ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพ	เทคโนโลยีชีวภาพ
สาขา	**ภาควิชา**

เรื่อง การกำจัดสีย้อมรีแอคทีฟผสมโดย *Lentinus polychrous* Lév. ที่เคลือบด้วยไคโตซานและผ่านการทำแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบด

Decolorization of Mixed Reactive Dyes by Fluidized – Bed Dried *Lentinus polychrous* Lév. Coated with Chitosan

นามผู้วิจัย นางสาวรจนาวรรณ หวั่งประดิษฐ์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ภคมน จิตประเสริฐ, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุทธิพันธุ์ แก้วสมพงษ์, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา ....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุทธิพันธุ์ แก้วสมพงษ์, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

....

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ .... **เดือน** .... **พ.ศ.** ....

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การกำจัดสีย้อมรีแอคทีฟผสมโดย *Lentinus polychrous* Lév. ที่เคลือบด้วยไคโตซานและผ่านการทำแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบด

Decolorization of Mixed Reactive Dyes by Fluidized-Bed Dried *Lentinus polychrous* Lév. Coated with Chitosan

โดย

นางสาวรจนาวรรณ หวั่งประดิษฐ์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
พ.ศ. 2557

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

รจนาวรรณ หวั่งประดิษฐ์ 2557: การกำจัดสีย้อมรีแอคทีฟผสมโดย *Lentinus polychrous* Lév. ที่เคลือบด้วยไคโตซานและผ่านการทำแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบด ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ภคมน จิตประเสริฐ, Ph.D. 77 หน้า

มลภาวะทางน้ำที่เกิดจากการปนเปื้อนสีย้อมสังเคราะห์เป็นปัญหาที่ส่งผลกระทบรุนแรงต่อระบบนิเวศและสิ่งแวดล้อมอันจะนำมาสู่ปัญหาสุขภาพของมนุษย์ในที่สุด งานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาการกำจัดสีย้อมรีแอคทีฟโดย *Lentinus polychrous* Lév. ที่เคลือบด้วยไคโตซานและผ่านการทำแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบด โดยแปรผันความเข้มข้นของสารละลายไคโตซานที่ใช้เคลือบเป็น 3 ระดับ ได้แก่ 0.1, 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร และทดสอบความสามารถในการกำจัดสีย้อมรีแอคทีฟผสม 3 ชนิด คือ Reactive Blue 19, Reactive Blue 160 และ Reactive Blue 198 ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร จากการศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของไคโตซานที่ใช้เคลือบราต่อคุณสมบัติทางกายภาพ การรอดชีวิต ความสามารถการกำจัดสีย้อม ตลอดจนกลไกที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการกำจัดสีย้อม ผลการทดลองพบว่า พื้นผิวของราที่เคลือบด้วยไคโตซานมีลักษณะเรียบมากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของไคโตซานที่ใช้เคลือบเพิ่มขึ้น ซึ่งพื้นผิวเม็ดราที่เคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร มีลักษณะเรียบและเป็นระนาบมากที่สุด โดยราที่เคลือบด้วยไคโตซานทุกความเข้มข้นและผ่านการทำแห้งสามารถเจริญได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้ยังคงความสามารถในการกำจัดสีย้อมได้ 91 – 94 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งน้อยกว่าราที่ไม่เคลือบด้วยไคโตซานที่ใช้ระยะเวลา 144 ชั่วโมง นอกจากนี้ผลการศึกษากลไกต่าง ๆ ระหว่างการกำจัดสีย้อมโดยราที่เคลือบด้วยไคโตซาน ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงความยาวคลื่นสูงสุด กิจกรรมเอนไซม์ลิกนิโนไลติก และ การวิเคราะห์ Fourier Transform Infrared Spectroscopy (*FTIR*) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ากลไกการดูดซับสีย้อมรีแอคทีฟผสมเกิดขึ้นในช่วงแรกของการกำจัดสีย้อมต่อมาจึงเกิดกลไกการย่อยสลายทางชีวภาพโดยราผลิตเอนไซม์เพื่อย่อยสลายสีย้อมต่อไป จากผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า *Lentinus polychrous* Lév.ที่เคลือบด้วยไคโตซานและผ่านการทำแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบด สามารถกำจัดสีย้อมได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับราที่ไม่เคลือบด้วยไคโตซานโดยการกำจัดสีย้อมรีแอคทีฟผสมเกิดจากการทำงานร่วมกันระหว่างกลไกการดูดซับและกลไกการย่อยสลายทางชีวภาพ

________________________ ________________________________ _____ / _____ / _____

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Rodjanawan Wangpradid 2014: Decolorization of Mixed Reactive Dyes by Fluidized-Bed Dried *Lentinus polychrous* Lév. Coated with Chitosan. Master of Science (Biotechnology), Major Field: Biotechnology, Department of Biotechnology. Thesis Advisor: Assistant Professor Pakamon Chitprasert, Ph.D. 77 pages.

The water pollution contaminated by synthetic dyes effluent is a major problem that can widely affect the food chain, ecosystem and human health. This research aimed to study the decolorization of mixed reactive dyes by fluidized – bed dried *Lentinus polychrous* Lév. coated with chitosan. The chitosan coating concentrations were varied at 0.1, 0.5 and 1.0 % w/v to test the decolorization of 100 mgL^{-1} of 3 mixed reactive dyes; reactive blue 19, 160 and 198. The chitosan concentration coating on fungi influenced the physical property, fungal viability, dye decolorization and mechanism of decolorization. The physical property of external coated fungal surface showed that the surface chitosan coated fungi were smoother when the chitosan coating concentrations were higher. the surface of 1.0 % chitosan coated fungi illustrated the smoothest surface among those 3 chitosan coating concentrations. The survival of all coated and dried fungi were 100 % and the fungi were still able to degrade 91 – 94 % of mixed dyes within 72 hours which was shorter decolorization time than that of uncoated fungi (144 hours). The variation of dyes maximum wavelength, ligninolytic enzyme activity and Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) were also conducted to investigate the mechanism of decolorization by chitosan coated fungi. It was revealed that the decolorization process was caused by the collaboration between biosorption and biodegradation mechanism. The first period of decolorization was biosorption followed by secretion of enzyme for biodegradation. Results obtained in this study indicated that the chitosan coated and fluidized – bed dried *L. polychrous* Lév. can efficiently degrade mixed reactive dyes.

____________________ __________________________ ____ / ____ / ____

Student's signature   Thesis Advisor's signature

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภคมน จิตประเสริฐ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่ได้ช่วยวางแผนงานวิจัย ตลอดจนการให้คำปรึกษาแนะนำทั้งในเรื่องงานวิจัยและการดำเนินชีวิต รวมถึงให้โอกาสในการเสนอความคิดในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้อย่างเต็มที่ และช่วยตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ กราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุทธิพันธุ์ แก้วสมพงษ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม อาจารย์ ดร. สุมัลลิกา โมรากุล ประธานการสอบ และ อาจารย์ ดร. แสงชัย เอกประทุมชัย ผู้ทรงคุณวุฒิ ที่ได้ให้ความกรุณาตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอพระคุณอาจารย์ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพทุกท่าน ที่ได้อบรมสั่งสอนและมอบความรู้อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการและเจ้าหน้าที่ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพทุกท่าน ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในระหว่างการทำงานวิจัย

ขอกราบขอพระคุณ พ่อและแม่ ที่เป็นกำลังใจและแรงผลักดันอันแรงกล้าและให้การสนับสนุนข้าพเจ้าในทุก ๆ ด้าน ขอบพระคุณ นางสาวปัทมา พลอยสว่าง ที่ได้ให้ความช่วยเหลือด้านวิชาการ เทคนิคในการทำแลบและกำลังใจในยามท้อแท้ ขอบพระคุณ พี่ฝ้ายน้อย พี่อีฟ เอ็มมี่ หลินลี่ เก๋ น้องบอล น้องหวาน น้องนอย น้องทราย น้องแคน น้องวชิ และ พี่ ๆ เพื่อน ๆ และน้อง ๆ ทุกคน ที่ได้ให้กำลังใจ ปลุกขวัญและความช่วยเหลือในเรื่องต่าง ๆ เสมอมา

รจนาวรรณ หวังประดิษฐ์
มิถุนายน 2557

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	19
อุปกรณ์	19
วิธีการ	21
ผลและวิจารณ์	29
สรุปและข้อเสนอแนะ	48
สรุป	48
ข้อเสนอแนะ	49
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	50
ภาคผนวก	59
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ	60
ภาคผนวก ข ข้อมูลผลการทดลอง	63
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	77

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง

ตารางผนวกที่ **หน้า**

ข1 การกำจัดสีย้อมรีแอคทีฟผสมโดย *L. polychrous* Lév. ที่ไม่เคลือบไคโตซาน และไม่ผ่านการทำแห้งฟลูอิไดซ์เบด 64

ข2 การกำจัดสีย้อมรีแอคทีฟผสมโดย *L. polychrous* Lév. ที่เคลือบไคโตซาน 0.1 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร และไม่ผ่านการทำแห้งฟลูอิไดซ์เบด 65

ข3 การกำจัดสีย้อมรีแอคทีฟผสมโดย *L. polychrous* Lév. ที่เคลือบไคโตซาน 0.5 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร และไม่ผ่านการทำแห้งฟลูอิไดซ์เบด 66

ข4 การกำจัดสีย้อมรีแอคทีฟผสมโดย *L. polychrous* Lév. ที่เคลือบไคโตซาน 1.0 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร และไม่ผ่านการทำแห้งฟลูอิไดซ์เบด 67

ข5 การกำจัดสีย้อมรีแอคทีฟผสมโดย *L. polychrous* Lév. ที่ไม่เคลือบไคโตซาน และผ่านการทำแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบด 68

ข6 การกำจัดสีย้อมรีแอคทีฟผสมโดย *L. polychrous* Lév. เคลือบไคโตซาน 0.1 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร และผ่านการทำแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบด 68

ข7 การกำจัดสีย้อมรีแอคทีฟผสมโดย *L. polychrous* Lév. เคลือบไคโตซาน 0.5 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร และผ่านการทำแห้งแบบแบบฟลูอิไดซ์เบด 69

ข8 การกำจัดสีย้อมรีแอคทีฟผสมโดย *L. polychrous* Lév. เคลือบไคโตซาน 1.0 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร และผ่านการทำแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบด 69

ข9 กิจกรรมเอนไซม์แลคเคสที่ผลิตโดย *L. polychrous* Lév. ที่ไม่เคลือบไคโตซานและไม่ผ่านการทำแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบด 70

ข10 กิจกรรมเอนไซม์แลคเคสที่ผลิตโดย *L. polychrous* Lév. ที่เคลือบไคโตซาน 0.1 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร และไม่ผ่านการทำแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบด 70

ข11 กิจกรรมเอนไซม์แลคเคสที่ผลิตโดย *L. polychrous* Lév. ที่เคลือบไคโตซาน 0.5 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร และไม่ผ่านการทำแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบด 71

ข12 กิจกรรมเอนไซม์แลคเคสที่ผลิตโดย *L. polychrous* Lév. ที่เคลือบไคโตซาน 1.0 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร และไม่ผ่านการทำแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบด 71

ข13 กิจกรรมเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสที่ผลิตโดย *L. polychrous* Lév. ที่ไม่เคลือบไคโตซานและไม่ผ่านการทำแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบด 72

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่ **หน้า**

ข14 กิจกรรมเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสที่ผลิตโดย *L. polychrous* Lév. ที่เคลือบไคโตซาน 0.1 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร และไม่ผ่านการทำแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบด 72

ข15 กิจกรรมเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสที่ผลิตโดย *L. polychrous* Lév. ที่เคลือบไคโตซาน 0.5 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร และไม่ผ่านการทำแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบด 73

ข16 กิจกรรมเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสที่ผลิตโดย *L. polychrous* Lév. ที่เคลือบไคโตซาน 0.1 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร และไม่ผ่านการทำแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบด 73

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ดอกเห็ด *L. polychrous* Lév.	11
2	โครงสร้างของไคตินและไคโตซาน	14
3	โครงสร้างสีย้อมรีแอคทีฟ	20
4	ตำแหน่งการวาง *L. polychrous* Lév. ที่เคลือบด้วยไคโตซานจำนวน 10 จุด และเจริญบนจานเพาะเชื้อ PDA เพื่อทดสอบการรอดชีวิต	23
5	แผนผังการดำเนินการทดลอง	28
6	พื้นผิวภายนอกของ *L. polychrous* Lév. ที่เคลือบด้วยไคโตซานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ก่อนการทำแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบด	31
7	จำนวนจุดของการเจริญของเส้นใย *L. polychrous* Lév. ที่เคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ ก่อนและหลังการทำแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบด	33
8	การกำจัดสีย้อมรีแอคทีฟผสมโดย *L. polychrous* Lév. ที่เคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ และไม่ผ่านการทำแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบด	36
9	การกำจัดสีย้อมรีแอคทีฟผสมโดย *L. polychrous* Lév. ที่เคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ และผ่านการทำแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบด	36
10	เม็ดรา *L. polychrous* Lév. ที่เคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ และไม่ผ่านการทำแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบด ที่เวลาการกำจัดสีย้อมชั่วโมงที่ 72	37
11	พื้นผิวภายนอกของเม็ด *L. polychrous* Lév. ที่เคลือบด้วยไคโตซานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เวลาการกำจัดสีย้อมชั่วโมงที่ 72	39
12	การเปลี่ยนแปลงความยาวคลื่นของสีย้อมรีแอคทีฟผสม ที่เวลาการกำจัดสีย้อมต่าง ๆ	41
13	กิจกรรมเอนไซม์แลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสที่ผลิตโดย *L. polychrous* Lév. ที่เคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ และไม่ผ่านการทำแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบด	44
14	FTIR สเปคตรัมของเม็ดรา *L. polychrous* Lév. ที่เคลือบด้วยไคโตซานและผ่านการกำจัดสีย้อมที่เวลาต่าง ๆ	47
15	FTIR สเปคตรัมของน้ำสีย้อมรีแอคทีฟผสมที่เวลาการกำจัดสีย้อมต่าง ๆ	47

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่		หน้า
ข1	FTIR สเปคตรัมของสีย้อมรีแอคทีฟผสมที่เวลาการกำจัดสีย้อมชั่วโมงที่ 0	74
ข2	FTIR สเปคตรัมของเม็ดรา *L. polychrous* Lév. ที่เคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลาการกำจัดสีย้อมชั่วโมงที่ 0	74
ข3	FTIR สเปคตรัมของเม็ด *L. polychrous* Lév. ที่เคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลาการกำจัดสีย้อมชั่วโมงที่ 6	75
ข4	FTIR สเปคตรัมของเม็ด *L. polychrous* Lév. ที่เคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลาการกำจัดสีย้อมชั่วโมงที่ 48	75
ข5	FTIR สเปคตรัมของน้ำสีย้อมรีแอคทีฟผสมที่เวลาการกำจัดสีย้อมชั่วโมงที่ 6	76
ข6	FTIR สเปคตรัมของน้ำสีย้อมรีแอคทีฟผสมที่เวลาการกำจัดสีย้อมชั่วโมงที่ 48	76

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การกำจัดสีย้อมรีแอคทีฟผสมโดย *Lentinus polychrous* Lév. ที่เคลือบด้วยไคโตซานและผ่านการทำแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบด

Decolorization of Mixed Reactive Dyes by Fluidized-Bed Dried *Lentinus polychrous* Lév. Coated with Chitosan

คำนำ

เนื่องด้วยการพัฒนาเศรษฐกิจและอุตสาหกรรมของประเทศไทยทำให้ความต้องการในการใช้ทรัพยากรสูงขึ้นซึ่งผลกระทบสำคัญที่ตามมาคือ ปัญหาสิ่งแวดล้อม โดยปัญหามลภาวะทางน้ำที่ปนเปื้อนสีย้อมถือเป็นปัญหาสำคัญปัญหาหนึ่งที่นับวันจะทวีความรุนแรงมากขึ้น ทั้งนี้สาเหตุสำคัญมาจากอุตสาหกรรมสิ่งทอ ภาพถ่าย และพลาสติก เป็นต้น โดยเฉพาะอุตสาหกรรมสิ่งทอที่มักมีสีย้อมปนเปื้อนอยู่ในน้ำทิ้งประมาณ 15 – 20 เปอร์เซ็นต์ (Selvam *et al.*, 2003) การปล่อยน้ำทิ้งเหล่านี้ลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมอย่างรุนแรงโดยอนุภาคสีย้อมสามารถบดบังและลดการส่องผ่านของแสงอาทิตย์ซึ่งส่งผลให้ออกซิเจนในแหล่งน้ำลดลงและส่งผลกระทบต่อเนื่องต่อสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศใต้น้ำ (Hamedaani *et al.*, 2007) สีย้อมบางชนิดอาจเปลี่ยนรูปเป็นสารก่อมะเร็ง เช่น สารประกอบแอมีนหรือสารประกอบเชิงซ้อนอะโรมาติกซึ่งสามารถส่งผลกระทบต่อสุขภาพของมนุษย์ได้ (Ciullini *et al.*, 2008) นอกจากนี้สีย้อมซึ่งเป็นสารสีเข้มหากปนเปื้อนลงสู่แหล่งน้ำแม้เพียงปริมาณเล็กน้อยส่งผลทำให้เกิดทัศนียภาพที่น่ารังเกียจสร้างความรำคาญใจต่อผู้พบเห็นและอยู่อาศัยโดยรอบแหล่งน้ำ ดังนั้นการกำจัดสีย้อมก่อนปล่อยสู่แหล่งน้ำธรรมชาติจึงมีความจำเป็น โดยทั่วไปกระบวนการกำจัดสีย้อมมักใช้กระบวนการทางเคมีและกายภาพ (Pearce *et al.*, 2003) เนื่องจากใช้ระยะเวลาในการดำเนินการสั้น อย่างไรก็ตามวิธีการนี้โดยส่วนใหญ่ต้องใช้หลายขั้นตอนร่วมกันทำให้เสียค่าใช้จ่ายสูงและยังก่อให้เกิดการตกค้างของสารเคมีที่อาจมีพิษรุนแรงมากขึ้นในสิ่งแวดล้อม (Eichlerova *et al.*, 2007) ในทางตรงกันข้ามกระบวนการทางชีวภาพเป็นวิธีการหนึ่งที่มีค่าใช้จ่ายในการดำเนินการต่ำและที่สำคัญเป็นวิธีที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม หลักการของวิธีนี้คือการใช้จุลินทรีย์ที่สามารถเปลี่ยนโครงสร้างของสีย้อมทำให้สมบัติทางเคมีของสีย้อมเปลี่ยนแปลงไป เช่น โทนสี และความเป็นพิษ โดยจุลินทรีย์ที่สามารถกำจัดสีย้อมได้มีหลายประเภท เช่น แบคทีเรีย รา และยีสต์ อย่างไรก็ตามราถือเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการกำจัดสีย้อมที่มีประสิทธิภาพสูง โดยเฉพาะราขาว (White Rot Fungi) ที่สามารถผลิตเอนไซม์ในกลุ่มลิกนิโนไลติก (Ligninolytic enzyme) ซึ่งเอนไซม์กลุ่มนี้สามารถย่อยสลายโครงสร้างสีย้อมได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Young and Yu, 1997; Novotny *et al.*, 2001;

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Palmieri *et al*., 2005; Radha *et al*., 2005) *Lentinus polychrous* Lév. เป็นราขาวสายพันธุ์ที่พบในประเทศไทยและมีรายงานว่าสามารถสร้างเอนไซม์ในกลุ่มลิกนิโนไลติกและกำจัดสีย้อมได้อย่างมีประสิทธิภาพ (ปัทมา, 2551; Khamchmuang and Sarnthima, 2007; Chitprasert *et al*., 2011)

อย่างไรก็ตามการกำจัดสีย้อมด้วยกระบวนการทางชีวภาพยังคงมีข้อเสียด้านระยะเวลากำจัดสีย้อมที่นานโดยเฉพาะการใช้ราก กำจัด การประยุกต์กระบวนการกำจัดสีย้อมโดยการเพิ่มกระบวนการทางกายภาพด้วยการเคลือบไคโตซานลงบนเม็ดราเพื่อเพิ่มความสามารถในการดูดซับสีย้อมให้กับเม็ดราในช่วงแรกของการกำจัดสีย้อมจึงเป็นแนวทางที่น่าสนใจในการช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดสีย้อมได้ เนื่องจากไคโตซานจัดเป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติที่นอกจากมีคุณสมบัติในการดูดซับสีย้อมสูง (Crini and Badot, 2008) เป็นวัสดุที่หาได้ง่ายในประเทศไทย ยังมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม อย่างไรก็ตามหากพิจารณาในแง่ของการใช้งานราสดมีอายุการใช้งานสั้นและมีความไม่สะดวกต่อการนำไปใช้งาน การทำแห้งจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่ช่วยแก้ปัญหาดังกล่าวได้ ซึ่งงานวิจัยนี้สนใจการทำแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบด (Fluidized bed drying) เนื่องจากเป็นวิธีการทำแห้งที่มีขั้นตอนไม่ยุ่งยากซับซ้อน อีกทั้งยังมีต้นทุนการดำเนินการต่ำและประหยัดพลังงานอีกด้วย (ปัทมา, 2551)

งานวิจัยนี้จึงมีแนวคิดในการศึกษาความสามารถการกำจัดสีย้อมสังเคราะห์โดย *L. polychrous* Lév. ที่เคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ และผ่านการทำแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบด ร่วมกับศึกษากลไกของการกำจัดสีย้อมโดยราที่เคลือบด้วยไคโตซาน โดยคาดว่าการเคลือบไคโตซานบนราสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดสีย้อมซึ่งจากแนวคิดนี้จะเป็นต้นแบบในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ราแห้งเพื่อใช้ในระบบบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนสีย้อมได้อย่างมีประสิทธิภาพในอนาคต

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของไคโตซานที่เคลือบบน *L. polychrous* Lév. และผ่านการทำแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบดต่อความสามารถในการกำจัดสีย้อมสังเคราะห์ประเภทรีแอคทีฟของรา

2. ศึกษากลไกการกำจัดสีย้อมของราที่เคลือบด้วยไคโตซาน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การตรวจเอกสาร

1. สีย้อม

สีย้อมเป็นสารเคมีชนิดหนึ่งที่เมื่อนำไปย้อมบนวัสดุต่าง ๆ เช่น เส้นไหม และด้าย โมเลกุลของสีย้อมซึมผ่านเข้าเส้นใยและยึดติดกับโมเลกุลเส้นใย (Zollinger, 2003) สีย้อมสามารถแบ่งได้ 2 ประเภทหลัก ๆ ได้แก่ สีย้อมธรรมชาติ (Natural dyes) และสีย้อมสังเคราะห์ (Synthetic dyes) ในปัจจุบันอุตสาหกรรมต่าง ๆ นิยมใช้สีย้อมสังเคราะห์ เช่น สิ่งทอ การฟอกย้อมหนัง การผลิตพลาสติก และการถ่ายรูป เป็นต้น เนื่องจากสีย้อมสังเคราะห์สามารถติดบนวัสดุสม่ำเสมอและคงทน ใช้งานสะดวก และมีหลากหลายเฉดสี

การจำแนกประเภทของสีย้อมสังเคราะห์สามารถแบ่งได้หลายลักษณะ เช่น จำแนกตามลักษณะทางกายภาพ จำแนกตามส่วนประกอบและโครงสร้างทางเคมี และจำแนกตามการใช้งาน การจำแนกที่นิยมสามารถแบ่งเป็น 2 ลักษณะใหญ่ ๆ คือ จำแนกตามโครงสร้างทางเคมี เช่น สีอะโซ (Azo dyes) สีแอนทราควิโนน (Anthraquinone dyes) สีซัลเฟอร์ (Sulphur dyes) สีอินดิกอยด์ (Indigoids) สีไตรฟีนิลมีเทน (Triphenylmethane dyes) และสีฟอร์มาซาน (Formazan dyes) เป็นต้น และจำแนกตามการใช้งาน เช่น สีแอสิด (Acid dyes) สีเบสิค (Basic dyes) สีรีแอคทีฟ (Reactive dyes) สีดิสเพิร์ส (Disperse dyes) สีแวท (Vat dyes) สีไดเรกท์ (Direct dyes) สีมอร์แดนท์ (Mordant dyes) และสีออกซิเดชัน (Oxidation dyes) เป็นต้น โดยการจัดประเภทสีย้อมแบบนี้อยู่บนพื้นฐานของคัลเลอร์อินเดกซ์ (colour index, C.I.) (Choudhury, 2006)

จากการจำแนกสีย้อมตามการใช้งาน สีรีแอคทีฟจัดเป็นสีย้อมที่มีปริมาณการผลิตและใช้งานมากที่สุด โดยมีส่วนแบ่งทางการตลาดประมาณ 20 – 30 เปอร์เซ็นต์ (Zollinger, 2003; Orfao *et al.*, 2006) เนื่องจากสีรีแอคทีฟมีหลายเฉดสี มีความคงทนต่อแสง การขัดถู และการซักฟอกสูง ใช้งานง่าย ละลายน้ำได้ดี และให้ประจุลบ เหมาะสำหรับการย้อมเส้นใยเซลลูโลส (ดุษฎี, 2531; นฤมล, 2548) โดยโครงสร้างของสีประเภทนี้ประกอบด้วยหมู่ของสี (Chromophore group) ซึ่งเป็นหมู่ที่ทำให้เกิดสีมีโครงสร้างหลากหลาย เช่น อะโซ (Azo) แอนทราควิโนน (Anthraquinone) และไตรฟีนิลมีเทน (Triphenylmethane) เป็นต้น และหมู่ทำปฏิกิริยา (Reactive group) เช่น ไวนิลซัลโฟน (Vinyl sulphone) คลอโรไตอาซีน (Chlorotriazine) และไตรคลอโรไพริมีดีน (Trichloropyrimidine) เป็นต้น ซึ่งเป็นหมู่ที่ทำหน้าที่ยึดจับกับหมู่อะมิโน (Amino group) หรือหมู่ไฮดรอกซิล (Hydroxyl group) ของเส้นใยด้วยพันธะโควาเลนท์ (Covalent bond) (Sumathi and Manju, 2000; Akhtar *et al.*, 2005; Choudhury, 2006)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สีย้อมสามารถติดบนเส้นใยเพียงบางส่วนเท่านั้นในกระบวนการฟอกย้อม (Kirby *et al*., 2000) โดยสีย้อมที่เหลือปนเปื้อนอยู่ในน้ำย้อมและถูกปล่อยออกมากับน้ำทิ้งประมาณ 15 – 20 เปอร์เซ็นต์ (Selvam *et al*., 2003) ซึ่งในจำนวนนี้พบว่าเป็นสีย้อมรีแอคทีฟประมาณ 10 – 50 เปอร์เซ็นต์ (Al-Degs *et al*., 2008) เนื่องจากสีย้อมรีแอคทีฟมีปริมาณการใช้งานมากกว่าสีย้อมชนิดอื่น ๆ การปนเปื้อนสีย้อมในแหล่งน้ำก่อให้เกิดปัญหามลภาวะทางน้ำหลายด้าน เนื่องจากสีย้อมมีความเข้มสูงแม้อยู่ในน้ำทิ้งปริมาณเพียงเล็กน้อยก็สามารถเห็นได้ชัดเจนซึ่งสามารถบดบังแสงอาทิตย์ทำให้แสงอาทิตย์ไม่สามารถส่องผ่านลงสู่แหล่งน้ำส่งผลกระทบต่อการละลายของแก๊ซต่าง ๆ ทำให้ระบบนิเวศเสียสมดุลเป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำทั้งทางตรงและทางอ้อม (Hamedaani *et al*., 2007) นอกจากนี้สีย้อมบางชนิดสามารถเปลี่ยนโครงสร้างเป็นสารประกอบแอมีน (Aromatic amines) ซึ่งจัดเป็นสารก่อมะเร็งชนิดหนึ่ง การปนเปื้อนสีย้อมเหล่านี้ในระบบห่วงโซ่อาหารอาจมีผลกระทบต่อสัตว์น้ำซึ่งนำมาสู่ปัญหาสุขภาพของมนุษย์ในที่สุด (Ciullini *et al*., 2008) ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องมีวิธีการบำบัดสีย้อมอย่างมีประสิทธิภาพเพื่อป้องกันไม่ให้สีย้อมปนเปื้อนสู่แหล่งน้ำธรรมชาติและส่งผลกระทบต่อระบบห่วงโซ่อาหาร

2. การบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนสีย้อม

การบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนสีย้อมสามารถทำได้หลายกระบวนการ โดยสามารถแบ่งเป็นกระบวนการหลัก ๆ ได้ 3 กระบวนการคือ

2.1 กระบวนการทางกายภาพ

การบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนสีย้อมโดยกระบวนการทางกายภาพเป็นวิธีการแยกสารแขวนลอยออกด้วยการใช้แรงโน้มถ่วงหรือการเติมสารเคมีบางชนิดเพื่อให้สารแขวนลอยเกิดการรวมตัวและตกตะกอนหรือการคัดแยกตามขนาดของสารแขวนลอย โดยสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การตกตะกอน (Flocculation – Coagulation) การดูดซับ (Adsorption) และการกรองโดยใช้เยื่อกรอง (Membrane technology) เป็นต้น อย่างไรก็ตามการบำบัดด้วยกระบวนการทางกายภาพยังคงมีข้อจำกัดในเรื่องของปริมาณกากของเสียหลังจากการบำบัด เทคโนโลยีบางวิธีที่มีราคาสูง และบางวิธีไม่สามารถบำบัดสีได้ทั้งหมดจำเป็นต้องใช้วิธีการอื่นร่วมด้วย (Saratale *et al*., 2011)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.2 กระบวนการทางเคมี

การบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนสีย้อมโดยกระบวนการทางเคมีเป็นวิธีการที่ทำให้โครงสร้างของสีย้อมเกิดการเปลี่ยนแปลงโดยใช้ปฏิกิริยาทางเคมีเพื่อเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของสีย้อมโดยสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การออกซิเดชัน-รีดักชัน (Oxidation –Reduction) การโอโซเนชัน (Ozonation) และการอิเลกโตรไลซิส (Electrolysis) เป็นต้น แม้ว่าการบำบัดด้วยกระบวนการทางเคมีใช้เวลาในการดำเนินการสั้นแต่เป็นกระบวนการที่เสียค่าใช้จ่ายสูงและอาจเกิดสารประกอบชนิดใหม่ที่มีพิษสูงขึ้น (Saratale *et al*., 2011)

2.3 กระบวนการทางชีวภาพ

การบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนสีย้อมโดยกระบวนการทางชีวภาพเป็นวิธีที่ใช้จุลินทรีย์เป็นหลักโดยสามารถเป็นได้ทั้งแบบใช้ออกซิเจนและไม่ใช้ออกซิเจนทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของจุลินทรีย์ กระบวนการทางชีวภาพเป็นกระบวนการที่เสียค่าใช้จ่ายต่ำเนื่องจากไม่ต้องใช้เครื่องมือ สารเคมี หรือเทคโนโลยีขั้นสูงในกระบวนการบำบัดขณะเดียวกันเป็นกระบวนการที่มีประสิทธิภาพสูงและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม จากข้อดีดังกล่าวการบำบัดน้ำเสียโดยกระบวนการทางชีวภาพจึงเป็นวิธีการที่เหมาะสมที่สุด (Banat *et al*., 1996) สำหรับบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนสีย้อม ตัวอย่างรายงานการกำจัดสีย้อมด้วยกระบวนการทางชีวภาพมีดังนี้

Lucas *et al.* (2006) ศึกษาการกำจัดสีย้อม Reactive Black 5 ซึ่งเป็นสีย้อมประเภทรีแอคทีฟที่มีโครงสร้างแบบไดอะโซโดย *Candida oleophila* ผลการทดลองพบว่า ยีสต์ชนิดนี้สามารถกำจัดสีย้อมความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตรได้สูงกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะใช้อากาศ ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส โดยการกำจัดสีย้อมเกิดจากกลไกการย่อยสลายทางชีวภาพซึ่งเกิดจากทำงานของเอนไซม์อะโซรีดักเตส (Azoreductase) ดำเนินไปพร้อมกับการเจริญและไม่พบกลไกการดูดซับโดยเซลล์

Daneshvar *et al.* (2007) ศึกษาการกำจัดสีย้อม Malachite Green ซึ่งเป็นสีย้อมประเภทเบสิคที่มีโครงสร้างแบบไตรฟีนิลมีเทนโดย *Cosmarium* sp. ผลการทดลองพบว่า สาหร่ายสีเขียวชนิดนี้สามารถกำจัดสีย้อม Malachite Green ความเข้มข้นเริ่มต้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตรได้ประมาณ 89 เปอร์เซ็นต์ ที่พีเอช 9 ภายในเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยกลไกการดูดซับที่เวลา 0 – 7 ชั่วโมง ประมาณ 63 เปอร์เซ็นต์ และกลไกการย่อยสลายทางชีวภาพหลังจากชั่วโมงที่ 7 เป็นต้นไป และจากการศึกษา kinetic ตามหลัก Michaelis–Menten พบว่า ค่าMaximum Specific Decolorization Rate (V_{max}) คือ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

7.63 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้งต่อชั่วโมง และค่าสัมประสิทธิ์ Dissociation Constant (K_m) คือ 164.57 มิลลิกรัมต่อลิตร

Kolekar *et al.* (2008) ศึกษาการกำจัดสีย้อม Disperse Blue 79 และ Acid Orange 10 ซึ่งเป็นสีย้อมประเภทดิสเพิร์สและแอสิดที่มีโครงสร้างแบบอะโซ โดย *Bacillus fusiformis* เป็นแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินที่ปนเปื้อนสีย้อมในประเทศอินเดีย ผลการทดลองพบว่า แบคทีเรียชนิดนี้สามารถกำจัดสีย้อม Disperse Blue 79 ความเข้มข้น 1.5 กรัมต่อลิตร ได้ 90 เปอร์เซ็นต์ และ Acid Orange 10 ความเข้มข้น 1.5 กรัมต่อลิตร ได้ 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยกลไกการย่อยสลายทางชีวภาพภายใต้สภาวะไร้อากาศ โดยใช้ระยะเวลา 48 ชั่วโมง และไม่พบกลไกการดูดซับโดยเซลล์

Chen *et al.* (2008) ศึกษาการกำจัดสีย้อม Crystal Violet ซึ่งเป็นสีย้อมประเภทเบสิคที่มีโครงสร้างแบบไตรฟีนิลมีเทน โดย *Shewanella* sp. NTOU1 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากระบบหล่อเย็นของโรงกลั่นน้ำมัน ผลการทดลองพบว่า แบคทีเรียชนิดนี้สามารถกำจัดสีย้อม Crystal Violet ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ภายใต้สภาวะไร้อากาศ ที่อุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส และ พีเอช 8-9 ด้วยกลไกการย่อยสลายทางชีวภาพและไม่พบกลไกการดูดซับโดยเซลล์ และสามารถกำจัดสีย้อมความเข้มข้นสูงสุด 1,500 มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วยอัตราการกำจัดสีย้อม 298 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

จากงานวิจัยดังกล่าวเห็นได้ว่ามีจุลินทรีย์หลายกลุ่มสามารถกำจัดสีย้อมได้ อย่างไรก็ตาม การย่อยสลายสีย้อมภายใต้สภาวะไร้อากาศ โดยเฉพาะสีย้อมที่มีโครงสร้างแบบอะโซก่อให้เกิดสารก่อมะเร็ง (Ciullini *et al.*, 2008) การใช้จุลินทรีย์ในกลุ่มราขาวซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มของจุลินทรีย์ที่ใช้ออกซิเจนเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจนำมาใช้ในการบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนสีย้อม เนื่องจากราขาวเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ประเภทลิกนิโนไลติก (Ligninolytic enzyme) เช่น แลคเคส (Laccase) ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (Lignin peroxidase) และแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (Manganese peroxidase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายและทำลายวงอะโรมาติก (Aromatic rings) ของสีย้อมด้วยกลไกการย่อยสลายแบบออกซิเดทีฟ (Oxidative degradation) ซึ่งตัวอย่างงานวิจัยการกำจัดสีย้อมโดยจุลินทรีย์ในกลุ่มราขาวมีดังนี้

Selvam *et al.* (2003) ศึกษาการกำจัดสีย้อม Orange G, Amido Black 10B ซึ่งเป็นสีย้อมประเภทแอสิดที่มีโครงสร้างแบบอะโซและ Congo Red ซึ่งเป็นสีย้อมประเภทรีแอคทีฟที่มีโครงสร้างแบบอะโซโดย *Thelephora* sp. ผลการทดลองพบว่า ราขาวชนิดนี้สามารถกำจัดสีย้อม Orange G ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ ได้ 33.3 เปอร์เซ็นต์ สีย้อม Amido Black 10B ความ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ ได้ 98.8 เปอร์เซ็นต์ และสีย้อม Congo Red ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ ได้ 97.1 เปอร์เซ็นต์ โดยการทำงานของเอนไซม์แลคเคส ลิกนินเปอร์ออกซิเดส และแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส เป็นหลักโดยพบกลไกการดูดซับในกระบวนการกำจัดสีย้อมประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์

Tychanowicz *et al.* (2004) ศึกษาการบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนสีย้อม 8 ชนิด ได้แก่ สีย้อม Amido Black, Congo Red และ Trypan Blue ซึ่งเป็นสีย้อมที่มีโครงสร้างแบบอะโซ Methyl Green, Brilliant Cresyl Blue R, Methyl Violet และ Ethyl Violet ซึ่งเป็นสีย้อมที่มีโครงสร้างแบบไตรฟีนิลมีเทน และ Remazol Brilliant Blue ซึ่งเป็นสีย้อมที่มีโครงสร้างแบบแอนทราควิโนนโดย *Pleurotus pulmonarius* ผลการทดลองพบว่า ราขาวชนิดนี้สามารถกำจัดสีย้อมทั้ง 8 ชนิด ความเข้มข้น 200 ppm ได้ประมาณ 85 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 6 วัน โดยการทำงานของเอนไซม์แลคเคสเป็นหลัก ซึ่งมีกิจกรรมเอนไซม์สูงสุด 480 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 6 และพบกลไกการดูดซับในกระบวนการกำจัดสีย้อมน้อยกว่า 10 เปอร์เซ็นต์

Levin *et al.* (2005) ศึกษาการกำจัดสีย้อม Ponceau 2R ซึ่งเป็นสีย้อมประเภทแอสิดที่มีโครงสร้างแบบไซลิดีน สีย้อม Malachite Green ซึ่งเป็นสีย้อมประเภทเบสิคที่มีโครงสร้างแบบไตรฟีนิลมีเทนและ Anthraquinone Blue ซึ่งเป็นสีย้อมประเภทรีแอคทีฟที่มีโครงสร้างแบบแอนทราควิโนนโดย *Trametes trogii* MYA 28-11 ผลการทดลองพบว่า ราขาวชนิดนี้สามารถกำจัดสีย้อม Ponceau 2R ความเข้มข้น 8.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วยอัตรา 2.14 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรชั่วโมง โดยการทำงานของเอนไซม์แลคเคสเป็นหลัก และสามารถกำจัดสีย้อม Malachite Green ความเข้มข้น 2.7 มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วยอัตรา 1.35 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรชั่วโมง และ Anthraquinone Blue ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วยอัตรา 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรชั่วโมง โดยการทำงานของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสเป็นหลักและไม่พบกลไกการดูดซับโดยเซลล์รา

Yu *et al.* (2006) ศึกษาการกำจัดสีย้อม Reactive Brilliant Red K-2BP ซึ่งเป็นสีย้อมประเภทรีแอคทีฟที่มีโครงสร้างแบบอะโซโดย *Phanerochaete chrysosporium* ผลการทดลองพบว่า ราขาวชนิดนี้สามารถกำจัดสีย้อม Reactive Brilliant Red K-2BP ความเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ 71 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 7 วัน ซึ่งเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสที่มีกิจกรรมสูงสุด 197 ยูนิตต่อลิตร ในวันที่ 3 ของการกำจัดสีย้อมและไม่พบกลไกการดูดซับโดยเซลล์รา

Eichlerova *et al.* (2007) ศึกษาการกำจัดสีย้อม Orange G ซึ่งเป็นสีย้อมประเภทแอสิดที่มีโครงสร้างแบบอะโซและ Remazol Brilliant Blue R ซึ่งเป็นสีย้อมประเภทรีแอคทีฟที่มีโครงสร้าง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

แบบแอนทราควิโนนโดย *Dichomitus squalens* ผลการทดลองพบว่า ราขาวชนิดนี้สามารถกำจัดสีย้อม Orange G ความเข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตร ได้ 99 เปอร์เซ็นต์ และ Remazol Brilliant Blue R ความเข้มข้น 3 กรัมต่อลิตร ได้ 96 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 14 วัน ซึ่งเกิดจากการทำงานของเอนไซม์แลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส และในวันที่ 10 พบกิจกรรมเอนไซม์สูงสุด เท่ากับ 0.012 และ 0.0042 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และไม่พบการดูดซับโดยเซลล์รา

Revankar and Lele (2007) ศึกษาการกำจัดสีย้อม Amaranth ซึ่งเป็นสีย้อมที่มีโครงสร้างแบบอะโซ โดย *Ganoderma* sp. WR-1 ผลการทดลองพบว่า ราขาวชนิดนี้สามารถกำจัดสีย้อม Amaranth ความเข้มข้น 100 ppm ได้ 96 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 8 ชั่วโมง และเมื่อทดสอบความสามารถในการกำจัดสีย้อมปนเปื้อนในน้ำเสียจริงซึ่งประกอบด้วยสีย้อมประเภทรีแอคทีฟที่มีโครงสร้างต่างกันหลายเฉดสี ผลการทดลองพบว่า ราขาวชนิดนี้สามารถกำจัดสีย้อมได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 12 วัน โดยกลไกการย่อยสลายทางชีวภาพและไม่พบกลไกการดูดซับโดยเซลล์รา

Saparrat *et al.* (2008) ศึกษาการกำจัดสีย้อม 12 ชนิด ได้แก่ Congo Red, Methyl Red และ Trypan Blue ซึ่งเป็นสีย้อมที่มีโครงสร้างแบบอะโซ Brilliant Green, Crystal Violet และ Fuchsin เป็นสีย้อมที่มีโครงสร้างแบบไตรฟีนิลมีเธน Bengal Rose, Eosin Y, Phloxine, Methylene Blue B, Neutral Red และToluidine Blue เป็นสีย้อมที่มีโครงสร้างแบบเฮเทอร์โรไซคลิก โดย *Grammothele subargentea* ผลการทดลองพบว่า ราขาวชนิดนี้สามารถกำจัดสีย้อมได้ทุกชนิด ที่ความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 21 วัน โดยการทำงานของเอนไซม์แลคเคสเป็นหลัก ซึ่งพบกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดจากการกำจัดสีย้อม Brilliant Green เท่ากับ 292 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 15 ของการกำจัดสีย้อมโดยไม่พบกลไกการดูดซับบนเส้นใยรา

แม้ว่าปัจจุบันมีเทคโนโลยีการกำจัดสีย้อมทันสมัยมากขึ้นแต่การบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนสีย้อมโดยราขาวยังคงได้รับความนิยมเนื่องมีจุดเด่นที่สำคัญคือ มีประสิทธิภาพในการกำจัดสีย้อมสูงตลอดจนเป็นวิธีที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม อย่างไรก็ตามราขาวที่ใช้ในกระบวนการบำบัดส่วนใหญ่เป็นราขาวสายพันธุ์ที่พบในแถบยุโรปซึ่งเจริญที่อุณหภูมิต่ำเป็นผลให้ไม่เหมาะกับภูมิอากาศของประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจเลือก *Lentinus polychrous* Lév. ซึ่งเป็นจุลินทรีย์กลุ่มราขาวที่พบในประเทศไทย และมีรายงานพบว่าราชนิดนี้มีความสามารถในการกำจัดสีย้อมได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. *Lentinus polychrous* Lév.

L. polychrous Lév. เป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มราขาวซึ่งจัดจำแนกชนิดทางอนุกรมวิธานได้ดังนี้

Class Basidiomycetes

Sub-class Heterobasidiomyces

Order Agaricales

Family Tricholomataceae

Genus Lentinus

Species polychrous

L. polychrous Lév. มีชื่อเรียกสามัญภาษาไทยหลายชื่อ ได้แก่ เห็ดลม เห็ดบด เห็ดกระด้าง ซึ่งชื่อเรียกที่ต่างกันนั้นขึ้นกับแต่ละภูมิภาค นอกจากนี้ *L. polychrous* Lév. ยังเป็นเห็ดกินได้ พบบริเวณป่าแถบภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ปัจจุบันมีการเพาะเห็ดชนิดนี้เพื่อการบริโภคมากขึ้น จังหวัดที่มีการเพาะมากที่สุด ได้แก่ แพร่ ขอนแก่น กาฬสินธุ์ ร้อยเอ็ด และชัยภูมิ เป็นต้น

3.1 สัณฐานวิทยา

Lentinus polychrous Lév. เป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มราขาว เจริญเป็นเส้นใย (Mycelium) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อเส้นใยเจริญเต็มที่สามารถรวมตัวกันและแบ่งเซลล์ออกเป็นส่วนต่าง ๆ เช่น ก้าน ครีบ หมวกดอก และดอกเห็ด (Basidiocarp) ซึ่งแต่ละส่วนมีขนาดและหน้าที่แตกต่างกัน โดยหมวกดอก (Pileus) มีขนาดประมาณ 4 – 20 เซนติเมตร แผ่กว้างคล้ายพัด สีของดอกเห็ดเป็นสีน้ำตาลอ่อนถึงเข้มขึ้นอยู่กับสภาพภูมิอากาศและสายพันธุ์ ดังภาพที่ 1 ก้านดอก (Stalk) เป็นส่วนชูหมวกดอกและยึดติดกับวัสดุเพาะเลี้ยง มีขนาดประมาณ 0.3 – 1.6 เซนติเมตร ยาวตั้งแต่ 3.2 – 13.2 เซนติเมตร ครีบ (Gills) คือส่วนที่เป็นเนื้อเยื่ออยู่ใต้หมวก ซึ่งมีหน้าที่สร้างสปอร์เพื่อการสืบพันธุ์ โดยทั่วไปเห็ดลมสามารถขึ้นเองตามธรรมชาติในสภาพอากาศร้อนชื้น เจริญได้ตั้งแต่อุณหภูมิ 15 – 32 องศาเซลเซียส และควรมีความชื้นในอากาศประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ และพีเอช ประมาณ 6.0 – 6.5 (Pegler, 1983)

3.2 การผลิตเอนไซม์ของ *L. polychrous* Lév.

เนื่องจาก *L. polychrous* Lév. เป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มราขาว ที่เจริญได้ดีบนวัสดุธรรมชาติ เช่น ไม้ ขี้เลื่อย และฟางข้าว ซึ่งเป็นวัสดุที่ประกอบด้วยสารลิกโนเซลลูโลส โดยรากลุ่มนี้จะสร้าง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอนไซม์กลุ่มลิกนิโนไลติก เช่น ลิกนินเปอร์ออกซิเดส แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส และแลคเคส ซึ่งสามารถย่อยสลายสารลิกโนเซลลูโลสได้ ด้วยเหตุผลนี้ราขาวจึงสามารถย่อยสลายสีย้อมซึ่งมีโครงสร้างคล้ายกับสารประกอบลิกโนเซลลูโลสโดยใช้กลไกหลักเดียวกับการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลส อย่างไรก็ตามมีรายงานศึกษาเกี่ยวกับ *L. polychrous* Lév. ในเรื่องของปริมาณการผลิตเอนไซม์และการนำไปกำจัดสีย้อมเพียงเล็กน้อย ได้แก่

ภาพที่ 1 ดอกเห็ด *L. polychrous* Lév.

ที่มา: สำนักสารนิเทศ กระทรวงสาธารณสุข (2551)

Pukahuta *et al*. (2004) ศึกษาการผลิตเอนไซม์ของ *Lentinus* spp. 22 ไอโซเลท ผลการทดลองพบว่า *L. polychrous* Lév. 4 ไอโซเลท ได้แก่ *L. polychrous* Lév. LP-PT-1, *L. polychrous* Lév. LP-SW-3, *L. polychrous* Lév. LP-WR-13 และ *L. polychrous* Lév. LP-UD-1 สามารถผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส (Xylanase) เซลลูเลส (Cellulase) และแลคเคส โดย *L. polychrous* Lév. LP-SW-3 ที่เจริญในอาหารเหลว Fahraeus ผสมฟางข้าว 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 7 วัน สามารถผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสและแลคเคสได้สูงสุด โดยมีกิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 13.1 และ 3.27 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

Khammuang and Sarnthima (2007) ศึกษาเอนไซม์แลคเคสที่ผลิตโดยก้อนเห็ด *L. polychrous* Lév. ที่เจริญในก้อนเห็ดใช้แล้ว ผลการทดลองพบว่า สภาวะที่เหมาะสมของการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้ คือ พีเอช 3 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และเมื่อทำให้บริสุทธิ์พบ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอนไซม์ปริมาณ 18.5 เปอร์เซ็นต์ มีมวลโมเลกุล 32 กิโลดาลตัน และจากการทดสอบความสามารถในการกำจัดสีย้อม Remazol Brilliant Blue R ซึ่งเป็นสีย้อมประเภทรีแอคทีฟที่มีโครงสร้างแบบแอนทราควิโนน ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์ พบว่า สามารถกำจัดสีย้อมได้ 66 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 3.5 ชั่วโมง ที่พีเอช 4

ปัทมา (2551) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการกำจัดสีย้อม Remazol Brilliant Blue R ซึ่งเป็นสีย้อมรีแอคทีฟที่มีโครงสร้างแบบแอนทราควิโนน ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร โดย *L. polychrous* Lév. ที่ผ่านการทำแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบด โดยแปรผันพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ และความเร็วรอบในการเลี้ยง ผลการทดลองพบว่า ราอายุ 5 วันสามารถกำจัดสีย้อมได้ดีที่สุดที่พีเอช 4 และความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที โดยสามารถกำจัดสีย้อมได้มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์และใช้ระยะเวลาการกำจัดสีย้อมรวม 99 ชั่วโมง ด้วยการทำงานของเอนไซม์แลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส และพบกลไกการดูดซับประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตาม Chitprasert *et al.* (2011) พบว่า เมื่อรามีอายุมากขึ้นจะสามารถกำจัดสีย้อมได้เร็วขึ้นโดยราอายุ 17 วัน สามารถกำจัดสีย้อมได้เร็วที่สุด และเมื่อทดสอบความเป็นพิษของน้ำสี พบว่า น้ำสีที่ผ่านการบำบัดโดย *L. polychrous* Lév. มีความเป็นพิษลดลง เนื่องจากรากของข้าวโพดและผักบุ้งจีนที่เลี้ยงโดยน้ำสีหลังการบำบัดเจริญได้ดีกว่าในน้ำสีก่อนการบำบัดซึ่งอาจเป็นผลมาจากโครงสร้างของสีย้อมที่เป็นวงอะโรมาติกถูกเอนไซม์ย่อยสลายทำให้สีย้อมมีความเป็นพิษลดลง

Suwannawong *et al.* (2010) ศึกษาการกำจัดสีย้อม Rhodamine B ซึ่งเป็นสีย้อมประเภทเบสิค และ Congo Red เป็นสีย้อมประเภทรีแอคทีฟ โดยเอนไซม์แลคเคสที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วน (Partial Purified Laccase) ที่ผลิตจาก *L. polychrous* Lév. ผลการทดลองพบว่า เอนไซม์แลคเคสสามารถกำจัดสีย้อม Rhodamine B ได้ประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ ใช้เวลาประมาณ 52 ชั่วโมง ที่พีเอช 4 – 5 และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดยสามารถกำจัดสีย้อม Congo red ได้มากกว่า 75 เปอร์เซ็นต์ภายในระยะเวลา 3 ชั่วโมง ที่พีเอช 6 – 7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ข้อมูลข้างต้นทำให้เห็นว่า *L. polychrous* Lév. เป็นราที่มีประสิทธิภาพในการการกำจัดสีย้อมโดยสามารถผลิตเอนไซม์ได้หลากหลายชนิดโดยเฉพาะเอนไซม์แลคเคส อย่างไรก็ตามการกำจัดสีย้อมโดยรามีข้อด้อยในเรื่องการใช้ระยะเวลาในการกำจัดสีย้อมนานเมื่อเปรียบเทียบกับกระบวนการทางกายภาพหรือเคมี เช่น การดูดซับหรือการออกซิเดชัน แต่วิธีการเหล่านี้มีข้อเสียเช่นกันคือ กระบวนการทางเคมีอาจก่อให้เกิดสารใหม่ที่มีพิษมากขึ้น ส่วนการดูดซับเป็นวิธีการที่ทำให้สีย้อมเกาะติดบริเวณพื้นผิวของวัสดุที่เป็นตัวดูดซับแต่ไม่สามารถเปลี่ยนแปลงโครงสร้างสีย้อมได้ อย่างไรก็ตามวิธีการนี้มีข้อดีในแง่ของการใช้ระยะเวลาดำเนินการสั้นและไม่ยุ่งยากซับซ้อน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

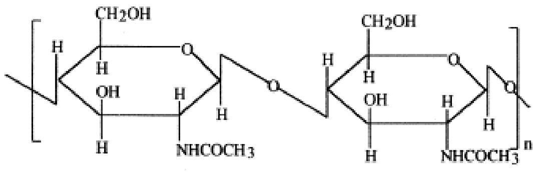
(Robinson *et al.,* 2001; Forgacs *et al*., 2004) ดังนั้นเมื่อพิจารณาจากข้อด้อยด้านระยะเวลาการกำจัดสีย้อมของรา งานวิจัยนี้จึงมีแนวคิดประยุกต์ใช้วิธีทางกายภาพร่วมกับวิธีทางชีวภาพโดยการเคลือบสารที่มีความสามารถในการดูดซับบนเม็ดรา โดยคาดว่ากระบวนการดูดซับสามารถช่วยให้สีย้อมมาสะสมบริเวณเส้นใยราทำให้เอนไซม์ที่ปล่อยออกทางปลายเส้นใยสัมผัสกับสีย้อมได้เร็วขึ้นส่งผลให้ราสามารถกำจัดสีย้อมได้เร็วมากขึ้น

4. ไคโตซาน

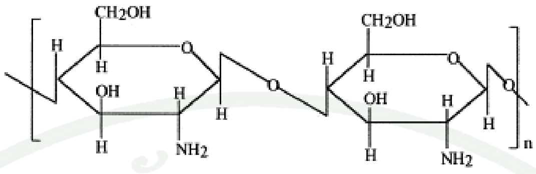
ไคโตซานเป็นอนุพันธ์ของไคตินซึ่งเป็นสารโคพอลิเมอร์ธรรมชาติระหว่างโมโนเมอร์ของ N-acetyl-D-glucosamine และ D-glucosamine โดยไคโตซานมีสัดส่วนของโมโนเมอร์ที่สองมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ และมีสูตรทางเคมี คือ Poly[β–(1→4)–2–amino–2–deoxy–D–glucopyranose] ซึ่งเกิดจากการกำจัดหมู่อะซีติล (-$COCH_3$) ของไคตินแล้วเปลี่ยนเป็นหมู่อะมิโน (-NH_2) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 ดังนั้นโครงสร้างทางเคมีของไคโตซานจึงคล้ายกับไคตินดังภาพที่ 2 (Rinaudo, 2006)

ไคโตซานสามารถสกัดจากเปลือกของสัตว์ต่าง ๆ เช่น กุ้ง ปู หมึก หอย แมลง และผนังเซลล์จุลินทรีย์ เช่น รา และยีสต์ เป็นต้น ซึ่งเป็นแหล่งที่มีปริมาณไคตินเป็นองค์ประกอบสูง ไคโตซานเป็นโพลิเมอร์สายยาวมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำแต่สามารถละลายได้ในสารละลายกรดอินทรีย์ เช่น กรดน้ำส้ม (Acetic acid) กรดมะนาว (Citric acid) และกรดแลคติก (Lactic acid) เป็นต้น มีค่า pKa อยู่ในช่วง 6.2 – 6.5 (Pepic *et al*., 2008) ดังนั้นเมื่อไคโตซานอยู่ในสภาวะพีเอชเป็นกรดไคโตซานแสดงประจุเป็นบวกเนื่องจากหมู่อะมิโน (-NH_2) ได้รับโปรตอนจึงสามารถเปลี่ยนเป็น Cationic amine (-NH_3^+) แต่ไคโตซานไม่ละลายเมื่ออยู่ในสภาวะพีเอชที่มากกว่า pKa นอกจากนี้สารละลายไคโตซานสามารถขึ้นรูปได้หลายแบบ เช่น แผ่นเยื่อบาง เจล เม็ด เส้นใย หรือทำเป็นสารเคลือบ เป็นต้น เนื่องจากเป็นสารที่มีความยืดหยุ่นสูง และสามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติและไม่เป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิต จากคุณสมบัติที่หลากหลายทำให้ไคโตซานถูกนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ในงานด้านต่าง ๆ มากมาย เช่น ด้านอาหาร และการถนอมอาหาร ด้านบรรจุภัณฑ์ ด้านการเกษตร ด้านการแพทย์และเภสัชกรรม ด้านเครื่องสำอาง ด้านสิ่งทอและกระดาษ ด้านระบบบำบัดน้ำ และด้านเทคโนโลยีชีวภาพ เป็นต้น (Kumar, 2000; Shukla *et al*., 2013)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



Chitin



Chitosan

ภาพที่ 2 โครงสร้างของไคตินและไคโตซาน

ที่มา: Kumar (2000)

เนื่องจากคุณสมบัติของไคโตซานที่สามารถแสดงประจุเป็นบวกได้ในสภาวะกรดดังนั้นจึงสามารถจับกับสารที่มีประจุเป็นลบได้ เช่น สีย้อมรีแอคทีฟ และพอลิเมอร์ต่าง ๆ นอกจากนี้ไคโตซานยังสามารถจับโลหะหนัก เช่น ทองแดง เหล็ก และสังกะสีได้ เนื่องจากไนโตรเจนอะตอมในหมู่อะมิโนของไคโตซานสามารถสร้างพันธะระหว่างโลหะหนักในหลายรูปแบบ เช่น พันธะไอออนิก พันธะโควาเลนซ์ และแรงไฟฟ้าสถิตย์ เป็นต้น จากคุณสมบัติดังกล่าวจึงทำให้ไคโตซานเป็นพอลิเมอร์ที่ทำหน้าที่เป็นตัวดูดซับ (adsorbent) และนำมาใช้ในการบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนโลหะหนักและสีย้อมอย่างแพร่หลายโดยเฉพาะสีย้อมรีแอคทีฟซึ่งมีประจุเป็นลบ (Anionic Reactive dye) และมีงานวิจัยที่นำไคโตซานไปใช้เป็นตัวดูดซับสีย้อมอย่างแพรหลาย ดังเช่น

Chiou *et al.* (2004) ศึกษาการดูดซับสีย้อมซึ่งมีประจุเป็บลบโดยไคโตซานในรูปแบบเม็ดที่เชื่อมไขว้ (Cross-link) ด้วยโซเดียมไตรโพลีฟอสเฟต โซเดียมไฮดรอกไซด์ และ Epichlorohydrin ซึ่งขนาดเม็ดไคโตซานที่ใช้ในการทดลองมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.3 – 2.5 มิลลิเมตร การทดลองแปรผันพีเอชของน้ำสีตั้งแต่ 3 – 8 และใช้สีย้อมทั้งหมด 8 สี โดยเป็นสีย้อมรีแอคทีฟจำนวน 4 สี ได้แก่ Reactive blue 2, Reactive red 2, Reactive yellow 2 และ 86 สีย้อมแอสิดจำนวน 3 สี คือ Acid red 14, Acid orange 7 และ 12 และ สีย้อมไดเรกท์ 1 สี คือ Direct red 81 ผลการทดลองพบว่า เม็ดไคโตซานสามารถดูดซับสีย้อมได้ 1,911 – 2,498 กรัมต่อกิโลกรัม และเมื่อเปรียบเทียบความสามารถการดูดซับกับถ่านกัมมันต์ (Activated Carbon) เม็ดไคโตซานสามารถดูดซับได้สูงกว่า 3.4 – 15 เท่า และพบว่าประสิทธิของการดูดซับจะสูงขึ้นเมื่อพีเอชลดต่ำลงโดยที่พีเอช 3 สามารถดูดซับสีย้อมได้ดีที่สุดคือ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Sakkayawong *et al.* (2005) ศึกษากลไกการดูดซับสีย้อม Reactive red 141 ซึ่งเป็นสีย้อมประเภทรีแอคทีฟที่มีโครงสร้างแบบอะโซ โดยไคโตซานที่มีขนาด 0.850 – 1.0 มิลลิเมตร การทดลองแปรผันพีเอชของน้ำสีตั้งแต่ 2 – 11 และใช้สีย้อมความเข้มข้นเริ่มต้น 400 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลการทดลองพบว่า ไคโตซานสามารถดูดซับสีย้อมมากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้กลไกการดูดซับด้วยแรงไฟฟ้าสถิตย์ระหว่างหมู่อะมิโนของไคโตซานและหมู่ซัลโฟเนตของสีรีแอคทีฟภายใต้สภาวะกรด (พีเอช 2 – 5) และใช้กลไกการดูดซับจากการสร้างพันธะโควาเลนซ์ระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลของไคโตซานและหมู่คลอไรด์ของสีรีแอคทีฟภายใต้สภาวะเบส (พีเอช 8 – 11)

Annadurai *et al.* (2008) ศึกษาการดูดซับสีย้อม Reactive black 5 ซึ่งเป็นสีย้อมประเภทรีแอคทีฟที่มีโครงสร้างแบบอะโซ โดยไคโตซานที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสและคัดขนาดจนกระทั่งไคโตซานมีขนาดอนุภาคต่างกัน 3 ระดับ การทดลองแปรผันความเข้มข้นของสีย้อมเริ่มต้นเป็น 100 – 300 มิลลิกรัมต่อลิตร แปรผันขนาดของไคโตซานเป็น 0.177, 0.384 และ 1.651 มิลลิเมตร แปรผันพีเอชน้ำสีเป็น 6.7 – 9 และแปรผันอุณหภูมิของระบบเป็น 30 – 60 องศาเซลเซียส ผลการทดลองพบว่า ไคโตซานสามารถดูดซับสีย้อมได้ 91.47 – 130 มิลลิกรัมต่อกรัม ที่พีเอชน้ำสีเท่ากับ 6.7 และพบว่าการดูดซับเกิดจากการทำงานของหมู่อะมิโนของไคโตซานจับกับสีย้อมด้วยแรงไฟฟ้าสถิตย์

Momenzadeh *et al.* (2011) ศึกษาการกำจัดสีย้อม Reactive red 120 ซึ่งเป็นสีย้อมประเภทรีแอคทีฟที่มีโครงสร้างแบบอะโซ โดยไคโตซานซึ่งเชื่อมไขว้ด้วยโซเดียมไตรโพลีฟอสเฟตและปั่นผสมที่ 10,000 รอบต่อนาที จนกระทั่งได้ไคโตซานในรูปแบบของ Nanodispersion ซึ่งมีขนาดเม็ดเฉลี่ย 86 นาโนเมตร การทดลองแปรผันพีเอชเริ่มต้นตั้งแต่ 2.5 – 7.5 โดยทำการทดลองเปรียบเทียบความสามารถการดูดซับสีระหว่างสารละลายไคโตซานซึ่งเตรียมโดยละลายไคโตซานในสารละลายกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์และ Nanodispersion ผลการทดลองพบว่า Nanodispersion มีความสามารถการดูดซับสีย้อมได้ประมาณ 910 มิลลิกรัมต่อกรัม ซึ่งสูงกว่าสารละลายไคโตซาน 18 เท่า เนื่องจากในระหว่างการเติมสีย้อมลงในไคโตซานแต่ละประเภท Nanodispersion เกิดการรวมตัวอย่างรวดเร็วเป็นกลุ่มซึ่งมีประจุบวกสูงจึงสามารถดูดซับสีย้อมได้สูงและการดูดซับสีย้อมสูงที่สุดที่ช่วงพีเอช 4 – 5 เนื่องด้วยเป็นช่วงพีเอชที่ต่ำกว่า 6.5 ซึ่งเท่ากับ pKa ของไคโตซาน จึงทำให้ไคโตซานแสดงประจุเป็นบวกซึ่งสามารถจับกับสีย้อมรีแอคทีฟที่มีประจุลบด้วยแรงไฟฟ้าสถิตย์

Jiang *et al.* (2014) ศึกษาการดูดซับสีย้อม Reactive blue 19 ซึ่งเป็นสีย้อมประเภทรีแอคทีฟที่มีโครงสร้างแบบแอนทราควิโนน โดยไคโตซานในรูปแบบที่ถูกดัดแปรด้วยวิธี Graft

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Copolymerization โดยผสมสาร Methyl Methacrylate และ Glycidyl Methacrylate เพื่อสร้างเป็นเม็ดไคโตซานดัดแปร การทดลองแปรผันความเข้มข้นของสีเริ่มต้นเป็น 40, 70 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และแปรผันพีเอชเป็น 3 และ 7 ผลการทดลองพบว่า เม็ดไคโตซานดัดแปรมีความสามารถการดูดซับสูงสุดเท่ากับ 1,498 มิลลิกรัมต่อกรัม ที่พีเอช 3 และพบว่า ที่สภาวะพีเอชสูงขึ้นช่วยให้การดูดซับสีมากขึ้น เนื่องด้วยที่พีเอชต่ำกว่า 3 สีย้อม Reactive blue 19 มีประจุลบลดลงจึงส่งผลให้ไคโตซานซึ่งมีประจุเป็นบวกจับกับสีย้อมด้วยแรงไฟฟ้าสถิตย์ได้น้อยลง

งานวิจัยข้างต้นทำให้เห็นว่าไคโตซานสามารถดูดซับสีย้อมรีแอคทีฟได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยสามารถใช้งานไคโตซานได้ในหลายรูปแบบ เช่น ผง เม็ด เม็ดเจล หรือการเคลือบติดไคโคซานบนวัสดุ เป็นต้น จากลักษณะของไคโตซานที่สามารถใช้ได้หลายรูปแบบ งานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ไคโตซานมาเคลือบบนเม็ดราเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดสีย้อม

5. การเก็บรักษาเชื้อราโดยการทำแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบด

การเก็บรักษาเชื้อรามีหลายวัตถุประสงค์ เช่น เพื่อการศึกษาค้นคว้า เพื่อใช้ในอุตสาหกรรม เพื่อนำมาใช้ในการเรียน หรือเป็นการเก็บรวบรวมเพื่อนำมาเปรียบเทียบ โดยหลักการสำคัญของการเก็บรักษาเชื้อรา คือ การหยุดหรือลดการเจริญโดยควบคุมปัจจัยที่จำเป็นต่อการเจริญโดยเฉพาะความชื้น ซึ่งการทำแห้งเป็นวิธีการเก็บรักษาเชื้อราวิธีหนึ่งโดยใช้หลักการดึงน้ำออกและป้องกันไม่ให้เกิดความชื้นขึ้นอีก ซึ่งถือเป็นวิธีการที่เหมาะสมกับเชื้อราเป็นอย่างยิ่งเนื่องจากเชื้อราเป็นจุลินทรีย์ที่ทนต่อความแห้งได้ดี (สมบูรณ์, 2539)

การทำแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบดเป็นวิธีการทำแห้งที่ทำให้อนุภาคที่อยู่บนตะแกรงของหอทดลองเกิดการเคลื่อนที่ในลักษณะเหมือนของไหลภายในหอทดลอง โดยการผ่านของไหลซึ่งอาจจะเป็นลมร้อนหรือของเหลวจากด้านล่างของตะแกรงที่มีอนุภาคของแข็งวางอยู่ และเมื่อเพิ่มความเร็วของของไหลขึ้นเรื่อย ๆ จะส่งผลให้อนุภาคของแข็งเคลื่อนไหวลอยตัวอยู่ในหอทดลองอย่างอิสระ (จันทนา, 2546)

เนื่องจากหลักการสำคัญของการเก็บรักษาเชื้อคือการควบคุมปัจจัยในการเจริญโดยเฉพาะความชื้น การทำแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบดเป็นวิธีการทำแห้งวิธีการหนึ่งที่มีอุณหภูมิในการทำแห้งต่ำและมีระยะเวลาในการทำแห้งสั้นทำให้อัตราการรอดชีวิตของราสูงเนื่องจากความเร็วอาจทำลายผนังเซลล์ราได้น้อยเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการทำแห้งด้วยวิธีอื่น นอกจากนี้การทำแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบดมีขั้นตอนไม่ซับซ้อนและประหยัดพลังงานอีกด้วย (Chitprasert *et al.*, 2011) ในแง่ของการ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ใช้งานราแห้งช่วยเพิ่มความสะดวกในการขนส่งช่วยลดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นและช่วยเพิ่มอายุการเก็บรักษาได้ อย่างไรก็ตามเชื้อแห้งมีข้อเสียในเรื่องของความไม่พร้อมใช้งานจึงอาจจำเป็นต้องเพิ่มขั้นตอนกระตุ้นการเจริญของเชื้อแห้งก่อนนำไปใช้ซึ่งปัจจุบันมีงานที่ศึกษาการทำแห้งเส้นใยราน้อยมาก

ปัทมา (2551) ศึกษาการทำแห้ง *L. polychrous* Lév. แบบฟลูอิไดซ์เบด ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 นาที เพื่อนำไปทดสอบความสามารถการกำจัดสีย้อม Remazol Brilliant Blue R ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และประเมินอายุการเก็บรักษา โดยแปรผันอายุราก่อนทำแห้งเป็น 3, 5 และ 7 วัน ผลการทดลองพบว่า อายุของราที่เหมาะสมที่สุดคือ 5 และพบว่า ราแห้งยังคงสามารถกำจัดสีย้อมได้แต่เมื่อเปรียบเทียบกับราสดระยะเวลาการกำจัดสีย้อมรวมของราแห้งจะมากกว่า และเมื่อราแห้งได้รับการกระตุ้นจากอาหาร Mushroom Complete Medium เป็นเวลา 36 ชั่วโมงพบว่า ราแห้งจะสามารถกำจัดสีย้อมโดยใช้ระยะเวลาการกำจัดสีย้อมรวม ใกล้เคียงกับราสดเท่ากับ 90 ชั่วโมง นอกจากนี้พบว่า ราแห้งที่อายุการเก็บรักษา 6 เดือน ยังคงความสามารถการกำจัดสีย้อมได้แต่ต้องกระตุ้นการเจริญเป็นระยะเวลา 6 วัน จึงจะสามารถกำจัดสีย้อมโดยใช้ระยะเวลาใกล้เคียงราสด

จากงานวิจัยที่กล่าวมาทั้งหมดข้างต้นเห็นได้ว่า *L. polychrous* Lév. เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถกำจัดสีย้อมได้อย่างมีประสิทธิภาพแต่มีข้อด้อยด้านการมีระยะเวลาการกำจัดสีย้อมที่นาน การประยุกต์ใช้ไคโตซานซึ่งเป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติเป็นสารเคลือบบนเม็ดราเพื่อเพิ่มกลไกการดูดซับสีย้อมบนเม็ดรา โดยคาดว่าสามารถทำให้ลดระยะเวลาการกำจัดสีย้อมลงได้ อย่างไรก็ตามราสดมีความไม่สะดวกในการใช้งานและการเก็บรักษา การทำแห้งราแบบฟลูอิไดซ์เบดจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่ง่ายและสะดวกอีกทั้งยังมีระยะเวลาการทำแห้งสั้นและอุณหภูมิทำแห้งต่ำทำให้รามีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าวิธีทำแห้งแบบอื่น ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาการกำจัดสีย้อมรีแอคทีฟผสมโดย *L. polychrous* Lév. ที่เคลือบด้วยไคโตซานและผ่านการทำแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. เครื่องมือ

1.1 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (ES-315, Tomy, Japan)

1.2 เครื่องกรองสุญญากาศ (SUE 30E, SUE Heto, Denmark)

1.3 เครื่องไมโครเซนตริฟิวจ์ (Z323, Hermel, Germany)

1.4 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UVG 111607, Hexios, England)

1.5 ตู้เขี่ยเชื้อ (HVS 60, Boss Tech, Thailand)

1.6 เครื่องวัดพีเอช (S220, Mettler Toledo, Switzerland)

1.7 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (NE1-14CE, Clifton, England)

1.8 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (VS-8480 SFN, Vision Scientific, Korea)

1.9 เครื่องทำแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบด (6 MAS 1009, Sherwood Scientific, England) พร้อมด้วยแผ่นกรองอากาศขนาด 0.1 ไมโครเมตร (Filtrate, 3M, Thailand)

1.10 ตู้อบแห้ง (VS-120 2D4N, Vision Scientific, Korea)

1.11 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (JSM-5410LV, Jeol, Japan)

1.12 เครื่องเคลือบทอง (Balzers SCD 040, Balzers Union, Liechtenstein)

1.13 เครื่องทำแห้ง ณ จุดวิกฤต (Balzers CPD 020, Balzers Union, Liechtenstein)

1.14 เครื่องฟูเรียร์ทรานฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (Tensor 27, Bruker, Germany)

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ *Lentinus polychrous* Lév.

อาหารเลี้ยงเชื้อ *Lentinus polychrous* Lév. 3 ชนิด โดยองค์ประกอบแสดงในภาคผนวก ก ได้แก่

2.1 Potato Dextrose Agar (PDA, Merck, Germany)

2.2 Mushroom Complete Medium (MCM) (ปัทมา, 2551)

2.3 Minimal Medium (MM) (ปัทมา, 2551)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. ไคโตซาน

ไคโตซานประเภทผงซึ่งมีมวลโมเลกุล 30 กิโลดาลตัน และมี Degree of Deacetylation 95 เปอร์เซ็นต์ จากบริษัท ไบโอ 21 จำกัด จ. ชลบุรี ประเทศไทย

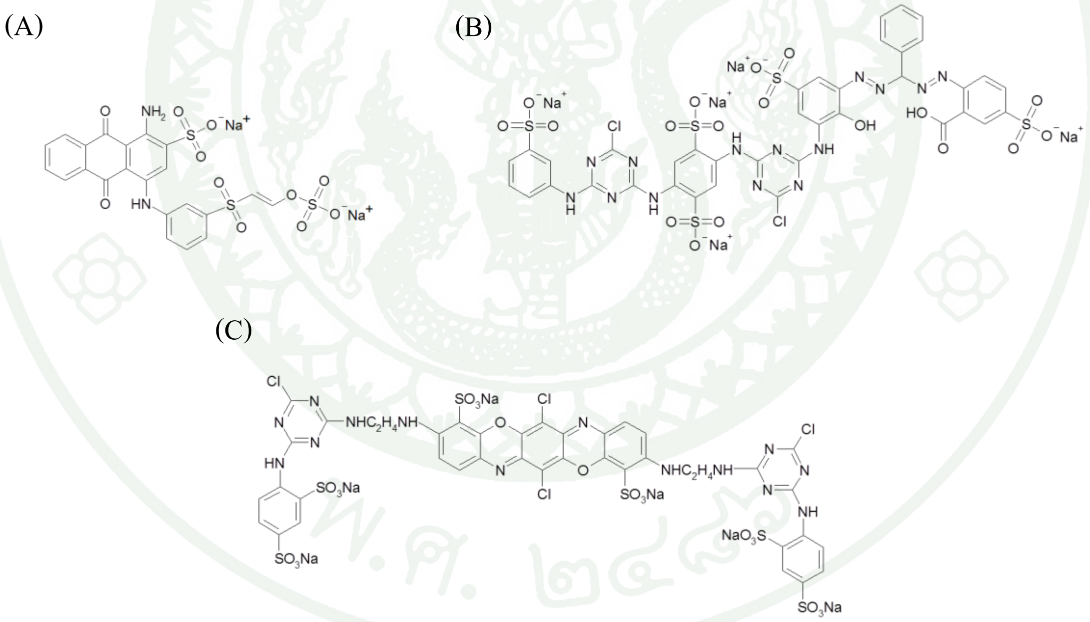
4. สีย้อมสังเคราะห์

สีย้อมสังเคราะห์ซึ่งเป็นสีย้อมประเภทรีแอคทีฟได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท ไดสตาร์ไทย จำกัด โดยโครงสร้างของสีย้อมทั้งหมดแสดงดังภาพที่ 3

4.1 Remazol Brilliant Blue R (Reactive Blue 19, RB 19)

4.2 Procion Blue HERD (Reactive Blue 160, RB 160)

4.3 Procion Blue HEGN (Reactive Blue 198, RB 198)



ภาพที่ 3 โครงสร้างสีย้อม (A) RB19 มีโครงสร้างแบบ Anthraquinone; (B) RB160 มีโครงสร้างแบบ Azo; (C) RB198 มีโครงสร้างแบบ Triphenodioxazine

ที่มา: (A) Champagne *et al*. (2010); (B) Bansal and Sud (2011); (C) Almeida *et al*. (2006)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5. จุลินทรีย์

Lentinus polychrous Lév. จากศูนย์รวบรวมพันธุ์เห็ดแห่งประเทศไทย กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เก็บรักษาบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และต่อเชื้อทุก 1 เดือน

วิธีการ

1. การเลี้ยง *L. polychrous* Lév. บนอาหารขี้เลื่อย

การเลี้ยง *L. polychrous* Lév. บนอาหารขี้เลื่อย ดัดแปลงวิธีจากงานวิจัยของปัทมา (2551) ด้วยการถ่ายเชื้อเริ่มต้นที่เก็บรักษาบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยใช้แท่งเจาะวุ้นเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 มิลลิเมตร ตัดส่วนปลายเส้นใยแล้ววางบนกลางจานเพาะเชื้อที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ MCM บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เพื่อกระตุ้นการเจริญ จากนั้นถ่ายเชื้อโดยใช้แท่งเจาะวุ้นขนาดเดิมตัดส่วนปลายเส้นใยจากบริเวณริมขอบจำนวน 8 plugs ลงขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารขี้เลื่อยไม้ยางพาราที่มีขนาดขี้เลื่อย 0.250 – 0.425 มิลลิเมตร ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ปริมาณ 5 กรัม โดยปรับความชื้นของอาหารเป็น 60 เปอร์เซ็นต์ ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นบดชิ้นวุ้นที่มีราเกาะด้วย spatula ให้ละเอียดและคลุกผสมให้เข้ากับอาหารขี้เลื่อย บ่มที่อุณหภูมิ 30 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน และคลุกผสมทุกวัน

2. การเคลือบ *L. polychrous* Lév. ด้วยสารละลายไคโตซาน

เตรียมสารละลายไคโตซานที่แปรผันความเข้มข้นเป็น 0.1, 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร โดยละลายผงไคโตซานในสารละลายกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.6 เปอร์เซ็นต์ และปรับพีเอชของสารละลายไคโตซานเป็น 6.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ จากนั้นเทสารละลายไคโตซานปริมาตร 100 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ซึ่งบรรจุราที่เลี้ยงบนอาหารขี้เลื้อยเป็นเวลา 7 วัน ปริมาณ 10 กรัม ทำการเคลือบราโดยใช้เครื่องเขย่าความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 40 นาที และกรองราด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. การทำแห้ง *L. polychrous* Lév. แบบฟลูอิไดซ์เบด

ทำแห้งราที่ผ่านการเคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาณ 10 กรัม ด้วยเครื่องทำแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบด โดยสภาวะการทำแห้ง คือ อุณหภูมิลม 40 ± 1 องศาเซลเซียส ความเร็วลม 1.85 เมตรต่อวินาที และระยะเวลาทำแห้ง 5 นาที จากนั้นนำราเคลือบด้วยไคโตซานและผ่านการทำแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบดไปทดสอบความสามารถการกำจัดสีย้อมและสมบัติต่าง ๆ ต่อไป

4. การศึกษาอิทธิพลของการเคลือบ *L. polychrous* Lév. ด้วยไคโตซานและผ่านการทำแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบดต่อสมบัติต่าง ๆ ของรา

4.1 การวิเคราะห์พื้นผิวราที่เคลือบด้วยไคโตซานด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM)

วิเคราะห์พื้นผิวเม็ดราก่อนการกำจัดสีย้อมโดยตัวอย่าง คือ เม็ดราที่ไม่เคลือบด้วยไคโตซานและเม็ดราที่เคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 0.1, 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ทั้งก่อนและหลังการทำแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบด และตัวอย่างเม็ดราประเภทเดียวกันที่ไม่ผ่านการทำแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบด หลังการกำจัดสีย้อม 72 ชั่วโมง วิธีการเตรียมตัวอย่างเม็ดราก่อนการกำจัดสีย้อมทำโดยการอังด้วยไอของออสเมียมเททรอกไซด์ (OsO_4) ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง สำหรับเม็ดราหลังการกำจัดสีย้อม 72 ชั่วโมงเตรียมตัวอย่างโดยการแช่เม็ดราในสารละลายออสเมียมเททรอกไซด์ภายใต้สภาวะเดียวกันและล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง จากนั้นจึงเข้าสู่ขั้นตอนการทำตัวอย่างให้แห้งโดยการห่อตัวอย่างเม็ดราด้วยกระดาษเซ็ดเลนส์และแช่ลงในสารละลายเอทานอลในแต่ละความเข้มข้นที่ 30, 50, 70 และ 90 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที ความเข้มข้นละ 1 ครั้ง ตามลำดับ แล้วจึงนำตัวอย่างแช่ในเอทานอลความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 3 ครั้ง ระเหยเอทานอลโดยการอังด้วยคาร์บอนไดออกไซด์อิ่มตัว จากนั้นทำแห้งตัวอย่างทั้งหมดด้วยเครื่องทำแห้ง ณ จุดวิกฤต (Critical point dryer) และฉาบเคลือบตัวอย่างด้วยทองโดยเครื่อง Ion sputter ติดตัวอย่างบนแท่นอะลูมิเนียมก่อนนำตัวอย่างไปส่องด้วยกล้อง SEM

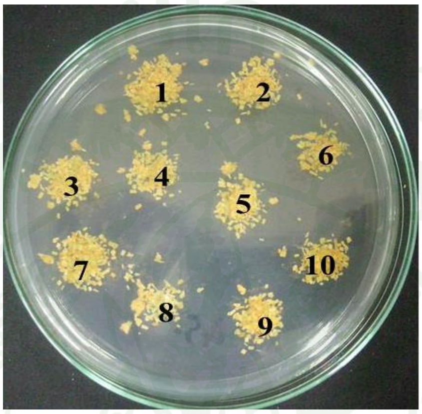
4.2 การวิเคราะห์การรอดชีวิตของ *L. polychrous* Lév. ที่เคลือบด้วยไคโตซาน

ทดสอบการรอดชีวิตของ *L. polychrous* Lev. ที่ไม่เคลือบและเคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ ก่อนและหลังการทำแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบด ด้วยวิธีซึ่งดัดแปลงจาก Gassara

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

et al. (2010) โดยถ่ายตัวอย่างราลงบนอาหารแข็ง PDA จำนวน 10 จุด จุดละ 0.05 กรัม รอบจานเพาะเชื้อ ดังภาพที่ 4 วัดการเจริญโดยการนับจำนวนจุดราที่มีการเจริญ โดยบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 วัน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วคำนวณการรอดชีวิตตามสมการดังนี้

$$\text{การรอดชีวิตของรา (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{จำนวนจุดของราที่มีการเจริญในวันที่ 5}}{10} \times 100$$



ภาพที่ 4 ตำแหน่งของการวาง *L. polychrous* Lév. ที่เคลือบด้วยไคโตซาน 10 จุดบนจานเพาะเชื้อซึ่งบรรจุอาหารแข็ง PDA

4.3 การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น

วิเคราะห์ปริมาณความชื้นของ *L. polychrous* Lev. ที่ไม่เคลือบและเคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ ก่อนและหลังการทำแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบด ด้วยวิธีอบแห้ง ที่อุณหภูมิ 105 ± 2 องศาเซลเซียส โดยอบจนกระทั่งตัวอย่างมีน้ำหนักคงที่ (Horwitz, 2000) ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ

4.4 การวิเคราะห์ความสามารถการกำจัดสีย้อม

ถ่ายราที่ไม่เคลือบและเคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ ก่อนและหลังการทำแห้งแบบฟลูอิไดซ์ ปริมาณ 0.2 กรัมน้ำหนักแห้ง ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุสีย้อมผสม 3 ชนิด ได้แก่ สีย้อม RB 19, 160 และ 198 ที่กรองด้วยกระดาษกรองเซลลูโลสไนเตรต (Whatman) ขนาด 0.45 ไมโครเมตร มีความเข้มข้นรวมเป็น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเหลว

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

MM ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 4.0 ด้วย McIvan buffer และเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 ± 1 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที วิเคราะห์ปริมาณสีย้อมที่ลดลงที่เวลาต่าง ๆ โดยปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องไมโครเซนตริฟิวจ์ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อแยกส่วนใสจากนั้นจึงวัดค่าการดูดกลืนแสงของสีย้อมผสมที่ความยาวคลื่นสูงสุด 597 นาโนเมตร ทำการทดลองจำนวน 5 ซ้ำ ชุดควบคุม คือ ชุดที่ปราศจากรา และคำนวณปริมาณสีย้อมที่เหลือโดยใช้สมการดังนี้

$$\text{ปริมาณสีย้อมที่เหลือ (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของสีย้อมที่เหลือ}}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของสีย้อมชั่วโมงที่ 0}} \times 100$$

5. การศึกษากลไกการกำจัดสีย้อม

5.1 การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงความยาวคลื่นสูงสุดของสีย้อมรีแอคทีฟผสมที่เวลาการกำจัดสีย้อมต่าง ๆ

วิเคราะห์ตัวอย่างสีย้อมที่กำจัดโดยราที่ไม่เคลือบและเคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ชั่วโมงที่ 0, 6, 18, 30, 36 และ 72 ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่การลดลงของสีย้อมเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงจนกระทั่งคงที่ วิเคราะห์ความยาวคลื่นสูงสุดของสีย้อมที่เวลาดังกล่าวโดยการเตรียมตัวอย่างเช่นเดียวกับการทดลองข้อ 4.4 และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 – 700 นาโนเมตร ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ

5.2 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์

วิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์โดยเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 4.4 ซึ่งมีวิธีการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ ดังนี้

5.2.1 เอนไซม์แลคเคส

วิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์แลคเคสจากการเพิ่มขึ้นของค่าการดูดกลืนแสงจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของ 2, 2’- azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate (ABTS) ตามวิธีของ Bourbonnais and Paice (1990) โดยส่วนผสมที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาประกอบด้วยสารละลายสีย้อมที่ผ่านการกำจัดสีย้อมเวลาต่าง ๆ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร สารละลาย ABTS ความเข้มข้น 0.5 มิลลิ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

โมลาร์ ซึ่งเป็นสับสเตรทของปฏิกิริยา ปริมาตร 850 ไมโครลิตร และ Acetate buffer ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 4.5 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร วัดอัตราการเพิ่มขึ้นของปฏิกิริยาจากการเพิ่มของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร แล้วคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์จากค่า Molar absorption coefficient ของ ABTS ซึ่งเท่ากับ 36,000 โมลต่อลิตรต่อเซนติเมตรโดย 1 หน่วยของเอนไซม์ คือ ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถออกซิไดซ์ ABTS 1.0 ไมโครโมล เป็น $ABTS^{\cdot+}$ ในเวลา 1 นาที

5.2.2 เอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส

วิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสจากการเพิ่มขึ้นของค่าการดูดกลืนแสงจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของ 3-methyl-2-benzothiazoline hydrazine (MBTH) ตามวิธีของ Castillo *et al*. (1994) โดยส่วนผสมที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาประกอบด้วยสารละลายสีย้อมที่ผ่านการกำจัดสีย้อมเวลาต่าง ๆ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร สารละลาย MBTH ความเข้มข้น 0.07 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 250 ไมโครลิตร สารละลาย 3-dimethylamino benzoic acid (DMAB) ความเข้มข้น 0.99 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร สารละลาย $MnSO_4$ ความเข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร สารละลาย H_2O_2 ความเข้มข้น 0.05 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และ Acetate buffer ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ พีเอช 4.5 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร วัดอัตราการเพิ่มขึ้นของปฏิกิริยาจากการเพิ่มของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร แล้วคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์จากค่า Molar absorption coefficient ของ MBTH ซึ่งเท่ากับ 59,000 โมลต่อลิตรต่อเซนติเมตรโดย 1 หน่วยของเอนไซม์ คือ ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถออกซิไดซ์ MBTH 1.0 ไมโครโมล เป็น aminoindamineในเวลา 1 นาที

5.2.3 เอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส

วิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสจากการเพิ่มขึ้นของค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาออกซิเดชันของ 3,4-dimethoxybenzylalcohol (veratrylic alcohol) ตามวิธีของ Tien and Kirk (1984) โดยส่วนผสมที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาประกอบด้วยสารละลายสีย้อมที่ผ่านการกำจัดสีย้อมเวลาต่าง ๆ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร สารละลาย 3,4-dimethoxybenzylalcohol ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 650 ไมโครลิตร และสารละลาย H_2O_2 ความเข้มข้น 0.05 มิลลิโมลาร์ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และ Acetate buffer ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ พีเอช 4.5 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร วัดอัตราการเพิ่มขึ้นของปฏิกิริยาจากการเพิ่มของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร แล้วคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์จากค่า Molar absorption

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

coefficient ของ Veratrylic alcohol ซึ่งเท่ากับ 9,300 โมลต่อลิตรต่อเซนติเมตร โดย 1 หน่วยของเอนไซม์ คือ ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถออกซิไดซ์ veratrylic alcohol 1.0 ไมโครโมล ให้ได้เป็น Veratraldehyde ในเวลา 1 นาที

5.3 การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของเม็ดราและน้ำสีที่ผ่านการกำจัดสีย้อม

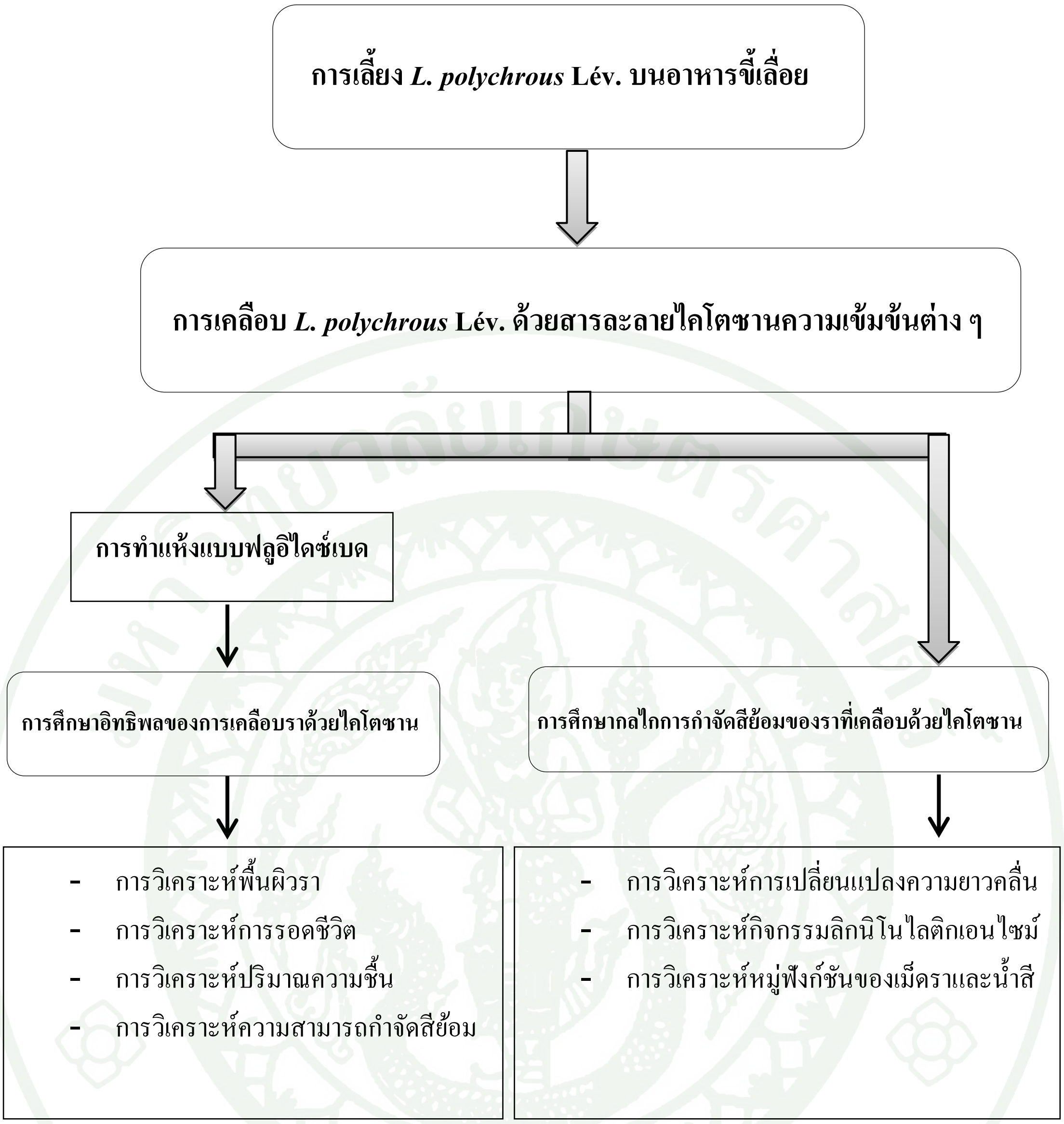
เตรียมตัวอย่างเม็ดราที่เคลือบด้วยไคโตซานและไม่ผ่านการทำแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบดที่เวลาการกำจัดสีย้อมชั่วโมงที่ 0, 6 และ 48 และน้ำสีที่เวลาการกำจัดสีย้อมชั่วโมงที่ 0 และ 48 โดยการทำแห้งด้วยวิธีแช่เยือกแข็ง ที่อุณหภูมิ -45 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง ซึ่งทำแห้งภายใต้สภาวะสูญญากาศซึ่งมีความดัน 0.055 mbar จนกระทั่งตัวอย่างแห้งและมีอุณหภูมิ 23 ± 2 องศาเซลเซียส จากนั้นบดตัวอย่างที่ผ่านการทำแห้งให้ละเอียด และนำผงตัวอย่างไปบดผสมกับผง KBr ในอัตราส่วน 1:10 ด้วยโกร่งบดสาร จากนั้นนำผงดังกล่าวไปอัดเป็นแผ่นก่อนนำเข้าเครื่องเครื่องฟูเรียร์ทรานฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR) โดยวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันที่ช่วง 4,000 – 400 cm^{-1}

6. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design) ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ สำหรับการทดลองวิเคราะห์ปริมาณความชื้น การวิเคราะห์ความสามารถในการกำจัดสีย้อม และการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ลิกนิโนไลติกที่ผลิตโดย *L. polychrous* Lév. ที่เคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ โดยวิเคราะห์ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานและแสดงผลการทดลองด้วยค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานด้วยโปรแกรม Microsoft excel 2007

จากวิธีการทดลองทั้งหมดข้างต้นสามารถสรุปเป็นแผนผังการดำเนินการทดลองดังภาพที่ 5

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 5 แผนผังการดำเนินการทดลองการกำจัดสีย้อมรีแอคทีฟผสมโดย *L. polychrous* Lév. ที่เคลือบด้วยไคโตซานและผ่านการทำแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลและวิจารณ์

1. การศึกษาอิทธิพลของการเคลือบ *L. polychrous* Lév. ด้วยไคโตซาน และการทำแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบดต่อคุณสมบัติทางกายภาพของเม็ดราและความสามารถการกำจัดสีย้อมรีแอคทีฟผสม

1.1 การวิเคราะห์พื้นผิว *L. polychrous* Lév. ที่เคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ ก่อนและหลังการทำแห้งด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

การกำจัดสีย้อมโดย *L. polychrous* Lév. มีข้อด้อยเรื่องระยะเวลาการกำจัดสีย้อมนาน (Robinson *et al*., 2001; Anjaneyulu *et al*., 2005) งานวิจัยนี้จึงใช้ไคโตซานซึ่งมีคุณสมบัติเด่นด้านการดูดซับสีย้อมเคลือบบนเม็ดราเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดสีย้อม อย่างไรก็ตามการเกาะติดของไคโตซานบนเม็ดราถือเป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการกำจัดสีย้อม ดังนั้นการทดลองนี้จึงวิเคราะห์พื้นผิวของราที่เคลือบด้วยไคโตซานทั้งก่อนและหลังการทำแห้ง เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของระดับความเข้มข้นของไคโตซานต่อลักษณะพื้นผิวของเม็ดราด้วยกล้อง SEM โดยตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์คือราที่เจริญบนขี้เลื้อยเป็นเวลา 7 วัน เคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้น 0.1, 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร และทำการทดลองเปรียบเทียบกับเม็ดราที่ไม่เคลือบด้วยไคโตซาน

เมื่อเปรียบเทียบลักษณะภายนอกของเม็ดราที่ไม่เคลือบและเคลือบด้วยไคโตซานดังภาพที่ 6 พบว่าลักษณะของเม็ดราที่ไม่เคลือบด้วยไคโตซานก่อนการทำแห้งเป็นรูปทรงของชิ้นขี้เลื้อยและสามารถเห็นรูซึ่งเป็นปลายเปิดของท่อลำเลียงของขี้เลื้อย ดังภาพที่ 6A สำหรับเม็ดราที่เคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า เม็ดราที่เคลือบด้วยไคซานความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 6B) มีลักษณะพื้นผิวที่ใกล้เคียงกับพื้นผิวของราที่ไม่เคลือบด้วยไคโตซานแต่ไม่สามารถเห็นรูของท่อลำเลียงได้ชัดเจนเนื่องจากมีชั้นของไคโตซานปกคลุมอยู่ และเมื่อพิจารณาพื้นผิวเม็ดราที่เคลือบด้วยไคโตซานที่ความเข้มข้นสูงขึ้นพบว่า ลักษณะพื้นผิวของเม็ดราจะเรียบและไม่เห็นรูพรุนเพราะมีไคโตซานปกคลุมสม่ำเสมอมากขึ้น ดังภาพที่ 6C และ 6D ซึ่งเป็นเม็ดราที่เคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้ยังได้ศึกษาลักษณะพื้นผิวภายนอกของเม็ดราที่เคลือบและไม่เคลือบด้วยไคโตซานหลังการทำแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบด พบว่า รูปทรงและพื้นผิวของเม็ดรามีลักษณะคล้ายคลึงกับเม็ดราที่ไม่ผ่านการทำแห้ง (ข้อมูลไม่แสดง)

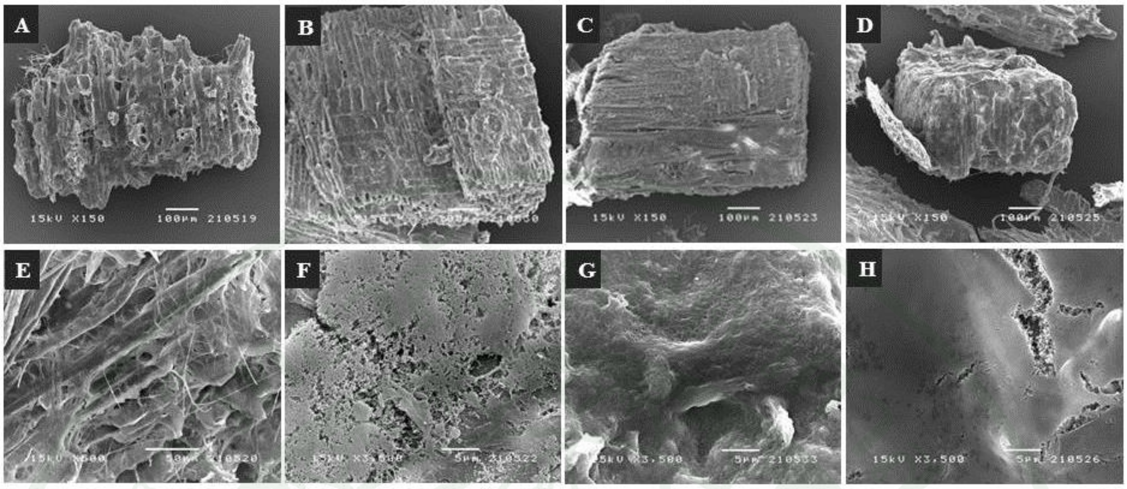
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เมื่อพิจารณาพื้นผิวเม็ดราที่กำลังขยายสูงขึ้น พบว่า พื้นผิวของเม็ดราที่ไม่เคลือบด้วยไคโตซาน สามารถเห็นเส้นใยราปกคลุมที่พื้นผิวด้านนอกและแทรกอยู่ตามช่องรูพรุนของขี้เลื่อยอย่างชัดเจน แสดงดังภาพที่ 6E ซึ่งเป็นภาพที่มีกำลังขยาย 500x ทั้งนี้ พบว่า การใช้กำลังขยาย 3500x กับเม็ดราที่ไม่เคลือบด้วยไคโตซานทำให้ไม่สามารถเห็นภาพรวมภายนอกของเม็ดราได้แต่สามารถเห็นเฉพาะเส้นใยราเท่านั้น (ข้อมูลไม่แสดง) สำหรับเม็ดราที่เคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 6F) พบว่า พื้นผิวของเม็ดรามีชั้นไคโตซานปกคลุมอยู่บางส่วนจึงทำให้พื้นผิวมีลักษณะขรุขระเป็นรูพรุน แต่ไม่สามารถสังเกตเห็นเส้นใยราที่เจริญอยู่บนขี้เลื่อย ส่วนเม็ดราที่เคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 6G และ 6H ตามลำดับ) พบว่าพื้นผิวของเม็ดรามีไคโตซานเคลือบติดทั่วพื้นผิวมากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของไคโตซานสูงขึ้น ทำให้พื้นผิวเม็ดรามีลักษณะเรียบและไม่พบลักษณะของรูพรุนบนพื้นผิว นอกจากนี้พบว่าพื้นผิวของเม็ดราที่เคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 6H) สามารถสังเกตเห็นชั้นของไคโตซานที่เคลือบบนเม็ดราจากรอยแตกที่เกิดจากการเตรียมตัวอย่าง จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของไคโตซานมีอิทธิพลต่อการเกาะติดบนเม็ดรา กล่าวคือ เมื่อความเข้มข้นของไคโตซานสูงขึ้นทำให้การเคลือบราเกิดขึ้นอย่างทั่วถึงมากขึ้น โดยการเกาะติดของไคโตซานกับเซลล์ราอาจเกิดได้จากแรงไฟฟ้าสถิตย์ (Electrostatic force) เนื่องจากผนังเซลล์รามีองค์ประกอบหลายชนิด เช่น โปรตีน พอลิแซคคาร์ไรด์ ไขมัน และเมลานิน เป็นต้น จึงทำให้ที่ผนังเซลล์รามีหมู่ฟังก์ชัน (Functional group) เช่น คาร์บอกซิล ไฮดรอกซิล ฟอสเฟต และ ซัลฟ์ไฮดริล (Gadd, 1993; Bayramoglu *et al.*, 2006) ซึ่งหมู่ฟังก์ชันเหล่านี้แสดงประจุเป็นลบได้ (Say *et al.*, 2001) ทำให้ไคโตซานที่ละลายอยู่ในสารละลายกรดพีเอช 6 ซึ่งต่ำกว่า pKa ของไคโตซาน ที่ประมาณ 6.3-6.5 (Strand *et al.*, 2001; Pepic *et al.*, 2008) แสดงประจุเป็นบวกสามารถเกาะติดกับราบริเวณตำแหน่งที่มีประจุเป็นลบดังกล่าวได้ (Gadd, 1993) อย่างไรก็ตามนอกจากไคโตซานสามารถเกาะติดบนผนังเซลล์ราแล้ว ไคโตซานยังสามารถเกาะติดกับขี้เลื่อยซึ่งเป็นตัวยึดของราด้วยการจับกับหมู่ฟังก์ชันต่าง ๆ ของไม้ด้วยแรงแวนเดอร์วาลส์และพันธะไฮโดรเจน (Strnad *et al.*, 2010) นอกจากนี้เมื่อพิจารณาขนาดของเม็ดรา อาจกล่าวได้ว่า เม็ดรามีขนาดสม่ำเสมอเนื่องจากมีการคัดขนาดขี้เลื่อยอยู่ในช่วง 0.250 – 0.425 มิลลิเมตร ก่อนการนำไปใช้เลี้ยงราและระหว่างการเลี้ยงราได้ทำการคลุกผสมขี้เลื่อยและราเพื่อให้รามีการเจริญและกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ ทั้งนี้เมื่อเคลือบเม็ดราด้วยไคโตซานส่งผลให้เม็ดรามีขนาดใหญ่ขึ้นโดยมีขนาดประมาณ 0.450 – 0.600 มิลลิเมตร

จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าไคโตซานเป็นสารที่สามารถเกาะติดบนเม็ดราได้ โดยที่ความเข้มข้นสูงขึ้นทำให้การเคลือบติดบนเม็ดรามากขึ้น อย่างไรก็ตามมีรายงานวิจัยที่พบว่าไคโตซานมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของรา (Allan and Hadwiger, 1979; Ghaouth *et al.*,

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1992; Kong *et al*., 2010) การทดลองต่อไปจึงทดสอบความสามารถการในเจริญของราที่เคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ



ภาพที่ 6 พื้นผิวภายนอกของเม็ดรา *L. polychrous* Lév. ที่เคลือบด้วยไคโตซานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ก่อนการทำแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบด (A) ราที่ไม่เคลือบด้วยไคโตซาน (150x); (B) ราที่เคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้น 0.1 (150x); (C) 0.5 (150x); (D) 1.0 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร (150x); (E) พื้นผิวเม็ดราที่ไม่เคลือบด้วยไคโตซาน (500x); (F) พื้นผิวเม็ดราที่เคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้น 0.1 (3500x); (G) 0.5 (3500x); (H) 1.0 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร (3500x)

1.2 การวิเคราะห์การรอดชีวิตและปริมาณความชื้นของราที่เคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ ก่อนและหลังการทำแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบด

แม้ว่าไคโตซานมีความสามารถในการดูดซับสีย้อมรีแอคทีฟสูง อย่างไรก็ตามมีงานวิจัยจำนวนมากที่พบว่าไคโตซานมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของรา การทดลองนี้จึงวิเคราะห์การรอดชีวิตของ *L. polychrous* Lév. ที่เคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ ทั้งก่อนและหลังการทำแห้ง โดยการดัดแปลงวิธีวิเคราะห์ของ Gassara *et al.* (2010) ซึ่งทำให้สามารถวิเคราะห์การรอดชีวิตของ *L. polychrous* Lév. ได้ แสดงผลได้ง่ายและรวดเร็ว อย่างไรก็ตามไม่สามารถระบุปริมาณการรอดชีวิตโดยละเอียดเนื่องจาก *L. polychrous* Lév. ที่ใช้ในงานวิจัยนี้อยู่ในช่วงอายุที่ยังไม่สามารถสร้างสปอร์ ผลการทดลองพบว่า ราที่เคลือบด้วยไคโตซานทุกความเข้มข้นสามารถเจริญได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ทั้งราที่ผ่านการทำแห้งและไม่ผ่านการทำแห้ง อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบความหนาแน่นของเส้นใยราที่เคลือบและไม่เคลือบด้วยไคโตซานก่อนการทำแห้ง พบว่า เส้นใยของราที่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

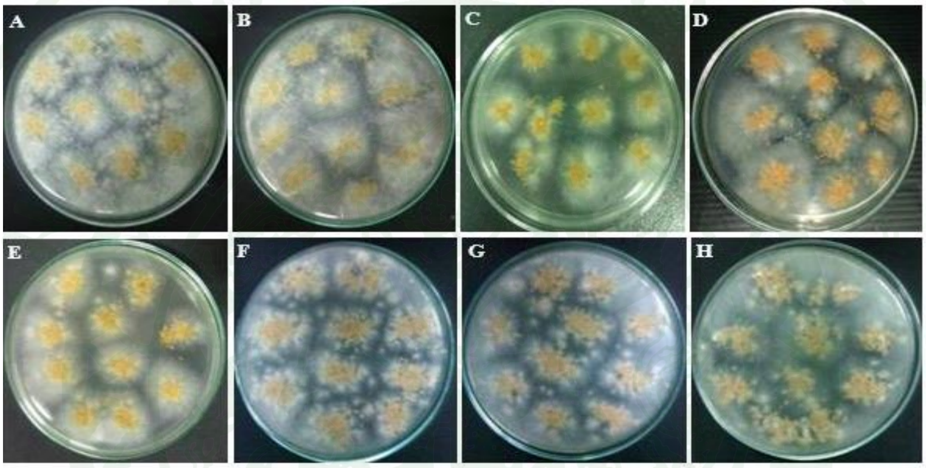
ไม่เคลือบด้วยไคโตซาน (ภาพที่ 7A) มีความหนาแน่นมากกว่าเส้นใยราที่เคลือบด้วยไคโตซาน และเมื่อพิจารณาเส้นใยราที่เคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า ราที่เคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 7B) มีความหนาแน่นของเส้นใยมากที่สุดโดยเส้นใยมีความหนาแน่นใกล้เคียงกับราที่ไม่เคลือบด้วยไคโตซาน รองลงมา คือ เส้นใยราที่เคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 7C และ 7D ตามลำดับ) จากผลการทดลองดังกล่าวชี้ให้เห็นว่า สารละลายไคโตซานส่งผลต่อลักษณะการเจริญของเส้นใย *L. polychrous* Lév. ทำให้ความหนาแน่นของเส้นใยราลดลง เนื่องจากสารละลายไคโตซานที่เกาะบนผนังเซลล์สามารถรบกวนการซึมผ่านของแก๊ซและสารต่าง ๆ ที่ผนังเซลล์ ซึ่งส่งผลต่อการเจริญของเส้นใยรา (Zakrzewska *et al*., 2007; Singh *et al*., 2008; Palma-Guerrero *et al*., 2010) อย่างไรก็ตาม Allan and Hadwiger (1979) และ Singh *et al*. (2008) พบว่า ราแต่ละชนิดมีความสามารถในการทนฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญที่เกิดจากไคโตซานได้แตกต่างกันทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของไคโตซานอีกด้วย จึงอาจเป็นไปได้ว่า *L. polychrous* Lév. สามารถทนฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของไคโตซานเนื่องจากยังคงความสามารถในการเจริญและสร้างเส้นใยบนอาหารแข็ง PDA

อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาความหนาแน่นของเส้นใยราโดยเปรียบเทียบราก่อนการทำแห้งและหลังการทำแห้ง พบว่า เส้นใยราหลังการทำแห้งมีความหนาแน่นน้อยกว่าเส้นใยของราก่อนการทำแห้ง โดยเส้นใยราที่ไม่เคลือบด้วยไคโตซานหลังการทำแห้ง (ภาพที่ 7E) มีความหนาแน่นมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับเส้นใยราที่เคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ผ่านการทำแห้ง กล่าวคือ เส้นใยราที่เคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 7F) มีความหนาแน่นใกล้เคียงกับเส้นใยของราที่ไม่เคลือบไคโตซาน และความหนาแน่นของเส้นใยราเริ่มน้อยลงเมื่อความเข้มข้นของไคโตซานสูงขึ้น (ภาพที่ 7G และ 7H) อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาภาพที่ 7 จะเห็นว่าเส้นใยราหลังการทำแห้งมีการกระจายตัว ออกจากตำแหน่งที่วางเชื้อเป็นจุดเล็ก ๆ ซึ่งต่างกับราก่อนการทำแห้ง ลักษณะดังกล่าวเกิดจากตัวอย่างหลังการทำแห้งมีความชื้นต่ำ ดังนั้นในระหว่างการวางตัวอย่างจึงเกิดการกระจายตัวขึ้น ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่า นอกจากอิทธิพลของไคโตซานที่ส่งผลต่อการเจริญของราแล้วยังมีอิทธิผลของการทำแห้งเข้ามาเกี่ยวข้องด้วย โดยปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อการเจริญของเส้นใยราที่มาจากกระบวนการทำแห้ง คือ ความร้อน ซึ่งการใช้ลมร้อนไหลผ่านเม็ดราเพื่อกำจัดน้ำอิสระอาจส่งผลให้ราแห้งอยู่ในสภาพไม่สมบูรณ์ เนื่องจากน้ำเป็นตัวกลางในการพาความร้อนเข้าสู่เม็ดรา (Chitprasert *et al*., 2011) จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้ความหนาแน่นของเส้นใยราระหว่างก่อนและหลังทำแห้งต่างกัน โดยความชื้นเริ่มต้นของราก่อนทำแห้งคือ ประมาณ 62.5 – 63.8 เปอร์เซ็นต์ และหลังจากทำแห้งราที่ไม่เคลือบด้วยไคโตซานมีความชื้นประมาณ 6.8 เปอร์เซ็นต์ ส่วนราที่เคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้น 0.1, 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ มีความชื้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประมาณ 12.6, 10.8 และ 9.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากผลการทดลองดังกล่าวชี้ให้เห็นว่า ความหนาแน่นของเส้นใยราที่ต่างกันเกิดจากอิทธิพลร่วมของไคโตซานและความร้อนจากการทำแห้ง

จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าราที่เคลือบด้วยไคโตซานและผ่านการทำแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบดยังคงรอดชีวิตเมื่อทดสอบการรอดชีวิตของราด้วยวิธีการซึ่งดัดแปลงจาก Gassara *et al.* (2010) จึงทำให้เม็ดราที่เคลือบด้วยไคโตซานและผ่านการทำแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบดมีความเหมาะสมสำหรับนำไปใช้บำบัดน้ำที่ปนเปื้อนสีย้อม ดังนั้นการทดลองในลำดับต่อไปจึงศึกษาความสามารถในการกำจัดสีย้อมของราเคลือบด้วยไคโตซานที่ผ่านการทำแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบด



ภาพที่ 7 จำนวนจุดของการเจริญของเส้นใยรา *L. polychrous* Lév. ที่ไม่เคลือบและเคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ไม่ผ่านการทำแห้ง บนอาหารแข็ง PDA (A) ราที่ไม่เคลือบด้วยไคโตซาน; (B) ราที่เคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้น 0.1;(C) 0.5; (D) 1.0 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร; และราที่ผ่านการทำแห้ง (E) ราที่ไม่เคลือบด้วยไคโตซาน; (F) ราที่เคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้น 0.1; (G) 0.5 เปอร์เซ็นต์; (H) 1.0 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร

1.3 การวิเคราะห์ความสามารถการกำจัดสีย้อมรีแอคทีฟผสมของ *L. polychrous* Lév. ที่เคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ ทั้งก่อนและหลังการทำแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบด

เนื่องด้วยความเข้มข้นของไคโตซานที่เคลือบบนเม็ดราส่งผลต่อประสิทธิภาพการกำจัดสีย้อม การทดลองนี้จึงทดสอบความสามารถการกำจัดสีย้อมรีแอคทีฟผสมของเม็ดราที่เคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ ทั้งก่อนและหลังการทำแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบด เพื่อศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของไคโตซานที่เคลือบบนเม็ดราในการเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดสีย้อม โดยการถ่าย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เม็ดราที่เคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้น 0.1, 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร ทั้งก่อนและหลังการทำแห้ง ลงในน้ำสีย้อมรีแอคทีฟผสมและติดตามการลดลงของสีย้อมที่เวลาต่าง ๆ

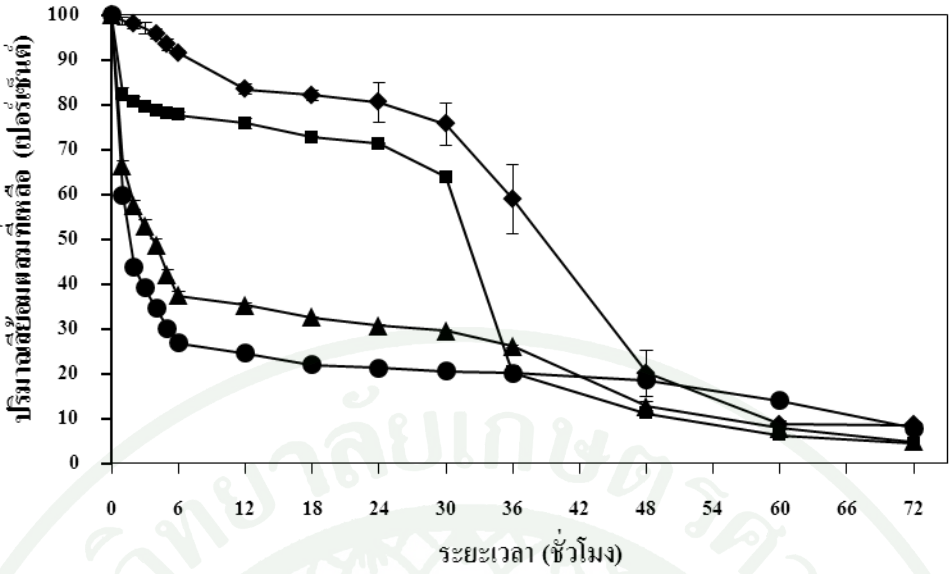
จากผลการทดลองการกำจัดสีย้อมโดยราที่เคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้น 0.1, 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับราที่ไม่เคลือบด้วยไคโตซานและไม่ผ่านการทำแห้ง (ภาพที่ 8) พบว่าสีย้อมลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงเวลาการกำจัดสีย้อมชั่วโมงที่ 0 – 6 โดยราที่เคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ สามารถกำจัดสีย้อมได้มากที่สุดประมาณ 75 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ ราที่เคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้น 0.5 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งกำจัดสีย้อมได้ 63 และ 22 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ขณะที่ราที่ไม่เคลือบด้วยไคโตซานสามารถกำจัดสีย้อมได้เพียง 10 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามทั้งราที่เคลือบและไม่เคลือบด้วยไคโตซานสามารถกำจัดสีย้อมทั้งหมดได้ 91.4 – 95.5 เปอร์เซ็นต์ ที่ระยะเวลาการกำจัดสีย้อม 72 ชั่วโมง จากผลการทดองดังกล่าวอาจเป็นไปได้ว่าการลดลงของสีย้อมในช่วง 6 ชั่วโมงแรก เป็นผลมาจากกลไกการดูดซับสอดคล้องกับงานวิจัยของ Knapp *et al*. 1995; Miranda *et al*. 1996; Fu and Viraraghavan (2001); Levin *et al.* (2004) พบว่า ราสามารถดูดซับสีย้อมได้ประมาณ 10 – 25 เปอร์เซ็นต์ และเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงแรกของการกำจัดสีย้อมโดยความสามารถในการดูดซับขึ้นอยู่กับชนิดของสีย้อมและชนิดของรา อย่างไรก็ตามการเคลือบไคโตซานบนเม็ดราอาจเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดการดูดซับสีย้อมได้มากขึ้น โดยสังเกตได้จากปริมาณสีย้อมลดลงมากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของไคโตซานเพิ่มขึ้น

เมื่อพิจารณาผลการกำจัดสีย้อมโดยราเคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้น 0.1, 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับราที่ไม่เคลือบด้วยไคโตซาน และผ่านการทำแห้ง (ภาพที่ 9) พบว่า สีย้อมลดลงอย่างรวดเร็วที่เวลาการกำจัดสีย้อมชั่วโมงที่ 0 – 12 โดยราที่เคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ สามารถกำจัดสีย้อมได้มากที่สุดประมาณ 56 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ ราที่เคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้น 0.5 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งกำจัดสีย้อมได้ 53 และ 32 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนราที่ไม่เคลือบด้วยไคโตซานสามารถกำจัดสีย้อมได้เพียง 9 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้พบว่า ราที่เคลือบด้วยไคโตซาน สามารถกำจัดสีย้อมได้ 91.6 – 94.3 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้เวลาในกำจัดสีย้อมที่สั้นกว่า คือ 72 ชั่วโมง ขณะที่ราที่ไม่เคลือบไคโตซานใช้เวลากำจัดสีย้อม 144 ชั่วโมง จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า แนวโน้มการลดลงของสีย้อมมีลักษณะคล้ายกับสภาวะก่อนการทำแห้งแต่ราที่ผ่านการทำแห้งใช้เวลาการกำจัดสีย้อมที่นานกว่าโดยราที่เคลือบด้วยไคโตซานสามารถกำจัดสีย้อมได้เร็วกว่า ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากกลไกการดูดซับสีย้อมเช่นเดียวกัน ซึ่งการเคลือบไคโตซานบนเม็ดราสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการดูดซับสีย้อมและทำให้สีย้อมสะสมบริเวณพื้นผิวเม็ดรามากขึ้นส่งผลให้ราสามารถย่อยสลายสีย้อมได้เร็วขึ้น

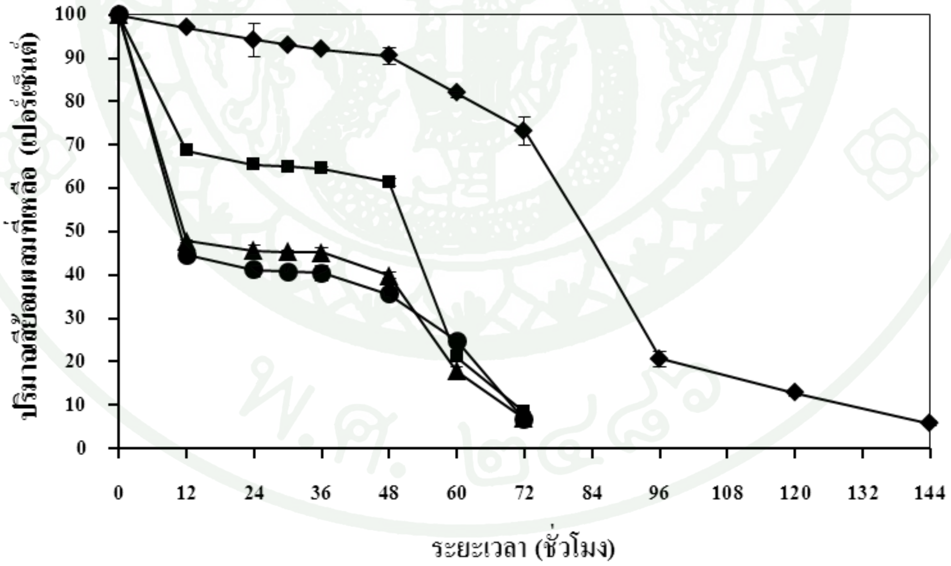
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบปริมาณสีย้อมที่ลดลงในช่วงแรกของการกำจัดสีย้อมโดยราที่เคลือบด้วยไคโตซานที่ผ่านและไม่ผ่านการทำแห้ง เห็นได้ว่า ราที่ผ่านการทำแห้งทำให้สีย้อมลดลงน้อยกว่าและใช้ระยะเวลาที่นานกว่าราที่ไม่ผ่านการทำแห้งซึ่งอาจเป็นผลมาจากไคโตซานอยู่ในสถานะของแข็งส่งผลต่อประจุบนเม็ดราที่เคลือบด้วยไคโตซานมีปริมาณลดลงจึงทำให้ความสามารถในการดูดซับสีย้อมลดลง นอกจากนี้เมื่อพิจารณาการลดลงของสีย้อมโดยราที่ไม่เคลือบด้วยไคโตซานที่ผ่านและไม่การผ่านการทำแห้ง พบว่า ราที่ผ่านการทำแห้งใช้เวลาในการกำจัดสีย้อมนานกว่าราที่ไม่ผ่านการทำแห้ง จากผลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่า การทำแห้งอาจส่งผลให้เส้นใยราไม่สมบูรณ์ซึ่งเกิดจากการสัมผัสกับความร้อนจากการทำแห้งและทำให้ประสิทธิภาพการกำจัดสีย้อมด้อยลง อย่างไรก็ตามท้ายที่สุดราที่ผ่านการทำแห้งทั้งที่ไม่เคลือบและเคลือบด้วยไคโตซานยังคงสามารถกำจัดสีย้อมได้โดยราที่เคลือบด้วยไคโตซานและผ่านการทำแห้งสามารถกำจัดสีย้อมโดยใช้ระยะเวลารวมในการกำจัดสีย้อมใกล้เคียงกับราที่เคลือบด้วยไคโตซานที่ไม่ผ่านการทำแห้ง ซึ่งชี้ให้เห็นว่าการเคลือบไคโตซานบนเม็ดราสามารถเพิ่มความสามารถการดูดซับสีย้อมบนราทำให้การกำจัดสีย้อมมีประสิทธิภาพมากขึ้น อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาลักษณะและปริมาณของเม็ดราหลังจากการกำจัดสีย้อม พบว่า เม็ดราที่เคลือบด้วยไคโตซานมีสีย้อมเกาะติดมากกว่าเม็ดราที่ไม่ผ่านการเคลือบซึ่งอาจเป็นผลมาจากความสามารถในการดูดซับสีย้อมของไคโตซาน ประกอบกับเม็ดราที่เคลือบด้วยไคโตซานมีขนาดใหญ่ขึ้นเมื่อความเข้มข้นของไคโตซานเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 10) แต่มีจำนวนเม็ดราน้อยกว่าราที่ไม่ได้เคลือบด้วยไคโตซาน ซึ่งลักษณะของเม็ดราที่ต่างกันส่งผลต่อความสามารถในการกำจัดสีย้อมของราเนื่องจากไม่สามารถควบคุมขนาดของเม็ดราที่เจริญในระหว่างการกำจัดสีย้อมแม้ว่าสภาวะที่ใช้ในการกำจัดสีย้อมเหมือนกัน การทดลองลำดับต่อไปจึงวิเคราะห์ลักษณะพื้นผิวเม็ดราที่เคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ผ่านการกำจัดสีย้อม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

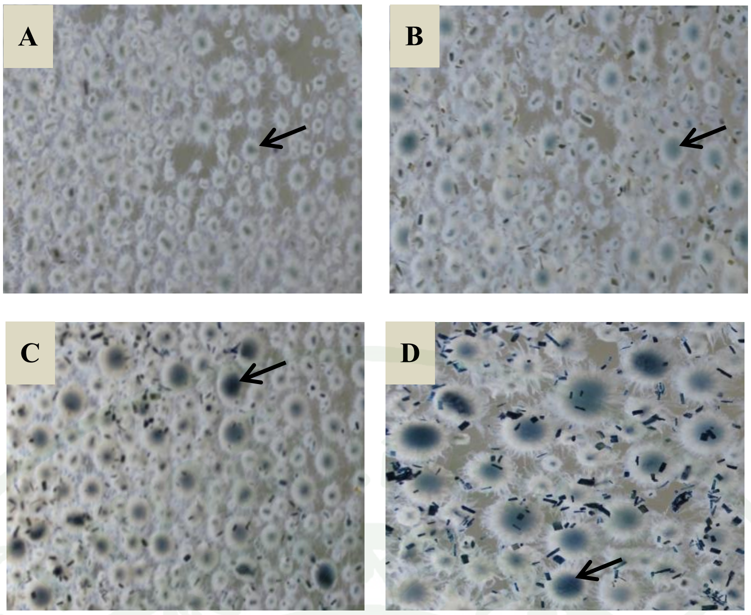


ภาพที่ 8 การกำจัดสีย้อมรีแอคทีฟผสมโดย *L. polychrous* Lév. ที่เคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ และไม่ผ่านการทำแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบด (-◆-) ราที่ไม่เคลือบด้วยไคโตซาน (-■-) ราที่เคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้น 0.1; (-▲-) 0.5; (-●-) 1.0 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร



ภาพที่ 9 การกำจัดสีย้อมรีแอคทีฟผสมโดย *L. polychrous* Lév. ที่เคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ และผ่านการทำแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบด (-◆-) ราที่ไม่เคลือบด้วยไคโตซาน (-■-) ราที่เคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้น 0.1; (-▲-) 0.5; (-●-) 1.0 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 10 เม็ดรา *L. polychrous* Lév. ที่เคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ และไม่ผ่านการทำแห้งที่เวลาการกำจัดสีย้อมชั่วโมงที่ 72 (A) ราที่ไม่เคลือบด้วยไคโตซาน; (B) ราที่เคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้น 0.1 ; (C) 0.5; (D) 1.0 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร ลูกศรแสดงบริเวณที่มีสีย้อมติดบนเม็ดรา

1.4 การวิเคราะห์พื้นผิวเม็ดราที่เคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ และผ่านการกำจัดสีย้อมรีแอคทีฟผสมด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

การเคลือบไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ บนเม็ดราส่งผลต่อปริมาณและลักษณะของเม็ดราในระหว่างการกำจัดสีย้อม การทดลองนี้จึงศึกษาอิทธิพลของระดับความเข้มข้นไคโตซานต่อลักษณะปรากฏของเม็ดราด้วย SEM โดยวิเคราะห์พื้นผิวของเม็ดราที่เคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ และไม่ผ่านการทำแห้ง เปรียบเทียบกับเม็ดราที่ไม่เคลือบด้วยไคโตซาน และไม่ผ่านการทำแห้ง ที่เวลาการกำจัดสีย้อมชั่วโมงที่ 72 ซึ่งเป็นเวลาที่สิ้นสุดการกำจัดสีย้อม

จากผลการศึกษาลักษณะพื้นผิวภายนอกของเม็ดราที่ไม่เคลือบและเคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า เม็ดราที่ไม่เคลือบด้วยไคโตซานมีลักษณะกลมและการเจริญของเส้นใยราหนาแน่นสม่ำเสมอทั่วทั้งเม็ด (ภาพที่ 11A) เมื่อเปรียบเทียบกับเม็ดราที่เคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 11B) ซึ่งมีลักษณะเม็ดค่อนข้างกลม แต่การเจริญของเส้นใยบางบริเวณมีความหนาแน่นไม่เท่ากัน ขณะที่เส้นใยราที่เคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ มีเส้นใยบางส่วนเจริญแยกออกจากเม็ดราทำให้เม็ดรามีความเป็นทรงกลมน้อยลง เมื่อ

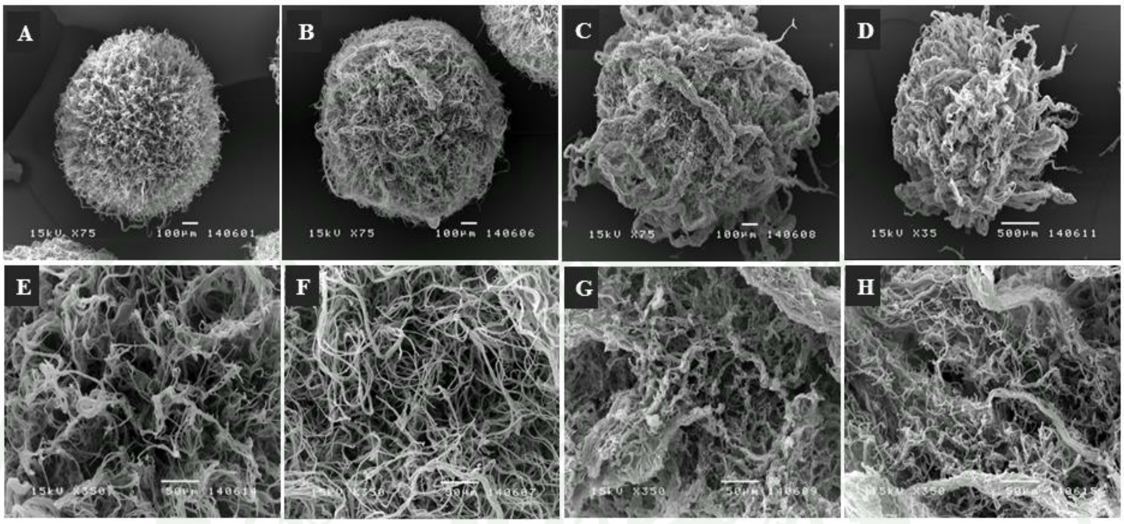
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ความเข้มข้นของไคโตซานเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 11C และ 11D ตามลำดับ) นอกจากนี้เมื่อพิจารณาลักษณะพื้นผิวเม็ดราที่กำลังขยาย 350 เท่า พบว่า เส้นใยราที่ไม่เคลือบด้วยไคโตซาน (ภาพที่ 11E) มีลักษณะการกระจายตัวของเส้นใยที่สม่ำเสมอและเส้นใยเกาะกันอย่างหลวม ๆ สำหรับการเจริญของเส้นใยราที่เคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้น 0.1, 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ พบว่า บางบริเวณราเจริญซ้อนทับกันมากกว่าปกติทำให้เส้นใยแต่ละบริเวณมีความหนาแน่นไม่เท่ากัน นอกจากนี้เส้นใยรายังมีลักษณะบิดงอและจับกันเป็นกลุ่มซึ่งลักษณะดังกล่าวปรากฏมากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของไคโตซานสูงขึ้น (ภาพที่ 11F, 11G และ 11H ตามลำดับ) จากลักษณะการเจริญของเส้นใยราที่ซ้อนทับกันอาจเป็นผลมาจากการเคลือบติดของไคโตซานบนเม็ดรามีความไม่สม่ำเสมอหรือไคโตซานที่เกาะติดบนเม็ดราบางส่วนอาจละลายออกมาปนในน้ำสีย้อมบางส่วนเนื่องจากน้ำสีย้อมมีค่าพีเอชต่ำกว่า pKa ของไคโตซาน ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่าราเจริญหนีออกจากบริเวณที่มีไคโตซานเคลือบติดอยู่จึงทำให้การเจริญของเส้นใยไม่สม่ำเสมอและไม่เป็นระนาบเดียวกันซึ่งจากลักษณะการเจริญของเส้นใยราที่มีการกระจายตัวไม่สม่ำเสมอสอดคล้องกับงานวิจัยของ Roller and Covill (1999) ที่ศึกษาคุณสมบัติการยับยั้งการเจริญของรา (antifungal activity) ของไคโตซาน และพบว่าเส้นใยรา *Mucor racemosus* ที่เจริญบนอาหารแข็งผสมไคโตซานความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร มีลักษณะการเจริญในแนวตั้งไม่แผ่ขยายเส้นใยตามแนวระนาบรัศมีเมื่อเปรียบเทียบกับลักษณะการเจริญของราบนอาหารแข็งที่ไม่ผสมไคโตซานเพื่อต้องการหลีกเลี่ยงการสัมผัสกับไคโตซาน นอกจากนี้ลักษณะเส้นใยที่บิดงอและจับกันเป็นกลุ่มอาจเป็นผลมาจากอิทธิพลของไคโตซาน นอกจากไคโตซานแล้วสีย้อมยังเป็นอีกสาเหตุที่ทำให้ลักษณะการเจริญของเส้นใยราเปลี่ยนแปลงไป สอดคล้องกับงานวิจัยของ Eichlerova *et al.* (2007) ซึ่งศึกษาอิทธิพลของสีย้อม RBBR ต่อการเจริญของเส้นใยรา *Dichomitus squalens* พบว่า สีย้อมส่งผลรบกวนการทำงานของ actin fiber ที่อยู่ในเซลล์ราทำให้ลักษณะการเจริญของเส้นใยเปลี่ยนแปลงไป ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่า ทั้งไคโตซานและสีย้อมมีอิทธิพลการเจริญของเส้นใยราและทำให้ลักษณะเส้นใยราเปลี่ยนแปลงไป โดยเมื่อความเข้มข้นของไคโตซานเพิ่มขึ้นจึงส่งผลต่อลักษณะการเจริญของเส้นใยรามากขึ้นเนื่องจากสีย้อมที่เกาะบนเม็ดรามีปริมาณมากขึ้น จากผลการวิเคราะห์พื้นผิวของเม็ดราหลังการกำจัดสีย้อมแสดงให้เห็นว่า การเคลือบไคโตซานบนเม็ดราส่งผลต่อลักษณะการเจริญของเส้นใยราแต่ราที่เคลือบด้วยไคโตซานยังคงมีความสามารถในการกำจัดสีย้อมได้เช่นเดียวกับราที่ไม่เคลือบด้วยไคโตซาน นอกจากนี้การเคลือบไคโตซานยังสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดสีย้อมด้วยการเพิ่มความสามารถในการดูดซับสีย้อมบนราในช่วงแรกของการกำจัดสีย้อม

จากการศึกษาอิทธิพลของการเคลือบ *L. polychrous* Lév. ด้วยไคโตซานและผ่านการทำแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบด พบว่า ราที่เคลือบด้วยไคโตซานและผ่านการทำแห้งสามารถกำจัดสีย้อมได้ใกล้เคียงราที่ไม่ผ่านการทำแห้ง ซึ่งชี้ให้เห็นว่า การเคลือบราด้วยไคโตซานสามารถเพิ่ม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประสิทธิภาพการกำจัดสีย้อมอย่างไรก็ตามการวิเคราะห์คุณสมบัติต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นระหว่างการกำจัดสีย้อม เช่น การเปลี่ยนแปลงความยาวคลื่นของสีย้อม การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ และการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของเม็ดราที่เวลาการกำจัดสีย้อมต่าง ๆ สามารถช่วยให้เข้าใจกลไกการกำจัดสีย้อมของราที่เคลือบด้วยไคโตซานมากขึ้นซึ่งได้ศึกษาในการทดลองลำดับต่อไป



ภาพที่ 11 พื้นผิวภายนอกของเม็ดรา *L. polychrous* Lév. ที่เคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เวลาการกำจัดสีย้อมชั่วโมงที่ 72 (A) เม็ดราที่ไม่เคลือบด้วยไคโตซาน (75x); (B) เม็ดราที่เคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้น 0.1 (75x); (C) 0.5 (75x); (D) 1.0 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร (75x); (E) เส้นใยราที่ไม่เคลือบด้วยไคโตซาน (350x); (F) เส้นใยราที่เคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้น 0.1 (350x); (G) 0.5 (350x); (H) 1.0 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร (350x)

2. การศึกษากลไกการกำจัดสีย้อมรีแอคทีฟผสมของ *L. polychrous* Lév. ที่เคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ

2.1 การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงความยาวคลื่นของสีย้อมรีแอคทีฟผสมที่เวลาการกำจัดสีย้อมต่าง ๆ

เนื่องจากความยาวคลื่นสูงสุด (λ_m) ของสีย้อมเป็นคุณสมบัติเฉพาะของสีย้อม ดังนั้นการเปลี่ยนแปลง λ_m ระหว่างกระบวนการกำจัดสีย้อมโดยราที่เคลือบด้วยไคโตซาน จึงสามารถใช้บ่งชี้ถึงกลไกการกำจัดสีย้อมจากการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของสีย้อมได้ การทดลองนี้จึงศึกษาการ

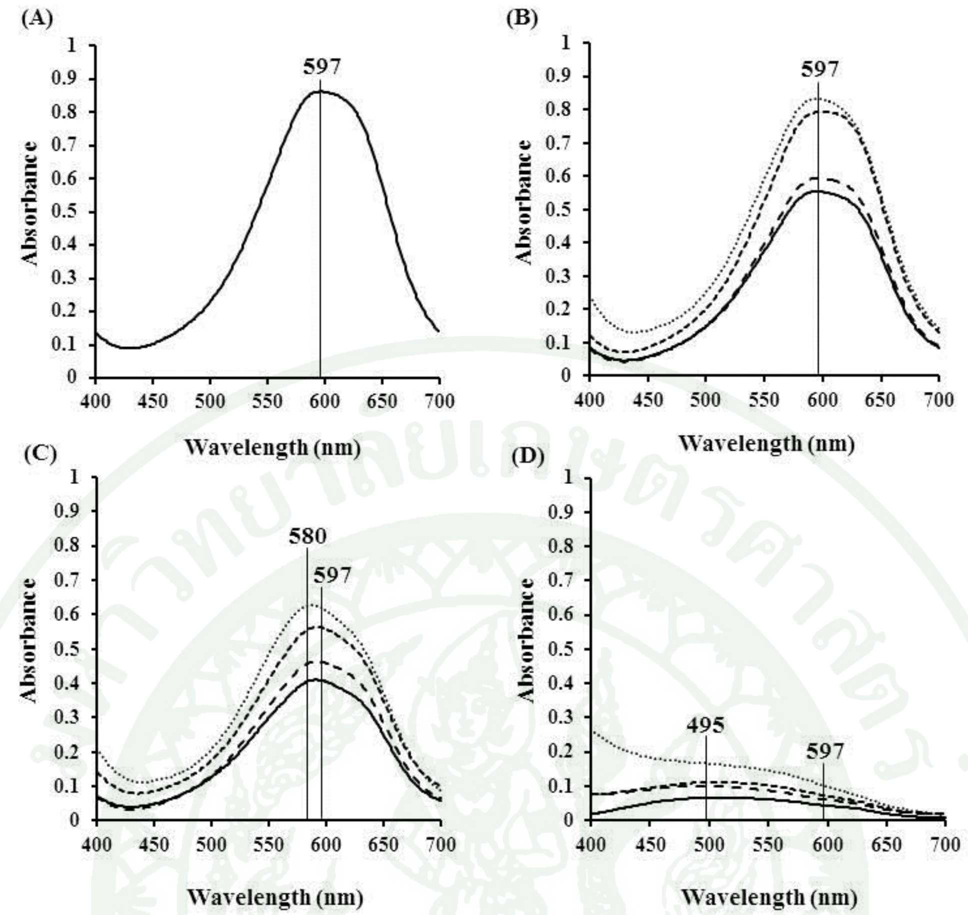
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เปลี่ยนแปลง λ_m ของสีย้อมผสมที่ผ่านการกำจัดด้วยราที่ไม่เคลือบและเคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้น 0.1, 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลาการกำจัดสีย้อมชั่วโมงที่ 0, 6, 18, 30, 36 และ 72 โดยวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 400 – 700 นาโนเมตร

จากผลการศึกษาค่า λ_m ของสีย้อมผสมที่ผ่านการกำจัดโดยราที่เคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า ที่เวลาการกำจัดสีย้อมชั่วโมงที่ 0 และ 6 (ภาพที่ 12A และ 12B ตามลำดับ) ค่า λ_m ของสีย้อมทั้งสองเวลามีค่าเท่ากับ 597 นาโนเมตร เมื่อพิจารณาที่เวลาการกำจัดสีย้อมชั่วโมงที่ 6 ค่าการดูดกลืนแสงของสีย้อมที่ผ่านการกำจัดด้วยราที่เคลือบด้วยไคโตซานมีค่าน้อยกว่าสีย้อมที่ผ่านการกำจัดด้วยราที่ไม่เคลือบด้วยไคโตซาน และค่าการดูดกลืนแสงยิ่งลดลงเมื่อความเข้มข้นของไคโตซานเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามที่เวลาการกำจัดสีย้อมชั่วโมงที่ 18 และ 30 ของทุกสภาวะการเคลือบ ค่า λ_m ยังคงเท่ากับชั่วโมงที่ 0 ส่วนค่าการดูดกลืนแสงของสีย้อมยังคงใกล้เคียงกับที่ชั่วโมงที่ 6 (ข้อมูลไม่แสดง) สอดคล้องการปริมาณสีย้อมที่เวลาการกำจัดสีย้อมชั่วโมงที่ 6 – 30 ที่มีปริมาณค่อนข้างคงที่ นอกจากนี้เมื่อพิจารณาที่ชั่วโมงการกำจัดสีย้อมที่ 36 (ภาพที่ 12C) เห็นได้ว่าค่า λ_m ของทุกสภาวะการเคลือบมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยโดยเปลี่ยนจาก 597 นาโนเมตร เป็น 580 นาโนเมตร และค่าการดูดกลืนแสงของทุกสภาวะการเคลือบมีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่อง สอดคล้องกับปริมาณสีย้อมที่มีแนวโน้มลดลงจนกระทั่งสิ้นสุดการกำจัดสีย้อมที่ชั่วโมงที่ 72 (ภาพที่ 12D) ซึ่งเป็นเวลาที่ค่า λ_m ของน้ำสีย้อมเปลี่ยนแปลงมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับชั่วโมงที่ 0 โดยเปลี่ยนจาก 597 นาโนเมตร เป็น 495 นาโนเมตร จากผลการทดลองดังกล่าวสรุปได้ว่า ที่ช่วงเวลาการกำจัดสีย้อมชั่วโมงที่ 0 – 30 ค่า λ_m ของสีย้อมไม่มีการเปลี่ยนแปลงดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าการลดลงของสีย้อมในช่วงเวลาดังกล่าวเกิดจากกลไกการดูดซับซึ่งเกิดจากหมู่ฟังก์ชันต่าง ๆ บนผนังเซลล์ราและหมู่อะมิโนของไคโตซานที่มีประจุเป็นบวกจับกับสีย้อมรีแอฟทีฟที่มีประจุเป็นลบด้วยแรงไฟฟ้าสถิตย์ (Knapp *et al.* 1995; Levin *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2011) และเมื่อพิจารณาค่า λ_m ของสีย้อมหลังชั่วโมงที่ 36 เป็นต้นไป พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจนซึ่งเป็นข้อบ่งชี้ได้ว่าที่ช่วงเวลานี้การลดลงของสีย้อมเกิดจากกลไกการย่อยสลายทางชีวภาพ อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลง λ_m ของสีย้อมที่ช่วงเวลานี้อาจมีสาเหตุมาจากหลายปัจจัย เช่น การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างสีย้อมบริเวณหมู่ที่ให้สี (Chromophore group) การเกิดสารเมตาบอไลต์ระหว่างกระบวนการกำจัดสีย้อม เป็นต้น

จากผลดังกล่าวจึงชี้ให้เห็นว่า การลดลงของสีย้อมเกิดจากการทำงานของกลไกที่ต่างกันตามช่วงเวลา ดังนั้นการทดลองต่อไปจึงเป็นการศึกษากลไกต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นระหว่างการกำจัดสีย้อมด้วยราที่เคลือบด้วยไคโตซาน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 12 การเปลี่ยนแปลงความยาวคลื่นของสีย้อมรีแอคทีฟผสมที่เวลาการกำจัดสีย้อมที่ชั่วโมงที่ (A) 0; (B) 6; (C) 36; (D) 72 โดย (······) *L. polychrous* Lév. ที่ไม่เคลือบด้วยไคโตซาน; (- - -) ที่เคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้น 0.1; (- -) 0.5; (—) 1.0 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร

2.2 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ลิกนิโนไลติกที่ผลิตโดย *L. polychrous* Lév. ที่เคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ ระหว่างการกำจัดสีย้อมรีแอคทีฟผสม

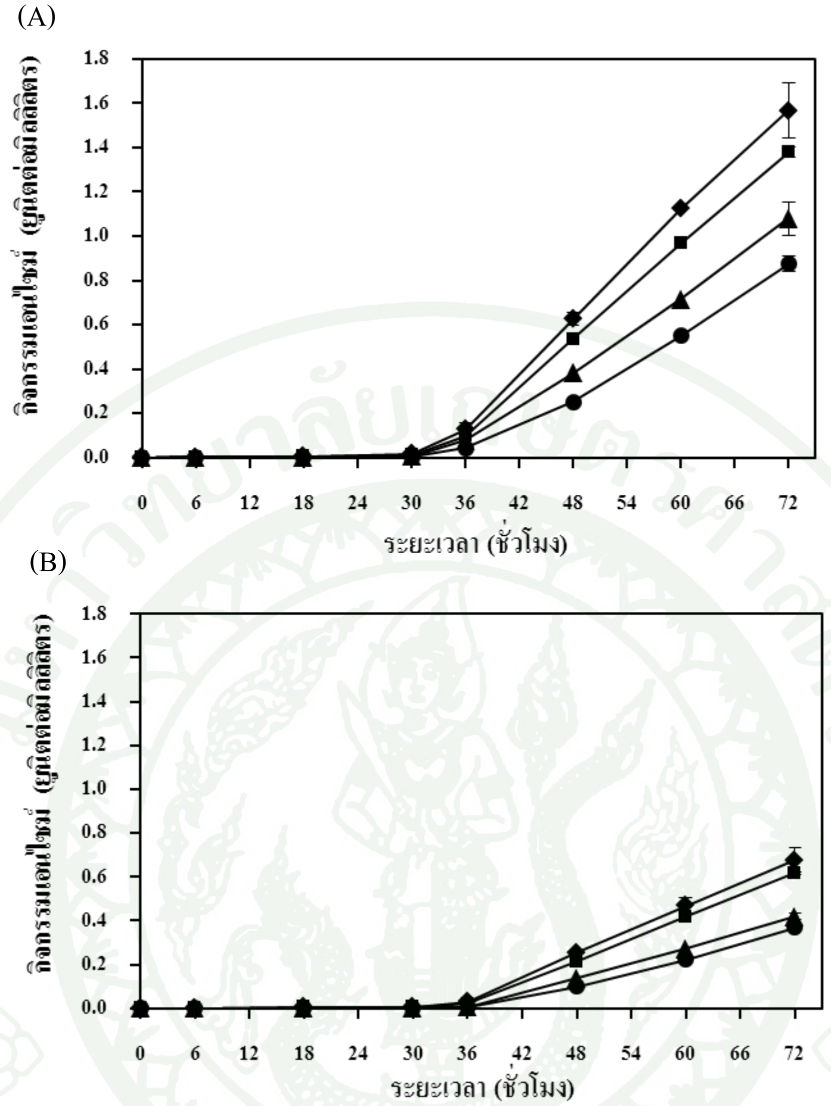
เพื่อเป็นการยืนยันว่าการลดลงของสีย้อมไม่ได้เกิดจากกลไกการดูดซับเท่านั้นแต่ยังเป็นผลมาจากกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพ ดังนั้นการทดลองนี้จึงศึกษาการสร้างกิจกรรมเอนไซม์ในกลุ่มลิกนิโนไลติก ของ *L. polychrous* Lév. จากตัวอย่างราที่เคลือบด้วยไคโตซาน 0.1, 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับราที่ไม่เคลือบด้วยไคโตซาน ซึ่งจากผลการทดลองเบื้องต้นพบว่า ราสามารถผลิตเอนไซม์แลคเคสและเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส แต่ไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส ซึ่งสอดคล้องกับงานของปัทมา (2551), Chitprasert *et al.* (2011) และ Budda *et al.* (2012)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จากผลการทดลองวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แลคเคส (ภาพที่ 13A) และแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (ภาพที่ 13B) ระหว่างกระบวนการกำจัดสีย้อมโดยราที่ไม่เคลือบและเคลือบด้วยไคโตซานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า การเพิ่มขึ้นของกิจกรรมเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด มีลักษณะเช่นเดียวกัน โดยในชั่วโมงที่ 0 – 30 กิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสมีปริมาณน้อยมาก ประมาณ 0.017 และ 0.007 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และหลังจากชั่วโมงที่ 30 เป็นต้นไป กิจกรรมของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดมีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาการกำจัดสีย้อมเพิ่มขึ้นในทุกตัวอย่างซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Radha *et al.* (2005) ที่พบว่ารา *Phanerochaete chrysosporium* เริ่มสร้างเอนไซม์ลิกนิโนไลติกหลังจากชั่วโมงที่ 24 ของการกำจัดสีย้อมและมีปริมาณสูงขึ้นเมื่อระยะเวลาการกำจัดสีย้อมเพิ่มขึ้น จากนั้นกิจกรรมของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดที่ผลิตโดยราที่ไม่เคลือบและเคลือบด้วยไคโตซานเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาการกำจัดสีย้อมนานขึ้น สอดคล้องกับปริมาณสีย้อมที่ลดลงอย่างต่อเนื่องหลังจากเวลาการกำจัดสีย้อมชั่วโมงที่ 30 และเมื่อพิจารณาที่ชั่วโมงการกำจัดสีย้อมที่ 72 ซึ่งเป็นช่วงเวลาสิ้นสุดกระบวนการกำจัดสีย้อม พบว่า ราที่ไม่เคลือบด้วยไคโตซานสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด โดยมีกิจกรรมเอนไซม์แลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสเป็น 1.57 และ 0.68 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ขณะที่ราที่เคลือบด้วยไคโตซานสามารถผลิตเอนไซม์ได้น้อยลงเมื่อความเข้มข้นของไคโตซานเพิ่มขึ้นที่ 0.1, 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นั่นคือ ที่ชั่วโมงการกำจัดสีย้อมที่ 72 มีกิจกรรมเอนไซม์แลคเคส 1.38, 1.08 และ 0.88 ยูนิตต่อมิลลิลิตรและกิจกรรมเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส 0.62, 0.42 และ 0.37 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากราปล่อยเอนไซม์ทางปลายเส้นใย (Kaushik and Malik, 2009) ดังนั้นปริมาณเซลล์ราจึงส่งผลต่อกิจกรรมเอนไซม์ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองเบื้องต้นที่ศึกษาปริมาณเซลล์ราด้วยการชั่งน้ำหนักของรา (ข้อมูลไม่แสดง) และพบว่า ปริมาณเซลล์ราที่ไม่เคลือบด้วยไคโตซานมีมากที่สุด รองลงมาเป็นราที่เคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้น 0.1, 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้จากผลการทดลองเห็นได้ว่าราสามารถผลิตเอนไซม์แลคเคสได้มากกว่าแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส สอดคล้องกับงานวิจัยของ Chitprasert *et al.* (2011) ที่ศึกษาการกำจัดสีย้อม RBBR โดย *L. polychrous* Lév. ซึ่งพบว่าราผลิตเอนไซม์แลคเคสได้มากกว่าแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส เช่นเดียวกับการศึกษาของ Budda *et al.* (2012) ที่พบว่า *L. polychrous* Lév. ผลิตเอนไซม์แลคเคสเป็นหลัก อย่างไรก็ตามยังไม่มีงานวิจัยที่พบว่า *L. polychrous* Lév. สามารถผลิตเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายไคโตซานซึ่งอาจส่งผลต่อความสามารถการดูดซับสีย้อมทำให้ประสิทธิภาพการกำจัดสีย้อมลดลง

จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า ราสามารถกำจัดสีย้อมโดยใช้กระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพ ซึ่งอาจส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสีย้อม ดังนั้นการทดลองถัดไปจึงเป็นการศึกษาการเปลี่ยนแปลงหมู่ฟังก์ชันของสีย้อมและเม็ดราระหว่างกระบวนการกำจัดสีย้อม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 13 กิจกรรมเอนไซม์ (A) แลคเคส และ (B) แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส ซึ่งผลิตโดย (-◆-) *L. polychrous* Lév.ที่ไม่เคลือบด้วยไคโตซาน (-■-) ที่เคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้น 0.1; (-▲-) 0.5 และ (-●-) 1.0 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร และไม่ผ่านการทำแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบด

2.3 การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของสีย้อมรีแอคทีฟผสมและ *L. polychrous* Lév. ที่เคลือบด้วยไคโตซานที่เวลาการกำจัดสีย้อมต่าง ๆ

การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของน้ำสีย้อมและเม็ดราที่เคลือบด้วยไคโตซานสามารถช่วยให้ทราบในเบื้องต้นถึงการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างของสีย้อมรวมถึงการเกาะติดของสีย้อมบนเม็ดราที่เคลือบด้วยไคโตซาน การทดลองนี้จึงวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของน้ำสีรีแอคทีฟผสมและเม็ดรา

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ที่เคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นสภาวะที่สามารถดูดซับสีย้อมรีแอคทีฟผสมได้มากที่สุด โดยการสังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นที่เวลาการกำจัดสีย้อมต่าง ๆ ได้แก่ เวลาการกำจัดสีย้อมชั่วโมงที่ 0, 6 และ 48 ด้วยเครื่อง FTIR เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงหมู่ฟังก์ชันของเม็ดราและน้ำสีย้อมในระหว่างกระบวนการกำจัดสีย้อม

จากการศึกษาสเปคตรัมของเม็ดราที่เคลือบด้วยไคโตซานที่ผ่านการกำจัดสีย้อมรีแอคทีฟผสมที่เวลาต่าง ๆ ด้วยเครื่อง FTIR ที่ช่วงความยาวคลื่น 1,900 – 500 cm^{-1} สามารถช่วยอธิบายการเกาะติดของสีย้อมบนเม็ดราได้ โดยผลการวิเคราะห์สเปคตรัมของสีย้อมรีแอคทีฟผสม 3 ชนิด ที่เวลาการกำจัดสีย้อมชั่วโมงที่ 0 (ภาพที่ 14A) พบ พีค (peak) ที่แสดงว่าเป็นหมู่ที่ทำให้เกิดสี (Chromophore group) ได้แก่ 1,638 และ 1,498 cm^{-1} โดยพีคดังกล่าวเป็นลักษณะของโครงสร้างแบบอะโซ (-N=N-) (Dizge *et al*., 2008; Pachhade *et al*., 2009) ซึ่งเป็นหมู่ให้สีของสีย้อม Reactive blue 160 สำหรับพีคที่ตำแหน่ง 1,617 cm^{-1}แสดงถึงองค์ประกอบของโครงสร้างแบบแอนทราควิโนนที่เป็นหมู่ให้สีของสีย้อม Reactive blue 19 (Fanchiang and Tseng, 2009) ส่วนพีคที่ตำแหน่ง 1,573 cm^{-1}แสดงถึงหมู่ฟังก์ชันที่เป็นองค์ประกอบของโครงสร้างแบบไตรฟีโนไดออกซาซีนซึ่งเป็นหมู่ให้สีของสีย้อม Reactive blue 198 (Rajkumar and Muthukumar, 2011) นอกจากนี้ยังพบพีคที่ตำแหน่ง 1,190 cm^{-1} ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันที่เป็นตัวเชื่อมระหว่างวงอะโรมาติกของสีย้อม Reactive blue 19 (Fanchiang and Tseng, 2009) ขณะเดียวกันพบพีคที่ตำแหน่ง 1,139 ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของซัลโฟเนตที่สามารถทำให้สีย้อมแสดงประจุเป็นลบ (Chitprasert *et al*., 2011) เมื่อศึกษาสเปคตรัมของเม็ดราที่เคลือบด้วยไคโตซาน ที่เวลาการกำจัดสีย้อมชั่วโมงที่ 0 (ภาพที่ 14B) พบพีคที่ตำแหน่ง 1,639 cm^{-1} ซึ่งแสดงถึงหมู่ฟังก์ชันที่เป็นองค์ประกอบของหมู่อะมิโน (Mohacek-Grosev *et al*., 2001) ที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ราและไคโตซานซึ่งสามารถแสดงประจุเป็นบวก จากผลการวิเคราะห์ดังกล่าวจึงยืนยันได้ว่าเม็ดราที่เคลือบด้วยไคโตซานและสีย้อมมีหมู่ฟังก์ชันที่สามารถจับกันได้

จากการศึกษาสเปคตรัมของเม็ดราที่เคลือบด้วยไคโตซานที่เวลาการกำจัดสีย้อมชั่วโมงที่ 6 (ภาพที่ 14C) พบ พีคตำแหน่ง 1,618 cm^{-1} ซึ่งแสดงลักษณะเฉพาะ (Fingerprint) ของสีย้อม Reactive blue 19 นอกจากนี้ยังพบพีคที่ตำแหน่ง 1,639 cm^{-1} ซึ่งเป็นตำแหน่งของหมู่อะมิโนและ 1,037 cm^{-1} ซึ่งเป็นหมู่ฟังชันก์ที่เป็นลักษณะเฉพาะของสีย้อม Reactive blue 160 มีลักษณะแหลมมากขึ้น จากลักษณะดังกล่าว ชี้ให้เห็นว่า สีย้อมเกิดการเกาะติดบนเม็ดราที่เคลือบด้วยไคโตซานโดยการจับกันระหว่างไอออนบวกของหมู่อะมิโนที่อยู่บนเม็ดราที่เคลือบด้วยไคโตซานและไอออนลบของหมู่ซัลโฟเนตของสีย้อมด้วยแรงไฟฟ้าสถิตย์ และเมื่อศึกษาสเปคตรัมของน้ำสีย้อมรีแอคทีฟผสมที่เวลาการกำจัดสีย้อมชั่วโมงที่ 6 (ภาพที่ 15B) พบว่ามีลักษณะเช่นเดียวกันกับที่เวลาการกำจัดสีย้อม

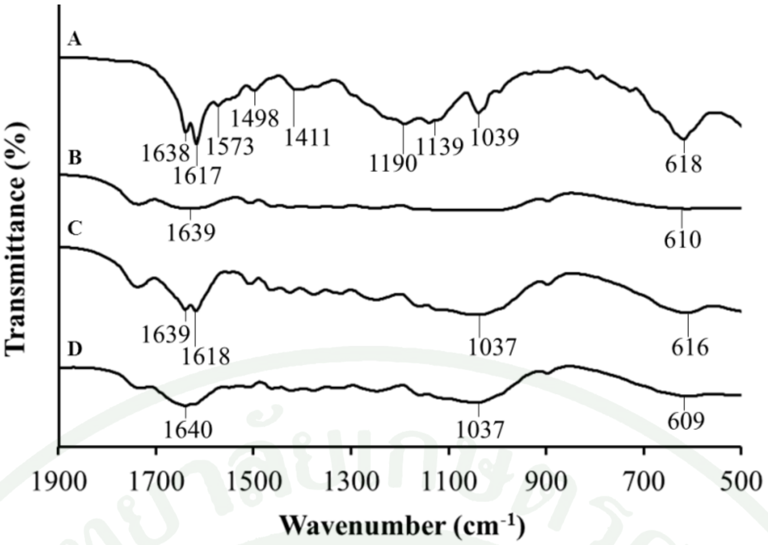
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ชั่วโมงที่ 0 (ภาพที่ 14A และ15A) จากลักษณะปรากฏของสเปคตรัมของเม็ดราและน้ำสีที่เวลาการกำจัดสีย้อมชั่วโมงที่ 6 ชี้ให้เห็นว่า โครงสร้างของสีย้อมไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง ดังนั้นจึงสามารถยืนยันได้ว่าการลดลงของสีย้อมที่เวลานี้เป็นผลมาจากกลไกการดูดซับสอดคล้องกับผลการทดลองเรื่องการเปลี่ยนแปลงความยาวคลื่นสูงสุดของสีย้อม

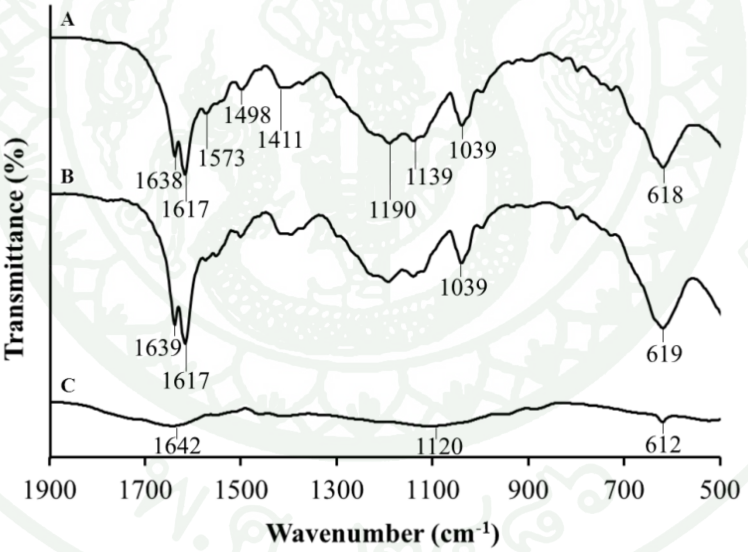
เมื่อศึกษาสเปคตรัมของเม็ดราที่เคลือบด้วยไคโตซานที่เวลาการกำจัดสีย้อมชั่วโมงที่ 48 (ภาพที่ 14D) พบว่า ไม่ปรากฏพีคในตำแหน่งที่แสดงลักษณะเฉพาะของสีย้อม แต่ยังคงพบพีคที่แสดงองค์ประกอบของเซลล์รา (1,640 และ 609 cm^{-1}) และเมื่อพิจารณาสเปคตรัมของน้ำสี (ภาพที่ 15C) พบว่า พีคตำแหน่ง 1,642 cm^{-1} มีลักษณะเล็กและตื้นขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับสเปคตรัมของสีย้อมเริ่มต้น (ภาพที่ 15A) จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า การลดลงของสีย้อมที่เวลานี้ไม่ได้เกิดจากกลไกการดูดซับแต่เกิดจากกลไกการย่อยสลายทางชีวภาพโดยทำงานของเอนไซม์ที่ราผลิตขึ้นส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างสีย้อมทำให้พีคที่แสดงลักษณะเฉพาะของสีย้อมหายไป

จากการศึกษา spectrum ของเม็ดราและน้ำสีที่เวลาการกำจัดสีย้อมต่าง ๆ สามารถช่วยยืนยันกลไกการกำจัดสีย้อมของราที่เคลือบด้วยไคโตซานได้ โดยกลไกที่ทำหน้าที่หลักในช่วงเวลาการกำจัดสีย้อมก่อนชั่วโมงที่ 30 คือ กลไกการดูดซับและที่ช่วงเวลาการกำจัดสีย้อมหลังจากชั่วโมงที่ 30 เป็นกลไกการย่อยสลายทางชีวภาพและจากการทดลองทั้งหมดสามารถช่วยอธิบายกลไกการกำจัดสีย้อมโดย *L. polychrous* Lév. ที่เคลือบด้วยไคโตซานได้อย่างชัดเจน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 14 FTIR สเปคตรัมของ *L. polychrous* Lév. ที่เคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร ที่เวลาการกำจัดสีย้อมชั่วโมงต่าง ๆ (A) สีย้อมรีแอคทีฟผสมชั่วโมงที่ 0; (B) เม็ดราที่เวลาการกำจัดสีย้อมชั่วโมงที่ 0; (C) 6; (D) 48



ภาพที่ 15 FTIR สเปคตรัมของน้ำสีรีแอคทีฟผสมที่ผ่านการกำจัดสีย้อมโดย *L. polychrous* Lév. ที่เคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร ที่เวลาการกำจัดสีย้อมชั่วโมงต่าง ๆ (A) ชั่วโมงที่ 0; (B) ชั่วโมงที่ 6; (C) ชั่วโมงที่ 48

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

จากการศึกษาการกำจัดสีย้อมรีแอคทีฟผสมโดย *L. polychrous* Lév.ที่เคลือบด้วยไคโตซานและผ่านการทำแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบด เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดสีย้อมโดยการศึกษาสมบัติทางด้านกายภาพของเม็ดราที่เคลือบด้วยไคโตซานตลอดจนกลไกต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการกำจัดสีย้อม ผลการทดลองพบว่า ไคโตซานเป็นสารที่สามารถเกาะติดบนเม็ดราได้โดยที่ความเข้มข้นสูงขึ้นทำให้การเคลือบติดมากขึ้นตลอดจนพื้นผิวของเม็ดรามีลักษณะเรียบมากขึ้นซึ่งราที่ผ่านการเคลือบด้วยไคโตซานยังคงความสามารถเจริญได้ 100 เปอร์เซ็นต์ แต่มีลักษณะการเจริญของเส้นใยราเปลี่ยนแปลงไป เมื่อทดสอบความสามารถในการกำจัดสีย้อม พบว่า ราที่เคลือบด้วยไคโตซานสามารถกำจัดสีย้อมได้เร็วกว่าราที่ไม่เคลือบด้วยไคโตซานทั้งนี้เป็นผลจากการเคลือบไคโตซานบนเม็ดราทำให้สีย้อมเกาะติดบนเม็ดรามากขึ้นส่งผลให้ราสามารถย่อยสีย้อมได้เร็วขึ้นซึ่งให้ผลเช่นเดียวกันทั้งในราที่ผ่านการทำแห้งและไม่ผ่านการทำแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบด ชี้ให้เห็นว่าการเคลือบไคโตซานบนเม็ดราช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดสีย้อม นอกจากนี้การศึกษากลไกการกำจัดสีย้อมที่เกิดขึ้นระหว่างการกำจัดสีย้อมโดยราที่เคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ ด้วยการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงความยาวคลื่นสูงสุดของสีย้อมรีแอคทีฟผสม การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ และการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของเม็ดราและน้ำสีด้วยเครื่อง FTIR จากผลการวิเคราะห์ดังกล่าว จึงสามารถสรุปได้ว่า ราที่เคลือบด้วยไคโตซานสามารถกำจัดสีย้อมโดยกลไกการดูดซับร่วมกับกลไกการย่อยสลายทางชีวภาพ โดยในชั่วโมงที่ 0 – 30 การลดลงของสีย้อมเกิดจากกลไกการดูดซับเป็นหลักและหลังจากชั่วโมงที่ 30 การลดลงของสีย้อมเกิดจากกลไกการย่อยสลายทางชีวภาพเป็นหลัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ข้อเสนอแนะ

1. ศึกษาการกำจัดสีย้อมผสมชนิดอื่น ๆ โดย *L. polychrous* Lév. ที่เคลือบด้วยไคโตซาน ซึ่งจะเป็นการยืนยันได้ว่าราที่เคลือบด้วยไคโตซานสามารถกำจัดสีย้อมได้หลากหลายชนิด เพื่อนำมาใช้เป็นต้นแบบสำหรับการบำบัดน้ำเสียจริงในอนาคต

2. ศึกษาอายุการเก็บรักษาของ *L. polychrous* Lév. ที่เคลือบด้วยไคโตซานและผ่านการทำแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบด เพื่อเป็นการพัฒนาผลิตภัณฑ์ราเคลือบไคโตซานแห้งในอนาคต

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

จันทนา ไพรบูรณ์. 2546. **การเลี้ยงสาหร่ายทะเล *Dunaliella salina* 1197 ที่ผลิตเบต้าแคโรทีนในบ่อกลางแจ้งเพื่อผลิตผลิตภัณฑ์เซลล์เบต้าแคโรทีนแห้งโดยวิธีฟลูอิไดซ์เบด.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ดุษฎี สุนทราชุน. 2531. **การออกแบบลายพิมพ์.** พิมพ์ครั้งที่ 5. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ.

นฤมล ศิริทรงธรรม. 2548. การย้อมสีเส้นไหม. **คัลเลอร์เวย์.** 58: 52 – 54.

ปัทมา พลอยสว่าง. 2551. **อิทธิพลของอายุ สภาวะแวดล้อม และการกระตุ้นการเจริญต่อการกำจัดสีย้อมสังเคราะห์โดย Lentinus polychrous Lév. ที่ผ่านการทำแห้งแบบฟลูอิไดซ์.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์. 2539. **เทคนิคการเก็บรักษาจุลินทรีย์.** จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

สำนักสารนิเทศ กระทรวงสาธารณสุข. 2551. **ผลงานนักวิจัยม.เทคโนฯอีสานเห็ดกระด้างรักษาเบาหวาน-เอดส์.** ข่าวสาธารณสุขภูมิภาค. แหล่งที่มา: http://www.moph.go.th/ops/iprg/iprg_new/page/search_news.php, 1 พฤศจิกายน 2551.

Akhtar, S., A. A. Khan and Q. Husain. 2005. Partially purified bitter gourd (*Momordica charantia*) peroxidase catalyzed decolorization of textile and other industrially important dyes. **Bioresource Technol.** 96: 1804-1811.

Al-Degs, Y.S., M.I. El-Barghouthi, A.H. El-Sheikh and G.M. Walker. 2008. Effect of solution pH, ionic strength, and temperature on adsorption behavior of reactive dyes on activated carbon. **Dyes Pigments** 77: 16-13.

Allan, C.R. and L.A. Hadwiger. 1979. The fungicidal effect of chitosan on fungi of varying cell wall composition. **Exp. Mycol.** 3: 285-287.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Annadurai, G., L.Y. Ling and J.F. Lee. 2008. Adsorption of reactive dye from an aqueous solution by chitosan: isotherm, kinetic and thermodynamic analysis. **J. Hazard. Mater.** 152: 337–346.

Banat, I.M., P. Nigam, D. Singh and R. Marchant. 1996. Microbial decolorization of textile-dye-containing effluents : a review. **Bioresource Technol.** 58: 217-227.

Bayramoglu, G., G. Celik and M.Y. Arica. 2006. Biosorption of Reactive Blue 4 dye by native and treated fungus *Phanerocheate chrysosporium*: Batch and continuous flow system studies. **J. Hazard. Mater.** 137: 1689–1697.

Bourbonnais R. and M.G. Paice. 1990. Oxidation of non-phenolic substrates an expanded role for lactase in lignin biodegradation. **FEBS Lett.** 1:99-102.

Budda, W., R. Sarnthima, S. Khammuang, N. Milintawisamai and S. Naknil. 2012. Ligninolytic enzymes of *Lentinus polychrous* grown on solid substrates and its application in black liquor treatment. J. Biol. Sci. 12: 25-33.

Castillo, M.D., J. Stenstrom and P. Ander. 1994. Determination of manganese peroxidase activity with 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone and 3-(dimethylamino) benzoic acid. **Anal. Biohem.** 218: 399-404.

Chen, C.H., C.F. Chang, C.H. Ho, T.L. Tsai and S.M. Liu. 2008. Biodegradation of crystal violet by *Shewanella* sp. NTOU1. **Chemosphere** 72: 1712-1720.

Chiou, M.S., P.Y. Ho and H.Y. Li. 2004. Adsorption of anionic dyes in acid solutions using chemically cross-linked chitosan beads. **Dyes Pigm.** 60: 69–84.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Chitprasert, P., P. Ploysawang, R. Wangpradit and A. Rodklongtan. 2011. Decolorization of Remazol Brilliant Blue R by fluidized-bed dried *Lentinus polychrous* Lév. **Suranaree J. Sci. Technol.** 18: 217-228.

Choudhury, A.K.R. 2006. **Textile preparation and dying.** Science Publishers., Enfield, New York.

Ciullini, I., S. Tilli, A. Scozzafava and F. Briganti. 2008. Fungal laccase, cellobiose dehydrogenase, and chemical mediators: Combined actions for the decolorization of different classes of textile dyes. **Bioresource Technol.** 99: 7003–7010.

Crini, G. and P.M. Badot. 2008. Application of chitosan, a natural aminopolysaccharide, for dye removal from aqueous solutions by adsorption processes using batch studies: A review of recent literature. **Prog. Polym. Sci.** 33: 399-447.

Daneshvar, N., M. Ayazloo., A.R. Khataee and M. Pourhassan. 2007. Biological decolorization of dye solution containing Malachite Green by microalgae *Cosmarium* sp. **Bioresource Technol.** 98:1176–1182.

Eichlerova, I., L. Homolka, O. Benada, O. Kofronova, T. Hubalek and F. Nerud. 2007. Decolorization of Orange G and Remazol Brilliant Blue R by the white rot fungus *Dichomitus squalens*: Toxicological evaluation and morphological study. **Chemosphere** 69:795–802.

Forgacs, E., T. Cserhati and G. Oros. 2004. Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review. **Environ. Int.** 30; 953-971.

Fu, Y. and T. Viraraghavan. 2001. Fungal decolorization of dye wastewater: a review. **Bioresource Technol.** 79: 252-262.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Gadd, G.M. 1993. Tansley review No .47 Interactions of fungi with toxic metals. **New Phytol.** 124: 25-6.

Gassara, F., S.K. Brar, R.D. Tyagi, M. Verma and R.Y. Surampalli. 2010. Screening of agro-industrial wastes to produce ligninolytic enzymes by *Phanerochaete chrysosporium.* **Biochem. Eng. J.** 49:388–394.

Hamedaani, H.R.K., A. Sakurai and M. Sakakibara. 2007. Decolorization of synthetic dyes by new manganese peroxidase-producing white rot fungus. **Dyes Pigments** 72: 157-162.

Horwitz, W. 2000. **Official method of analysis of AOAC international.** AOAC international., Maryland, USA.

Jiang, X., Y. Sun, L. Liu, S. Wang and X. Tian. 2014. Adsorption of C.I. Reactive Blue 19 from aqueous solutions by porous particles of the grafted chitosan. **Chem. Eng. J.** 235: 151–157.

Khammuang, S. and R. Sarnthima. 2007. Laccase from spent mushroom compost of *Lentinus polychorus* Lev. And its potential for Remazol Brilliant Blue R decolourisation. **Biotechnology** 6: 408-413.

Kaushik, P. and A. Malik. 2009. Fungal dye decolourization: Recent advances and future potential. **Environ. Int.** 35: 127-141.

Kirby, N., R. Marchant and G. Mcmullan. 2000. Decolourisation of synthetic textile dyes by *Phlebia tremellosa*. **FEMS Microbiol. Lett.** 188: 93-96.

Kolekar, Y.M., S.P. Pawar, K.R. Gawai, P.D. Lokhande, Y.S. Shouche and K.M. Kodam. 2008. Decolorization and degradation of Disperse Blue 79 and Acid Orange 10 by *Bacillus fusiformis* KMK5 isolated from the textile dye contaminated soil. **Bioresource Technol.** 99: 8999–9003.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Kumar, M.N.V.R. 2000. A review of chitin and chitosan applications. **React. Funct. Polym.** 46: 1-27.

Levin, L., L. Papinutti and F. Forchiassin. 2004. Evaluation of Argentinean white rot fungi for their ability to produce lignin-modifying enzymes and decolorize industrial dyes. **Bioresource Technol.** 94: 169–176.

Levin, L., F. Forchiassina and A. Vialeb. 2005. Ligninolytic enzyme production and dye decolorization by *Trametes trogii*: application of the Plackett–Burman experimental design to evaluate nutritional requirements. **Process Biochem.** 40: 1381–1387.

Mazmanci M.A. and A. Unyayar. 2005. Decolourisation of Reactive Black 5 by *Funalia trogii* immobilised on *Luffa cylindrica* sponge. **Process Biochem.** 40: 337–342.

Momenzadeh, H., A.R. Tehrani-Bagha, A. Khosravi, K. Gharanjig and K. Holmberg. 2011. Reactive dye removal from wastewater using a chitosan nanodispersion. **Desalination.** 271: 225–230.

Novotny, C., B. Rawal, M. Bhatt, M. Patel, V. Sasek and H.P. Molitoris. 2001. Capacity of *Irpex lacteus* and *Pleurotus ostreatus* for decolorization of chemically different dyes. **J. Biotechnol.** 89: 113-122.

Orfao, J.J.M., A.I.M. Silva, J.C.V. Pereira, S.A. Barata, I.M. Fonseca, P.C.C. Faria and M.F.R. Pereira. 2006. Adsorption of a reactive dye on chemically modified activated carbons influence of pH. **J. Colloid Interf. Sci.** 296: 480-489.

Palma-Guerrero, J., J.A. Lopez-Jimenez, A.J. Pérez-Berná, I.C. Huang, H.B. Jansson, J. Salinas, J. Villalaín, N.D. Read and L.V. Lopez-Llorca. 2010. Membrane fluidity determines sensitivity of filamentous fungi to chitosan. **Mol. Microbiol.** 75: 1021-1032.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Palmieri, G., G. Cennamo and G. Sammia. 2005. Remazol Brilliant Blue R decolorization by the fungus *Pleurotus ostreatus* and its oxidative enzyme system. **Enzyme Microb. Technol.** 36: 17-24.

Pearce, C.I., J.R. Lloyd, J.T. Guthrie. 2003. The removal of colour from textile wastewater using whole bacterial cells: a review. **Dyes Pigments** 58: 179 – 196.

Pegler, D.N. 1983. **The genus Lentinus : a world monography.** Her Majesty's Stationery Office, London.

Pepic, I., J. Filipovic-Grcic and I. Jalsenjak. 2008. Interactions in a nonionic surfactant and chitosan mixtures. **Colloid Surface A** 327: 95-102.

Pukahuta, C., P. Suwanarit, E. Shianagawa, H. Hoshida and Y. Nishizawa. 2004. Combination of laccase, xylanase and cellulose in lignocellulose degradation by white rot fungi, *Lentinus polychrous* Lev. And *L. squarrosulus* Mont. **Kasetsart J.** 38: 65-72.

Radha, K.V., I. Regupathi, A. Arunagiri and T. Murugesan. 2005. Decolorization studies of synthetic dyes using *Phanerochaete chrysosporium* and their kinetics. **Process Biochem.** 40: 3337-3345.

Revankar, M.S. and S.S. Lele. 2007. Synthetic dye decolorization by white rot fungus, *Ganoderma* sp. WR-1. **Bioresource. Technol.** 98: 775-780.

Rinaudo, M. 2006. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Prog. Polym. Sci.** 31: 603-632.

Robinson, T., G. McMullan, R. Marchant and P. Nigam. 2001. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. **Bioresource Technol.** 77: 247-255.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Roller, S. and N. Covill. 1999. The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. **Int. J. Food Microbiol.** 47: 67-77.

Saparrat, M.C.N., P. Mocchiutti, C.S. Liggieri, M.B. Aulicino, N.O. Caffini, P.A. Balatti, M.J. Martinez. 2008. Ligninolytic enzyme ability and potential biotechnology applications of the white-rot fungus *Grammothele subargentea* LPSC no. 436 strain. **Process Biochem.** 43: 368–375.

Sakkayawong, N., P. Thiravetyan and W. Nakbanpote. 2005. Adsorption mechanism of synthetic reactive dye wastewater by chitosan. **J. Colliod Interf. Sci.** 286: 36-42.

Saratale, R.G., J.S. Chang and S.P. Govindwar. 2011. Bacterial decolorization and degradation of **azo dyes: A review.** J. Taiwan Inst. Chem. E. **42: 138-157.**

Say, R., A. Denizli and M.Y. Aroca. 2001. Biosorption of cadmium (II), lead (II) and copper (II) with the filamentous fungus *Phanerochaete chrysosporium.* **Bioresource Technol.** 76: 67-70.

Shukla, S.K., A.K. Mishra, O.A. Arotiba and B.B. Mamba. Chitosan-based nanomaterials: A state-of-the-art review. **Int. J. Biol. Macromol.** 59: 46-58.

Selvam, K., K. Swaminathan and K.S. Chae. 2003. Decolourization of azo dyes and a dye industry effluent by a white rot fungus *Thelephora* sp. **Bioresource Technol.** 88:115–119.

Si, J., B.K. Cui and Y.C. Dai. 2013. Decolorization of chemically different dyes by white-rot fungi in submerged cultures. **Ann. Microbiol.** 63: 1099 – 1108.

Singh, T., D. Vesentini, A.P. Singh and G. Daniel. 2008. Effect of chitosan on physiological, morphological, and ultrastructural characteristics of wood-degrading fungi. **Int. Biodeter. Biodegr.** 62: 116-124.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Strand, S.P., M.S. Vandvik, K.M. Varum, and K. Ostgaard. 2001. Screening of chitosans and conditions for bacterial flocculation. **Biomacromolecules** 2: 126-133.

Sumathi, S. and B.S. Manju. 2000. Uptake of reactive textile dyes by *Aspergillus foetidus*. **Enzyme Microb.Technol.** 27: 347-355.

Suwannawong, P., S. Khammuang and R. Sarnthima. 2010. Decolorization of rhodamine B and congo red by partial purified laccase from *Lentinus polychrous* Lév. **J. Biochem. Tech.** 3: 182-186.

Tychanowicz, G. K., A. Zilly, C.G.M. Souza and R.M. Peralta. 2004. Decolourisation of Industrial dyes by solid-state cultures of *Pleurotus pulmonarius*. **Process Biochem.** 39: 855–859.

Tein, M. And K. Kirk. 1984. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification, characterization, and catalytic properties of a unique H_2O_2 – requiring oxygenase. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA** 81: 2280-2284.

Young, L. and J. Yu. 1997. Ligninase-catalysed decolorization of synthetic dyes. **Water Res.** 31: 1187-1193.

Yu, G., X. Wen, R. Li and Y. Qian. 2006. In vitro degradation of a reactive azo dye by crude ligninolytic enzymes from nonimmersed liquid culture of *Phanerochaete chrysosporium*. **Process Biochem.** 41: 1987–1993.

Zakrzewska, A., A. Boorsma, D. Delneri, S. Brul, S.G. Oliver and F.M. Klis. 2007. Cellular processes and pathways that protect *Saccharomyces cerevisiae* cells against the plasma membrane-perturbing compound chitosan. **Eukaryot. Cell** 6: 600-608.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Zhou, L., J. Jin, Z. Liu, X. Liang and C. Shang. 2012. Adsorption of acid dyes from aqueous solutions by the ethylenediamine-modified magnetic chitosan nanoparticles. **J. Hazard. Mater.** 185: 1045-1052.

Zollinger, H. 2003. **Color chemistry : syntheses, properties, and applications of organic dyes and pigments. Wiley-VCH, Zurich.**

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA, Merck, Germany)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ความเข้มข้น 39 กรัมต่อลิตร แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ Mushroom Complete Medium (MCM)

เตรียม MCM จากองค์ประกอบดังนี้

Glucose	20.00	กรัม
Yeast extract	2.00	กรัม
Peptone	2.00	กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.50	กรัม
KH_2HPO_4	0.46	กรัม
K_2HPO_4	1.00	กรัม
น้ำกลั่น	1000.00	มิลลิลิตร

ปรับค่าพีเอชเท่ากับ 6.0 แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นระยะเวลา 15 นาที

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ Minimal Medium (MM)

เตรียม MM จากองค์ประกอบดังนี้

Glucose	5.00	กรัม
K_2HPO_4	1.00	กรัม
Asparagine	0.68	กรัม
Yeast extract	0.50	กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.50	กรัม
KCl	0.50	กรัม
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.10	กรัม
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	0.008	กรัม
$Zn(CH_3COO)_2$	0.003	กรัม
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	0.006	กรัม
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.003	กรัม
น้ำกลั่น	1000.000	มิลลิลิตร

ปรับค่าพีเอชเท่ากับ 6.0 แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นระยะเวลา 15 นาที

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ข

ข้อมูลจากการทดลอง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ข1 การกำจัดสีย้อมรีแอคทีฟผสมโดย *L. polychrous* Lév. ที่ไม่เคลือบด้วยไคโตซาน และไม่ผ่านการทำแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบด

ระยะเวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณสีย้อมที่เหลือ (เปอร์เซ็นต์) ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย
0	100.00	100.00	100.00	100.00±0.00
1	99.40	98.76	97.70	98.62±0.86
2	98.46	98.59	96.65	97.90±1.08
3	97.59	97.75	95.57	96.97±1.21
4	95.95	96.71	94.45	95.70±1.15
5	94.78	92.20	93.16	93.38±1.30
6	91.86	91.03	91.61	91.50±0.42
12	82.19	84.53	83.44	83.38±1.17
18	81.71	81.26	83.36	82.11±1.11
24	75.55	83.68	82.55	80.59±4.40
30	70.39	79.76	76.74	75.63±4.78
36	51.78	67.07	58.07	58.97±7.68
48	17.20	26.12	17.05	20.12±5.19
60	7.77	9.25	9.15	8.73±0.83
72	7.85	9.13	8.88	8.62±0.68

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ข2 การกำจัดสีย้อมรีแอคทีฟผสมโดย *L. polychrous* Lév. ที่เคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร และไม่ผ่านการทำแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบด

ระยะเวลา	ปริมาณสีย้อมที่เหลือ (เปอร์เซ็นต์)			
(ชั่วโมง)	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย
0	100.00	100.00	100.00	100.00±0.00
1	83.88	81.70	81.42	82.33±1.35
2	80.32	81.97	79.99	80.76±1.06
3	78.67	79.53	80.12	79.44±0.73
4	79.00	78.87	78.12	78.66±0.48
5	77.50	78.60	78.05	78.05±0.55
6	78.49	77.10	77.38	77.66±0.66
12	77.20	75.83	74.62	75.88±1.15
18	73.00	72.74	72.54	72.76±0.20
24	71.53	71.47	70.98	71.33±0.27
30	65.00	62.74	63.84	63.86±1.01
36	20.17	20.47	20.35	20.33±0.14
48	11.20	11.20	10.93	11.11±0.14
60	6.43	6.35	6.26	6.35±0.07
72	4.57	4.57	4.33	4.49±0.12

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ข3 การกำจัดสีย้อมรีแอคทีฟผสมโดย *L. polychrous* Lév. ที่เคลือบด้วยไคโตซาน ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร และไม่ผ่านการทำแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบด

ระยะเวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณสีย้อมที่เหลือ (เปอร์เซ็นต์)			
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย
0	100.00	100.00	100.00	100.00±0.00
1	67.73	65.73	65.78	66.42±1.14
2	58.76	56.92	57.24	57.64±0.98
3	54.67	51.82	51.97	52.82±1.60
4	50.31	47.99	48.06	48.79±1.32
5	48.53	46.19	46.54	47.09±1.26
6	36.12	38.09	37.98	37.39±0.99
12	34.63	35.89	35.48	35.33±0.57
18	32.63	32.51	32.71	32.62±0.09
24	30.68	30.54	30.85	30.69±0.14
30	29.14	29.74	29.86	29.58±0.34
36	25.70	26.42	26.34	26.15±0.35
48	14.06	12.32	12.01	12.80±0.99
60	8.15	7.83	7.55	7.84±0.27
72	4.85	4.76	4.95	4.86±0.09

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ข4 การกำจัดสีย้อมรีแอคทีฟผสมโดย *L. polychrous* Lév. ที่เคลือบด้วยไคโตซาน ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร และไม่ผ่านการทำแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบด

ระยะเวลา	ปริมาณสีย้อมที่เหลือ (เปอร์เซ็นต์)			
(ชั่วโมง)	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย
0	100.00	100.00	100.00	100.00±0.00
1	60.61	59.08	59.84	59.84±0.76
2	43.08	43.86	44.07	43.67±0.52
3	39.64	39.38	38.63	39.21±0.52
4	34.22	34.62	35.02	34.62±0.40
5	30.39	29.87	30.11	30.12±0.26
6	26.34	27.05	27.40	26.93±0.48
12	24.59	24.34	24.99	24.64±0.29
18	22.04	21.93	22.18	22.05±0.11
24	21.20	21.49	21.16	21.28±0.16
30	20.64	20.69	20.66	20.66±0.02
36	20.11	20.24	20.05	20.13±0.08
48	18.23	19.03	18.70	18.65±0.36
60	14.13	14.07	14.03	14.08±0.05
72	8.60	7.72	7.32	7.88±0.58

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ข5 การกำจัดสีย้อมรีแอคทีฟผสมโดย *L. polychrous* Lév. ที่ไม่เคลือบด้วยไคโตซาน และผ่านการทำแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบด

ระยะเวลา	ปริมาณสีย้อมที่เหลือ (เปอร์เซ็นต์)			
(ชั่วโมง)	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย
0	100.00	100.00	100.00	100.00±0.00
12	97.12	96.88	97.01	97.00±0.12
24	97.15	96.28	89.22	94.22±3.89
30	92.76	93.37	92.86	93.00±0.33
36	91.73	91.87	92.42	92.01±0.37
48	92.21	91.38	87.94	90.51±2.02
60	80.97	83.09	81.92	81.99±1.06
72	77.13	72.49	69.95	73.19±3.25
96	21.93	21.68	18.23	20.61±1.85
120	13.10	13.29	11.91	12.76±0.67
144	6.50	5.70	5.07	5.75±0.64

ตารางผนวกที่ ข6 การกำจัดสีย้อมรีแอคทีฟผสมโดย *L. polychrous* Lév. ที่เคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร และผ่านการทำแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบด

ระยะเวลา	ปริมาณสีย้อมที่เหลือ (เปอร์เซ็นต์)			
(ชั่วโมง)	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย
0	100.00	100.00	100.00	100.00±0.00
12	69.34	68.01	68.76	68.70±0.66
24	65.19	65.23	65.69	65.37±0.28
30	64.99	65.01	65.00	65.00±0.01
36	64.84	64.36	64.53	64.58±0.24
48	60.43	61.84	62.12	61.46±0.90
60	20.80	21.42	20.96	21.06±0.32
72	8.43	8.43	8.20	8.36±0.14

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ข7 การกำจัดสีย้อมรีแอคทีฟผสมโดย *L. polychrous* Lév. ที่เคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร และผ่านการทำแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบด

ระยะเวลา	ปริมาณสีย้อมที่เหลือ (เปอร์เซ็นต์)			
(ชั่วโมง)	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย
0	100.00	100.00	100.00	100.00±0.00
12	48.08	47.91	47.43	47.80±0.34
24	45.45	44.39	46.87	45.57±1.24
30	44.88	45.66	45.32	45.29±0.39
36	44.58	44.23	46.62	45.14±1.29
48	39.45	39.66	40.70	39.93±0.67
60	17.48	18.85	17.17	17.83±0.89
72	7.57	6.22	6.79	6.86±0.68

ตารางผนวกที่ ข8 การกำจัดสีย้อมรีแอคทีฟผสมโดย *L. polychrous* Lév. ที่เคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร และผ่านการทำแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบด

ระยะเวลา	ปริมาณสีย้อมที่เหลือ (เปอร์เซ็นต์)			
(ชั่วโมง)	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย
0	100.00	100.00	100.00	100.00±0.00
12	45.31	44.55	44.07	44.64±0.63
24	42.80	41.00	39.58	41.13±1.62
30	40.28	40.90	41.21	40.80±0.47
36	42.14	40.36	38.78	40.43±1.68
48	36.14	35.79	34.65	35.53±0.78
60	24.92	24.53	24.82	24.76±0.20
72	6.56	6.94	6.43	6.64±0.27

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ข9 กิจกรรมเอนไซม์แลคเคสที่ผลิตโดย *L. polychrous* Lév. ที่ไม่เคลือบด้วยไคโตซานและที่ไม่ผ่านการทำแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบด

ระยะเวลา	กิจกรรมเอนไซม์แลคเคส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)			
(ชั่วโมง)	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย
0	0.000	0.000	0.000	0.000±0.000
6	0.005	0.002	0.003	0.004±0.001
18	0.006	0.004	0.004	0.005±0.001
30	0.017	0.015	0.018	0.017±0.002
36	0.146	0.091	0.146	0.128±0.032
48	0.678	0.628	0.669	0.658±0.027
60	1.113	1.045	1.212	1.123±0.084
72	1.690	1.440	1.570	1.567±0.125

ตารางผนวกที่ ข10 กิจกรรมเอนไซม์แลคเคสที่ผลิตโดย *L. polychrous* Lév ที่เคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร และไม่ผ่านการทำแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบด

ระยะเวลา	กิจกรรมเอนไซม์แลคเคส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)			
(ชั่วโมง)	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย
0	0.000	0.000	0.000	0.000±0.000
6	0.003	0.003	0.003	0.003±0.000
18	0.004	0.004	0.004	0.004±0.000
30	0.010	0.010	0.012	0.010±0.001
36	0.100	0.098	0.101	0.099±0.001
48	0.533	0.584	0.488	0.536±0.048
60	0.993	0.928	0.979	0.967±0.034
72	1.349	1.392	1.394	1.378±0.026

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ข11 กิจกรรมเอนไซม์แลคเคสที่ผลิตโดย *L. polychrous* Lév ที่เคลือบด้วยไคโตซาน ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร และไม่ผ่านการทำแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบด

ระยะเวลา	กิจกรรมเอนไซม์แลคเคส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)			
(ชั่วโมง)	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย
0	0.000	0.000	0.000	0.000±0.000
6	0.002	0.002	0.002	0.002±0.000
18	0.002	0.002	0.002	0.002±0.000
30	0.006	0.006	0.006	0.006±0.000
36	0.077	0.079	0.077	0.078±0.001
48	0.406	0.362	0.375	0.381±0.023
60	0.738	0.687	0.721	0.715±0.026
72	1.010	1.168	1.057	1.078±0.081

ตารางผนวกที่ ข12 กิจกรรมเอนไซม์แลคเคสที่ผลิตโดย *L. polychrous* Lév ที่เคลือบด้วยไคโตซาน ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร และไม่ผ่านการทำแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบด

ระยะเวลา	กิจกรรมเอนไซม์แลคเคส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)			
(ชั่วโมง)	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย
0	0.000	0.000	0.000	0.000±0.000
6	0.002	0.002	0.001	0.002±0.000
18	0.002	0.002	0.002	0.002±0.000
30	0.003	0.003	0.004	0.003±0.000
36	0.044	0.045	0.045	0.044±0.001
48	0.209	0.262	0.286	0.252±0.040
60	0.567	0.494	0.587	0.550±0.049
72	0.876	0.835	0.914	0.875±0.040

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ข13 กิจกรรมเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสที่ผลิตโดย *L. polychrous* Lév. ที่ไม่เคลือบด้วยไคโตซานและไม่ผ่านการทำแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบด

ระยะเวลา	กิจกรรมเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)			
(ชั่วโมง)	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย
0	0.000	0.000	0.000	0.000±0.000
6	0.001	0.001	0.002	0.002±0.000
18	0.007	0.006	0.007	0.007±0.001
30	0.006	0.005	0.010	0.007±0.003
36	0.029	0.026	0.033	0.029±0.003
48	0.290	0.249	0.226	0.255±0.032
60	0.440	0.465	0.505	0.470±0.033
72	0.635	0.658	0.739	0.677±0.054

ตารางผนวกที่ ข14 กิจกรรมเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสที่ผลิตโดย *L. polychrous* Lév ที่เคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตรและไม่ผ่านการทำแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบด

ระยะเวลา	กิจกรรมเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)			
(ชั่วโมง)	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย
0	0.000	0.000	0.000	0.000±0.000
6	0.001	0.001	0.001	0.001±0.000
18	0.005	0.005	0.005	0.005±0.000
30	0.006	0.006	0.006	0.006±0.000
36	0.023	0.022	0.020	0.021±0.001
48	0.213	0.201	0.226	0.213±0.012
60	0.400	0.427	0.434	0.420±0.018
72	0.624	0.610	0.620	0.618±0.007

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

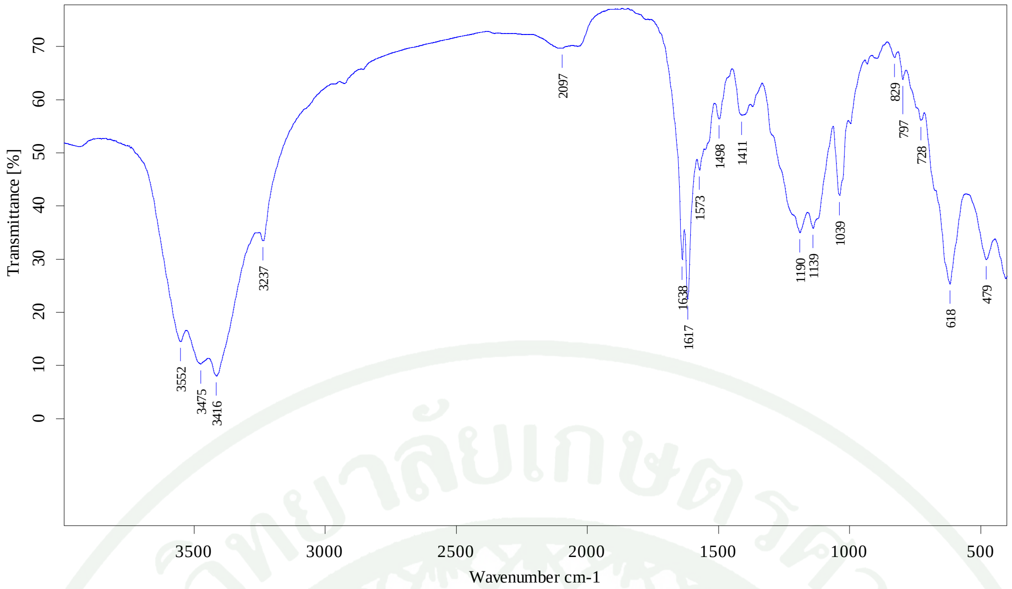
ตารางผนวกที่ ข15 กิจกรรมเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสที่ผลิตโดย *L. polychrous* Lév ที่เคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตรและไม่ผ่านการทำแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบด

ระยะเวลา	กิจกรรมเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)			
(ชั่วโมง)	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย
0	0.000	0.000	0.000	0.000±0.000
6	0.001	0.001	0.001	0.001±0.000
18	0.001	0.001	0.001	0.001±0.000
30	0.004	0.003	0.004	0.004±0.000
36	0.017	0.002	0.002	0.007±0.008
48	0.101	0.131	0.181	0.137±0.040
60	0.244	0.300	0.275	0.273±0.028
72	0.438	0.419	0.403	0.420±0.017

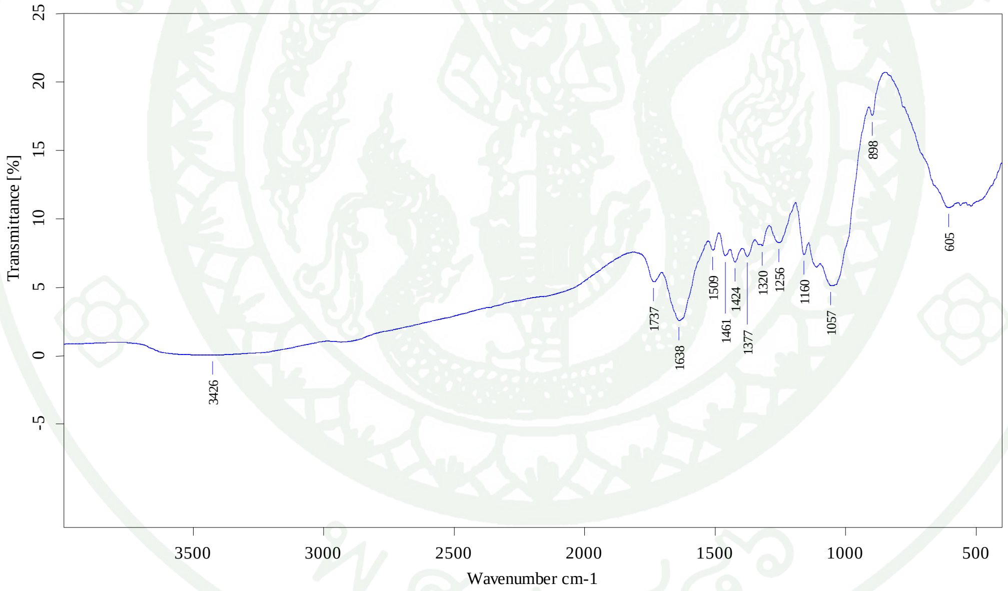
ตารางผนวกที่ ข16 กิจกรรมเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสที่ผลิตโดย *L. polychrous* Lév ที่เคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร และไม่ผ่านการทำแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบด

ระยะเวลา	กิจกรรมเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)			
(ชั่วโมง)	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย
0	0.000	0.000	0.000	0.000±0.000
6	0.001	0.001	0.001	0.001±0.000
18	0.001	0.001	0.001	0.001±0.000
30	0.003	0.003	0.003	0.003±0.000
36	0.012	0.001	0.001	0.005±0.005
48	0.096	0.094	0.106	0.099±0.007
60	0.201	0.226	0.245	0.224±0.022
72	0.376	0.359	0.370	0.368±0.008

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

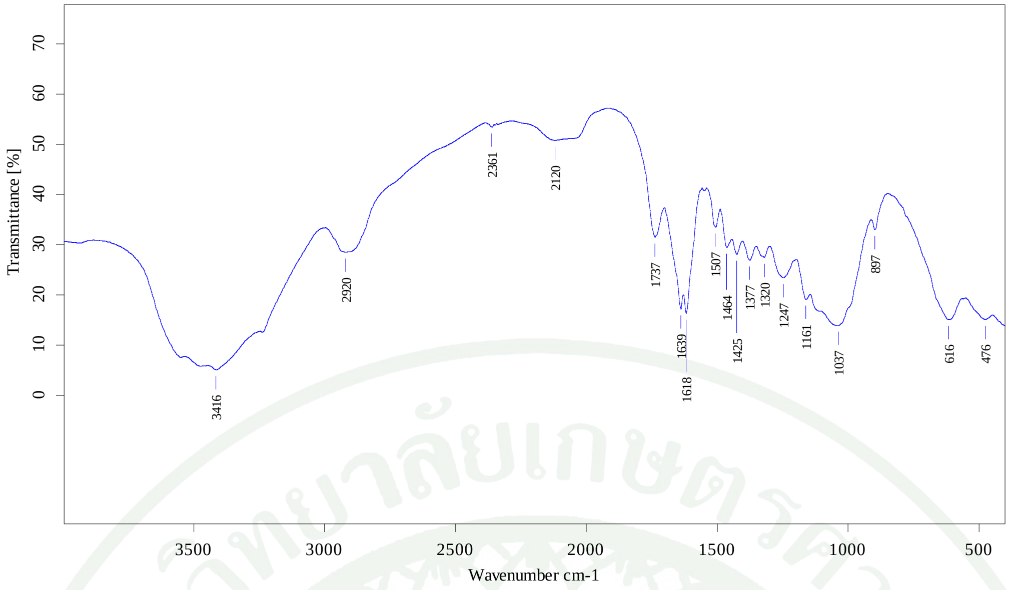


ภาพผนวกที่ ข1 FTIR สเปคตรัมของสีย้อมรีแอคทีฟผสมที่เวลาการกำจัดสีย้อมชั่วโมงที่ 0

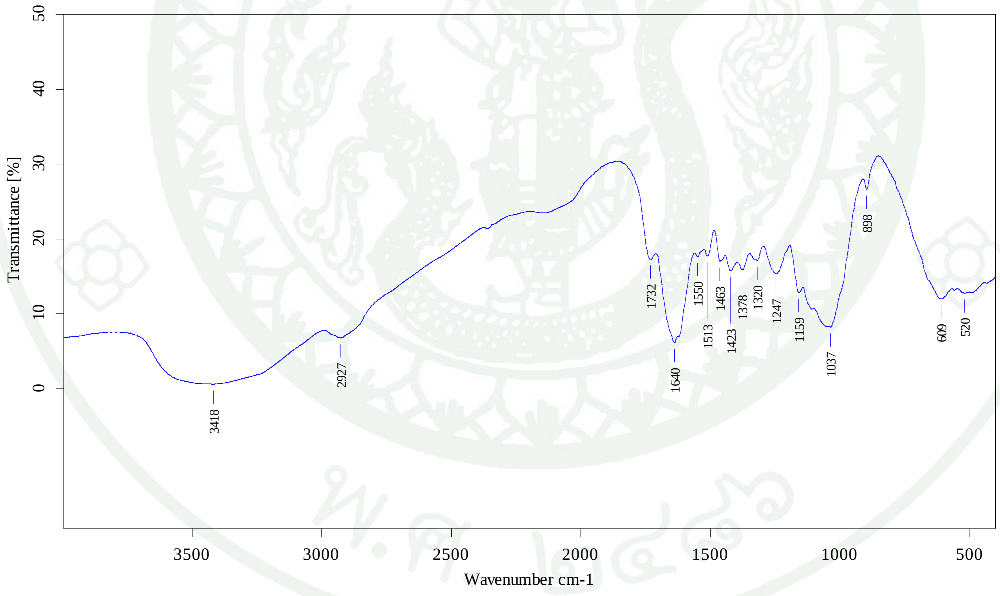


ภาพผนวกที่ ข2 FTIR สเปคตรัมของเม็ดรา *L. polychrous* Lév. ที่เคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร ที่เวลาการกำจัดสีย้อมชั่วโมงที่ 0

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

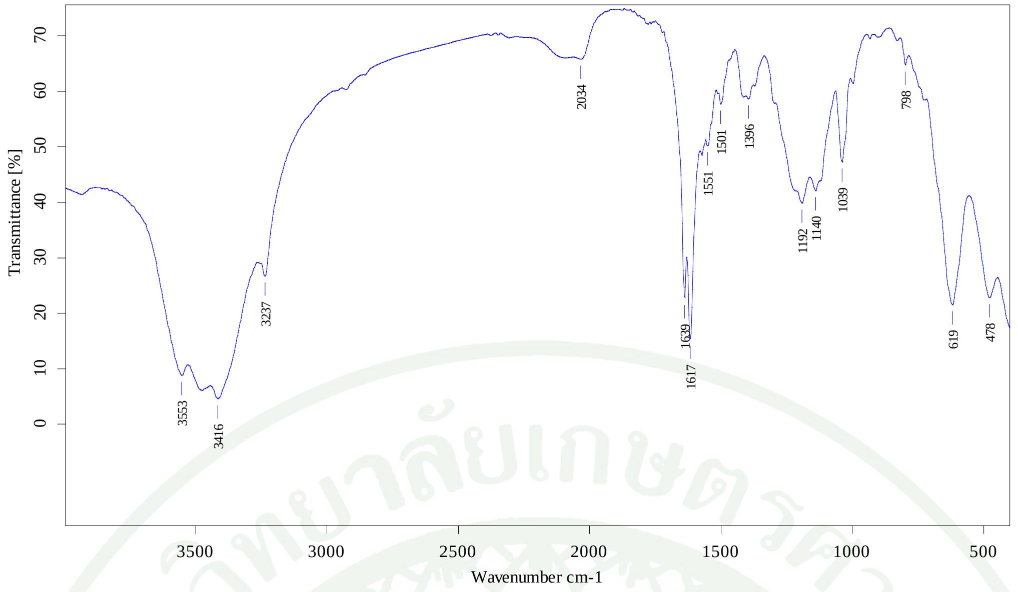


ภาพผนวกที่ ข3 FTIR สเปคตรัมของเม็ดรา *L. polychrous* Lév. ที่เคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร ที่เวลาการกำจัดสีย้อมชั่วโมงที่ 6

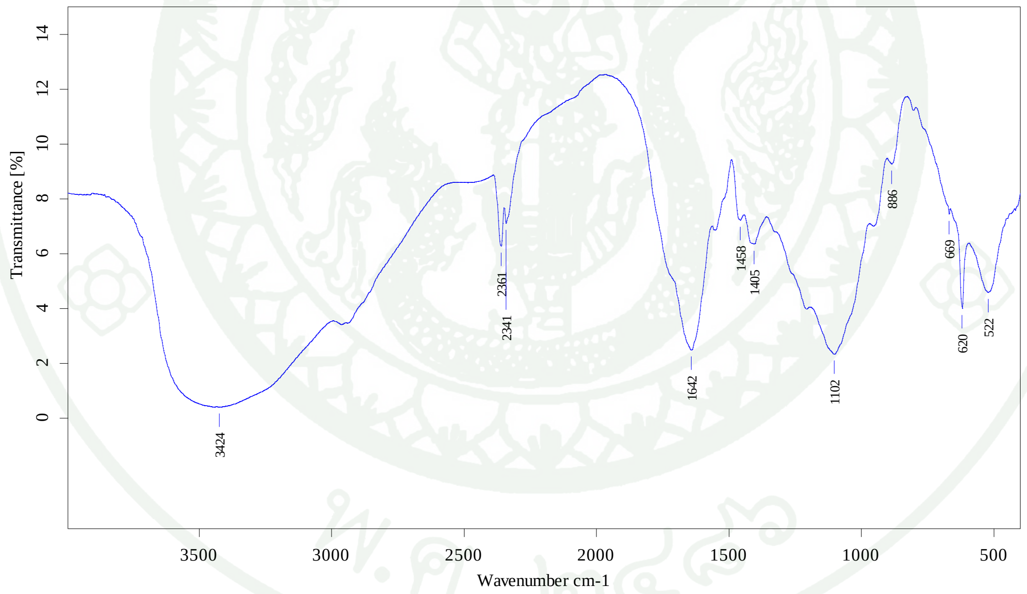


ภาพผนวกที่ ข4 FTIR สเปคตรัมของเม็ดรา *L. polychrous* Lév. ที่เคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร ที่เวลาการกำจัดสีย้อมชั่วโมงที่ 48

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพผนวกที่ ข5 FTIR สเปคตรัมของน้ำสีย้อมรีแอคทีฟผสมที่เวลาการกำจัดสีย้อมชั่วโมงที่ 6



ภาพผนวกที่ ข6 FTIR สเปคตรัมของน้ำสีย้อมรีแอคทีฟผสมที่เวลาการกำจัดสีย้อมชั่วโมงที่ 48

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ – นามสกุล	นางสาวรจนาวรรณ หวั่งประดิษฐ์
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันที่ 24 มีนาคม 2528
สถานที่เกิด	จังหวัดกรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์