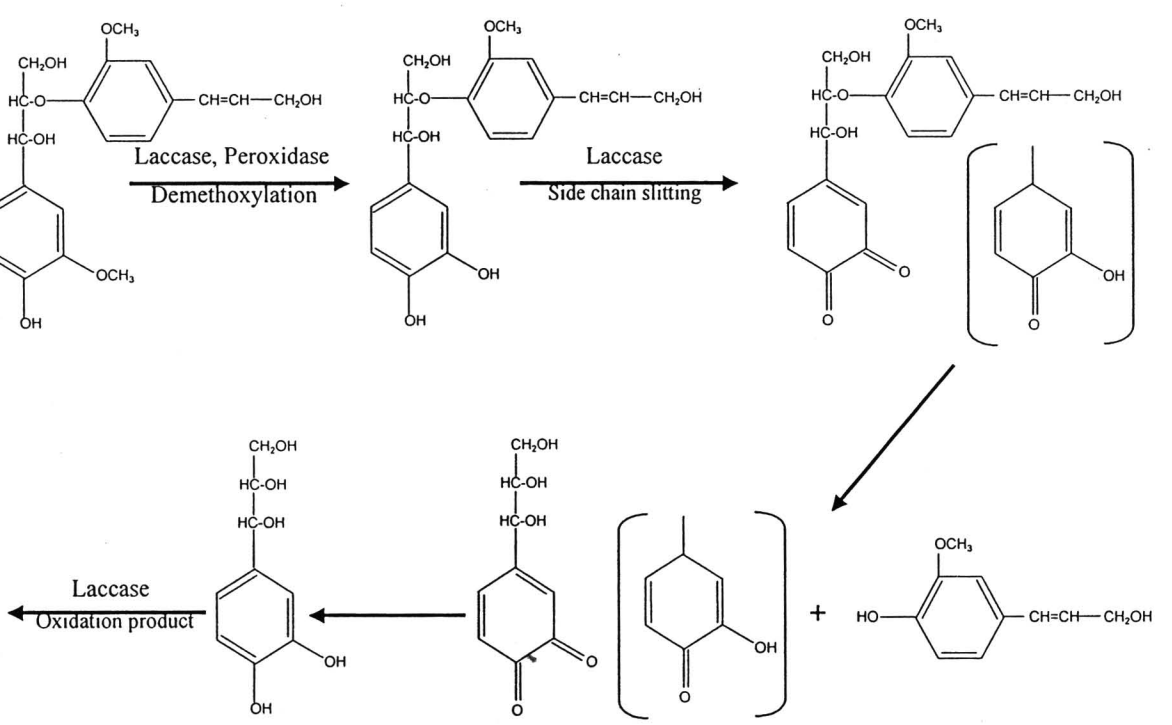


ภาพที่ 2.2 กลไกการทำงานของเอนไซม์แลคเคส

ที่มา : Kluczek-Turpeinen (2007)

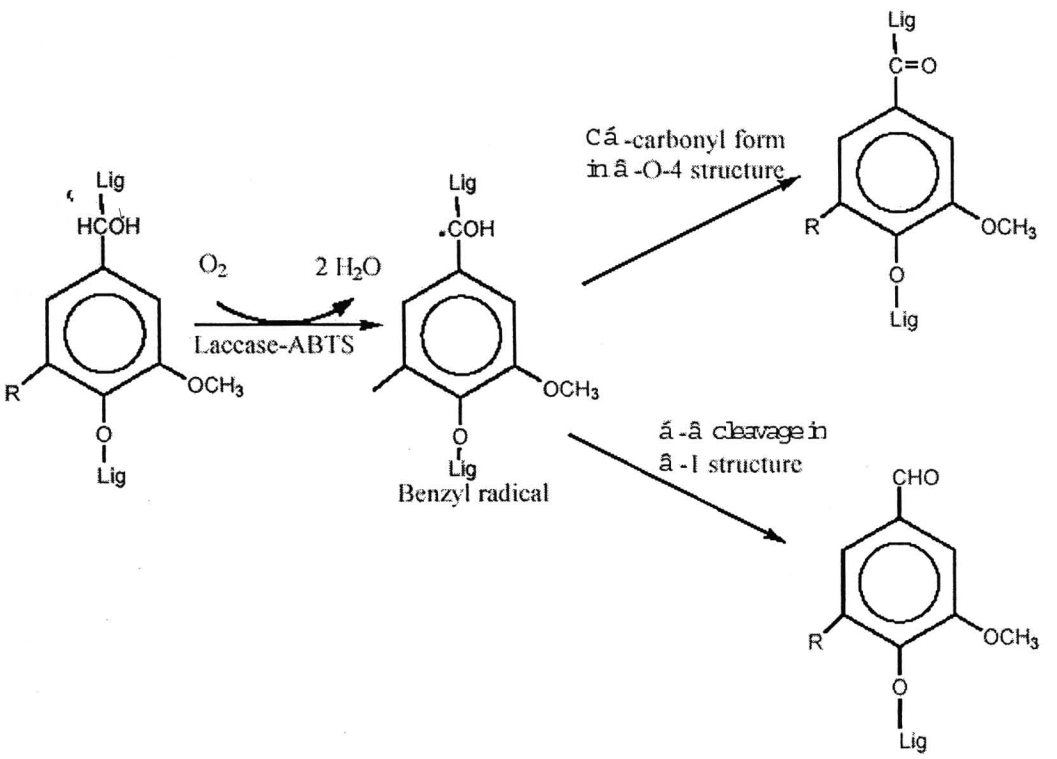
เชื้อราขาวจะสร้างเอนไซม์ขึ้นในกระบวนการเมทาบอลิซึมขั้นทุติยภูมิ (secondary metabolism) ในสภาพที่พบทั่วไปในธรรมชาติและที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ปัจจัยหลักที่มีผลต่อการสร้างเอนไซม์ เช่น พีเอช อุณหภูมิ แหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน แม้ว่าเอนไซม์จะถูกผลิตขึ้นในขั้น stationary phase แต่ปัจจัยข้างต้นก็ยังคงส่งผลเชื้อราในการสร้างเอนไซม์

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



ภาพที่ 2.3 กลไกการสลายสารประกอบฟีนอลโดยเชื้อรา
ที่มา : ดัดแปลงจาก Trojanowski (2001)

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



ภาพที่ 2.4 กลไกการสลายลิกนินที่ไม่มีองค์ประกอบของฟีนอลโดยเชื้อรา
ที่มา : ดัดแปลงจาก Archibald *et al.* (1997)

จากรายงานของ Paice และคณะ (1995) เอนไซม์แลคสามารถนำไปใช้ฟอกขาวเยื่อกระดาษได้ค่อนข้างดี โดยใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาน้อย แต่อย่างไรก็ตาม ยังต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงสภาวะที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการนำไปใช้งานในระดับอุตสาหกรรม

ด้วยการทำงานของเอนไซม์ทำให้เชื้อราต่าง ๆ ข้างต้นสามารถย่อยองค์ประกอบที่อยู่ในน้ำเสีย เช่น สารอินทรีย์ และสารประกอบที่ก่อให้เกิดสีได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนั้นยังสามารถนำเชื้อราเหล่านี้ไปใช้ประโยชน์ในการบำบัดน้ำเสียเพื่อ

ลดองค์ประกอบที่มีพิษได้ เช่น สารประกอบไฮโดรคาร์บอน ยาฆ่าแมลง และสีย้อมผ้า เป็นต้น (Hammel 1989)

จากที่กล่าวมาข้างต้น จะเห็นได้ว่าหากมีการศึกษาปัญหาสีของน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มอย่างจริงจัง นอกจากจะเป็นการช่วยลดปัญหาของโรงงานประการหนึ่งแล้ว ยังเป็นการช่วยลดปัญหามลภาวะทางสิ่งแวดล้อมได้อีกประการ