

การปรับสภาพเบื้องต้นไม้ยูคาลิปตัสโดยใช้ราเนาขาวสายพันธุ์เขตร้อน
เพื่อผลิตเยื่อแบบคราฟต์

นางสาววิรัชญา ศรีแพทย์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2556
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

PRETREATMENT OF EUCALYPTUS WOOD USING TROPICAL STRAINS
OF WHITE ROT FUNGI FOR KRAFT PULPING

Miss Varidtha Sripat

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2013

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การปรับสภาพเบื้องต้นไม้ยูคาลิปตัสโดยใช้
	ราเน่าขาวสายพันธุ์เขตร้อนเพื่อผลิตเยื่อแบบคราฟต์
โดย	นางสาววิรัชญา ศรีแพทย์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สีหนาท ประสงค์สุข
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	อาจารย์ ดร. กุณิณี สุวรรณกิจ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัย
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ต่อศักดิ์ สีลานันท์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สีหนาท ประสงค์สุข)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(อาจารย์ ดร. กุณิณี สุวรรณกิจ)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กนกทิพย์ ภัคดีบำรุง)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(อาจารย์ ดร. นุชจรินทร์ เหลืองสะอาด)

วิชา ตรีแพทย : การปรับสภาพเบื้องต้นไม้ยูคาลิปตัสโดยใช้ราเน่าขาวสายพันธุ์เขตร้อนเพื่อ
 ผลิตเยื่อแบบคราฟต์ (PRETREATMENT OF EUCALYPTUS WOOD USING TROPICAL
 STRAINS OF WHITE ROT FUNGI FOR KRAFT PULPING) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก :
 ผศ. ดร. สีนันท ประสงค์สุข, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ดร. กุณทีนี สุวรรณกิจ, 96 หน้า.

จากการศึกษาและคัดเลือกราเน่าขาวจากประเทศไทยที่มีประสิทธิภาพในการปรับสภาพไม้ยูคา
 ลิปตัสเพื่อผลิตเยื่อแบบคราฟต์ สามารถเลือกรากจากปฏิบัติการวิจัยการใช้ประโยชน์จากชีวมวลพืชได้ 14
 ไอโซเลต และเมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ที่เหมาะสมบนอาหารแข็งพบว่าราที่
 สร้างเอนไซม์ลิกนินโนโลติกได้ดี และผลิตเซลลูเลสน้อย ได้แก่ SK7, CUT3 และ KK16 จากนั้นเมื่อนำราทั้ง
 สามไอโซเลตมาทดสอบประสิทธิภาพในการปรับสภาพไม้ยูคาลิปตัส พบว่าราที่ลดลิกนินภายในไม้ได้สูง
 ที่สุด ได้แก่ SK7 CUT3 และ KK16 โดยลดลง 19.23%, 18.49% และ 15.45% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับ
 ไม้ที่ไม่ปรับสภาพ ที่ระยะเวลาการบ่ม 15 วัน และเมื่อตรวจสอบการสร้างเอนไซม์เชิงปริมาณ พบว่ารา
 SK7 มีการสร้างแลคเคสสูงที่สุด ที่ 0.1532 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตลอดจนมีแอกติวิตีของแมงกานีสเปอร์ออก
 ซิเดส และลิกนินเปอร์ออกซิเดสระหว่างการปรับสภาพไม้ จากข้อมูลดังกล่าวจึงนำ SK7 มาใช้ในการผลิต
 เยื่อแบบชีวภาพร่วมกับวิธีการคราฟต์ โดยใช้ความเข้มข้นต่างที่เหมาะสมที่ 25% และซัลฟิไดตีที่ 25% ซึ่ง
 จากการแปรผันระยะเวลาบ่มกับปริมาณเชื้อในการปรับสภาพ พบว่าค่าดัชนีความต้านทานต่อแรงดึง
 (tensile index) และค่าปริมาณด่างที่เหลือ (residual alkali) มีแนวโน้มสูงขึ้นเมื่อเพิ่มระยะเวลาบ่มและ
 ปริมาณเชื้อ ซึ่งเมื่อใช้สมการรีเกรสชันศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยที่แปรผันดังกล่าวที่มีต่อค่า
 ตอบสนองที่ศึกษาพบว่า ที่ระยะเวลาบ่ม 25 วัน ปริมาณเชื้อ 100 มิลลิกรัมแห้ง สามารถเพิ่มค่าดัชนี
 ความต้านทานต่อแรงดึงได้สูงสุด 5.00% และทำให้ค่าปริมาณด่างที่เหลือเพิ่มขึ้นสูงสุดคิดเป็น 23.47%
 เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ปรับสภาพ นอกจากนี้ยังพบว่าการลดขนาดชิ้นไม้ในการปรับสภาพช่วยให้ค่า
 ดัชนีความต้านทานต่อแรงดึงเพิ่มขึ้นมากกว่าการปรับสภาพในไม้ขนาดปกติ 2.01 เท่า ในขณะที่ใช้ความ
 เข้มข้นสารเคมีในการต้มลดลง จึงประหยัดการใช้สารเคมีและพลังงานในการต้มมากขึ้น และพบว่า
 ประสิทธิภาพในการปรับสภาพชิ้นไม้ของราที่คัดเลือกกับราสายพันธุ์อ้างอิง (*Phanerochaete
 chrysosporium*) ใกล้เคียงกันทั้งการพัฒนาสมบัติความแข็งแรงของกระดาษและปริมาณด่างที่เหลือ

สาขาวิชา.....เทคโนโลยีชีวภาพ.....ลายมือชื่อนิสิต.....
 ปีการศึกษา.....2556.....ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....
 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

5272711023 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORDS : BIOLOGICAL PRETREATMENT/ PULPING/ ECOLOGICAL FRIENDLY
TECHNOLOGY / WHITE ROT FUNGI

VARIDTHA SRIPAT : PRETREATMENT OF EUCALYPTUS WOOD USING TROPICAL STRAINS OF WHITE ROT FUNGI FOR KRAFT PULPING. ADVISOR : ASST. PROF. SEHANAT PRASONGSUK, Ph.D., CO-ADVISOR : KUNTINEE SUVARNAKICH, Ph.D., 96 pp.

Screening of tropical white rot fungi from Thailand for biopretreatment of Eucalyptus wood was investigated. Fourteen isolates of white rot fungi were cultivated and their ligninolytic and cellulase production were tested using plate screening assay with solid lignin/cellulose modified basal media. Of these, 3 isolates (SK7, CUT3 and KK16) exhibited high ligninase and low cellulase production which are suitable for pretreatment in the next step. The highest lignin loss was found in SK7, CUT3 and KK16 at 19.59%, 18.49% and 15.45%, respectively, when three isolates were used to treat Eucalyptus wood chip for 15 days. In quantitative assay for ligninolytic enzyme, SK7 showed the highest laccase at values 0.1532 Unit/ml. And also produced manganese peroxidase and ligninperoxidase in testing. For the optimal condition for wood chip pretreatment by selected white rot fungus (SK7) with kraft pulping at 25% effective alkaline and 25% sulfidity, The addition of inoculation size and incubation time trended to increase the tensile index and residual alkali. In addition, using of regression equation to predict the relationship between factors and responses values exhibited the highest percentage of tensile index and residual alkaline at 5% and 23.47%, respectively, after incubation for 25 days with 100 mg dry weight of inoculation size. Decreasing the size of wood chip further improved the tensile index with 2.01 folds compared to the original size after pretreatment and also reduced the alkali consumption. This could lead to chemicals and energy saving in pulping process. In addition, the efficiency of wood chip pretreatment from selected fungus was similar to the reference strain (*P. chrysosporium*) in case of strength properties and residual alkaline.

Field of Study : ...Biotechnology..... Student's Signature.....

Academic Year : 2013..... Advisor's Signature.....

Co-advisor's Signature.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดีด้วยความอนุเคราะห์จากหลายฝ่าย ขอกราบ
ขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สีนันท ประสงค์สุข อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์เป็นอย่าง
สูงที่ให้ความรู้ คำปรึกษา และแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จลุล่วงและถูกต้องยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. กุณิณี สุวรรณกิจ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษาและตรวจแก้ต้นฉบับวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องครบถ้วน

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ต่อศักดิ์ สีลานันท์ หัวหน้าภาควิชาที่กรุณา
เป็นประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และตรวจแก้ต้นฉบับให้สมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กนกทิพย์ ภัคดีบำรุง ที่กรุณาเป็น
กรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ และตรวจแก้ต้นฉบับให้สมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. นุชจรินทร์ เหลืองสะอาด ที่กรุณาเป็นกรรมการ
(ผู้ทรงคุณวุฒิจากภายนอก) ในการสอบวิทยานิพนธ์ และตรวจแก้ต้นฉบับให้มีความสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ สมพร ชัยอารีย์กิจ ที่กรุณาให้คำปรึกษาในการเตรียมสารเคมี
และวิธีการทดลอง จนสามารถทำการวิจัยนี้ได้สำเร็จลุล่วง

ขอขอบพระคุณ บริษัทแอดวานซ์ อะโกร จำกัด (มหาชน) ที่สนับสนุนตัวอย่างไม้ยูคา
ลิปดัลในการวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ หน่วยปฏิบัติการวิจัยการใช้ประโยชน์จากชีว
มวลพืช ภาควิชาพฤกษศาสตร์ และสาขาวิชาเทคโนโลยีเยื่อกระดาษ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทาง
ภาพถ่ายและเทคโนโลยีการพิมพ์ คณะวิทยาศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบพระคุณภาควิชาฟิสิกส์ และภาควิชาชีววิทยาที่เชื้อเพื่อเครื่องมือในการทดลอง

ขอขอบคุณสมาชิกในหน่วยปฏิบัติการวิจัยการใช้ประโยชน์จากชีวมวลพืชทุกท่าน
รวมถึงบุคลากรหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพและพฤกษศาสตร์ ที่ให้ความช่วยเหลืออย่างดีเสมอมา

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดามารดา ผู้วางรากฐานให้โอกาสทางการศึกษา และที่
น้องผู้มีอุปการะคุณตลอดมา

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์สำหรับนิสิต ครั้งที่ 1 ปี
การศึกษา 2556 จากบัณฑิตศึกษา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูป.....	ฐ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
3 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง.....	20
3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	20
3.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย.....	22
3.3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	24
3.3.1 เลื่อยราเนาขาวสายพันธุ์ต่างๆ.....	24
3.3.2 คัดเลือกกรามีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ที่เหมาะสม.....	24
3.3.3 คัดเลือกกรามีความเหมาะสมกับการปรับสภาพขึ้นไม้.....	25
3.3.4 หากภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพขึ้นไม้เพื่อการผลิตเยื่อกระดาษ. แบบคราฟต์.....	26
3.3.5 วิเคราะห์สมบัติของกระดาษ.....	28
4 ผลการทดลองและการวิเคราะห์ข้อมูล.....	30
4.1 เลื่อยราเนาขาวสายพันธุ์ต่างๆและคัดเลือกกรามีประสิทธิภาพในการสร้าง เอนไซม์ที่เหมาะสม.....	30
4.2 คัดเลือกกรามีความเหมาะสมกับการปรับสภาพขึ้นไม้.....	33

บทที่	หน้า
4.3 การหาภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพขึ้นไม้เพื่อการผลิตเยื่อกระดาษแบบคราฟต์.....	36
4.4 การเปรียบเทียบสมบัติกระดาษกับชุดการทดลองที่ปรับสภาพด้วยราสายพันธุ์อ้างอิง.....	55
5 อภิปรายผลการวิจัย	
5.1 เลี้ยงร่าเนาชาวสายพันธุ์ต่างๆและคัดเลือกที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ที่เหมาะสม.....	60
5.2 การคัดเลือกที่มีความเหมาะสมกับการปรับสภาพขึ้นไม้.....	62
5.3 การหาภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพขึ้นไม้เพื่อการผลิตเยื่อกระดาษแบบคราฟต์.....	63
5.4 การเปรียบเทียบสมบัติกระดาษกับไม้ที่ได้จากการปรับสภาพด้วยราสายพันธุ์อ้างอิง.....	68
6 สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ	
6.1 เลี้ยงร่าเนาชาวสายพันธุ์ต่างๆและคัดเลือกที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ที่เหมาะสม.....	70
6.2 คัดเลือกที่มีความเหมาะสมกับการปรับสภาพขึ้นไม้.....	70
6.3 การหาภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพขึ้นไม้เพื่อการผลิตเยื่อกระดาษคราฟต์.....	71
6.4 การเปรียบเทียบสมบัติกระดาษกับไม้ที่ได้จากการปรับสภาพด้วยราสายพันธุ์อ้างอิง.....	72
ข้อเสนอแนะ.....	72
รายการอ้างอิง.....	73

บทที่	หน้า
ภาคผนวก.....	81
ภาคผนวก ก.....	82
ภาคผนวก ข.....	85
ภาคผนวก ค.....	87
ภาคผนวก ง.....	93
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	96

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
4.1	ความสามารถของราในการสร้างลิกนินในไลติกเอนไซม์บนอาหารสูตรLMB ที่เติมสารตั้งต้นในการทดสอบ และการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหารแข็งที่เติม CMC เป็นสารตั้งต้น.....	32
4.2	องค์ประกอบทางเคมีของไม้ยูคาลิปตัส.....	33
4.3	ตารางแสดงค่าแอกติวิตีของเอนไซม์จากรา SK7 KK16 และ CUT3 ที่บ่มกับชิ้นไม้ยูคาลิปตัสเป็นเวลา 20 วัน.....	34
4.4	องค์ประกอบทางเคมีของไม้ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยราเปรียบเทียบกับไม้ที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ.....	35
4.5	ผลผลิตเยื่อ ความขาวสว่าง และสมบัติเชิงกลที่ได้จากการผลิตเยื่อด้วยค่าความเข้มข้นต่างๆ.....	38
4.6	ผลผลิตเยื่อ (pulp yield) และปริมาณด่างที่เหลือ (residual alkali) หลังการต้มชิ้นไม้ที่ผ่านการบ่มเป็นเวลา 10, 20 และ 30 วัน ร่วมกับการใช้ปริมาณเชื้อ 50, 75 และ 100 มิลลิกรัมแห้ง.....	40
4.7	สมบัติเชิงกลของกระดาษที่ผลิตจากไม้ยูคาลิปตัสด้วยวิธีการคราฟต์ เมื่อแปรผันปริมาณเชื้อราที่ใช้และระยะเวลาในการบ่ม.....	41
4.8	สมบัติเชิงแสงของกระดาษที่ผลิตจากไม้ยูคาลิปตัสด้วยวิธีการคราฟต์ เมื่อแปรผันปริมาณเชื้อราที่ใช้และระยะเวลาในการบ่ม.....	42
4.9	ความเรียบของกระดาษที่ผลิตจากไม้ยูคาลิปตัสด้วยวิธีการคราฟต์ เมื่อแปรผันปริมาณเชื้อราที่ใช้และระยะเวลาในการบ่ม.....	43

ตารางที่	หน้า	
4.10	องค์ประกอบทางเคมีของเยื่อที่ได้จากการต้มด้วยไม้ที่ผ่านการปรับสภาพและไม่ปรับสภาพเปรียบเทียบกับองค์ประกอบทางเคมีของชิ้นไม้ที่ไม่ผ่านการต้มด้วยสารเคมี.....	45
4.11	ปัจจัยและรหัสของปัจจัยในการทดลองแบบ Central composite design (CCD) ตลอดจนผลการตอบสนองที่ได้ (ดัชนีความต้านทานต่อแรงดึง) สำหรับการศึกษาระยะเวลาในการบ่มและปริมาณเชื้อที่เหมาะสมในการปรับสภาพไม้ด้วยรา....	46
4.12	ปัจจัยและรหัสของปัจจัยในการทดลองแบบ Central composite design (CCD) ตลอดจนผลการตอบสนองที่ได้ (ปริมาณต่างที่เหลือ) สำหรับการศึกษาระยะเวลาในการบ่มและปริมาณเชื้อที่เหมาะสมในการปรับสภาพไม้ด้วยรา...	48
4.13	ค่าปริมาณต่างที่เหลือที่ได้หลังการต้มเยื่อจากไม้ที่ผ่านการร่อนซึ่งปรับสภาพด้วยราเทียบกับไม้ขนาดปกติ.....	50
4.14	ความต้านทานต่อแรงดึง (tensile index) ของกระดาษที่ผ่านการปรับสภาพด้วยราโดยใช้ไม้ที่ผ่านการร่อนเทียบกับสมบัติของไม้ขนาดปกติ.....	51
4.15	ดัชนีความต้านทานต่อแรงฉีก (tear index) ของกระดาษที่ผ่านการปรับสภาพด้วยราโดยใช้ไม้ที่ผ่านการร่อนเทียบกับไม้ขนาดปกติ.....	53
4.16	ค่าความขาวสว่าง (brightness) ของกระดาษที่ผ่านการปรับสภาพด้วยราโดยใช้ไม้ที่ผ่านการร่อนเทียบกับไม้ขนาดปกติ.....	53
4.17	ค่าความทึบแสง (opacity) ของกระดาษที่ผ่านการปรับสภาพด้วยราโดยใช้ไม้ที่ผ่านการร่อนเทียบกับไม้ขนาดปกติ.....	54
4.18	ค่าความเรียบ (smoothness) ของกระดาษที่ผ่านการปรับสภาพด้วยราโดยใช้ไม้ที่ผ่านการร่อนเทียบกับไม้ขนาดปกติ.....	54
4.19	ค่าปริมาณต่างที่เหลือที่ได้หลังการต้มเยื่อจากไม้ซึ่งปรับสภาพด้วยราที่คัดเลือกและร่ายพันธุ์อ้างอิง.....	57

ตารางที่	หน้า	
4.20	เปรียบเทียบสมบัติเชิงแสงของกระดาษที่ผ่านการปรับสภาพด้วยราที่คัดเลือก (SK7) กับราสายพันธุ์อ้างอิง <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	58
4.21	เปรียบเทียบค่าความเรียบของกระดาษที่ผ่านการปรับสภาพด้วยราที่คัดเลือก (SK7) กับราสายพันธุ์อ้างอิง (<i>Phanerochaete chrysosporium</i>).....	58
4.22	เปรียบเทียบสมบัติเชิงกลของกระดาษที่ผ่านการปรับสภาพด้วยราที่คัดเลือก (SK7) กับราสายพันธุ์อ้างอิง <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	59

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 โครงสร้างของลิกนิน.....	12
2.2 หน่วยย่อยที่เป็นโครงสร้างหลักของลิกนิน.....	13
4.1 การเปลี่ยนแปลงสีของอาหารรุ้น	
ก) อาหารรุ้นที่ผสม ABTS เป็นสารตั้งต้นเพื่อทดสอบการผลิตเอนไซม์ แลคเคสของรา.....	31
ข) แสดงการเปลี่ยนสีของอาหารรุ้นที่ผสม Azure B เป็นสารตั้งต้นเพื่อทดสอบ การผลิตเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสของรา.....	33
4.2 เยื่อที่ได้จากการผลิตเยื่อกราฟต์ชุดควบคุม.....	36
4.3 กระดาษที่ได้จากการผลิตเยื่อ ที่แอดที่พัลคาไลน์ 20%, 23%, 25% และ 28%	37
4.4 ลักษณะขึ้นไม้ที่ปกคลุมด้วยเส้นใยราเมื่อบ่มเป็นระยะเวลา 10, 20 และ 30 วัน.	39
4.5 ภาพพื้นที่ผิวการตอบสนองแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาในการบ่ม และปริมาณเชื้อที่ใช้ต่อค่าดัชนีความต้านทานต่อแรงฉีกของกระดาษที่ผลิตได้ จากการปรับสภาพขึ้นไม้ด้วยรา.....	47
4.6 ภาพพื้นที่ผิวการตอบสนองแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาในการบ่มและ ปริมาณเชื้อที่ใช้ต่อค่าปริมาณต่างที่เหลือของกระดาษที่ผลิตได้จากการปรับสภาพ ขึ้นไม้ด้วยรา.....	49
4.7 กราฟเปรียบเทียบค่า tensile index ระหว่างชุดการทดลองที่ใช้ไม้ขนาดปกติ กับชุดการทดลองที่ใช้ไม้ขนาดเล็ก เมื่อบ่มด้วยเชื้อ 100 มิลลิกรัมแห้ง เป็นเวลา 20 และ 30 วัน.....	52
4.8 ลักษณะการเจริญของราบนขึ้นไม้	
ก) <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	55
ข) SK7.....	55

รูปที่	หน้า
4.9 ชิ้นไม้จากชุดการทดลอง	
ก) ผ่านการปรับสภาพด้วยราที่คัดเลือก.....	56
ข) ผ่านการปรับสภาพด้วยราสายพันธุ์อ้างอิง.....	56
ค) ไม่ปรับสภาพด้วยรา.....	56
4.10 กระจกที่ได้จากการผลิตเยื่อกราฟต์	
ก) จากไม้ที่ปรับสภาพด้วยราที่คัดเลือกด้วยภาวะที่เหมาะสม.....	56
ข) จากไม้ที่ปรับสภาพด้วยราสายพันธุ์อ้างอิงด้วยภาวะที่เหมาะสม.....	56
ค) ไม้ที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ.....	56

บทที่ 1

บทนำ

ราเน่าขาว (White rot fungi) เป็นราที่เจริญอยู่บนเนื้อไม้และใช้สารประกอบในไม้เป็นแหล่งอาหาร ส่วนใหญ่เป็นสมาชิกในคลาสเบสิดิโอไมซีทิส (Basidiomycetes) เมื่อรากกลุ่มนี้เจริญบนเนื้อไม้จะทำให้เกิดการผุพัง เนื่องจากรามีการสร้างเอนไซม์ไปเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของเนื้อไม้ (Akhtar และคณะ, 1998) ซึ่งได้แก่ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน โดยในส่วนของความสามารถในการสร้างเอนไซม์เปลี่ยนแปลงโครงสร้างลิกนิน มีการศึกษาอย่างกว้างขวาง เอนไซม์ที่มีความสามารถในการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างลิกนิน ที่สำคัญได้แก่ ลิกนินเปอร์ออกซิเดส แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส และแลคเคส (Singh และคณะ, 2010) ซึ่งเอนไซม์ทั้งสามชนิดมีปฏิริยาในการเข้าเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของลิกนินในเชิงรายละเอียดและเมดิเอเตอร์ที่แตกต่างกัน จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า ราเน่าขาวแต่ละชนิดมีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ได้ต่างกันทั้งในแง่ของชนิดและปริมาณ ที่นิยมศึกษาและให้ประสิทธิภาพที่ดี ได้แก่ *Phanerochaete chrysosporium*, *Ganoderma lucidum*, *Ceriporiopsis subvermispota*, *Coriolus versicolor* เป็นต้น โดยมีการนำความสามารถของราเน่าขาวที่ผลิตเอนไซม์กลุ่มนี้ไปประยุกต์ใช้อย่างแพร่หลาย เช่น การนำไปกำจัดลิกนินในเนื้อไม้เพื่อนำไปผลิตเอทานอล (Akin และคณะ, 1995; Vares และคณะ, 1995) การใช้ในการลดสีในน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม (Prasongsuk และคณะ, 2009) รวมถึงการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตและฟอกเยื่อกระดาษ การศึกษาถึงการผลิตเยื่อกระดาษแบบชีวภาพโดยใช้ราเน่าขาวได้มีการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง ทั้งในแง่ของการค้นหาสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูง และในแง่ของการค้นหาภาวะที่เหมาะสมของกระบวนการ เพื่อให้ได้การผลิตที่มีการใช้สารเคมีและพลังงานไฟฟ้าน้อยลง และมีการพัฒนาคุณภาพกระดาษให้สูงขึ้น โดยมักใช้การผลิตเยื่อแบบชีวภาพร่วมกับการผลิตเยื่อทางกล หรือร่วมกับการผลิตเยื่อเคมี หรือร่วมกับทั้งสองวิธีการ (Masarin และคณะ, 2009; Singh และคณะ, 2010) ในการผลิตเยื่อกระดาษขั้นตอนการผลิตเยื่อเป็นขั้นที่ขึ้นไม้เกิดการแยกของเส้นใยออกจากกันและมีการกำจัดสารที่เป็นองค์ประกอบในเนื้อไม้บางชนิด โดยวิธีการผลิตเยื่อแต่ละวิธีจะให้สมบัติของเยื่อที่ได้แตกต่างกันออกไป ในกรณีของเยื่อที่ผลิตโดยวิธีการทางเคมี เยื่อที่ได้จะมีการแยกของเส้นใยที่สมบูรณ์ และมีความขาวสว่างที่ดีเนื่องจากมีการกำจัดลิกนินออกไปบางส่วน เมื่อนำมาผลิตกระดาษจะได้

กระดาษที่มีค่าความแข็งแรงสูง และสามารถนำไปใช้ในงานได้หลายประเภท วิธีการผลิตเยื่อเคมีจึงถูกนำมาใช้ในการค้าอย่างมาก โดยเฉพาะการผลิตเยื่อแบบคราฟต์ ซึ่งใช้โซเดียมซัลไฟด์และโซเดียมไฮดรอกไซด์ ในการต้มเพื่อผลิตเยื่อ การผลิตวิธีนี้จะมีกลุ่มไฮโดรซัลไฟด์ซึ่งมีความสามารถในการให้อิเล็กตรอนที่ดีในปฏิกิริยาการเปลี่ยนโครงสร้างลิกนิน จะได้กระดาษที่มีเส้นใยยาว มีความแข็งแรงไม่เปราะ จึงถูกนำมาใช้มากที่สุดในปัจจุบัน และในกรณีกระดาษที่ต้องการค่าความขาวสว่างมาก จะผ่านกระบวนการฟอกด้วยสารเคมีอีกขั้นตอนหนึ่ง ดังนั้นในการผลิตเยื่อกระดาษและกระดาษในปัจจุบัน จึงทำให้เกิดสารเคมีเป็นของเสียปริมาณมากซึ่งเป็นปัญหาต่อสิ่งแวดล้อม ในขณะที่ความต้องการใช้กระดาษของประเทศที่เพิ่มสูงขึ้นเป็นปัจจัยผลักดันให้อุตสาหกรรมการผลิตเยื่อกระดาษและกระดาษมีการขยายตัวอย่างต่อเนื่อง (ศูนย์วิจัยกสิกรไทย, 2009) การพัฒนากระบวนการผลิตเพื่อให้เกิดของเสียที่เป็นสารเคมีน้อยลงจึงเป็นสิ่งที่จำเป็น ผู้วิจัยจึงสนใจใช้กระบวนการทางชีวภาพโดยนำราเน่าขาวมาช่วยในการผลิต กระบวนการนี้มีข้อดีหลายประการคือ เป็นวิธีที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม เนื่องจากช่วยลดปริมาณการใช้สารเคมีและของเสียเป็นพิษ (Ferraz และคณะ, 2007) เป็นวิธีที่ช่วยประหยัดพลังงานที่ใช้ (Akhtar และคณะ, 1998, 2000; Maijala และคณะ, 2008) และยังช่วยพัฒนาคุณภาพของกระดาษที่ได้ (Akhtar และคณะ, 1998) โดยในงานวิจัยจะทำการคัดเลือกกระดาษด้วยวิธีการ plate screening method การตรวจสอบแอกติวิตีของเอนไซม์จากระหว่างการปรับสภาพไม้ตลอดจนองค์ประกอบของไม้หลังการปรับสภาพ หากภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพด้วยราที่คัดเลือกได้ร่วมกับวิธีการคราฟต์ โดยตรวจสอบจากสมบัติกระดาษที่ได้และปริมาณต่างที่เหลือหลังการต้มเยื่อ เปรียบเทียบประสิทธิภาพกับการผลิตเยื่อคราฟต์แบบปกติ และเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการปรับสภาพกับราสายพันธุ์อ้างอิง เพื่อใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาการผลิตเยื่อกระดาษที่มีการใช้สารเคมีน้อยลงในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อคัดเลือกราเน่าขาวที่มีประสิทธิภาพในการปรับสภาพไม้ยูคาลิปตัสและหาภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพไม้ร่วมกับการผลิตเยื่อแบบคราฟต์
2. เพื่อเปรียบเทียบสมบัติของเยื่อและกระดาษจากการผลิตด้วยวิธีซีวภาพและเคมี

ขอบเขตงานวิจัย

1. ศึกษาการเจริญของราเน่าขาวสายพันธุ์ต่างๆ
2. ศึกษาการสร้างเอนไซม์ของราและคัดเลือกราที่มีการสร้างเอนไซม์ที่เหมาะสมด้วยวิธีการ plate screening method
3. ศึกษาการสร้างเอนไซม์ของราระหว่างการปรับสภาพไม้
4. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบภายในไม้ระหว่างการปรับสภาพด้วยรา
5. คัดเลือกรามีความเหมาะสมในการปรับสภาพชิ้นไม้
6. ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพชิ้นไม้ด้วยราที่คัดเลือกได้ร่วมกับการผลิตเยื่อกระดาษแบบคราฟต์

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถคัดเลือกราที่มีประสิทธิภาพและทราบภาวะการผลิตที่เหมาะสมในการปรับสภาพไม้ยูคาลิปตัสเพื่อใช้ร่วมกับการผลิตเยื่อกระดาษแบบคราฟต์

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ราเน่าขาว (white rot fungi)

เป็นราที่เจริญอยู่บนเนื้อไม้และใช้สารประกอบในไม้เป็นแหล่งอาหาร เมื่อเจริญบนไม้จะทำให้ไม้เป็นสีขาวเนื่องจากมีการสร้างรากกลุ่มนี้ส่วนใหญ่เป็นสมาชิกในคลาสเบสิดิโอไมซีทิส (Basidiomycetes) เมื่อรากกลุ่มนี้เข้าสู่เนื้อไม้จะทำให้เกิดการผุพัง เนื่องจากราสามารถสร้างเอนไซม์ที่ไปเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของเนื้อไม้ (Akhtar และคณะ, 1998) ซึ่งได้แก่ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และ ลิกนิน โดยเฉพาะอย่างยิ่งเอนไซม์ที่เปลี่ยนแปลงโครงสร้างลิกนิน (lignin modifying enzyme) มีการศึกษาอย่างกว้างขวางถึงประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ของราเน่าขาวชนิดต่างๆ เอนไซม์ที่เปลี่ยนแปลงโครงสร้างลิกนินที่สำคัญ ได้แก่ ลิกนินเปอร์ออกซิเดส แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส และแลคเคส โดยการสร้างเอนไซม์ของราเน่าขาวมีความแตกต่างกันทั้งในแง่ของชนิดและปริมาณ ตลอดจนมี ประสิทธิภาพในการย่อยสลายลิกนินในไม้แต่ละชนิดได้ต่างกัน เช่น *Phanerochaete chrysosporium* BKM พบว่าสามารถย่อยสลายลิกนินในไม้เนื้อแข็งได้ดีกว่าไม้เนื้ออ่อน โดยสามารถดลิกนินในไม้ แอสเพน (aspen) และ เบิร์ช (birch) ได้ถึง 71% และ 80% ตามลำดับ (Blancette และ คณะ, 1988, 1992) ชนิดของราเน่าขาวที่นิยมศึกษาและให้ประสิทธิภาพที่ดีที่สุด ได้แก่ *Phanerochaete chrysosporium*, *Ganoderma lucidum* และ *Ceriporiopsis subvermisporea*, *Coriolus versicolor* เป็นต้น (Singh และคณะ, 2010; Guerra, Mendonca, และ Ferraz, 2005)

2.1.1 เอนไซม์สำคัญที่ได้จากราเน่าขาว

ราเน่าขาวสามารถผลิตเอนไซม์ที่สำคัญ ได้แก่ ลิกนินเปอร์ออกซิเดส แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส และแลคเคส (Singh และคณะ, 2010) โดยเอนไซม์แต่ละชนิดมีโคเอนไซม์ที่จำเป็น ตัวกลางในปฏิกิริยา และการเปลี่ยนแปลงที่เกิดระหว่างการย่อยสลายลิกนินและสารประกอบอะโรมาติกที่แตกต่างกัน

(Akhtar, Blanchette และ Kirk, 1997; Thongkred และคณะ, 2011; Urea และ Reddy, 2012) โดยมีรายละเอียดดังนี้

2.1.1.1 แลคเคส (Laccase; Lac)

เป็นเอนไซม์ในกลุ่มออกซิโดรีดักเทส (Lac, E.C.1.10.3.2) เอนไซม์มีคอปเปอร์ 4 อะตอม เป็นองค์ประกอบ เมื่อแลคเคสถูกออกซิไดซ์ด้วยออกซิเจน (O_2) และสามารถไปออกซิไดซ์สารประกอบอะโรมาติกได้ต่อไป โดยอาจใช้เมดิเอเตอร์ร่วมในปฏิกิริยาดังกล่าว (Thongkred และคณะ, 2011; Urea และ Reddy, 2012)

2.1.1.2 ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (Ligninperoxidase; LiP)

เป็นเอนไซม์ในกลุ่มออกซิโดรีดักเทส (LiP, E.C 1.11.1.14) ที่มีเฟอร์ริก เป็นองค์ประกอบ โดยเมื่อลิกนินเปอร์ออกซิเดสถูกออกซิไดซ์ด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) และเมื่อมี veratryl alcohol จะสามารถไปออกซิไดซ์สารประกอบฟีนอลิกและสารประกอบอะโรมาติกกลุ่มอื่นได้ (Tuor และคณะ, 1995)

2.1.1.3 แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (Manganese peroxidase; MnP)

เป็นเอนไซม์ในกลุ่มออกซิโดรีดักเทส (MnP, E.C. 1.11.1.13) ที่มีเฟอร์ริก ฮีม (ferric heme) เป็นองค์ประกอบ โดยเมื่อแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสถูกออกซิไดซ์ด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) จะสามารถไปออกซิไดซ์ แมงกานีสอิสระ (Mn^{2+}) ให้เปลี่ยนเป็น Mn^{3+} และ Mn^{3+} จะสามารถไปทำปฏิกิริยากับสารที่เป็นกลุ่มอะโรมาติกได้ (Akhtar และคณะ, 1997; Shrestha, 2008; Thongkred และคณะ, 2011)

2.1.2 การใช้ประโยชน์จากราเนาขาว

มีการนำราเนาขาวมาใช้ประโยชน์ในหลายวัตถุประสงค์ วัตถุประสงค์หลักที่มีผู้ให้ความสนใจได้แก่ การใช้ประโยชน์เพื่อการบำบัด (bioremediation) เช่น การใช้อาเนาขาวย่อยสลายของเสียกลุ่มที่

เป็นสารเคมีอินทรีย์ (xenobiotics) ได้แก่ การย่อยสลายสาร chloro-organic pollutants (Urrea และ Reddy, 2012) การย่อยสลาย polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) (Field และคณะ, 1992; Thongkred และคณะ, 2011) การลดสีในน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม (Prasongsuk และคณะ, 2009) และการย่อยสลายตกค้างจากยากำจัดวัชพืช (Fragoero, 2005) เป็นต้น

วัตถุประสงค์ที่สำคัญอีกประการคือการใช้ประโยชน์ทางอุตสาหกรรม ที่นิยมได้แก่ การนำไปปรับสภาพวัสดุลิกโนเซลลูโลสเพื่อนำไปผลิตเอทานอล (Akin และคณะ, 1995; Vares และคณะ, 1995) รวมถึงการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตและฟอกเยื่อกระดาษ โดยใช้ราเน่าขาวปรับสภาพวัสดุก่อนเข้าสู่กระบวนการผลิตเยื่อ หรือใช้เอนไซม์จากราเน่าขาวในการฟอกให้มีความขาวสว่างมากขึ้น (Masarin และคณะ, 2009; Singh และคณะ, 2010)

2.2 การปรับสภาพ (pretreatment)

การปรับสภาพคือขั้นตอนที่ใช้ในการกำจัดลิกนินลดโครงสร้างผลึกของเซลลูโลสและเพิ่มความพรุนให้แก่วัสดุ (Kumar, 2009) โดยสามารถแบ่งได้เป็นวิธีการหลัก ได้แก่

2.2.1 การปรับสภาพด้วยวิธีทางกายภาพ เป็นวิธีการที่ใช้แรงกล เช่นการบด สับ เพื่อลดความเป็นโครงผลึกของเซลลูโลส รวมถึงการใช้รังสี และการใช้ไอน้ำที่อุณหภูมิสูง

2.2.2 การปรับสภาพด้วยวิธีการทางเคมี เป็นการใช้สารเคมีเพื่อให้เกิดการกำจัดลิกนิน โดยสารที่เคมีที่ใช้ แบ่งเป็น 1. สารกลุ่มกรด (acid hydrolysis) ได้แก่ กรดไฮโดรคลอริกและกรดซัลฟิวริก เป็นต้น โดยในอุตสาหกรรมนิยมใช้ในความเข้มข้นต่ำเนื่องจากความเหมาะสมด้านเงินทุนในการสร้างถึงปฏิกรณ์และความเป็นพิษของสารเคมี 2. สารกลุ่มด่าง (alkaline hydrolysis) จะใช้สารกลุ่มด่างเช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ และแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ เป็นต้น มาทำปฏิกิริยากับวัสดุที่อุณหภูมิและความดันต่ำ และ 3. สารกลุ่มตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เมทานอล เอทานอล และอะซิโตน เป็นต้น โดยใช้ร่วมกับกรดในการทำปฏิกิริยาละลายพันธะของลิกนินในวัสดุ (Shrestha, 2008)

2.2.3 การปรับสภาพด้วยวิธีทางชีววิทยา เป็นการปรับสภาพที่ใช้จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการสลายพันธะของโครงสร้างในวัสดุ เป็นวิธีที่ใช้ต้นทุนเครื่องมือและพลังงานในการผลิตต่ำ ในการปรับสภาพด้วยวิธีทางชีววิทยา จะใช้เอนไซม์จากราบางกลุ่ม ได้แก่ ราเน่าขาว (white rot fungi) ราเน่าน้ำตาล (brown rot fungi) เป็นต้น โดยเชื้อราแต่ละกลุ่มจะมีความสามารถในการย่อยสลายองค์ประกอบในวัสดุลิกโนเซลลูโลสได้แตกต่างกัน รากลุ่มที่สามารถย่อยสลายลิกนินในวัสดุและนิยมนำมาใช้ในการปรับสภาพ ได้แก่ ราเน่าขาว (Shrestha, 2008; Tuor, Winterhalter และ Fiechter, 1995)

2.3 การปรับสภาพด้วยราเน่าขาวกับอุตสาหกรรมกระดาษ

อุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษมีความสำคัญต่อการขยายตัวทางเศรษฐกิจและสังคมของประเทศ โดยประเทศมีแนวโน้มความต้องการใช้กระดาษเพิ่มสูงขึ้นเป็นปัจจัยผลักดันให้อุตสาหกรรมการผลิตเยื่อกระดาษและกระดาษมีการขยายตัวอย่างต่อเนื่อง (ศูนย์วิจัยกสิกรไทย, 2009) การวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเยื่อและกระดาษจึงมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง เพื่อลดต้นทุนและพลังงานในการผลิต ลดการใช้สารเคมี ตลอดจนเพื่อปรับปรุงคุณภาพของกระดาษให้เหมาะสมกับวัตถุประสงค์การใช้งาน

การนำราเน่าขาวมาใช้ในการปรับสภาพวัสดุก่อนกระบวนการผลิตเยื่อจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่ถูกนำมาใช้โดยเรียกวิธีการนี้ว่าการผลิตเยื่อด้วยวิธีทางชีวภาพ (biological pulping, biopulping) (Akhtar, 1997)

2.4 กระบวนการผลิตเยื่อ (pulping process)

การผลิตเยื่อเป็นขั้นตอนในการแยกเส้นใยให้เป็นเส้นใยเดี่ยว โดยการใช้แรงกล การกำจัดลิกนินหรือใช้ความร้อนในการทำให้ลิกนินอ่อนตัว เพื่อให้เส้นใยแยกจากกันได้ การผลิตเยื่อแบ่งได้เป็น 3 กระบวนการ

2.4.1 การผลิตเยื่อเชิงกล (mechanical process)

เป็นการผลิตเยื่อที่ใช้แรงในการบด (grinding) เพื่อกระจายเส้นใยออกจากกันโดยใช้ลูกโม่หิน และเครื่องบด มีการพัฒนาโดยนำมาใช้ร่วมกับสารเคมีเรียกว่า กระบวนการเคมีเมคานิคัล (Chemimechanical process-CMP) รวมถึงการให้ความร้อนช่วย เรียกว่า กระบวนการเทอร์โมเมคานิคัล (Thermomechanical process-TMP) ซึ่งให้เยื่อที่มีสมบัติดีขึ้นกว่าการใช้วิธีกลเพียงอย่างเดียว การผลิตเยื่อเชิงกลให้ผลผลิตเยื่อสูงถึงร้อยละ 85 ขึ้นไป เยื่อมีปริมาณลิกนินเหลืออยู่มาก ขนาดเส้นใยสั้น มีสมบัติด้านความเหนียวต่ำ และยังไม่เกิดการแยกเป็นเส้นใยเดี่ยวโดยสมบูรณ์ ส่วนใหญ่นำมาผลิตกระดาษหนังสือพิมพ์ เนื่องจากมีความทึบแสงสูง และมีข้อจำกัดของสมบัติด้านความแข็งแรง และการเหลืองของกระดาษเมื่ออายุการใช้งานเพิ่มขึ้น

2.4.2 การผลิตเยื่อเชิงเคมี (chemical pulping)

เป็นการผลิตเยื่อที่ใช้สารเคมีทำปฏิกิริยากับลิกนินที่ยึดระหว่างเส้นใย เพื่อให้เกิดการแยกเส้นใยจากกัน โดยใช้ความร้อนสูงในการต้มวัตถุดิบกับสารเคมีในหม้อต้มเยื่อ (digester) เยื่อที่ได้มีผลผลิตต่ำกว่าเยื่อเชิงกล โดยอยู่ที่ประมาณ 40-50% ของน้ำหนักแห้งของวัตถุดิบก่อนต้มเยื่อ เยื่อมีการแยกออกเป็นเส้นใยเดี่ยวได้ค่อนข้างสมบูรณ์ลิกนินเหลือน้อย เยื่อมีความแข็งแรงและเหนียว นิยมใช้ในอุตสาหกรรมผลิตกระดาษคุณภาพดีอย่างกว้างขวาง โดยแบ่งตามสารเคมีที่ใช้ ได้เป็น 2 วิธีการหลัก คือ (Casey, 1980; Akhtar, 1997)

2.4.2.1 กระบวนการที่ใช้ด่าง (alkaline process)

เป็นวิธีการที่ใช้สารเคมีกลุ่มด่างในการทำปฏิกิริยา ประกอบด้วย

2.4.2.1.1 กระบวนการโซดา (soda pulping)

เป็นกระบวนการที่ใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เป็นสารเคมีในการต้มเยื่อ แต่การใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์เพียงอย่างเดียวมีข้อจำกัดคือ เส้นใยจะถูกทำลายมาก

2.4.2.1.2 กระบวนการซัลเฟตหรือคราฟต์ (sulphate or kraft process)

เป็นกระบวนการที่พัฒนามาจากกระบวนการโซดา โดยใช้โซเดียมซัลไฟด์ (Na_2S) ร่วมกับโซเดียมไฮดรอกไซด์ในการต้มวัตถุดิบ เส้นใยที่ได้มีการแยกจากกันได้ดี เยื่อมีความแข็งแรงมาก นำมาผลิตกระดาษได้หลากหลายเนื่องาน โดยเฉพาะกระดาษที่มีความเหนียวและความแข็งแรงสูง เยื่อผ่านการฟอกสามารถนำมาผลิตกระดาษพิมพ์เขียนให้กระดาษที่มีคุณภาพสูง (Casey, 1980) ปัจจุบันอุตสาหกรรมนิยมผลิตเยื่อด้วยกระบวนการคราฟต์เนื่องจากให้เยื่อที่มีความแข็งแรงสูง สามารถนำไปฟอกและผลิตกระดาษได้หลายความต้องการ และมีต้นทุนการผลิตต่ำเมื่อใช้การนำสารเคมีกลับไปใช้ใหม่ในระบบ (Emerson process management, 2012)

2.4.2.2 กระบวนการที่ใช้กรด (acid process) สารเคมีที่ใช้ในระบบได้แก่ กรดซัลฟิวรัส (H_2SO_3) และไบซัลไฟด์ไฮไดรเจน (HSO_3)

2.5 วัตถุดิบที่นำมาใช้ผลิตเยื่อและกระดาษ (Casey, 1980; สฐิตารินทร์ สุโรพันธ์, 2552)

วัตถุดิบหลักที่นำมาใช้ผลิตเยื่อและกระดาษ คือ เส้นใย ที่ได้จากส่วนต่างๆของพืช สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทหลัก ได้แก่ เส้นใยจากพืชที่ไม่มีเนื้อไม้ (non woody fiber) และเส้นใยจากพืชที่มีเนื้อไม้ (wood fiber)

2.5.1 เส้นใยจากพืชที่มีเนื้อไม้

พืชที่มีเนื้อไม้สามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภท ตามหลักเกณฑ์ทางพฤกษศาสตร์ ซึ่งพิจารณาจากลักษณะของเส้นใยในเนื้อไม้ ได้แก่

2.5.1.1 ไม้เนื้อแข็ง (hard wood)

เป็นไม้ที่มีลักษณะใบกว้าง (board leaved) ส่วนใหญ่เป็นพืชในตระกูลไม้ผลัดใบ (deciduous) เช่น ยูคาลิปตัส (eucalyptus) ไม้โอ๊ค (oak) และ แอสเพน (aspen) เป็นต้น เส้นใยมีความยาวเส้นใยประมาณ 1-2 มิลลิเมตร ความกว้างเส้นใยประมาณ 19-22 ไมครอน มีความหนาผนังเซลล์ประมาณ 3-5 ไมครอน สามารถนำมาผลิตได้เยื่อใยสั้น

2.5.1.2 ไม้เนื้ออ่อน (softwood)

เป็นไม้ที่มีลักษณะใบแคบ ใบรูปเข็ม ไม่ผลัดใบ ส่วนใหญ่เป็นไม้ตระกูลสน เช่นสนสองใบ สนปรุช (spruce) เส้นใยมีลักษณะยาวประมาณ 3-5 มิลลิเมตร กว้าง 36-43 ไมครอน และมีความหนาของผนังเซลล์ของเส้นใย 5-11 ไมครอน เมื่อนำมาผลิตเส้นใยจะได้เยื่อใยยาว

2.5.2 เส้นใยจากพืชที่ไม่มีเนื้อไม้

เส้นใยจากพืชที่ไม่มีเนื้อไม้ได้ถูกนำมาใช้ตั้งแต่ยุคแรกของการทำกระดาษ ซึ่งเป็นเวลาหลายร้อยปีก่อนค้นพบการนำพืชที่มีเนื้อไม้มาใช้ทำกระดาษ พืชและส่วนของพืชกลุ่มนี้ ได้แก่ ปอแก้ว สับปะรด ชานอ้อย ฟางข้าว และวัชพืชต่างๆ เช่น กกธูปฤาษี หญ้าคา ผักตบชวา เป็นต้น

2.5.3 องค์ประกอบของเส้นใย (fiber structure)

เส้นใยในเนื้อไม้เป็นเซลล์ที่มีลักษณะ เป็นทรงกระบอก กลวง โดยมีความยาวและความกว้างแตกต่างกันตามแต่ชนิดของเส้นใยและชนิดของไม้ ช่องว่างตรงกลางเส้นใยเรียก ลูเมน (lumen) พบที่บริเวณผนังเซลล์เรียงเป็นแนวยาวเรียก พิต (pit) เส้นใยที่พบในไม้เนื้ออ่อนจะเป็นเซลล์เทรคีดที่วางตัวในแนวตั้ง (vertical tracheids) เซลล์อีพิทีเลียม (epithelial cell) หรือเรซินคาแนล (resin canal) และเซลล์เรย์ (ray cells) ส่วนเส้นใยที่พบในไม้เนื้อแข็ง มีความซับซ้อนกว่า โดยประกอบด้วย longitudinal fibers, vessel elements และ ray cells (Hakala, 2007)

เส้นใยประกอบด้วยชั้นของผนังหลัก ได้แก่ ผนังเซลล์ปฐมภูมิ (primary cell wall) ผนังเซลล์ทุติยภูมิ (secondary cell wall) และมิดเดิลลามลลาร์ (middle lamella) ซึ่งอยู่ระหว่างผนังชั้นปฐมภูมิของเซลล์ที่อยู่ติดกัน และเนื่องจากมิดเดิลลามลลาร์แยกออกจากผนังเซลล์ปฐมภูมิในแต่ละด้านได้ยาก จึงมีคำเรียกว่า compound middle lamella ซึ่งใช้ในการเรียกผนังทั้งสองชั้นร่วมกัน โดยในผนังเซลล์ของเส้นใยแต่ละชั้นมีรายละเอียด ดังนี้ (Gullichsen and Fogelholm, 1999)

2.5.3.1 มิดเดิล ลามลลาร์ (middle lamella) เป็นชั้นที่อยู่ระหว่างผนังชั้นปฐมภูมิของเซลล์ที่อยู่ติดกัน มีความหนาประมาณ 0.2-1.0 ไมครอน ขึ้นกับชนิดและระยะการเจริญ โครงสร้างไม่สม่ำเสมอ มีรูค่อนข้างมาก

2.5.3.2 ผนังเซลล์ปฐมภูมิ (primary cell wall) เป็นชั้นที่มีลักษณะค่อนข้างบาง (0.05-0.1 ไมครอน) มีการจัดเรียงของ cellulose microfibril ที่เรียงกันอย่างไม่เป็นทิศทาง

2.5.3.3 ผนังเซลล์ทุติยภูมิ (secondary cell wall) อยู่ถัดจาก primary cell wall เข้ามาในเซลล์ มีความหนามากกว่า middle lamella และ primary cell wall โดยชั้น secondary cell wall จะถูกห่อหุ้มด้วยเฮมิเซลลูโลส และลิกนินเป็นส่วนใหญ่ สามารถแบ่งชั้นนี้ออกได้อีกเป็น 3 ชั้น ตามการจัดเรียงตัวของ microfibrils

2.5.3.3.1 ชั้น S_1 (outer secondary wall) อยู่ติดกับ primary cell wall มีความหนาใกล้เคียงกัน มีการเรียงตัวของ microfibrils เป็นรูปตัว s หรือบันไดเวียน ทำมุมกับแกนยาวของเส้นใยประมาณ 60°

2.5.3.3.2 ชั้น S_2 (middle secondary wall) อยู่ถัดเข้ามา เป็นชั้นที่มีความหนามากที่สุด ประมาณ 10-30 ไมครอน และมีลักษณะการจัดเรียงตัวของ microfibril แบบบันไดเวียน หรือรูปก้นหอย (helix) มีความชันมากกว่าชั้น S_1 ทำมุม 20° แก่ กับแนวแกนยาวของเส้นใย

2.5.3.3.3 ชั้น S_3 (inner secondary wall) เป็นชั้นที่อยู่ติดกับ lumen มีลักษณะการจัดเรียงตัวของ microfibril คล้ายตัว Z ซึ่งมีความใกล้เคียงกับแนวตัดขวางมากที่สุด

นอกจากนี้ในเซลล์ทราเคอิด (tracheid) ของสน และเซลล์บางส่วนในไม้เนื้อแข็งยังพบชั้นที่อยู่ถัด secondary cell wall เข้าไปด้านในเซลล์ เรียกวอร์ติเลเยอร์ (warty layer) เป็นชั้นของเยื่อบางๆ ติดกับชั้น S_3 นอกจากนี้เส้นใยยังพบช่องกลวงตรงกลางเซลล์เรียกว่า ลูเมน (lumen) เป็นบริเวณที่เกิดการสลายของเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์หลังการสะสม secondary cell wall

2.5.4 เคมีของเส้นใย (fiber chemistry) (Casey, 1980; หรรษา ปุณณะพยัคฆ์, 2553)

เส้นใยมีองค์ประกอบทางเคมี 4 ส่วนหลัก ได้แก่

2.5.4.1 เซลลูโลส (cellulose)

เป็นสอมอพอลิเมอร์ของ ดี-กลูโคส เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ บีต้า 1,4 ไกลโคซิดิก (β 1,4 glycosidic linkage) โดยมีหน่วยย่อย (monomer) เป็นน้ำตาลกลูโคส (glucose, $C_6H_{12}O_6$) เชื่อมต่อเป็นพอลิเมอร์ มีลักษณะเป็นเส้นตรง มีระดับของการเป็นพอลิเมอร์ (degree of polymerization) ประมาณ 10,000 หน่วย ประกอบด้วยส่วนที่เรียงตัวเป็นระเบียบและไม่เป็นระเบียบ ส่วนที่เป็นผลึก (crystallinity) มีประมาณ 60-80% มีน้ำหนักโมเลกุลสูง

เซลลูโลสไม่ละลายน้ำหรือตัวทำละลาย สามารถทำปฏิกิริยาได้ดีกับกรดแก่ ในเส้นใยประกอบด้วยเซลลูโลสประมาณ 45%

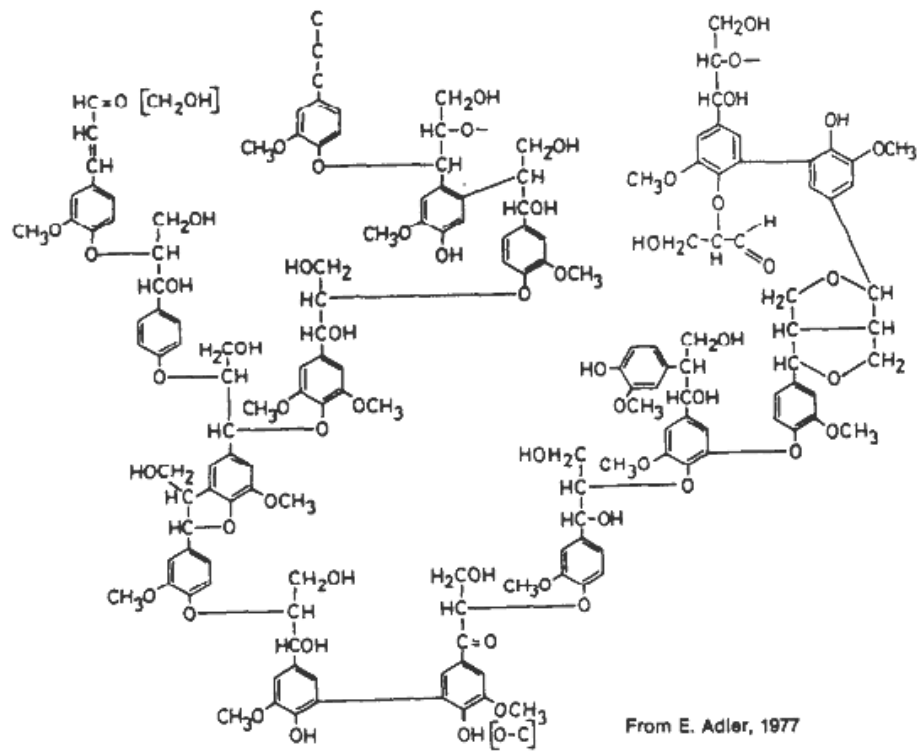
2.5.4.2 เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose)

เป็นเฮเทอโรพอลิเมอร์ (heteropolymer) ที่มีหน่วยย่อยเป็นน้ำตาลคาร์บอน 5 อะตอม (pentose, C5) ประกอบด้วย ไซโลส (xylose) อะราบินอส (arabinose) และ น้ำตาลคาร์บอน 6 อะตอม (hexose, C6) ประกอบด้วย กลูโคส (glucose) แมนโนส (mannose) กาแลคโตส (galactose) มีระดับของการเป็นพอลิเมอร์ประมาณ 200 หน่วย มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่าเซลลูโลส โครงสร้างมีลักษณะเป็นกิ่งก้านอยู่ล้อมรอบเซลลูโลส เชื่อมต่อกับเซลลูโลสด้วยพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) สามารถสลายตัวได้ง่ายเมื่อถูกความร้อน อุณหภูมิ และพองตัวได้ดี ในพืชมีหน้าที่ให้ความแข็งแรงกับเส้นใย เฮมิเซลลูโลสในไม้เนื้อแข็งเป็นพวกไซแลน (xylan) ส่วนในไม้เนื้ออ่อนเป็นพวก กลูโคแมนแนน (glucomannan)

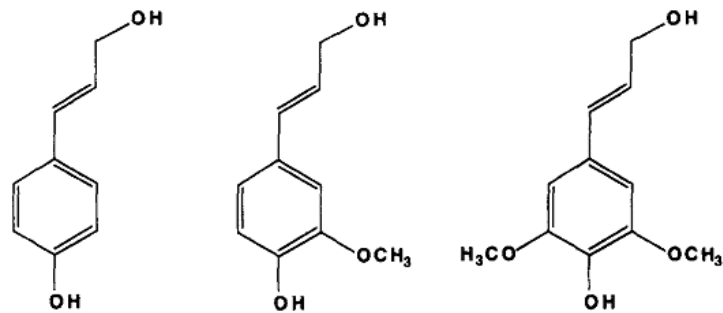
2.5.4.3 ลิกนิน (lignin)

ลิกนินเป็นสารประกอบอะโรมาติก (aromatic compound) โดยเป็นพอลิเมอร์ของ phenylpropane units ที่มีการเชื่อมต่อกันด้วยพันธะคาร์บอน (carbon bond, C-C) และอีเธอร์ (ether bond, C-O-C) ในหลายรูปแบบ เป็นสารประกอบที่มีโครงสร้างขนาดใหญ่และซับซ้อน และเป็นอสัณฐาน (amorphous) (รูปที่ 2.1) ที่มีโครงสร้างหลัก (building block) 3 ชนิด ได้แก่ paracoumaryl

alcohol หรือเรียกว่า *p*-coumaryl alcohol (*p*-hydroxyphenyl), coniferyl alcohol (guaiacyl) และ sinapyl alcohol (syringyl) โดยในไม้เนื้ออ่อนจะพบโครงสร้างหลักที่เป็น coniferyl alcohol เป็นส่วนใหญ่ ส่วนลิกนินในไม้เนื้อแข็งจะพบ sinapyl alcohol และ *p*-coumaryl alcohol (รูปที่ 2.2) เป็นโครงสร้างหลัก เป็นสารที่พบมากในชั้น middle lamellar



รูปที่ 2.1 โครงสร้างของลิกนิน (Kirk, 1985)

*p*-coumaryl alcohol

coniferyl alcohol

sinapyl alcohol

รูปที่ 2.2 หน่วยย่อยที่เป็นโครงสร้างหลักของลิกนิน

2.5.4.4 สารแทรก (extractive)

เป็นสารประกอบที่มีความหลากหลาย อยู่ตามส่วนต่างๆของพืช ตัวอย่างเช่น สารจำพวกขี้ผึ้ง (wax) และไขมัน (fat) พบสะสมอยู่ในเซลล์พาราไคมา สารจำพวกกรดเรซิน พบในท่อเรซิน (resin canal) บริเวณลำต้น สารจำพวกน้ำยาง (latex) ซึ่งพบในท่อน้ำยาง (latex canal) สารแทรกจำพวกฟีนอลิก (phenolic extractive) พบในเนื้อไม้และเปลือกไม้ เป็นต้น

2.6 ไม้ยูคาลิปตัส (เกษมสุข เกษสกุล, 2533; Lindsay, 1976)

ยูคาลิปตัสเป็นพันธุ์ไม้ที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศออสเตรเลีย และแถบหมู่เกาะอินโดมาเลเซียน ยูคาลิปตัสมีหลายสายพันธุ์ ปัจจุบันมีการนำมาปลูกนอกถิ่นกำเนิด สามารถพบได้ทั้งในเขตร้อนและเขตหนาว โดยในประเทศไทยมีการปลูกสายพันธุ์ต่างๆ ที่นิยมได้แก่ *Eucalyptus camaldulensis*, *Eucalyptus alba* นิยมปลูกทั่วประเทศ *Eucalyptus grandis* นิยมปลูกในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เป็นต้น โดยสายพันธุ์ที่นำมาใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ได้แก่ *Eucalyptus camaldulensis*

2.6.1 การจัดจำแนกทางอนุกรมวิธาน (taxonomic classification)

Division: Magnoliophyta

Class: Magnoliopsida

Order: Myrtales

Family: Myrtaceae

Genus: *Eucalyptus*

Species: *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh., *Eucalyptus rostrata* Schecht

ชื่อสามัญ: River red gum, Red gum, River gum (Lindsay, 1976)

2.6.2 ลักษณะทั่วไปและข้อมูลของ *Eucalyptus camaldulensis* ที่ปลูกในประเทศไทย

เป็นไม้ยืนต้นขนาดใหญ่ สูงประมาณ 24-50 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลางระดับอกใหญ่ที่สุดประมาณ 2 เมตร เปลือกตรง เปลือกเรียบสีเทาขาวอมชมพู มีการลอกออกเมื่อเปลือกส่วนในเจริญ ใบเรียวยาว ดอกคล้ายดอกบัว ส่วนล่างเป็นรูปถ้วยมีฝาปิด (operculum) มีการขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ดและแตกหน่อ มีส่วนที่เรียกว่าลิกโนทิวเบอร์ (lingotuber) อยู่บริเวณใบเลี้ยงคู่แรก ซึ่งมีหน้าที่สะสมอาหาร และมีตาเจริญอยู่ภายใน มีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดการเจริญของต้นใหม่เมื่อส่วนที่อยู่เหนือดินถูกทำลายซึ่งทำให้สามารถเจริญใหม่เมื่อตัดลำต้นไปใช้ รากมีการเจริญเติบโตเร็วและดูดน้ำได้อย่างมีประสิทธิภาพจึงทนทานต่อสภาวะวิกฤตหลายประการ

ยูคาลิปตัสสามารถโตได้เร็ว เจริญเติบโตในทางสูงปีละ 2-4 เมตร ทางเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2-3 เซนติเมตรต่อปี ผลผลิตที่เป็นเนื้อไม้มีอัตราการเจริญประมาณ 2-5 ลูกบาศก์เมตรต่อปีต่อไร่ ให้เนื้อไม้เป็นสีแดง แก่นสีแดงเข้มหรือน้ำตาล ค่อนข้างเรียบเป็นมัน มีความแข็งแรงมาก สายพันธุ์นี้เมื่อทดลองปลูกในประเทศไทยแล้วพบว่าอัตราการเจริญเติบโตดีที่สุด และมีอัตราการตายในระดับต่ำมาก ยูคาลิปตัสเป็นวัชตฤติบที่สำคัญในการผลิตกระดาษ เมื่อเจริญ 3-5 ปี เนื้อไม้มีความเหมาะสมในการผลิตกระดาษ โดยให้เส้นใยสั้น (0.4-1.6 มิลลิเมตร) ให้ปริมาณเซลลูโลสสูง สมบัติทางฟิสิกส์ของ

เยื่อสูง สามารถนำไปผลิตกระดาษเหนียวที่ผ่านและไม่ผ่านการฟอกได้ดี นอกจากนี้ยังสามารถใช้ในอุตสาหกรรมพลังงาน ไม้อัด และใช้เป็นวัสดุในการก่อสร้างได้ (เกษมสุข เกษสกุล, 2533)

2.7 กระดาษและสมบัติของกระดาษ

กระดาษคือ วัสดุที่มีลักษณะเป็นแผ่นราบบาง ประกอบด้วยส่วนที่เป็นเยื่อและไม่เป็นเยื่อ โดยกระดาษมีหลายชนิดและมีสมบัติแตกต่างกันไป ตามวัตถุประสงค์การใช้งาน สมบัติของกระดาษที่สำคัญ ประกอบด้วย

2.7.1 สมบัติทางโครงสร้างของกระดาษ (Levlin และ Soderhjelm, 1999)

2.7.1.1 น้ำหนักพื้นฐาน (basis weight) คือ น้ำหนักต่อหน่วยพื้นที่มาตรฐาน (หน่วยที่นิยมใช้เป็นกรัมต่อตารางเมตร) ที่เก็บรักษาในอุณหภูมิและความชื้นที่ใช้ควบคุมมาตรฐานการทดสอบ

2.7.1.2 ความหนา (thickness) คือระยะห่างที่ตั้งฉากระหว่างผิวด้านนอกและผิวด้านล่างของกระดาษภายใต้สภาวะทดสอบที่กำหนด หน่วยเป็นไมโครเมตร ใช้เครื่องไมโครมิเตอร์ในการวัด (แต่ส่วนใหญ่วัดเป็นมิลลิเมตร)

2.7.1.3 ความพรุน (porosity) คือช่องว่างภายในของเนื้อกระดาษที่อากาศสามารถไหลผ่านได้ หน่วยที่ใช้วัดเป็นวินาที หรือ มิลลิเมตรต่อวินาที

2.7.1.4 ทิศทางของเส้นใยและความแตกต่างของผิวกระดาษทั้งสองด้าน (two sidedness) เป็นค่าความแตกต่างของเนื้อกระดาษและความแตกต่างของกระดาษในแนวทั้งสองและความแตกต่างของกระดาษระหว่างด้านทั้งสอง

2.7.2 สมบัติเชิงกล (mechanical properties)

เป็นสมบัติที่เกี่ยวข้องกับความแข็งแรงของกระดาษ สมบัติเชิงกลที่นิยมใช้ ได้แก่

2.7.2.1 ความแข็งแรงต่อแรงดึง (tensile strength) คือ ความสามารถของกระดาษในการรับแรงดึงได้สูงสุดก่อนขาดออกจากกัน หน่วยเป็น แรงต่อความกว้างของชิ้นทดสอบ เช่น กิโลนิวตันต่อเมตร ปอนด์ต่อนิ้ว

2.7.2.2 ความแข็งแรงต่อแรงดันทะลุ (burst strength) คือ ความสามารถของกระดาษที่ทนแรงดันได้สูงสุดเมื่อได้รับแรงกระทำในทิศทางตั้งฉากต่อผิวหน้ากระดาษ มีหน่วยเป็นกิโลพาสคาล (kPa) หรือ กรัมต่อตารางเซนติเมตร หรือปอนด์ต่อตารางนิ้ว

2.7.2.3 ความแข็งแรงต่อแรงฉีกขาด (tear strength) คือ ความสามารถของกระดาษที่ต้านแรงซึ่งทำให้ชิ้นทดสอบหนึ่งชิ้นขาดออกจากรอยฉีกนำเดิม หน่วยที่วัดเป็น มิลลินิวตันต่อกรัม

2.7.3 สมบัติเชิงแสง (optical properties)

เป็นสมบัติที่เกิดจากการที่แสงตกกระทบกระดาษ และเกิดปรากฏการณ์ต่างๆ ได้แก่ การสะท้อน การกระเจิง การดูดกลืน สมบัติเชิงแสงที่สำคัญ ได้แก่

2.7.3.1 ความขาวสว่าง (brightness) ในทางเยื่อและกระดาษ หมายถึง ค่าสะท้อนแสงสีน้ำเงินที่ความยาวคลื่น 457 นาโนเมตร

2.7.3.2 ความทึบแสง (opacity) สามารถวัดโดยเปรียบเทียบค่าการสะท้อนแสงสีเขียวที่ความยาวคลื่น 557 นาโนเมตร ระหว่างกระดาษหนึ่งแผ่นที่รองหลังด้วยพื้นสีดำสนิทกับกระดาษที่วางซ้อนจนแสงไม่สามารถทะลุผ่านได้ เป็นต้น

2.8 การปรับสภาพโดยใช้ราเน่าขาวร่วมกับวิธีทางเคมีเพื่อผลิตเยื่อกระดาษ

การใช้ราเน่าขาวเพื่อปรับสภาพวัสดุได้รับความสนใจตลอดมา ตั้งแต่มีการค้นพบเอนไซม์ของรากลุ่มนี้ โดยได้มีการนำราเน่าขาวชนิดต่างๆมาศึกษาประสิทธิภาพในการกำจัดลิกนิน ตลอดจนผลของราที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบต่างๆภายในไม้ จากการศึกษาประสิทธิภาพของราเน่าขาว *Phanerochaete chrysosporium* 19 สายพันธุ์ และ *Ceriporiopsis subvermispora* 9 สายพันธุ์ ที่เก็บจากพื้นที่ที่มีความแตกต่างกัน พบว่า *Phanerochaete chrysosporium* BKM มีความสามารถในการ

ลดปริมาณลิกนินได้สูงถึง 71-80% ในไม้ผลัดใบ ในขณะที่ *Ceriporiopsis subvermispora* สามารถกำจัดลิกนินได้ระดับใกล้เคียงกัน ทั้งในไม้ผลัดใบและไม้ไม่ผลัดใบ แต่อยู่ในระดับที่น้อยกว่า ซึ่งจากการศึกษาแสดงให้เห็นว่า ประสิทธิภาพของราเนาขาวในการย่อยสลายองค์ประกอบภายในไม้ และความจำเพาะต่อการย่อยสลายลิกนิน รวมถึงประสิทธิภาพของการย่อยสลายเนื้อไม้ไม่มีความแตกต่างกันตามชนิดและสายพันธุ์ ตลอดจนพื้นที่ที่รามีการเจริญ (Blanchette และคณะ, 1992)

จากการศึกษาประสิทธิภาพของราเนาขาวในการย่อยสลายองค์ประกอบของไม้ชนิดต่างๆ รวมถึงการศึกษาแอกติวิตีของเอนไซม์ที่เกิดขึ้นระหว่างการปรับสภาพไม้ ทำให้ทราบข้อมูลเกี่ยวกับธรรมชาติของรา และข้อมูลเกี่ยวกับการทำงานของเอนไซม์รวมถึงภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพ จากงานวิจัยที่ศึกษาการปรับสภาพไม้ *Acacia mangium* เป็นเวลา 10-60 วัน ด้วยราสายพันธุ์เขตร้อน (*Trametes versicolor*, *Phellinus* sp., *Pycnoporus coccineus* และ *Daedalea* sp.) โดยใช้เส้นใยราที่ผ่านการโฮโมจีไนส์ (homogenize mycelium) พบว่ารามีการเจริญบนวัสดุอย่างทั่วถึง ระยะเวลาที่ให้ผลดีที่สุด คือ 50 วัน เอนไซม์ที่ราทั้ง 3 ชนิดมีการผลิตมากที่สุด คือ แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส แลคเคส และ ลิกนินเปอร์ออกซิเดส ตามลำดับ โดยแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสจะเป็นเอนไซม์หลักในการย่อยสลายลิกนินเมื่อมี Mn^{2+} เพียงพอ ในในระบบ แลคเคสจะแสดงประสิทธิภาพได้ดีเมื่อมีคอปเปอร์ (copper) เป็นตัวชักนำ (inducer) ในปฏิกิริยา นอกจากนี้ยังพบว่าแอกติวิตีของเซลล์ของราทั้ง 3 ชนิด มีค่าต่ำมากหรือไม่พบ ซึ่งเหมาะสมต่อการใช้ในการปรับสภาพวัสดุเพื่อผลิตกระดาษ (Liew และคณะ, 2011) และในการปรับสภาพไม้สนด้วยรา *Pleurotus* sp. ที่ความชื้น 80% เป็นเวลา 45, 90 และ 120 วัน พบว่าชุดการทดลองที่ให้ผลผลิตดีที่สุดอยู่ที่ 80-110 วัน ซึ่งแสดงถึงผลของระยะเวลาการเจริญของราที่มีผลต่อการย่อยสลายที่เกิดขึ้น (Molina และคณะ, 2000) นอกจากนี้การให้แหล่งอาหารเพิ่มเติมยังมีผลช่วยให้ราเจริญเร็วขึ้นและมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายองค์ประกอบดีขึ้น จากการศึกษาการเพิ่มน้ำแช่ข้าวโพด (Corn Steep Liquor, CSL) ซึ่งเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่ผลิตจากกระบวนการในอุตสาหกรรม ประกอบด้วย ส่วนที่เป็นเปปไทด์ น้ำตาล กรดแลคติก วิตามิน และเมทัลลิกไอออน (metallic ions) ในการปรับสภาพไม้ยูคาลิปตัสด้วยราเนาขาว พบว่า CSL ให้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ซึ่งช่วยให้ราเกิดการสร้างโคโลนีบนไม้ในช่วงเริ่มต้นได้ดีขึ้น และเพิ่มประสิทธิภาพในการทำงานของแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (Vicentim, 2006)

การปรับสภาพไม้ด้วยราเน่าขาวก่อนการผลิตเยื่อ พบว่ามีข้อดีหลายประการ จากการศึกษา การปรับสภาพไม้สนด้วยรา *Pleurotus* sp. ที่ความชื้น 80% เป็นเวลา 45, 90 และ 120 วัน พบว่า ผลผลิตเยื่อเฉลี่ยที่ได้มีค่า 49.2% สูงกว่าชุดควบคุม ซึ่งมีค่า 47.6% (Molina และคณะ, 2000)

ในการย่อยสลายไม้ยูคาลิปตัส (*Eucalyptus grandis*) พบว่าราที่มีการผลิตแลคเคส และ แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส โดยช่วยทำให้ลิกนินลดลงจาก 2.9 เป็น 11.7% เมื่อบ่มเป็นเวลา 15-90 วัน ช่วยให้สารแทรกลดลง 42% เมื่อผ่านไป 90 วัน (Ferraz และคณะ, 2002) นอกจากนี้ในการปรับสภาพ ไม้ยูคาลิปตัส (*Eucalyptus grandis*) ด้วยรา *Ceriporiopsis subvermispora* พบว่าสามารถลดลิกนิน ได้ $7.6 \pm 0.2\%$ ของ lignin และช่วยลดสารแทรกได้ $17.7 \pm 0.2\%$ และเมื่อต้มด้วยอัลคาไลน์ซัลไฟต์ (alkaline sulfite) พบว่าส่วนที่ไม่ใช่เยื่อ (reject) มีปริมาณลดลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุม เวลาในการบด (beating time) ลดลง 24% และสมบัติด้านความแข็งแรงเพิ่มขึ้น (Guerra และคณะ, 2005) ซึ่ง สอดคล้องกับการปรับสภาพไม้เนื้ออ่อนและไม้เนื้อแข็งเพื่อผลิตเยื่อคราฟต์พบว่าราสามารถพัฒนา ความแข็งแรงของกระดาษ (bursting index, tensile index, tearing index) ให้เพิ่มขึ้นได้ (Wolfaardt และคณะ, 2004) รวมถึงการใช้ราเน่าขาวร่วมกับการผลิตเยื่อเคมียังช่วยลดการใช้สารเคมีในกระบวนการ ต้มเยื่อ ซึ่งสามารถลดการปล่อยของเสียที่เป็นมลภาวะและแก๊สที่เป็นอันตรายให้น้อยลงได้ (Yadav และคณะ, 2010)

บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

อุปกรณ์	บริษัท / ประเทศ
เครื่องเขย่า (Shaker) รุ่น SPL 15	Labcon/The Republic of South Africa
หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave)	Ta Chang Medical Instrument Faculty/ Taiwan
เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น PP-50	Sartorius/ Germany
เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่งรุ่น BL610	Sartorius/ Germany
เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่งรุ่น TC-205	Denver Instrument Company/ USA
ตู้เขี่ยเชื้อแบบ Laminar flow รุ่น BV 123	ZISSOC/ Thailand
ตู้อบ (Hot air oven)	Binder/ USA
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV/ Vis Spectrophotometer) รุ่น 2800	Unico/ USA
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV/ Vis Spectrophotometer) รุ่น HP 8453	Agilent/ USA
เครื่องดูดสูญญากาศ (Vacuum pump)	GAST manufacturing Incorporated/ USA
เครื่องบดเยื่อ (Valley beater รุ่น UEC-2018A	Universal engineering corporation/ India
เครื่องต้มเยื่อ (Autoclave digester)	Universal engineering corporation/ India
เครื่องตีกระจายเยื่อ (Disintegrator) รุ่น T-292	Adirondack Machine Corporation/ USA
เครื่องวัดค่าสภาพระบายน้ (Freeness tester) รุ่น LTDA	Regmed/ Brazil

อุปกรณ์	บริษัท / ประเทศ
เครื่องขึ้นแผ่นกระดาษ (Sheet former)	
รุ่น Rapid-Köthen Blattbildner	PTI Laboratory Equipment/ Austria
เครื่องวัดความหนาของกระดาษ (Thickness tester)	Micro Meter/ บริษัท Loretzen
เครื่องวัดความแข็งแรงต่อแรงดึง (Tensile tester)	
รุ่น Strongraph E-S)	Toyoseiki Seisaku-SHO LTD/ Japan
เครื่องวัดความแข็งแรงต่อแรงฉีกขาด (Tear tester) รุ่น Protear Thwing Albert Instrument/ USA	
เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (0.005-4.000 g) รุ่น TB-4002	Denver Instrument/ Germany
เครื่องวัดความชื้น (Moisture determination balance)	
รุ่น KettFD-600	Kett Electric Laboratory/ USA
ตู้อบ (Oven)	Venticell/ Germany
เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH-meter)	Denver Instrument/ Germany
เครื่องวัดความขาวสว่างและความทึบแสง รุ่น Color Touch ISO Technidyne corporation/ USA	
หม้อต้ม (boiler)	Selecta/ UK
เครื่องโฮโมจีไนซ์เซอร์ (homogenizer) รุ่น omni TH	Omni/ USA

3.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย	บริษัท/ ประเทศ
กรดไฮโดรคลอริก (HCl)	Schrlau/ Spain
กลูโคส (C ₆ H ₁₂ O ₆)	Sigma/ USA
แคลเซียมคลอไรด์ ไดไฮเดรต (CaCl ₂ · 2H ₂ O)	Carlo Erba Reagent/ Italy
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (ZnSO ₄ · 7H ₂ O)	May & Baker/ England
ซูโครส (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁)	Carlo Erba Reagent/ Italy
เปปโตน (Peptone)	Difco/ USA
โปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH ₂ PO ₄)	Ajax Finechem/ Australia
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (MgSO ₄ · 7H ₂ O)	Carlo Erba Reagent/ Italy
แมงกานีสซัลเฟตเตตระไฮเดรต (MnSO ₄ · 4H ₂ O)	Carlo Erba Reagent/ Italy
เอปี้ทีเอส (2,2 –azinobis 3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) (C ₁₈ H ₁₈ N ₄ O ₆ S ₄)	Sigma/ USA
โซเดียมลอริลซัลเฟต (CH ₃ (CH ₂) ₁₁ OSO ₃ Na)	Ajax Finechem/ Australia
ไดโซเดียมเอทิลีนไดอะมีนเตตระอะซิเตท (EDTA) (C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈)	Mallinckrodt biotechnology/ USA
โซเดียมบอเรตเดคะไฮเดรต (Na ₂ B ₄ O ₇ · 10H ₂ O)	Ajax Finechem/ Australia
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na ₂ HPO ₄)	Merck/ Germany
เอทิลีนไกลคอลโมโนเอทิลอีเทอร์ (C ₄ H ₁₀ O ₂)	Merck/ Germany

สารเคมี	บริษัท/ ประเทศ
โซเดียมซัลไฟด์ (Na_2S)	Merk/ Germany
เดคะไฮโดรแนพทาลีน ($\text{C}_{10}\text{H}_{18}$)	Fluka/ Switzerland
อะซีโตน ($\text{CH}_3)_2\text{CO}$)	Merck/ Germany
กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4)	Merck/ Germany
ซีทิลไตรเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ (Cetyl trimethylammonium bromide, CTAB)	Ajax Finechem/ Australia
โปแตสเซียมเปอร์แมงกาเนต (KMnO_4)	Carlo Erba/ Italy
ซิลเวอร์ซัลเฟต (Ag_2SO_4)	Carlo Erba/ Italy
เฟอริกไนเตรตนาโนไฮเดรต ($\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$)	APS
ซิลเวอร์ไนเตรต (AgNO_3)	Merck/ Germany
โปแตสเซียมอะซิเตต ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$)	Scharlau
กรดอะซิติก, เกรเซียล (CH_3COOH)	Merck/ Germany
เทอร์เชียรี บิวทิล แอลกอฮอล์ (Tertiary butyl alcohol, Butanol)	APS
กรดออกซาลิกไดไฮเดรต (Oxalic acid dihydrate)	Carlo Erba/ Italy
เอทานอล 95% ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$)	Fisher/ USA
กรดไฮโดรคลอริก (HCl)	Merck/ Germany

3.3 วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.3.1 เลี้ยงราเนาขาวสายพันธุ์ต่างๆ

เลี้ยงราเนาขาวสายพันธุ์ต่างๆ ที่ได้จากหน่วยปฏิบัติการใช้ประโยชน์จากชีวมวลพืช ภาควิชาพฤกษศาสตร์จำนวน 14 ไอโซเลต และสายพันธุ์อ้างอิง (*Phanerochaete chrysosporium*) ซึ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสในอาหารสูตร Malt Extract Agar (MEA) (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน หรือจนกว่าเส้นใยจะเจริญเต็มจานเพาะเลี้ยง

3.3.2 คัดเลือกรามีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ที่เหมาะสม

3.3.2.1 นำราที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมาทดสอบการสร้างเอนไซม์ลิกนินในไลติกได้แก่ แลคเคส ลิกนินเปอร์ออกซิเดส และแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสของรา โดยใช้คอร์กบอเรียจาะเส้นใยราที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร MEA ขนาด 1 เซนติเมตร วางบนอาหารแข็งสูตร Lignin modifying enzyme basal medium (LMB) (ภาคผนวก ก) ที่มีการเติมสารสำหรับทดสอบเอนไซม์ชนิดต่างๆ ได้แก่ 3-ethylbenzthiazoline-5-sulphonate (ABTS) 0.001% สำหรับทดสอบแลคเคส เติม Azure-B 0.001 สำหรับทดสอบลิกนินเปอร์ออกซิเดส เติม phenol red 0.01% สำหรับทดสอบแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (Pointing, 1999) บ่มที่อุณหภูมิห้อง ($30\pm 2^{\circ}\text{C}$) ในที่มืด เป็นเวลา 3-7 วัน และบันทึกผลการทดสอบโดยสังเกตจากการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารแข็ง ถ้ามีการสร้างเอนไซม์ อาหารแข็งที่ใช้ทดสอบจะเปลี่ยนจากสีขาวเป็นสีเขียว จากสีน้ำเงินเป็นใสไม่มีสี และจากสีเหลืองเป็นสีแดง เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ทดสอบแลคเคส ลิกนินเปอร์ออกซิเดส และแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส ตามลำดับ

3.3.2.2 ทดสอบการสร้างเซลล์ของรา โดยใช้คอร์กบอเรียจาะเส้นใยราที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร MEA ขนาด 1 เซนติเมตร วางบนอาหารแข็งสูตร Cellulolysis Basal Medium (CBM) (ภาคผนวก ก) โดยใช้ Carboxymethyl Cellulose (CMC) เป็นสารตั้งต้นในการทดสอบ บ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด จนมีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีประมาณ 3 เซนติเมตร นำสารละลายแกรมไอโอดีน (Gram's iodine) (โพแทสเซียมคลอไรด์ (KI) 2.0 กรัม ไอโอดีน (iodine) 1.0 กรัม และน้ำกลั่น 300

มิลลิลิตร) เทให้ท่วมโคโลนีทิ้งไว้ 3-5 นาที อาหารแข็งจะติดสีน้ำตาลเข้มของสารละลายแกรมไอโอดีน บันที่กผลโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณที่ไม่เกิดการติดสีรอบโคโลนี (Kasana, 2008)

แล้วจึงคัดเลือกกราฟที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ลิกนินโนไลติกได้ดี และไม่สร้างหรือสร้างเซลลูเลสได้น้อยมาอย่างน้อย 2 สายพันธุ์ เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3.3.3 คัดเลือกกราฟที่มีความเหมาะสมกับการปรับสภาพชิ้นไม้

ในการปรับสภาพใช้ตัวอย่างชิ้นไม้ยูคาลิปตัสที่ได้จากบริษัท Double A จังหวัดปราจีนบุรี มา คัดขนาดไม้ให้ได้ขนาดประมาณ 0.1x0.5x2.5 cm ด้วยเครื่องร่อนไม้ ที่ความแรงการเขย่าระดับ 7 เป็น เวลา 10 นาที ผึ่งลมให้แห้ง วัดความชื้นด้วยเครื่องวัดความชื้น แล้วนำมาวัดองค์ประกอบทางเคมีของ ไม้ตัวอย่าง โดยใช้วิธีการสกัดด้วยสารละลายเพื่อคำนวณหาปริมาณของ Neutral Detergent Fiber (NDF) ในการหาปริมาณของเฮมิเซลลูโลส เซลลูโลสและลิกนินในไม้ตัวอย่าง (Goering และ Van Soest, 1970) (ภาคผนวก ค) ทำ 5 ซ้ำตัวอย่าง

เตรียมหัวเชื้อรา โดยเลี้ยงราแต่ละสายพันธุ์ในอาหารสูตร MEA ที่อุณหภูมิห้อง จนเส้นใยรา เจริญเกือบเต็มจานเพาะเลี้ยง ใช้คอรับเบอร์ขนาด 1 เซนติเมตร เจาะรบนอาหารรุ้นจำนวน 20 ชิ้น รุ้นใส่ในอาหาร MEB (Malt Extract Broth) เลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน ที่ภาวะนิ่ง แล้วจึงนำเส้นใยราที่ได้ไป ปั่นด้วยเครื่องไฮโมจีไนซ์เซอร์ที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที นำหัวเชื้อรามาบ่มกับไม้ยูคาลิปตัส ตาม วิธีที่ดัดแปลงจาก Vicentim (2006) โดยใช้ชิ้นไม้ยูคาลิปตัสน้ำหนักแห้ง 5 กรัม บ่มในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำแช่ข้าวโพด (corn steep liquor) 0.05% ของน้ำหนักแห้งของไม้ ปรับความชื้นให้เป็น 95% แล้วทำให้ปลอดเชื้อด้วยเครื่องนึ่งความดันไอน้ำ

ทำชุดทดลอง โดยใส่ราที่คัดเลือกได้ปริมาณ 10 มิลลิกรัมแห้ง ทำ 5 ซ้ำ ต่อรา 1 ชนิด บ่มที่ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 วัน ทำชุดควบคุม 5 ซ้ำ การทดลอง บ่มโดยไม่ต้องใส่เชื้อ

ทำการตรวจสอบประสิทธิภาพการบ่ม โดยนำไม้ที่ผ่านการบ่มมาสกัดด้วยสารละลาย โซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ (sodium acetate buffer) ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ pH 5.5 ที่ผสมกับ tween 80 ความเข้มข้น 0.1% ในภาวะเขย่า ที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วนำ สารละลายมาวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ลิกนินโนไลติก (ภาคผนวก ข.) ดังนี้

3.3.3.1 ตรวจสอบแอกติวิตีของแลคเคสตามวิธีของ Madhavi และ Lele (2006) โดย 1 ยูนิตของแลคเคส คือ ปริมาณของแลคเคสที่สามารถออกซิไดซ์ ABTS (2,2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) 1 ไมโครโมล ภายในเวลา 1 นาที โดยติดตามการเกิดปฏิกิริยาด้วยการวัดค่าการดูดกลืนที่ 420 นาโนเมตร

3.3.3.2 ตรวจสอบแอกติวิตีของแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสตามวิธีของ Watanabe และคณะ (2001) โดย 1 ยูนิตของแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส คือปริมาณของแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสที่สามารถออกซิไดซ์ 2,6 dimethoxyphenol 1 ไมโครโมล ภายในเวลา 1 นาที วัดจากการเกิดออกซิเดชันของแมงกานีสไอออน (Mn^{2+}) โดยติดตามการเกิดปฏิกิริยาด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 470 นาโนเมตร

3.3.3.3 ตรวจสอบแอกติวิตีของลิกนินเปอร์ออกซิเดสตามวิธีของ Tuisi และคณะ (1990) โดย 1 ยูนิตของลิกนินเปอร์ออกซิเดส คือปริมาณของเอนไซม์ ที่สามารถออกซิไดซ์เวอร์ทริลแอลกอฮอล์ (veratryl alcohol, VA) 1 ไมโครโมล ภายในเวลา 1 นาที โดยติดตามปฏิกิริยาด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 310 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ วัดค่าการดูดกลืนแสงในชั้นตอนดังกล่าว

แล้วนำตัวอย่างไม้บดและอบให้แห้งจนน้ำหนักคงที่ และตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของไม้ที่ผ่านการบ่ม ตามวิธีการหาองค์ประกอบเคมีในข้างต้น

แล้วจึงคัดเลือกกราฟที่มีความสามารถในการลดปริมาณลิกนินได้มาก และมีปริมาณเซลลูโลสคงที่เพื่อใช้ในการปรับสภาพขึ้นไม้ โดยเลือกมา 1 ไอโซเลต

3.3.4 หากวาระที่เหมาะสมในการปรับสภาพขึ้นไม้เพื่อการผลิตเยื่อกระดาษแบบคราฟต์

ใช้ภาวะในการปรับสภาพขึ้นไม้ตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Vicentim (2006) โดยใช้ขึ้นไม้ ปริมาณ 73 กรัม ที่ความชื้น 19% ในพลาสติกขนาด 1000 มิลลิลิตร เติมน้ำแช่ข้าวโพด 0.05% ของน้ำหนักแห้งของไม้ ปรับความชื้นให้เป็น 95% แล้วทำให้ปลอดเชื้อด้วยเครื่องนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที นำมาบ่มด้วยกราฟที่ให้ประสิทธิภาพดีที่สุดในการย่อยสลายลิกนินที่ได้จากขั้นตอนที่ 3.3.3 โดยมีขั้นตอนในการทดลอง ดังนี้

3.3.4.1 ผลิตรกระดาษจากเยื่อคราฟต์ชุดควบคุมจากขึ้นไม้ที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ

ผลิตเยื่อคราฟต์จากตัวอย่างขึ้นไม้เพื่อหาความเข้มข้นสารเคมีที่เหมาะสมในการต้มเยื่อโดยใช้ โซเดียมไฮดรอกไซด์และโซเดียมซัลไฟด์ที่ค่าแอกทีฟอัลคาไลน์ (active alkaline) 20%, 23%, 25% , 28% และซัลฟิไดต์ 25% ค่าอัตราส่วนของเหลวต่อไม้ (liquor to wood ratio) เป็น 7:1 ที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง แก่ หาอ้างอิง เก็บน้ำดำ (black liquor) ที่ได้จากกระบวนการต้มเยื่อ เพื่อใช้ในการตรวจสอบค่าต่างที่เหลือจากการต้ม (residual alkaline) ล้างเยื่อให้สะอาด แล้วอบด้วยเครื่องอบเยื่อ จนกระทั่งมีค่าสภาพระบายได้ (freeness) อยู่ที่ประมาณ 320-370 ml CSF

นำเยื่อไปตีกระจายให้เข้ากันด้วยเครื่องตีกระจายเยื่อ แล้วจึงนำไปขึ้นแผ่นกระดาษตามมาตรฐาน ISO 5269-2 ให้มีน้ำหนักมาตรฐานเท่ากับ 80 กรัม ต่อตารางเมตร ตัวอย่างละ 10 แผ่น เพื่อทดสอบสมบัติต่างๆ ตามข้อ 3.3.5

ตรวจสอบค่าปริมาณต่างที่เหลือและเลือกความเข้มข้นของสารเคมีที่เหมาะสมโดยพิจารณาจากลักษณะการแยกของเยื่อที่ได้หลังต้ม สมบัติกระดาษที่ได้ และปริมาณต่างที่เหลือจากการต้ม

3.3.4.2 ปรับสภาพขึ้นไม้โดยแปรผันปัจจัยที่เกี่ยวข้องในการปรับสภาพ ได้แก่ การแปรผันปริมาณของราและระยะเวลาในการบ่ม และการทดลองหาผลของขนาดขึ้นไม้ในการปรับสภาพที่มีต่อสมบัติกระดาษ โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely randomized design: CRD) ทำชุดการทดลองในการปรับสภาพด้วยราชุดการทดลองละ 10 ซ้ำ มีชุดการทดลองดังนี้

1) การแปรผันปริมาณของราและระยะเวลาในการบ่ม

- ชุดทดลองที่ 1: ปริมาณหัวเชื้อรา 50 มิลลิกรัมของน้ำหนักแห้ง บ่ม 10, 20 และ 30 วัน
- ชุดทดลองที่ 2: ปริมาณหัวเชื้อรา 75 มิลลิกรัมของน้ำหนักแห้ง บ่ม 10, 20 และ 30 วัน
- ชุดทดลองที่ 3: ปริมาณหัวเชื้อรา 100 มิลลิกรัมของน้ำหนักแห้ง บ่ม 10, 20 และ 30 วัน
- ชุดควบคุม บ่มขึ้นไม้ที่เตรียมในภาวะเดียวกันกับชุดทดลอง โดยไม่ใส่เชื้อรา เป็นเวลา 10, 20 และ 30 วัน

2) การทดลองหาผลของขนาดขึ้นไม้ในการปรับสภาพที่มีต่อสมบัติกระดาษ

โดยใช้ขึ้นไม้ที่ผ่านการร่อนที่ขนาดช่องตะแกรง 9.5 มิลลิเมตร ปริมาณหัวเชื้อรา 100 มิลลิกรัมของน้ำหนักแห้ง บ่ม 20 และ 30 วัน

3.3.4.3 ผลิตเยื่อโดยนำชิ้นไม้ที่ผ่านการปรับสภาพมาต้มกับโซเดียมไฮดรอกไซด์และโซเดียมซัลไฟด์ตามความเข้มข้นจากภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเยื่อแบบคราฟต์ในข้อ 3.3.4.1

3.3.4.4 นำเยื่อที่ผลิตได้จากไม้ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยรา มาตรวจสอบปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินที่เหลืออยู่ เปรียบเทียบปริมาณกับเยื่อจากไม้ที่ไม่ผ่านการปรับสภาพด้วยรา

3.3.4.5 นำเยื่อที่ได้ไปขึ้นแผ่นกระดาษ และทดสอบสมบัติตามข้อที่ 3.3.5 ทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการปรับสภาพไม้ในภาวะต่างๆ เพื่อเลือกภาวะที่เหมาะสม และเปรียบเทียบสมบัติกับกระดาษแบบคราฟต์ชุดควบคุม โดยใช้การสร้างกราฟเปรียบเทียบสมบัติกระดาษ วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS วิเคราะห์ความแปรปรวน (one factor analysis of variance: ANOVA), Duncan Multiple Range Test (DMRT) และใช้ response surface methodology ในการแปรวิเคราะห์และอภิปรายผล (Carley, Kamneva, และ Reminga, 2004)

3.3.4.6 ผลิตกระดาษจากไม้ที่ปรับสภาพโดยใช้รา SK7 ด้วยภาวะที่เหมาะสมและเปรียบเทียบสมบัติกับกระดาษที่ได้จากการปรับสภาพด้วยราสายพันธุ์อ้างอิง (*Phanerochaete chrysosporium*)

3.3.5 วิเคราะห์สมบัติของกระดาษ (Levlin และ Soderhjelm, 1999)

3.3.5.1 นำกระดาษที่ขึ้นแผ่นกระดาษตามมาตรฐาน ISO 5269-2 ด้วยเครื่อง Rapid-Kothen ไปทดสอบสมบัติต่างๆ ได้แก่

3.3.5.1.1 น้ำหนักมาตรฐาน (basis weight) ตามมาตรฐาน ISO 536 ทดสอบโดยนำกระดาษที่เก็บไว้ในอุณหภูมิและความชื้นที่เหมาะสมตามมาตรฐานกำหนด ชั่งน้ำหนัก อ่านค่าและนำค่าที่ได้หารด้วยพื้นที่ของกระดาษนั้น เพื่อหาน้ำหนักมาตรฐาน

3.3.5.1.2 ความหนาแน่นปรากฏ (apparent density หรือ density) ตามมาตรฐาน ISO 534 เป็นการวัดความหนาปรากฏของกระดาษ โดยวัดความหนาด้วยเครื่องทดสอบความหนา นำค่าที่อ่านได้หารน้ำหนักมาตรฐานของกระดาษ

3.3.5.1.3 ความเรียบ (smoothness) ตามมาตรฐาน ISO 5627 ทดสอบความเรียบของกระดาษ โดยเครื่องทดสอบความเรียบซึ่งเป็นการวัดเวลาที่อากาศไหลผ่านผิวของกระดาษ บันทึกค่าที่อ่านได้จากเครื่อง

3.3.5.1.4 ดัชนีความแข็งแรงต่อแรงดึง (tensile index) ตามมาตรฐาน ISO 1924 ทดสอบโดยนำกระดาษที่ได้รับการตัดแล้วได้ขนาดตามมาตรฐานทดสอบ และยึดไว้ระหว่างปากจับขึ้นทดสอบทั้งสอง จากนั้นปากจับขึ้นทดสอบจะเคลื่อนออกจากกันจนดึงขึ้นทดสอบขาดจากกัน โดยดึงด้วยความเร็วคงที่ จากนั้นนำค่าที่ได้หารด้วยน้ำหนักมาตรฐาน

3.3.5.1.5 ดัชนีความแข็งแรงต่อแรงฉีกขาด (tear index) ตามมาตรฐาน ISO 1974 การทดสอบทำโดยใส่ชิ้นทดสอบขนาดตามมาตรฐานกำหนดในระหว่างปากจับบนแท่นและบนลูกตุ้มซึ่งเคลื่อนที่ได้ ใช้ใบมีดตัดชิ้นทดสอบเพื่อเป็นการฉีกนำเป็นรอยยาวประมาณ 2 เซนติเมตร ทำการทดสอบโดยปล่อยให้ลูกตุ้มเคลื่อนที่ ชิ้นทดสอบจะขาดอ่านค่าและนำมาคำนวณตามมาตรฐาน แล้วนำค่าที่ได้หารด้วยน้ำหนักมาตรฐาน

3.3.5.1.6 ความขาวสว่าง (brightness) ตามมาตรฐาน ISO 2470 วัดค่าการสะท้อนของแสงสีน้ำเงินที่ช่วงคลื่น 457 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดความขาวสว่าง

3.3.5.1.7 ความทึบแสง (opacity) ตามมาตรฐาน ISO 2471 วัดค่าการสะท้อนแสงสีเขียวที่ช่วงคลื่น 557 นาโนเมตร ระหว่างกระดาษหนึ่งแผ่นที่รองหลังด้วยฟืนสีดำสนิทกับกระดาษที่วางซ้อนกันจนหนาจนแสงไม่ทะลุผ่าน เป็นต้น

3.3.5.2 การวิเคราะห์ผล

นำผลการทดสอบในการทดลองขั้นต่างๆ มาวิเคราะห์ผลเพื่อหากระบวนการผลิตที่แตกต่างจากไม้ยูคาลิปตัสที่เหมาะสม โดยใช้สถิติ one factor analysis of variance (one way ANOVA) และ Duncan Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรม SPSS for window 11.5 ประเทศสหรัฐอเมริกา

บทที่ 4

ผลการทดลองและการวิเคราะห์ข้อมูล

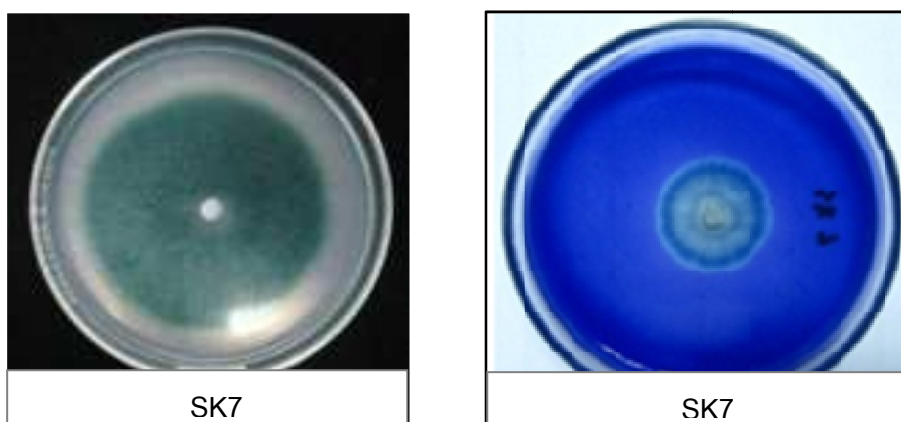
4.1 เลี้ยงราน้ำขาวสายพันธุ์ต่างๆและคัดเลือกที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ที่เหมาะสม

4.1.1 จากการเลี้ยงราน้ำขาวจากหน่วยปฏิบัติการวิจัยและใช้ประโยชน์จากชีวมวลพืชในอาหารสูตร MEA เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง พบว่ารามีการเจริญได้ 14 ไอโซเลต ซึ่งจะนำไปใช้ในการทดสอบการผลิตเอนไซม์ในขั้นตอนต่อไป

4.1.2 ทดสอบการสร้างเอนไซม์ลิกนินไลติก

จากการทดสอบการสร้างเอนไซม์ลิกนินไลติก โดยการเลี้ยงราน้ำขาวอาหารแข็งสูตร LMB ที่มีการเติมสารสำหรับทดสอบการสร้างแลคเคส ลิกนินเปอร์ออกซิเดส และแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส บ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เป็นเวลา 5 วัน พบว่าราที่สามารถสร้างเอนไซม์ลิกนินไลติกได้มีจำนวน 7 ไอโซเลต ซึ่งราที่สามารถสร้างแลคเคสได้มี 6 ไอโซเลต โดยสังเกตจากการเกิดวงสีเขียวของอาหารแข็งบริเวณภายในหรือรอบโคโลนีของรา (รูปที่ 4.1) โดย SK7 มีค่าเส้นผ่านศูนย์กลางวงสีสูงที่สุด คือ 7.25 เซนติเมตร และ KK07 เซนติเมตร มีค่าเส้นผ่านศูนย์กลางวงสีต่ำที่สุด คือ 2.10

ราที่มีการสร้างลิกนินเปอร์ออกซิเดส สังเกตจากการเกิดวงใสของอาหารแข็งรอบโคโลนีรา มี 2 ไอโซเลต ได้แก่ SK7 และ CUT3 โดยมีค่าเส้นผ่านศูนย์กลางวงสีเป็น 3.15 เซนติเมตร และ 3.05 เซนติเมตร ตามลำดับ (รูปที่ 4.1 ก และ ข)



รูปที่ 4.1 การเปลี่ยนสีของอาหารรูน ก) อาหารรูนที่ผสม ABTS เป็นสารตั้งต้นเพื่อทดสอบการผลิตแลคเคสของรา ข) อาหารรูนที่ผสม Azure B เป็นสารตั้งต้นเพื่อทดสอบการผลิตลิกันินเปอร์ออกซิเดสของรา

สำหรับการสร้างแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส ตรวจสอบได้จากการเกิดวงสีแดงชมพูรอบโคโลนีของรา เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารแข็งสูตร LBM ที่เติม 0.01% phenol red พบว่า ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของวงสีของอาหารรอบโคโลนี จึงอาจแสดงได้ว่า ราที่ใช้ในการทดสอบไม่มีการสร้างแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส ในปริมาณที่สามารถตรวจสอบได้โดยวิธีนี้ (ตารางที่ 4.1)

4.1.3 ทดสอบการสร้างเซลล์ของรา

จากการเลี้ยงราที่มีการสร้างเอนไซม์ลิกันินในไลติกบนอาหารแข็งสูตร CBM ที่มีการเติม CMC เป็นสารตั้งต้นในการทดสอบ ที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เป็นเวลา 3 วัน และตรวจสอบโดยการใช้แกรมไอโอดีนเทบนโคโลนีของรา พบว่า มีเพียงรา KK 66 ที่มีการสร้างเซลล์ โดยสังเกตจากการเกิดวงใสรอบโคโลนีที่ไม่ติดสีของแกรมไอโอดีน (ตารางที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 ความสามารถของราในการสร้างเอนไซม์ลิกนินโพลิติกและเซลลูเลสบนอาหารแข็ง

รา	เส้นผ่านศูนย์กลางของวงสี / เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (cm)*			
	ลิกนินเปอร์ออกซิเดส	แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส	แลคเคส	เซลลูเลส
SK7	3.15/2.75	-	7.25/8.85	-
KK16	-	-	4.55/3.40	-
KK16-1	-	-	3.60/1.15	-
KK66	-	-	2.75/1.75	5.2/5.11
KK40	-	-	3.58/1.50	-
KK07	-	-	2.10/1.20	-
CUT3	3.05/2.45	-	-	-
<i>Phanerocheate chrysosporium</i> BKM ATCC24725 (สายพันธุ์อ้างอิง)	3.95/3.30	-	-	-

* = เส้นผ่านศูนย์กลางของวงสีของอาหารแข็งที่เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในหรือรอบโคโลนีของรา

จากการศึกษาผลของการสร้างเอนไซม์ลิกนินโพลิติกและเซลลูเลสในราเน่าขาวจึงคัดเลือกรา 3 ไโซเลต ได้แก่ SK7 CUT3 และ KK16 เพื่อใช้ในขั้นตอนต่อไป เนื่องจาก SK7 และ KK16 มีการสร้างลิกนินเปอร์ออกซิเดสซึ่งเป็นเอนไซม์เด่นของราเน่าขาวที่มีประสิทธิภาพสูงในการเกิดปฏิกิริยาการออกซิไดซ์สารประกอบ โดยใน SK7 พบว่าสามารถสร้างแลคเคสได้ดีอีกด้วย รวมถึงรา KK16 ซึ่งสามารถสร้างแลคเคสได้ดีโดยมีค่าเส้นผ่านศูนย์กลางการเปลี่ยนแปลงวงสีในระดับสูง และไม่พบการสร้างเซลลูเลสในการทดสอบ จึงคัดเลือกทั้งสามไโซเลตนี้เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

4.2 คัดเลือกรากที่มีความเหมาะสมกับการปรับสภาพขึ้นไม้

4.2.1 องค์ประกอบทางเคมีของไม้ตัวอย่าง

จากการเตรียมไม้ยูคาลิปตัส ที่ได้จากบริษัท Double A พบว่ามีค่าความชื้น 19 % เมื่อวัดด้วยเครื่องวัดความชื้น (Moisture determination balance รุ่น KettFD-600, Kett Electric Laboratory/ USA) และเมื่อนำมาวิเคราะห์องค์ประกอบด้วยการหา neutral detergent fiber (Goering และ Van Soest, 1970) พบว่ามีเปอร์เซ็นต์องค์ประกอบทางเคมีดังแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 องค์ประกอบทางเคมีของไม้ยูคาลิปตัส

ชุดการทดลอง	% องค์ประกอบทางเคมี *				
	เซลลูโลส	เฮมิเซลลูโลส	ลิกนิน	เถ้า	อื่นๆ
ตัวอย่างไม้ยูคาลิปตัส	48.38±0.81	15.49±0.29	26.93±1.01	0.0041±0.00	9.19±1.29

*ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีจากชุดการทดลอง 5 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

4.2.2 ประสิทธิภาพในการปรับสภาพไม้ยูคาลิปตัสด้วยรากที่คัดเลือกได้

จากการปรับสภาพไม้ยูคาลิปตัสปริมาณ 5 กรัมแห้ง ด้วยรากที่คัดเลือกได้จำนวน 3 ไชโซเลต ได้แก่ SK7 CUT3 และ KK16 เป็นเวลา 15 วัน เมื่อนำสารละลายบัฟเฟอร์ซึ่งผ่านการเขย่ากับขึ้นไม้ที่ผ่านการปรับสภาพมาทดสอบแอกติวิตีของเอนไซม์ลิกนินโนไลติกพบว่า รากทั้งสามไอโซเลตมีการสร้างเอนไซม์ชนิดต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 4.3 โดยเอนไซม์แอกติวิตีของแลคเคส ที่พบใน SK7 มีค่ามากที่สุด คือ 0.1532 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ KK16 มีค่า 0.1259 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ CUT3 มีค่าน้อยมาก ได้แก่ 0.0003 ยูนิตต่อมิลลิลิตร สำหรับแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสพบว่ารากที่มีค่าแอกติวิตีสูงสุดคือ SK7, CUT3 และ KK16 โดยมีค่า 0.0213, 0.0192 และ 0.0146 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และลิกนินเปอร์ออกซิเดสพบว่าค่าสูงที่สุดใน CUT3 คือ 0.0608 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ใน SK7 และ KK16 มีค่าเล็กน้อย คือ 0.0079 และ 0.0026 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.3 ค่าแอกติวิตีของเอนไซม์จากรา SK7 KK16 และ CUT3 ที่บ่มกับขึ้นไม้ยูคาลิปตัสเป็นเวลา 15 วัน

เชื้อรา	แอกติวิตีของเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิเมตร)		
	แลคเคส	แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส	ลิกนินเปอร์ออกซิเดส
SK7	0.1532±0.00 ^a	0.0213±0.00 ^a	0.0079±0.00 ^b
KK16	0.1259±0.00 ^a	0.0146±0.00 ^b	0.0024±0.00 ^b
CUT3	0.0003±0.00 ^b	0.0192±0.00 ^a	0.0608±0.02 ^a

* ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการวัดแอกติวิตีของเอนไซม์จากการทดลอง 5 ซ้ำ+ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ตัวอักษรยกที่ต่างกันในแนวตั้งแสดงผลการทดลองที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$)

เมื่อนำไม้ที่ผ่านการปรับสภาพมาวิเคราะห์องค์ประกอบด้วยวิธีการเดียวกันกับข้างต้น พบว่าลิกนินในไม้มีค่าลดลงเมื่อเทียบกับไม้ที่ไม่ผ่านการปรับสภาพคิดเป็น 19.23%, 18.49% และ 15.45% เมื่อปรับสภาพโดยใช้รา SK7 CUT3 และ KK16 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.4) จึงเลือก SK7 ไปใช้ในขั้นตอนการปรับสภาพเพื่อผลิตเยื่อแบบชีวภาพต่อไป

ตารางที่ 4.4 องค์ประกอบทางเคมีของไม้ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยวาเปอริยเทียบกับไม้ที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ เปลี่ยนเป็นแบบข้างหลัง

ชุดการทดลอง	% องค์ประกอบทางเคมี *					% ลิกนินที่ลดลง
	เซลลูโลส	เฮมิเซลลูโลส	ลิกนิน	เถ้า	อื่นๆ	
ชุดควบคุม (ไม่ปรับสภาพ)	48.38±0.81 ^{ab}	15.49±0.29 ^c	26.93±1.01 ^b	0.0041±0.00 ^b	9.19±1.29 ^a	-
SK7	49.60±0.97 ^a	18.00±0.53 ^b	21.75±0.69 ^a	0.0017±0.00 ^{ab}	10.64±1.64 ^a	19.23
CUT3	49.18±2.44 ^{ab}	18.92±0.56 ^{ab}	21.95±0.62 ^a	0.0031±0.00 ^{ab}	10.03±1.88 ^a	18.49
KK16	46.25±1.85 ^b	19.83±1.63 ^a	22.77±1.93 ^a	0.0040±0.00 ^a	11.15±4.82 ^a	15.45

*ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีจากชุดการทดลอง 3 ซ้ำ±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ตัวอักษรยกที่ต่างกันในแนวดิ่งแสดงผลการทดลองที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$)

4.3 หากภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพขึ้นไม้เพื่อการผลิตเยื่อกระดาษแบบคราฟต์

4.3.1 การผลิตกระดาษจากเยื่อคราฟต์ชุดควบคุมจากขึ้นไม้ที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ

จากการผลิตเยื่อคราฟต์จากตัวอย่างขึ้นไม้เพื่อหาความเข้มข้นสารเคมีที่เหมาะสมในการต้มเยื่อ โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์และโซเดียมซัลไฟด์ ที่ค่าแอกทีฟอัลคาไลน์ 20%, 23%, 25% และ 28% ค่าซัลไฟดิตี 25% ค่าอัตราส่วนของเหลวต่อไม้ (liquor to wood ratio) เป็น 7:1 ที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง (ดัดแปลงจาก Su และคณะ, 2011; Segura และคณะ, 2012) นำมาบดเยื่อเป็นเวลา 50 นาที เพื่อให้ได้ค่าสภาพระบายได้อยู่ในช่วง 330-370 ml CSF โดยเยื่อที่ได้จากแต่ละความเข้มข้นต่างมีค่าสภาพการระบายได้ของเยื่อ (freeness) ที่ระยะเวลาบดตั้งแต่ 0-50 นาที ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Duncan Multiple range test จึงนำเวลาในการบดเยื่อที่ 50 นาที ไปใช้ในการบดเพื่อผลิตเยื่อในครั้งต่อไป จากการบดเยื่อได้เยื่อสีน้ำตาลดังแสดงในรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.2 เยื่อที่ได้จากการผลิตเยื่อคราฟต์ชุดควบคุม

จากนั้นหาผลผลิตเยื่อ (pulp yield) ตรวจสอบปริมาณต่างที่เหลือในน้ำดำ และนำเยื่อที่ได้มาขึ้นแผ่นกระดาษน้ำหนักมาตรฐาน 80 กรัมต่อตารางเมตร ได้กระดาษมีสีน้ำตาลโดยพบว่ากระดาษที่ได้จากแต่ละแอกที่ฟัลคาไลน์มีสีไม่แตกต่างกันเมื่อพิจารณาด้วยตาเปล่ามีเพียงกระดาษที่ใช้แอกที่ฟัลคาไลน์ 20% ที่มีสีอ่อนกว่าชุดทดลองอื่นเล็กน้อย (รูปที่ 4.3) จากนั้นจึงนำกระดาษที่ได้มาวัดค่าสมบัติกระดาษต่างๆ ได้ค่าดังแสดงในตารางที่ 4.5



รูปที่ 4.3 กระดาษที่ได้จากการผลิตเยื่อ ที่แอกที่ฟัลคาไลน์ 20%, 23%, 25% และ 28% จากซ้ายไปขวาตามลำดับ

จากการพิจารณาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการผลิตเยื่อ พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของด่างที่ใช้ในการต้มเยื่อ ความแข็งแรงของกระดาษจะมีค่าเพิ่มขึ้น ค่าความเรียบและสมบัติเชิงแสงมีความใกล้เคียงกัน โดยเมื่อพิจารณาปริมาณต่างที่เหลือพบว่าที่ความเข้มข้นด่าง 28% ปริมาณด่างที่เหลือในระบบมีมาก ซึ่งสิ้นเปลืองสารเคมีที่ใช้ในการผลิต และยังได้ผลผลิตเยื่อที่น้อยลง ประกอบกับค่าความแข็งแรงของกระดาษที่ได้จากการต้มที่ความเข้มข้นด่าง 25% และ 28% ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จึงได้เลือกความเข้มข้นด่างที่ 25% มาใช้ในการผลิตเยื่อในขั้นต่อไป

ตารางที่ 4.5 ผลผลิตเยื่อ ความขาวสว่าง และสมบัติเชิงกลที่ได้จากการผลิตเยื่อด้วยต่างที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นสารเคมี	ผลผลิตเยื่อ (pulp yeild, %)*	ปริมาณด่างที่เหลือ(g/L)**	ความขาวสว่าง (brighthness, %)***	ความเรียบ (smoothness, s)	ดัชนีความต้านทานต่อแรงฉีก (tear index, mN.m ² /g)****	ดัชนีความต้านทานต่อแรงดึง (tensile index, N.m/g) ****
20%	51.03±0.69 ^a	1.23±0.19 ^d	25.86*±0.37 ^a	15.08±0.38 ^b	5.05±0.87 ^b	61.28±1.46 ^b
23%	50.44±0.97 ^{ab}	1.43±0.05 ^c	25.15±0.11 ^b	15.74±0.17 ^a	5.24±0.30 ^b	61.76±1.51 ^{ab}
25%	49.53±0.72 ^{ab}	2.13±0.05 ^b	24.00±0.10 ^c	15.77±0.11 ^a	6.18±0.22 ^a	63.34±1.25 ^a
28%	49.40±0.69 ^b	3.26±0.00 ^a	25.11±0.29 ^b	15.74±0.33 ^a	6.49±0.28 ^a	62.45±1.45 ^a

*ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลอง 2 ครั้ง±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

** ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการวัดตัวอย่าง 5 ครั้ง ต่อ 1 ตัวอย่างน้ำด่าง±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

***ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการวัดตัวอย่าง 5 ครั้งต่อตัวอย่างกระดาษ 1 แผ่น จำนวน 5 ตัวอย่าง±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

****ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการวัด 2 ชั้นทดสอบ ต่อตัวอย่างกระดาษ 1 แผ่น จำนวน 5 ตัวอย่าง±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตัวอักษรยกที่ต่างกันในแนวตั้งแสดงผลการทดลองที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$)

4.3.2 ปรับสภาพขึ้นไม้โดยแปรผันปัจจัยที่เกี่ยวข้องในการปรับสภาพ

จากการปรับสภาพไม้ด้วยรา SK7 โดยแปรผันระยะเวลาในการบ่มเป็น 10, 20 และ 30 วัน และใช้ปริมาณเชื้อ 50, 75 และ 100 มิลลิกรัมแห้งต่อมิลลิลิตร พบว่ารามีการเจริญบนขึ้นไม้ดังแสดงในรูปที่ 4.4



รูปที่ 4.4 ลักษณะขึ้นไม้ที่ปกคลุมด้วยเส้นใยราเมื่อบ่มเป็นระยะเวลา 10, 20 และ 30 วัน

นำไม้ไปต้มด้วยวิธีการคราฟต์ตามภาวะที่ได้ในข้อที่ 4.3.1 นำเยื่อที่ผ่านการต้มมาบด จากนั้นหาผลผลิตเยื่อ (pulp yield) และปริมาณด่างที่เหลือ (residual alkali) ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.6

โดยพบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณเชื้อและระยะเวลาในการบ่ม ผลผลิตเยื่อที่ได้มีค่าลดลง โดยที่ 10 วัน ลดลงคิดเป็น 0.53%-1.47% ที่ 20 วัน ลดลงคิดเป็น 4.99%-6.22% และ 30 วัน ลดลงคิดเป็น 8.46%-9.13%

สำหรับปริมาณต่างที่เหลือ พบว่ามีค่าสูงขึ้นเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการบ่ม โดยมีค่าสูงที่สุดในช่วงระยะเวลาบ่มระหว่างวันที่ 20-30 และเริ่มลดลงเมื่อเวลาในการบ่มเพิ่มมากขึ้น โดยจากการปรับสภาพช่วยทำให้ต่างเหลือในระบบเพิ่มขึ้นคิดเป็น 6.10-23.47% เมื่อเทียบกับชุดที่ไม่ปรับสภาพด้วยรา

ตารางที่ 4.6 ผลผลิตเยื่อ (Pulp yield) และปริมาณต่างที่เหลือ (residual alkali) หลังการต้มขึ้นไม้ที่ผ่านการบ่มเป็นเวลา 10, 20 และ 30 วัน ร่วมกับการใช้ปริมาณเชื้อ 50, 75 และ 100 มิลลิกรัมแห้ง

ชุดการทดลอง	ระยะเวลาบ่ม (วัน)	ปริมาณเชื้อ (mg)	ปริมาณต่างที่เหลือ*** (residual alkali, g/L)	ผลผลิตเยื่อ (Pulp yield,%)**
ไม่ปรับสภาพ	-	-	2.13±0.04 ^d	49.53±0.72 ^a
ปรับสภาพ	10	50	2.26±0.05 ^d	49.27±1.07 ^a
		75	2.31±0.07 ^c	48.91±0.34 ^a
		100	2.33±0.04 ^c	48.80±0.66 ^a
	20	50	2.53±0.04 ^b	47.06±0.21 ^b
		75	2.63±0.04 ^a	46.64±0.53 ^{bc}
		100	2.57±0.03 ^b	46.45±0.66 ^{bcd}
	30	50	2.53±0.04 ^b	45.34±0.47 ^{cd}
		75	2.53±0.07 ^b	45.23±0.78 ^{cd}
		100	2.57±0.04 ^b	45.01±0.58 ^d

*ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักที่ลดลงหลังการปรับสภาพด้วยราจากการทดลอง 5 ซ้ำ±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

** ค่าเฉลี่ยของผลผลิตเยื่อที่ได้จากการทดลอง 2 ซ้ำ±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

***ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการวัดตัวอย่าง 5 ครั้ง ต่อ 1 ตัวอย่างน้ำดำ±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตัวอักษรยกที่ต่างกันในแนวดิ่งแสดงผลการทดลองที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$)

เมื่อนำเยื่อมาผลิตกระดาษและนำมาทดสอบสมบัติเชิงกล (ตารางที่ 4.7) พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณเชื้อและระยะเวลาในการบ่ม ดัชนีความแข็งแรงต่อแรงดึง (tensile index) ของกระดาษที่ต้มจากไม้ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยรา มีค่าสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เมื่อบ่มเป็นเวลา 10 วันปริมาณเชื้อ 100 มิลลิกรัมแห้ง และที่การบ่ม 20 วันเป็นต้นไป โดยมีค่าเพิ่มขึ้นสูงสุด 5.00% เมื่อปรับสภาพที่ 30 วัน ในขณะที่ดัชนีความต้านทานต่อแรงฉีก (tear index) ของชุดทดลองที่ปรับสภาพด้วยรามีค่าลดลงเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการบ่มและปริมาณเชื้อ

ตารางที่ 4.7 สมบัติเชิงกลของกระดาษที่ผลิตจากไม้ยูคาลิปตัสด้วยวิธีการคราฟต์ เมื่อแปรผันปริมาณเชื้อราที่ใช้และระยะเวลาในการบ่ม

ชุดการทดลอง	ระยะเวลาบ่ม (วัน)	ปริมาณเชื้อ (mg)	สมบัติเชิงกล*	
			ดัชนีความต้านทานต่อแรงดึง (tensile index, N.m/g)	ดัชนีความต้านทานต่อแรงฉีก (tear index, mN.m ² /g)
ไม่ปรับสภาพ	-	-	63.34±1.25 ^b	6.18±0.22 ^a
ปรับสภาพ	10	50	63.15±0.79 ^b	5.97±0.22 ^{ab}
		75	63.40±0.95 ^b	5.92±0.19 ^{ab}
		100	63.87±1.91 ^{ab}	5.87±0.18 ^{abc}
	20	50	64.05±1.44 ^{ab}	5.72±0.31 ^{bc}
		75	65.53±1.08 ^{ab}	5.75±0.49 ^{bc}
		100	66.27±2.52 ^a	5.70±0.14 ^{ab}
	30	50	64.66±2.30 ^{ab}	5.58±0.48 ^{bc}
		75	65.95±2.52 ^{ab}	5.50±0.16 ^c
		100	66.51±2.97 ^a	5.48±0.19 ^c

*ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการวัด 2 ซ้ำทดสอบ ต่อตัวอย่างกระดาษ 1 แผ่น จำนวน 5 ตัวอย่าง±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ตัวอักษรยกที่ต่างกันในแนวดิ่งแสดงผลการทดลองที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$)

เมื่อนำกระดาษมาวัดสมบัติเชิงแสงพบว่า ที่ระยะเวลาบ่ม 20 วันเป็นต้นไป ความขาวสว่างของกระดาษที่ผลิตจากไม้ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยรามิค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยเพิ่มขึ้น 1.1-1.8% เมื่อเทียบกับชุดการทดลองที่ไม่ผ่านการปรับสภาพด้วยรา สำหรับความทึบแสงพบว่าค่าที่ได้จากชุดทดลองที่ปรับสภาพด้วยราและไม่ปรับสภาพไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% (ตารางที่ 4.8)

ตารางที่ 4.8 สมบัติเชิงแสงของกระดาษที่ผลิตจากไม้ยูคาลิปตัสด้วยวิธีการคราฟต์ เมื่อแปรผันปริมาณเชื้อราที่ใช้และระยะเวลาในการบ่ม

ชุดการทดลอง	ระยะเวลาบ่ม (วัน)	ปริมาณเชื้อ (mg)	สมบัติเชิงแสง*	
			ความขาวสว่าง (Brightness, %)	ความทึบแสง (Opacity, %)
ไม่ปรับสภาพ	-	-	24.20±0.10 ^b	99.82±0.19 ^a
ปรับสภาพ	10	50	24.18±0.26 ^b	99.88±0.09 ^a
		75	24.00±0.71 ^b	99.83±0.05 ^a
		100	24.05±1.20 ^b	99.82±0.05 ^a
	20	50	24.64±0.93 ^a	99.73±0.14 ^a
		75	24.53±1.01 ^a	99.85±0.06 ^a
		100	24.47±0.94 ^a	99.80±0.10 ^a
	30	50	24.58±0.15 ^a	99.82±0.25 ^a
		75	24.53±0.11 ^a	99.87±0.04 ^a
		100	24.57±0.19 ^a	99.88±0.05 ^a

*ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการวัดตัวอย่าง 5 ครั้งต่อตัวอย่างกระดาษ 1 แผ่น วัดทั้งสิ้น 5 ตัวอย่าง±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานตัวอักษรยกที่ต่างกันในแนวดิ่งแสดงผลการทดลองที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$)

และจากการตรวจสอบค่าความเรียบของกระดาษพบว่าเมื่อปรับสภาพด้วยรามี่ผลให้ค่าความเรียบของกระดาษที่ได้ลดลงเล็กน้อยแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ตารางที่ 4.9)

ตารางที่ 4.9 ความเรียบ (smoothness) ของกระดาษที่ผลิตจากไม้ยูคาลิปตัสด้วยวิธีการคราฟต์ เมื่อแปรผันปริมาณเชื้อราที่ใช้และระยะเวลาในการบ่ม

ชุดการทดลอง	ระยะเวลาบ่ม (วัน)	ปริมาณเชื้อ (mg)	ความเรียบ (smoothness, s)
ไม่ปรับสภาพ	-	-	15.77±0.11 ^a
ปรับสภาพ	10	50	15.59±0.49 ^a
		75	15.58±0.63 ^a
		100	15.61±0.98 ^a
	20	50	15.57±0.23 ^a
		75	15.53±0.23 ^a
		100	15.54±0.26 ^a
	30	50	15.49±0.15 ^a
		75	15.52±0.20 ^a
		100	15.51±0.31 ^a

*ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการวัดตัวอย่าง 5 ครั้งต่อตัวอย่างกระดาษ 1 แผ่น วัดทั้งสิ้น 5 ตัวอย่าง±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานตัวอักษรยกที่ต่างกันในแนวดิ่งแสดงผลการทดลองที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$)

4.3.3 การตรวจสอบปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินที่เหลืออยู่ในเยื่อกราฟต์ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยรา

เมื่อนำเยื่อที่ผ่านการปรับสภาพด้วยรา SK7 และต้มด้วยวิธีการกราฟต์มาตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมี พบว่าลิกนิน เฮมิเซลลูโลส และเซลลูโลสในเยื่อที่ผ่านการปรับสภาพและการต้มด้วยสารเคมี มีค่าแตกต่างกันเล็กน้อย แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยเมื่อพิจารณาองค์ประกอบทางเคมีของเยื่อโดยเทียบจากผลผลิตเยื่อที่ได้ของแต่ละภาวะ พบว่าเมื่อผ่านการต้มเยื่อ องค์ประกอบต่างๆ ภายในไม่มีการเปลี่ยนแปลงไป โดยเมื่อต้มเซลลูโลสและลิกนินมีค่าลดลง แต่ลิกนินมีค่าลดลงมากกว่าซึ่งเป็นผลจากการทำปฏิกิริยาของสารเคมีที่เกิดขึ้นระหว่างการต้มเยื่อ (ตารางที่ 4.10)

ตารางที่ 4.10 องค์ประกอบทางเคมีของเยื่อที่ได้จากการต้มด้วยไม้ที่ผ่านการปรับสภาพและไม่ปรับสภาพเปรียบเทียบกับองค์ประกอบทางเคมีของชิ้นไม้ที่ไม่ผ่านการต้มด้วยสารเคมี

ชุดการทดลอง	ระยะเวลา ต้ม (วัน)	ปริมาณเชื้อ (mg)	% องค์ประกอบทางเคมี*				
			เซลลูโลส	เฮมิเซลลูโลส	ลิกนิน	เถ้า	อื่นๆ
ชิ้นไม้ไม่ปรับสภาพ	-	-	48.38±0.81 ^a	15.49±0.29 ^a	26.93±1.01 ^a	0.004±0.00 ^a	9.19±1.29 ^b
เยื่อไม่ปรับสภาพ	-	-	32.19±0.27 ^b	7.56±1.23 ^b	6.85±0.12 ^b	0.005±0.001 ^a	12.04±1.87 ^a
เยื่อปรับสภาพ	10	100	31.91±0.60 ^b	8.06±0.31 ^b	6.68±0.39 ^b	0.004±0.001 ^a	11.29±0.37 ^a
	20	100	30.33±0.60 ^b	7.51±0.34 ^b	6.26±0.29 ^b	0.002±0.001 ^a	12.20±0.56 ^a
	30	50	29.38±0.19 ^b	7.09±0.57 ^b	5.83±0.47 ^b	0.007±0.002 ^a	13.24±0.76 ^a
		75	29.26±0.24 ^b	7.28±0.38 ^b	5.63±0.36 ^b	0.005±0.001 ^a	12.04±1.87 ^a
		100	29.17±0.12 ^b	7.11±0.16 ^b	5.54±0.48 ^b	0.001±0.001 ^a	13.53±0.63 ^a

*ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี 3 ซ้ำ±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ตัวอักษรยกที่ต่างกันในแนวดิ่งแสดงผลการทดลองที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$)

จากผลการศึกษาระยะเวลาในการบ่มและปริมาณเชื้อที่เหมาะสมในการปรับสภาพขึ้นไม้ด้วยรา SK7 เมื่อนำผลที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยวิธีพื้นที่ผิวตอบสนอง (Response surface methodology) โดยพิจารณาค่าตอบสนอง 2 ค่า ได้แก่ค่าดัชนีความต้านทานต่อแรงดึง (tensile index) และปริมาณด่างที่เหลือ (residual alkali) โดยศึกษาปัจจัย 2 ปัจจัย ได้แก่ ระยะเวลาในการบ่ม และปริมาณเชื้อที่ใช้ ประกอบด้วยชุดการทดลอง 9 ชุดทดลอง โดยค่าดัชนีความต้านทานต่อแรงดึง (ตารางที่ 4.11) ที่ระยะเวลาบ่ม 30 วัน (X_1) และ ปริมาณเชื้อ 100 มิลลิกรัมแห้ง (X_2) สามารถให้ค่าดัชนีความต้านทานต่อแรงดึงได้สูงที่สุด เท่ากับ 66.51 Nm/g

ตารางที่ 4.11 ปัจจัยและรหัสของปัจจัยในการทดลองแบบ Central composite design (CCD) ตลอดจนผลการตอบสนองที่ได้ (ดัชนีความต้านทานต่อแรงดึง) สำหรับการศึกษาระยะเวลาในการบ่มและปริมาณเชื้อที่เหมาะสมในการปรับสภาพไม้ด้วยรา

ปัจจัย		รหัสของปัจจัย		ดัชนีความต้านทานต่อแรงดึง (tensile index, N.m/g)
ระยะเวลาเวลาในการบ่ม (วัน)	ปริมาณเชื้อที่ใช้ (mg)	X_1	X_2	
10	50	-1	-1	63.15
10	75	-1	0	63.40
10	100	-1	1	63.87
20	50	0	-1	64.05
20	75	0	0	65.53
20	100	0	1	66.27
30	50	1	-1	64.66
30	75	1	0	65.95
30	100	1	1	66.51

นำผลการทดลองที่ได้มาอธิบายความสัมพันธ์ด้วยสมการรีเกรสชัน (regression) ระหว่างระยะเวลาในการบ่มกับปริมาณเชื้อที่ใช้ และการปรับสภาพไม้ด้วยราที่คัดเลือก โดยใช้โปรแกรม JMP software version 10 (StatSoft Inc., USA) ได้สมการรีเกรสชันดังนี้

$$Y = 65.42 + 1.12X_1 + 0.80X_2 + 0.28X_1X_2 - 0.69X_1^2 - 0.21X_2^2$$

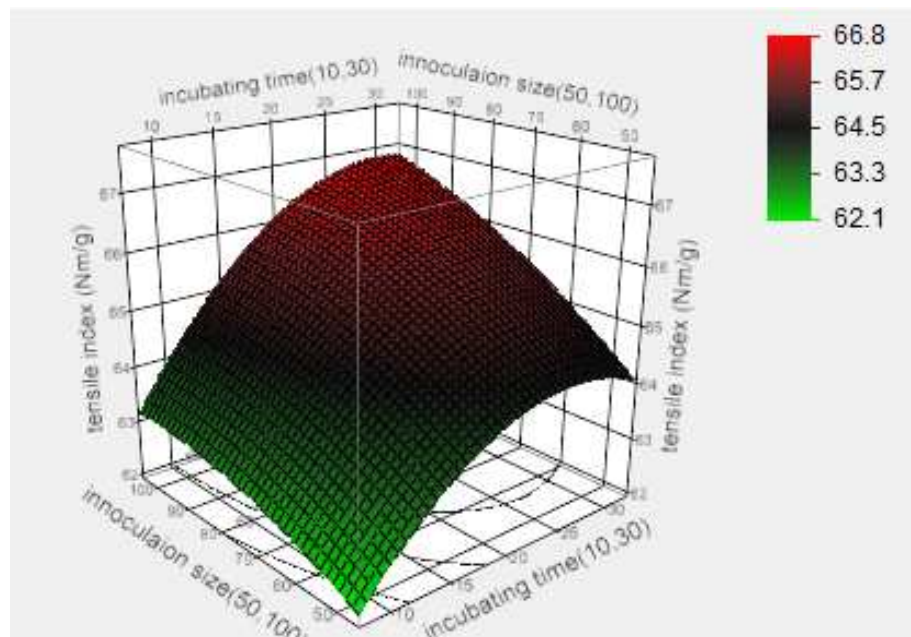
โดย Y คือค่าตอบสนอง (ดัชนีความต้านทานต่อแรงดึง, Nm/g)

X_1 คือ ระยะเวลาในการบ่ม (วัน)

X_2 คือ ปริมาณเชื้อที่ใช้ (มิลลิกรัมแห้ง)

เมื่อวิเคราะห์ความแปรปรวนของตัวแปรพบว่าค่า R^2 เท่ากับ 0.97 แสดงว่า การตอบสนองดังกล่าวเป็นผลจากตัวแปรในค่าตอบสนอง 97%

จากค่าการตอบสนองสามารถสร้างแผนภาพพื้นที่ผิวการตอบสนอง (contour plot) เพื่อคำนวณหาค่าที่เหมาะสมในแต่ละปัจจัยที่ส่งผลให้ได้สมบัติของกระดาษสูงที่สุด ดังรูปที่ 4.5



รูปที่ 4.5 ภาพพื้นที่ผิวการตอบสนองแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาในการบ่มและปริมาณเชื้อที่ใช้ต่อค่าดัชนีความต้านทานต่อแรงดึงของกระดาษที่ผลิตได้จากการปรับสภาพขึ้นไม้ด้วยรา

ในส่วนของคุณค่าปริมาณต่างที่เหลือ (ตารางที่ 4.12) โดยที่ระยะเวลาบ่ม 20 วัน (X_1) และปริมาณเชื้อ 75 มิลลิกรัมแห้ง (X_2) สามารถให้คุณค่าปริมาณต่างที่เหลือได้สูงที่สุด เท่ากับ 2.63 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 4.12 ปัจจัยและรหัสของปัจจัยในการทดลองแบบ Central composite design (CCD) ตลอดจนผลการตอบสนองที่ได้ (ปริมาณต่างที่เหลือ) สำหรับการศึกษาระยะเวลาในการบ่มและปริมาณเชื้อที่เหมาะสมในการปรับสภาพไม้ด้วยรา

ปัจจัย		รหัสของปัจจัย		ปริมาณต่างที่เหลือ (residual alkali, g/L)
ระยะเวลาเวลา ในการบ่ม (วัน)	ปริมาณเชื้อที่ใช้ (mg)	X_1	X_2	
10	50	-1	-1	2.26
10	75	-1	0	2.31
10	100	-1	1	2.33
20	50	0	-1	2.53
20	75	0	0	2.63
20	100	0	1	2.57
30	50	1	-1	2.53
30	75	1	0	2.53
30	100	1	1	2.57

นำผลการทดลองที่ได้มาอธิบายความสัมพันธ์ด้วยสมการรีเกรสชัน ระหว่างระยะเวลาในการบ่มกับปริมาณเชื้อที่ใช้ และการปรับสภาพไม้ด้วยราที่คัดเลือก โดยใช้โปรแกรม JMP software version 10 (StatSoft Inc., USA) ได้สมการรีเกรสชันดังนี้

$$Y = 2.59 + 0.122X_1 + 0.025X_2 - 0.008X_1X_2 - 0.155X_1^2 - 0.025X_2^2$$

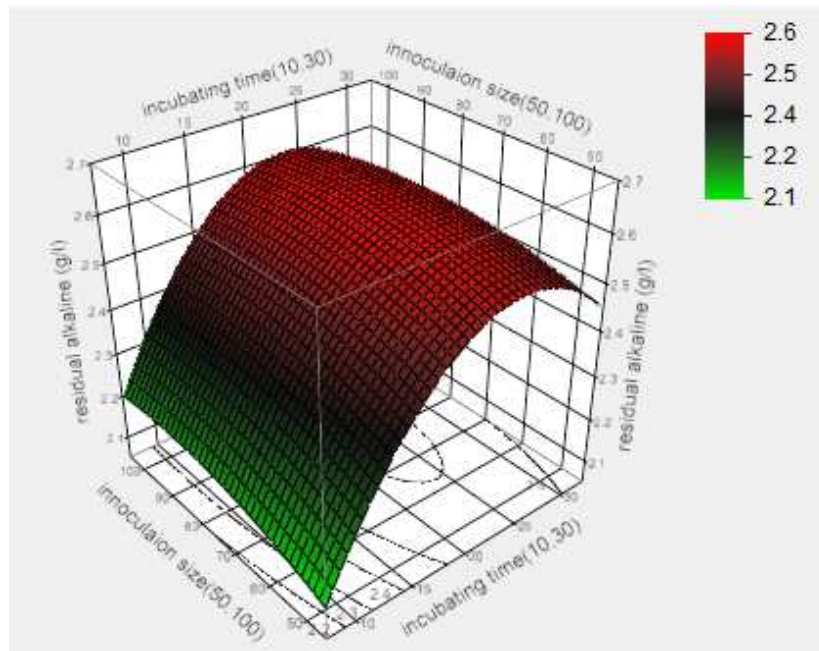
โดย Y คือค่าตอบสนองต่อปริมาณต่างที่เหลือ (g/l)

X_1 คือระยะเวลาในการบ่ม (วัน)

X_2 คือ ปริมาณเชื้อที่ใช้ (มิลลิกรัมแห้ง)

เมื่อวิเคราะห์ความแปรปรวนของตัวแปรพบว่าค่า R^2 เท่ากับ 0.98 แสดงว่า การตอบสนองดังกล่าวเป็นผลจากตัวแปรในค่าตอบสนอง 98%

จากค่าการตอบสนองสามารถสร้างแผนภาพพื้นที่ผิวการตอบสนอง (contour plot) เพื่อคำนวณหาค่าที่เหมาะสมในแต่ละปัจจัยที่ส่งผลให้ได้สมบัติของกระดาษสูงที่สุด ดังรูปที่ 4.6



รูปที่ 4.6 ภาพพื้นที่ผิวการตอบสนองแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาในการบ่มและปริมาณเชื้อที่ใช้ต่อค่าปริมาณต่างที่เหลือของกระดาษที่ผลิตได้จากการปรับสภาพขึ้นไม้ด้วยรา

จากการทดสอบสมการรีเกรสชันของค่าดัชนีความต้านทานต่อแรงดึงและปริมาณต่างที่เหลือในข้างต้น พบว่าค่าดัชนีความต้านทานต่อแรงดึงที่ได้จากแผนภาพพื้นที่ผิวการตอบสนองมีลักษณะเฉียงขึ้น แสดงถึงแนวโน้มของค่าที่ยังสามารถเพิ่มขึ้นได้ เมื่อเพิ่มปริมาณเชื้อและระยะเวลาในการบ่ม ในขณะที่ค่าปริมาณต่างที่เหลือจากแผนภาพพื้นที่ผิวการตอบสนองมีลักษณะโค้งลง ซึ่งแสดงถึงแนวโน้มของค่าปริมาณต่างที่เหลือที่สูงขึ้น เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการบ่มจนถึงวันที่ 25 จึงเริ่มลดลง และจากค่าตอบสนองพบว่าระยะเวลาในการบ่มมีผลต่อค่าปริมาณต่างที่เหลือที่เพิ่มขึ้นมากกว่าปริมาณเชื้อ

จากการทดสอบสมการรีเกรสชันที่ได้ โดยทดลองซ้ำด้วยภาวะที่เหมาะสม พบว่าให้ค่าดัชนีความต้านทานต่อแรงดึงที่ 67.32 Nm/g ซึ่งอยู่ในช่วงที่ทำนายได้ (65.71-67.38 Nm/g) และให้ปริมาณต่างที่เหลือที่ 2.57 g/l ซึ่งอยู่ในช่วงทำนายได้เช่นกัน (2.53-2.69 g/l) ดังนั้นแสดงว่าสมการที่หาได้จากแผนการทดลองข้างต้นสามารถอธิบายค่าตอบสนองทั้งสองที่ได้จากการปรับสภาพขึ้นไม้ได้อย่างแม่นยำ

4.3.4 การทดลองหาผลของขนาดขึ้นไม้ในการปรับสภาพที่มีต่อสมบัติกระดาษ

เมื่อใช้ปริมาณเชื้อรา 100 มิลลิกรัมของน้ำหมักแห้ง บ่มในขึ้นไม้ที่ผ่านการร่อนด้วยช่องตะแกรงขนาด 9.5 มิลลิเมตร เป็นเวลา 20 และ 30 วัน นำมาผลิตกระดาษด้วยวิธีคราฟต์ และวัดค่าปริมาณต่างที่เหลือได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.13 โดยพบว่าที่ระยะเวลาการบ่มเท่ากัน ค่าปริมาณต่างที่เหลือของชุดทดลองจากไม้ที่ผ่านการร่อนมีค่าเพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับปริมาณต่างที่เหลือของชุดทดลองที่ใช้ไม้ขนาดปกติ โดยให้ค่าที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 4.13 ค่าปริมาณต่างที่เหลือที่ได้หลังการต้มเยื่อจากไม้ที่ผ่านการร่อนซึ่งปรับสภาพด้วยราเทียบกับไม้ขนาดปกติ

ภาวะ	ปริมาณต่างที่เหลือ (residual alkali, g/L)*		
	ชุดควบคุม	100 mg/ 20 วัน	100 mg/ 30 วัน
ขึ้นไม้ปกติ	2.13±0.03 ^a	2.57±0.03 ^b	2.57±0.04 ^b
ขึ้นไม้ที่ผ่านการร่อน	2.18±0.03 ^a	2.70±0.03 ^a	2.64±0.04 ^a

*ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการวัดตัวอย่าง 5 ครั้ง ต่อ 1 ตัวอย่างนำค่า±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

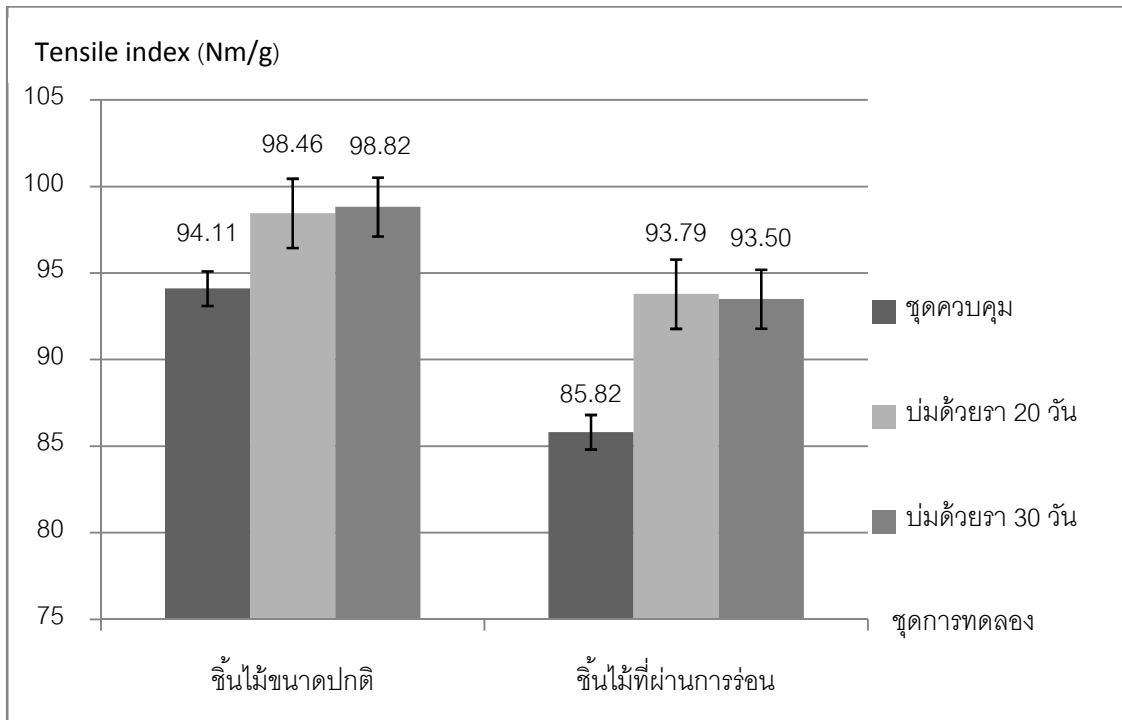
ตัวอักษรยกที่ต่างกันในแนวตั้งแสดงผลการทดลองที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$)

นำเยื่อมาผลิตกระดาษและทดสอบสมบัติเชิงกลได้ค่าดัชนีความต้านทานต่อแรงดึง ดังตารางที่ 4.14 โดยเมื่อเปรียบเทียบค่าดัชนีความต้านทานต่อแรงดึงของชุดการทดลองจากไม้ที่ผ่านการร่อนกับชุดการทดลองที่ใช้ไม้ขนาดปกติพบว่า ชุดการทดลองจากไม้ที่ผ่านการร่อนมีค่าดัชนีความต้านทานต่อแรงดึงต่ำกว่า แต่เมื่อพิจารณาค่าดัชนีความแข็งแรงต่อแรงดึงของไม้ที่ผ่านการปรับสภาพเทียบกับไม้ที่ไม่ปรับสภาพพบว่า การปรับสภาพด้วยราโดยใช้ไม้ที่ผ่านการร่อน ช่วยให้ค่าดัชนีความต้านทานต่อแรงดึงเพิ่มขึ้นได้มากกว่าการปรับสภาพด้วยไม้ขนาดปกติคิดเป็น 2.01 เท่า (รูปที่ 4.7)

ตารางที่ 4.14 ความต้านทานต่อแรงดึง (tensile index) ของกระดาษที่ผ่านการปรับสภาพด้วยราโดยใช้ไม้ที่ผ่านการร่อนเทียบกับสมบัติของไม้ขนาดปกติ

ภาวะ	ดัชนีความต้านทานต่อแรงดึง (tensile index, N.m/g)*		
	ชุดควบคุม	100 mg/ 20 วัน	100 mg/ 30 วัน
ชิ้นไม้ปกติ	63.34±1.25 ^a	66.27±2.52 ^a	66.51±2.97 ^a
ชิ้นไม้ที่ผ่านการร่อน	57.76±1.76 ^b	63.13±1.87 ^b	62.93±0.70 ^b

*ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการวัด 2 ชั้นทดสอบ ต่อตัวอย่างกระดาษ 1 แผ่น วัดทั้งสิ้น 5 ตัวอย่าง±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ตัวอักษรยกที่ต่างกันในแนวดิ่งแสดงผลการทดลองที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$)



รูปที่ 4.7 กราฟเปรียบเทียบค่าดัชนีความต้านทานต่อแรงดึงระหว่างชุดการทดลองที่ใช้ไม่ขนาดปกติกับชุดการทดลองที่ใช้ไม่ที่ผ่านการร่อน เมื่อบ่มด้วยเชื้อ 100 มิลลิกรัมแห้ง เป็นเวลา 20 และ 30 วัน

เมื่อวัดค่าดัชนีความต้านทานต่อแรงดึงของกระดาศะได้ผลดังตารางที่ 4.15 โดยพบว่าในชุดการทดลองที่ใช้ไม่ที่ผ่านการร่อน ค่าดัชนีความต้านทานต่อแรงดึงมีค่าลดลงเมื่อเทียบกับไม่ขนาดปกติ และพบว่าเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการปรับสภาพ ค่าดัชนีความต้านทานต่อแรงดึงมีค่าลดลงเมื่อเทียบกับชุดการทดลองที่ไม่ปรับสภาพ โดยการลดลงของค่าที่ได้จากชุดการทดลองที่ใช้ไม่ที่ผ่านการร่อนคิดเป็น 1.82% น้อยกว่าในชุดการทดลองที่ใช้ไม่ปกติซึ่งลดลงคิดเป็น 7.77%

เมื่อนำกระดาศะมาวัดสมบัติเชิงแสงได้ผลดังตารางที่ 4.16 และ 4.17 โดยพบว่าค่าความขาวสว่างของกระดาศะที่ผ่านการปรับสภาพด้วยราด้วยไม่ทั้งสองขนาดมีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อย เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้ปรับสภาพ โดยความขาวสว่างของกระดาศะจากข้าวไม่ปกติมีค่าสูงกว่ากระดาศะจากข้าวไม่ที่ผ่านการร่อนเล็กน้อย สำหรับค่าความทึบแสงของกระดาศะที่ได้จากการปรับสภาพไม่ทั้งสองขนาดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 4.15 ดัชนีความต้านทานต่อแรงฉีก (tear index) ของกระดาษที่ผ่านการปรับสภาพด้วยราโดยใช้ไม้ที่ผ่านการร่อนเทียบกับไม้ขนาดปกติ

ภาวะ	ดัชนีความต้านทานต่อแรงฉีก (tear index, mN.m ² /g)*		
	ชุดควบคุม	100 mg/ 20 วัน	100 mg/ 30 วัน
ชิ้นไม้ปกติ	6.18±0.22 ^a	5.70±0.14 ^a	5.48±0.19 ^b
ชิ้นไม้ที่ผ่านการร่อน	4.39±0.17 ^b	4.31±0.13 ^b	4.31±0.18 ^a

*ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการวัด 2 ซีนทดสอบ ต่อตัวอย่างกระดาษ 1 แผ่น วัดทั้งสิ้น 5 ตัวอย่าง±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ตัวอักษรยกที่ต่างกันในแนวดิ่งแสดงผลการทดลองที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$)

ตารางที่ 4.16 ค่าความขาวสว่าง (Brightness) ของกระดาษที่ผ่านการปรับสภาพด้วยราโดยใช้ไม้ที่ผ่านการร่อนเทียบกับไม้ขนาดปกติ

ภาวะ	ความขาวสว่าง (Brightness, %)*		
	ชุดควบคุม	100 mg/ 20 วัน	100 mg/ 30 วัน
ชิ้นไม้ปกติ	24.20±0.10 ^a	24.47± 0.09 ^a	24.57±0.19 ^a
ชิ้นไม้ที่ผ่านการร่อน	24.06±0.26 ^b	24.30±0.11 ^b	24.47±0.16 ^b

*ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการวัดตัวอย่าง 5 ครั้งต่อตัวอย่างกระดาษ 1 แผ่น วัดทั้งสิ้น 5 ตัวอย่าง±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ตัวอักษรยกที่ต่างกันในแนวดิ่งแสดงผลการทดลองที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$)

ตารางที่ 4.17 ค่าความทึบแสง (opacity) ของกระดาษที่ผ่านการปรับสภาพด้วยราโดยใช้ไม้ที่ผ่านการ ร้อนเทียบกับไม้ขนาดปกติ

ภาวะ	ความทึบแสง (opacity, %)*		
	ชุดควบคุม	100 mg/ 20 วัน	100 mg/ 30 วัน
ขึ้นไม้ปกติ	99.82±0.19 ^a	99.80±0.10 ^a	99.88±0.05 ^a
ขึ้นไม้ที่ผ่านการร้อน	99.80±0.07 ^a	99.82±0.05 ^a	99.83±0.05 ^a

*ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการวัดตัวอย่าง 5 ครั้งต่อตัวอย่างกระดาษ 1 แผ่น วัดทั้งสิ้น 5 ตัวอย่าง+ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน ตัวอักษรยกที่ต่างกันในแนวดิ่งแสดงผลการทดลองที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทาง สถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$)

สำหรับค่าค่าความเรียบ (smoothness) ของกระดาษที่ผ่านการปรับสภาพด้วยราในไม้ทั้งสอง ขนาดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ตารางที่ 4.18)

ตารางที่ 4.18 ค่าความเรียบ (smoothness) ของกระดาษที่ผ่านการปรับสภาพด้วยราโดยใช้ไม้ที่ผ่าน การร้อนเทียบกับไม้ขนาดปกติ

ภาวะ	ค่าความเรียบ (smoothness, s)		
	ชุดควบคุม	100 mg/ 20 วัน	100 mg/ 30 วัน
ขึ้นไม้ปกติ	15.77±0.11 ^a	15.54± 0.26 ^a	15.51±0.31 ^a
ขึ้นไม้ที่ผ่านการร้อน	15.81±0.43 ^a	15.68±0.54 ^a	15.63±0.45 ^a

*ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการวัดตัวอย่าง 5 ครั้งต่อตัวอย่างกระดาษ 1 แผ่น วัดทั้งสิ้น 5 ตัวอย่าง+ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน ตัวอักษรยกที่ต่างกันในแนวดิ่งแสดงผลการทดลองที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทาง สถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$)

4.4 การเปรียบเทียบสมบัติกระดาษกับชุดการทดลองที่ปรับสภาพด้วยสาหร่ายพันธุ์อ้างอิง

จากการปมขึ้นไม้ด้วยราที่คัดเลือกได้ (SK7) และสาหร่ายพันธุ์อ้างอิง (*Phanerochaete chrysosporium*) เป็นระยะเวลา 25 วัน ปริมาณเชื้อ 100 มิลลิกรัมแห้ง พบว่าราทั้งสองสายพันธุ์มีการเจริญเต็มฟลาสก์ โดย *P. chrysosporium* มีการสร้างสปอร์เป็นสีขาวกระจายบนชิ้นไม้ (รูปที่ 4.8 ก) ในขณะที่ SK7 ไม่พบการสร้างสปอร์ มีเพียงเส้นใยสีขาวขึ้นบางๆทั่วทั้งฟลาสก์ (รูปที่ 4.8 ข) และชิ้นไม้จากชุดทดลองที่ปรับสภาพด้วยราทั้งสองสายพันธุ์มีสีอ่อนกว่าชิ้นไม้ที่ไม่ปรับสภาพด้วยรา (รูปที่ 4.9 ก-ค) นำไม้มาผลิตเยื่อและนำมาขึ้นแผ่นกระดาษ พบว่ากระดาษที่ได้จากการปรับสภาพด้วยราทั้งสองมีสีและลักษณะไม่แตกต่างกันเมื่อพิจารณาด้วยตาเปล่า (รูปที่ 4.10) จากนั้นเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการปรับสภาพชิ้นไม้ด้วยราที่คัดเลือกกับสาหร่ายพันธุ์อ้างอิง โดยพิจารณาจากปริมาณต่างที่เหลือ (ตารางที่ 4.19) พบว่าปริมาณต่างที่เหลือจากการต้มเยื่อที่ผ่านการปรับสภาพด้วยราในชุดการทดลองที่ใช้รา SK7 และ *P. chrysosporium* มีค่าต่างที่เหลือเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยคิดเป็น 21.8% และ 22.75% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ผ่านการปรับสภาพด้วยรา



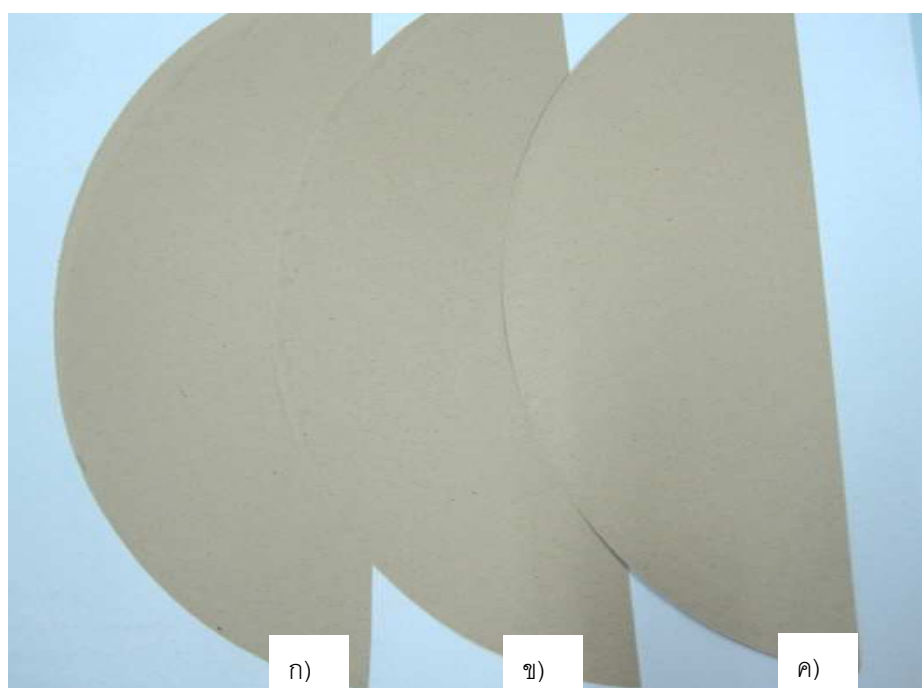
ก)

ข)

รูปที่ 4.8 ลักษณะการเจริญของราบนชิ้นไม้ ก) *Phanerochaete chrysosporium* ข) SK7



รูปที่ 4.9 ชี้น้ไม้จากชุดการทดลอง ก) ผ่านการปรับสภาพด้วยราที่คัดเลือก ข) ผ่านการปรับสภาพด้วยราสายพันธุ์อ้างอิง ค) ไม่ปรับสภาพด้วยรา



รูปที่ 4.10 กระดาษที่ได้จากการผลิตเยื่อกระดาษ ก) จากไม้ที่ปรับสภาพด้วยราที่คัดเลือกด้วยภาวะที่เหมาะสม ข) จากไม้ที่ปรับสภาพด้วยราสายพันธุ์อ้างอิงด้วยภาวะที่เหมาะสม ค) ไม้ที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ

ตารางที่ 4.19 ค่าปริมาณต่างที่เหลือที่ได้หลังการต้มเยื่อจากไม้ซึ่งปรับสภาพด้วยราที่คัดเลือกและราสายพันธุ์อ้างอิง

ภาวะ	ปริมาณต่างที่เหลือ* (residual alkali, g/L)
25% (ชุดควบคุม)	2.11±0.04 ^b
SK7	2.57±0.04 ^a
<i>P. chrysosporium</i>	2.59±0.03 ^a

*ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการวัดตัวอย่าง 5 ครั้ง ต่อ 1 ตัวอย่าง น้ำดำ±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานตัวอักษรยกที่ต่างกันในแนวดิ่งแสดงผลการทดลองที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$)

เมื่อวัดสมบัติเชิงแสงของกระดาษ พบว่าค่าความขาวสว่าง (brightness) ของกระดาษที่ผ่านการปรับสภาพด้วยรา SK7 มีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อย (0.78%) และที่ปรับสภาพด้วย *P. chrysosporium* มีค่าลดลง 4.15% เมื่อเทียบกับชุดควบคุม ในขณะที่ความทึบแสงของไม้ทั้งสองขนาดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4.20)

สำหรับสมบัติเชิงกล (ตารางที่ 4.21) พบว่าค่าดัชนีความต้านทานต่อแรงดึงของเยื่อที่ผ่านการปรับสภาพด้วยรา SK7 และ *P. chrysosporium* มีค่าเพิ่มขึ้น 4.37% และ 4.31% ตามลำดับ ในขณะที่ค่าดัชนีความต้านทานต่อแรงฉีกมีค่าลดลง 9.39% และ 3.30% ตามลำดับเมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ผ่านการปรับสภาพด้วยรา

และสำหรับความเรียบของกระดาษที่ได้จากการปรับสภาพด้วยราทั้งสองสายพันธุ์พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ปรับสภาพด้วยรา (ตารางที่ 4.22)

ตารางที่ 4.20 เปรียบเทียบสมบัติเชิงแสงของกระดาษที่ผ่านการปรับสภาพด้วยราที่คัดเลือก (SK7) กับราสายพันธุ์อ้างอิง (*Phanerochaete chrysosporium*)

ภาวะ	สมบัติเชิงแสง*	
	ความขาวสว่าง (Brightness, %)	ความทึบแสง (Opacity, %)
ชุดควบคุม	24.32±0.13 ^a	99.83±0.04 ^a
SK7	24.51±0.34 ^a	99.87±0.06 ^a
<i>P. chrysosporium</i>	23.31±0.32 ^b	99.85±0.03 ^a

*ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการวัดตัวอย่าง 5 ครั้งต่อตัวอย่างกระดาษ 1 แผ่น วัดทั้งสิ้น 5 ตัวอย่าง±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานตัวอักษรยกที่ต่างกันในแนวดิ่งแสดงผลการทดลองที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$)

ตารางที่ 4.21 เปรียบเทียบค่าความเรียบ (smoothness) ของกระดาษที่ผ่านการปรับสภาพด้วยราที่คัดเลือก (SK7) กับราสายพันธุ์อ้างอิง (*Phanerochaete chrysosporium*)

ภาวะ	ความเรียบ (smoothness, s)
ชุดควบคุม	15.68±0.32 ^a
SK7	15.56±0.34 ^a
<i>P. chrysosporium</i>	15.60±0.22 ^a

*ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการวัดตัวอย่าง 5 ครั้งต่อตัวอย่างกระดาษ 1 แผ่น วัดทั้งสิ้น 5 ตัวอย่าง±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานตัวอักษรยกที่ต่างกันในแนวดิ่งแสดงผลการทดลองที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$)

ตารางที่ 4.21 เปรียบเทียบสมบัติเชิงกลของกระดาษที่ผ่านการปรับสภาพด้วยราที่คัดเลือก (SK7) กับราสายพันธุ์อ้างอิง (*Phanerochaete chrysosporium*)

ภาวะ	สมบัติเชิงกล*	
	ดัชนีความต้านทานต่อแรงดึง (tensile index, N.m/g)	ดัชนีความต้านทานต่อแรงฉีก (tear index, mN.m ² /g)
ชุดควบคุม	64.50±0.70 ^b	6.07±0.29 ^a
SK7	67.32±2.86 ^a	5.50±0.26 ^b
<i>P. chrysosporium</i>	67.28±2.15 ^a	5.87±0.15 ^a

*ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการวัด 2 ชั้นทดสอบ ต่อตัวอย่างกระดาษ 1 แผ่น จำนวน 5 ตัวอย่าง±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ตัวอักษรยกที่ต่างกันในแนวดิ่งแสดงผลการทดลองที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$)

บทที่ 5

อภิปรายผลการวิจัย

5.1 เลี้ยงราเน่าขาวสายพันธุ์ต่างๆ และคัดเลือกราที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ที่เหมาะสม

5.1.1 การเลี้ยงราเน่าขาวสายพันธุ์ต่างๆ

จากการเลี้ยงราเน่าขาวจากหน่วยปฏิบัติการวิจัยและใช้ประโยชน์จากชีวมวลพืชในอาหารสูตร MEA เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง ราสามารถเจริญได้ 14 ไอโซเลต โดยรดังกล่าวประกอบด้วยรากลุ่มเห็ดสร้างดอกบนขอนไม้และรากลุ่มริซูปิเนต (resupinate fungi) ซึ่งมีการเจริญในลักษณะแผ่ราบบนไม้ โดยโคโลนีของราที่เพาะเลี้ยงมีลักษณะแบนและไม่สร้างสปอร์ โดยในบางไอโซเลตพบว่าเจริญได้เร็วไม่แตกต่างจาก *Phanerocheate chrysosporium* ที่เป็นสายพันธุ์มาตรฐาน

5.1.2 ทดสอบการสร้างเอนไซม์ลิกนินโนโลติก

จากการศึกษาการสร้างเอนไซม์ลิกนินโนโลติกด้วยวิธี Plate screening method ในกรณีการตรวจสอบการสร้างเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสด้วยการเติม azure B ในอาหารแข็ง โดยสังเกตการสร้างเอนไซม์จากการเปลี่ยนแปลงวงสีอาหารรอบโคโลนีจากสีน้ำเงินเป็นไม่มีสี ซึ่งเป็นผลจาก decolorized ของ azure B ด้วยเอนไซม์ โดย azure B เป็นสารสังเคราะห์ที่มีความจำเพาะต่อการตรวจสอบเอนไซม์กลุ่มเปอร์ออกซิเดสและไม่มีการตอบสนองต่อแลคเคส (Archibald, 1992) ซึ่งจากการทดสอบพบว่าราที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงวงสีของอาหารแข็งดังกล่าวมี 2 ไอโซเลต ได้แก่ SK7 และ CUT3 รวมถึงพบการเปลี่ยนแปลงวงสีในราสายพันธุ์อ้างอิงคือ *P. chrysosporium* ซึ่งสอดคล้องรายงานที่ผ่านมาซึ่งพบว่า *P. chrysosporium* มีการสร้างลิกนินเปอร์ออกซิเดสได้ดี โดยลิกนินเปอร์ออกซิเดสเป็นเอนไซม์ที่สำคัญของราเน่าขาวซึ่งสามารถให้ค่า redox potential สูงกว่าเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสและออกซิเดสชนิดอื่นๆ (Hammel และคณะ, 1986; Kersten และคณะ, 1990) และมีรายงานว่าค่า ionization potential (IP) สูงถึง 9.0 eV (Have และคณะ, 1998) ลิกนินเปอร์ออกซิเดสมีบทบาทสำคัญในการผลิตเยื่อแบบชีวภาพดังเห็นได้จาก *P. chrysosporium* ซึ่งเป็นราเน่าขาวที่ให้ประสิทธิภาพ

สูงในการผลิตเยื่อแบบชีวภาพ และพบว่าสามารถสร้างลิกนินเปอร์ออกซิเดสได้ดี (Singh และ Chen, 2008) ราที่สร้างลิกนินเปอร์ออกซิเดสจึงมีความน่าสนใจในการนำไปใช้ในการปรับสภาพในขั้นต่อไป

สำหรับการทดสอบแลคเคสด้วยการเติม ABTS ในอาหารแข็ง โดยสังเกตการสร้างเอนไซม์จากการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารรอบโคโลนีจากสีขาวเป็นสีเขียว ซึ่งสีที่เกิดขึ้นเป็นผลจากการที่ ABTS ถูกออกซิไดซ์ กลายเป็น ABTS radical ซึ่งจะให้สีเขียวถึงสีม่วง โดย ABTS เป็นสารที่จำเพาะต่อเอนไซม์กลุ่ม extracellular radical-generating enzymes ซึ่งรวมถึงแลคเคส (Hatakka และคณะ, 2001) จากการทดสอบพบว่าราที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารแข็งได้มี 6 ไอโซเลต โดย SK7 ให้ค่าเส้นผ่านศูนย์กลางการเปลี่ยนแปลงวงสีที่ดีที่สุด รองลงมาคือ KK16

และในการตรวจสอบการสร้างแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสใช้ phenol red เป็นสารตั้งต้นเดิมในอาหารแข็ง โดยแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสเป็นเอนไซม์ที่ต้องการไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และแมงกานีสอิสระเป็นเมดิเอเตอร์ในปฏิกิริยา (Shrestha, 2008; Thongkred และคณะ, 2011) ซึ่งตรวจสอบการสร้างได้จากการเกิดวงสีแดงชมพูรอบโคโลนีของรา จากการตรวจสอบเอนไซม์ชนิดนี้ในราที่ทดสอบพบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของวงสี จึงอาจเป็นไปได้ว่าราที่ใช้ในการทดสอบไม่มีการสร้างแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสในปริมาณที่สามารถตรวจสอบได้โดยวิธีนี้ หรือมีการสร้างแต่ไม่สามารถตรวจสอบได้โดยวิธีดังกล่าว

5.1.3 การทดสอบเซลลูเลส

โดยทั่วไปแล้วราเน่าขาวจะมีการสร้างเอนไซม์เพื่อใช้ประโยชน์ที่ต่างกัน ขึ้นกับสายพันธุ์ของรา (Blancette และคณะ, 1988; 1992) ราเน่าขาวแต่ละสายพันธุ์อาจมีการสร้างเซลลูเลสในปริมาณมากหรือน้อย ซึ่งราที่มีการสร้างเซลลูเลสปริมาณน้อย เป็นราที่มีประสิทธิภาพในการนำไปใช้ในงานที่มีวัตถุประสงค์ในการกำจัดลิกนินแบบจำเพาะและต้องการรักษาส่วนที่เป็นเซลลูโลสไว้ ซึ่งจากการตรวจสอบการสร้างเซลลูเลสในราที่มีการสร้างเอนไซม์ลิกนินไคติกได้ดีในข้างต้น พบว่ามีเพียงรา KK 66 ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของอาหารแข็งเมื่อทดสอบด้วยอาหารสูตร CBM ที่เติม CMC เป็นสารตั้งต้น โดยเมื่อ CMC ถูกย่อยสลายด้วยเซลลูเลสจะเกิดการเปลี่ยนโครงสร้าง และเมื่อใช้แกรมไอโอดีนย้อม อาหารแข็งส่วนที่มี CMC จะติดสี ในขณะที่บริเวณที่ CMC ถูกย่อยด้วยเซลลูเลสจะเห็นเป็นวงใสไม่ติดสีน้ำตาลของแกรมไอโอดีน (Kasana, 2008)

จากข้อมูลผลการทดสอบเอนไซม์ดังกล่าวจึงสรุปได้ว่า SK7 CUT3 และ KK16 มีการสร้างเอนไซม์ลิกนินไโกลติกได้ดีและไม่สร้างเซลลูเลส ซึ่งมีความเหมาะสมแก่การคัดเลือกเพื่อนำไปใช้ปรับสภาพในขั้นต่อไป

5.2 การคัดเลือกที่มีความเหมาะสมกับการปรับสภาพชิ้นไม้

5.2.1 องค์ประกอบทางเคมีของไม้ตัวอย่าง

จากการตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของไม้ยูคาลิปตัสด้วยวิธีวิเคราะห์ % Neutral detergent fiber (NDF) ซึ่งเป็นวิธีหาเปอร์เซ็นต์องค์ประกอบภายในไม้โดยใช้สารเคมีในการทำปฏิกิริยากับองค์ประกอบต่างๆ และคำนวณเป็นสัดส่วนจากน้ำหนักคงเหลือของไม้ โดยนำไม้มาทำปฏิกิริยากับสารเคมีที่เป็นกลาง (neutral detergent) เพื่อละลายสารแทรก (extractive) ต่อมาเฮมิเซลลูโลสจะถูกละลายด้วยสารเคมีที่เป็นกรด (acid detergent) ลิกนินจะถูกทำปฏิกิริยาด้วยสารละลาย combine permanganate lignin และถูกชะออกมาด้วยสารละลายกรด และขั้นสุดท้ายเซลลูโลสจะถูกคำนวณจากการนำตัวอย่างไปเผาที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส (นฤมล ชูบัวทอง, 2550) จากวิธีการดังกล่าวพบว่าไม้ยูคาลิปตัสตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองมีปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน เป็น 48.38%, 15.49% และ 26.93% ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่ผ่านมาที่พบว่าปริมาณของเซลลูโลสในไม้ยูคาลิปตัสโดยปกติมีค่าอยู่ในช่วง 40.2%-50.0% เฮมิเซลลูโลสอยู่ในช่วง 15.9%-19% และลิกนินอยู่ในช่วง 22.9%-27.1% (Ferraz และคณะ 2000; Canettieri และคณะ, 2007; Barneto และคณะ, 2011) ซึ่งปริมาณองค์ประกอบทางเคมีของไม้ชนิดต่างๆ มีความแตกต่างกันขึ้นกับหลายปัจจัย เช่น ชนิดและสายพันธุ์ของพืช อายุ ระยะการเจริญ รวมไปถึงสภาพแวดล้อม (Singh และคณะ, 2010) โดยองค์ประกอบภายในไม้มีผลต่อความเหมาะสมในการนำไปใช้ประโยชน์และการย่อยสลายองค์ประกอบของราที่มีการเจริญบนไม้ (Tuor และคณะ 1995)

5.2.2 ทดสอบประสิทธิภาพในการปรับสภาพไม้ยูคาลิปตัสด้วยราที่คัดเลือกได้

จากการศึกษาประสิทธิภาพในการปรับสภาพไม้ด้วยราที่คัดเลือก ได้แก่ SK7 CUT3 และ KK16 พบว่าสามารถทำให้ลิกนินภายในไม้มีค่าลดลงเมื่อเทียบกับไม้ที่ไม่ปรับสภาพคิดเป็น 19.23%, 18.49% และ 15.45% ตามลำดับ ที่ระยะเวลาบ่ม 15 วัน ซึ่งมีความสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาซึ่งมีรายงานว่าราเน่าขาวหลายชนิดให้ประสิทธิภาพที่ดีในการปรับสภาพไม้ยูคาลิปตัส ได้แก่

Peniophora lycii, *Ceriporiopsis subvermispora*, *P. chrysosporium* และ *Trametes sp.* เป็นต้น ซึ่งสามารถทำให้ลิกนินในไม้มีค่าลดลงตั้งแต่ 5%-20% เมื่อเทียบกับไม้ที่ไม่ปรับสภาพที่ระยะเวลาปม 7-21 วัน (Ferraz และคณะ, 2003; Yang และคณะ, 2007; Speranza และคณะ, 2009; Yadav และคณะ, 2010)

สำหรับการตรวจสอบเอนไซม์ลิกนินโกลติกของราหลังการปรับสภาพพบว่า SK7 มีการสร้างเอนไซม์ 2 ชนิด โดยมีแอกติวิตีของแลคเคสสูงที่สุด (0.1532 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) และมีแอกติวิตีของแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสสูงเป็นอันดับสอง (0.019 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) สำหรับ CUT3 มีแอกติวิตีของลิกนินเปอร์ออกซิเดสสูงที่สุด (0.0601 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) และ KK16 มีการสร้างแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสได้ดีที่สุด (0.153 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ซึ่งแอกติวิตีของราที่ศึกษาได้สอดคล้องกับค่าการลดลงของลิกนินซึ่งวัดได้จากการตรวจสอบองค์ประกอบของไม้ในข้างต้น

ทั้งนี้ในผลการตรวจสอบแอกติวิตีของแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสพบว่าไม่สอดคล้องกับการตรวจสอบการสร้างเอนไซม์ในอาหารแข็ง ซึ่งคาดว่าเป็นผลจากในการทดสอบโดยใช้อาหารแข็งการสัมผัสกับอาหารและสารจำเป็นในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์หรือเมดิเอเตอร์ในปฏิกิริยาอาจเกิดได้ไม่ดี ต่างจากการทำปฏิกิริยาของการวัดเอนไซม์เชิงปริมาณซึ่งอยู่ในรูปสารละลายเอนไซม์ จึงทำให้ค่าที่ได้ไม่สอดคล้องกับการวัดเชิงปริมาณ

จากการทดสอบประสิทธิภาพในการปรับสภาพของราโดยพิจารณาค่าแอกติวิตีของการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบไม้ รา SK7 จึงมีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการปรับสภาพเพื่อผลิตเยื่อในขั้นต่อไป

5.3 การหาภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพขึ้นไม้เพื่อการผลิตเยื่อกระดาษแบบคราฟต์

5.3.1 การผลิตกระดาษจากเยื่อคราฟต์ชุดควบคุมจากขึ้นไม้ที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ

การผลิตเยื่อคราฟต์เป็นการผลิตเยื่อเคมีที่ใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์และโซเดียมซัลไฟด์เป็นสารในการทำปฏิกิริยาในการกำจัดลิกนินและทำให้เกิดการแยกออกจากกันของเยื่อ โดยจะแสดงค่าสารเคมีที่ใช้ในรูปของแอกทีฟอัลคาไลน์ (active alkaline) หรือ (effective alkaline) และค่าซัลฟิดิตี (sulfidity) ซึ่งบอกถึงสารเคมีที่ทำปฏิกิริยาในระหว่างการผลิตเยื่อ (Casey, 1980) ค่าซัลฟิดิตีมีการใช้ตั้งแต่ 10%-

40% แต่โดยปกตินิยมใช้ที่ 25% (Fujioka และ Nishiyama, 1974; Yang และ Lai, 1997; Rahmati, 2001) โดยระหว่างการทำเยื่อ ซัลไฟด์ไอออน (S^{2-}) ไฮโดรเจนซัลไฟด์ไอออน (SH^-) และ ไฮดรอกไซด์ไอออน (OH^-) จะทำปฏิกิริยากับลิกนิน สารที่เป็นกรดอินทรีย์ และสารแทรกในไม้ (Lindedahl, 2008) โดยในการย่อยสลายลิกนิน SH^- และ OH^- จะทำปฏิกิริยาลิกนินบริเวณที่เป็นพันธะ β -aryl ether และ α -aryl ether (Chakar, 2004) การเพิ่มหมู่ไอออนที่ทำปฏิกิริยาช่วยให้เยื่อกราฟต์มีความแข็งแรงสูง แต่มีค่าความขาวสว่างต่ำเมื่อไม่ผ่านการฟอก ผลผลิตเยื่อที่ได้มีค่าในช่วง 40-50%

จากการผลิตเยื่อกราฟต์ด้วยตัวอย่างชิ้นไม้เพื่อหาความเข้มข้นสารเคมีที่เหมาะสมในการผลิตเยื่อ พบว่าค่าผลผลิตเยื่อที่ได้มีความสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมา และพบว่าเวลาที่เหมาะสมในการบดเยื่อให้มีสภาพระบายได้ที่เหมาะสม (320-370 ml CSF) อยู่ที่ 50 นาที ซึ่งเป็นระยะเวลาที่นำไปใช้สำหรับบดเยื่อในครั้งต่อไป

และเมื่อพิจารณาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการผลิตเยื่อ พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของต่างที่ใช้ในการต้มเยื่อ ความแข็งแรงของกระดาษจะมีค่าเพิ่มขึ้น เนื่องจากการแยกตัวของเส้นใยเกิดได้ดีขึ้น อันเป็นผลจากการมีสารเคมีที่ทำปฏิกิริยาในระบบเพิ่มขึ้น (Casey, 1980) ซึ่งส่งผลให้ผลผลิตเยื่อที่ได้ลดลง สอดคล้องกับรายงานของ Rautiainen และ Alén (2009) ดังนั้นเมื่อพิจารณาความเข้มข้นต่างที่ 28% พบว่าปริมาณต่างที่เหลือในระบบมีมาก ซึ่งสิ้นเปลืองสารเคมีที่ใช้ในการผลิต และยังมีผลให้ผลผลิตเยื่อที่ได้น้อยลง ประกอบกับค่าความแข็งแรงของกระดาษที่ได้จากการต้มที่ความเข้มข้นต่าง 25% และ 28% ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จึงได้เลือกความเข้มข้นต่างที่ 25% มาใช้ในการผลิตเยื่อในขั้นตอนต่อไป

5.3.2 การปรับสภาพชิ้นไม้โดยแปรผันปัจจัยที่เกี่ยวข้องในการปรับสภาพ

จากการนำชิ้นไม้มาปรับสภาพด้วยราที่คัดเลือกได้ (SK7) พบว่ารามีการเจริญเป็นเส้นใยบางๆ คลุมชิ้นไม้ทั่วทั้งฟลากลุ่ม ไม่มีการสร้างสปอร์ โดยเมื่อเวลาในการบ่มเพิ่มขึ้น การเจริญของเส้นใยมีความหนาแน่นของเส้นใยเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน

จากสมบัติของกระดาษที่ได้จากการปรับสภาพด้วยราที่คัดเลือก พบว่าความเรียบของกระดาษที่ได้จากชุดทดลองที่ปรับสภาพไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกระดาษควบคุม

สำหรับสมบัติด้านความแข็งแรงพบว่า การปรับสภาพด้วยราช่วยเพิ่มค่าดัชนีความต้านทานต่อแรงดึงได้สูงสุด 5.0% เมื่อปรับสภาพที่ 30 วัน ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานที่ผ่านมาที่พบว่า การใช้ราเน่าขาวในการปรับสภาพไม้ยูคาลิปตัสสามารถเพิ่มค่าดัชนีความต้านทานต่อแรงดึง (tensile index) ได้ในช่วง 3.13%-13.7% (Gutierrez และคณะ, 2000; Bajpai และคณะ, 2001) โดยจากการศึกษาความสัมพันธ์ของตัวแปร (ระยะเวลาในการบ่มและปริมาณเชื้อ) และค่าตอบสนอง (ค่าดัชนีความต้านทานต่อแรงดึง) จากแผนภาพการตอบสนองที่ได้ พบว่าค่าดัชนีความต้านทานต่อแรงดึงยังมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการบ่มและปริมาณเชื้อ

สำหรับดัชนีความต้านทานต่อแรงฉีก (tear index) ของชุดทดลองที่ปรับสภาพด้วยรามีค่าลดลงเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการบ่มและปริมาณเชื้อ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาซึ่งรายงานว่า การปรับสภาพด้วยราจะส่งผลให้ค่าดัชนีความต้านทานต่อแรงฉีกลดลงเมื่อเทียบกับชุดทดลองที่ไม่ปรับสภาพ โดยมีค่าลดลงตั้งแต่ 3.18%-14.6% (Gutierrez และคณะ, 2000; Bajpai และคณะ, 2001)

จากการเพิ่มขึ้นของค่าดัชนีความต้านทานต่อแรงดึงและการลดลงของค่าดัชนีความต้านทานต่อแรงฉีกของกระดาษเมื่อใช้ไม้ที่ปรับสภาพด้วยรดังกล่าว สามารถอธิบายได้จากการศึกษาของ Yadav และคณะ (2010) โดยพบว่าผนังเส้นใยของไม้ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยราเน่าขาวมีลักษณะบวมและอ่อนนุ่ม รวมถึงรายงานของ Yang และคณะ (2007) ที่พบว่า การปรับสภาพไม้ด้วยราเน่าขาวจะช่วยเพิ่มการแตกแขนงของเส้นใย (fibrillation) ซึ่งการที่เส้นใยอ่อนนุ่มและแตกแขนงมากจะส่งผลให้การทำพันธะของเส้นใยเกิดได้ดีขึ้น (Zhang และคณะ, 2013) และทำให้ค่าดัชนีความต้านทานต่อแรงดึงมีค่าสูงขึ้น เนื่องจากดัชนีความต้านทานต่อแรงดึงเป็นค่าที่แสดงถึงความแข็งแรงของกระดาษที่เกิดจากพันธะระหว่างเส้นใย ในขณะที่เมื่อเส้นใยมีการแตกแขนงมากขึ้นเส้นใยก็มีความแข็งแรงในตัวเองน้อยลง ทำให้ค่าดัชนีความต้านทานต่อแรงฉีกซึ่งแสดงถึงความแข็งแรงภายในของเส้นใยมีค่าลดลง จึงมีรายงานว่าส่วนใหญ่เมื่อดัชนีความต้านทานต่อแรงดึงเพิ่มขึ้นค่าดัชนีความต้านทานต่อแรงฉีกมักมีค่าน้อยลง (Covan, 1995) ซึ่งสอดคล้องกับผลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้

ในส่วนของการตรวจสอบปริมาณด่างที่เหลือ (residual alkali) จากน้ำดำของชุดการทดลองที่ปรับสภาพด้วยรา พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณเชื้อและระยะเวลาในการบ่ม ปริมาณด่างที่เหลือจะมีค่าเพิ่มขึ้น ซึ่งช่วงระยะเวลาในการบ่มที่ 20-30 วัน มีค่าปริมาณด่างที่เหลือเพิ่มขึ้นสูงสุด คิดเป็น 23.47% เมื่อเทียบกับไม้ที่ไม่ปรับสภาพ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่ผ่านมาที่พบว่า การปรับสภาพไม้ด้วยราช่วยลด

การใช้สารเคมีในระบบซึ่งเป็นผลจากการที่เอนไซม์จากราทำปฏิกิริยากับองค์ประกอบในไม้ (Vicentim และคณะ, 2009; Yadav และคณะ, 2010) และจากผลการศึกษาที่ได้เมื่อนำมาศึกษาความสัมพันธ์ของ ปัจจัย (ระยะเวลาในการบ่มและปริมาณเชื้อ) ที่มีต่อค่าตอบสนอง (ปริมาณต่างที่เหลือ) โดยใช้สมการ รีเกรสชันพบว่าปริมาณต่างที่เหลือมีค่าสูงสุดเมื่อบ่มที่ 25 วัน และมีค่าลดลงเมื่อระยะเวลาบ่มเพิ่มขึ้น ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการที่เส้นใยราเริ่มมีการเจริญหนาแน่นเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นและเริ่มมีการใช้สารเคมีในระบบ ตลอดจนอาจมีการเพิ่มขึ้นของสารประกอบที่เป็นกรดในองค์ประกอบของเยื่อ เช่น กรดออกซาลิก ซึ่งเกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์จากรา เมื่อระยะเวลาบ่มเพิ่มขึ้นทำให้มีผลต่อพีเอชของเยื่อ และการทำปฏิกิริยาของต่างในระบบ (Vicentim และคณะ, 2009)

นอกจากนี้จากยังพบว่าปริมาณเชื้อที่ใช้มีอิทธิพลต่อปริมาณต่างที่เหลือน้อยกว่าระยะเวลาในการบ่ม ซึ่งอาจเป็นผลมาจากเมื่อราเจริญครอบคลุมพื้นที่ผิวชิ้นไม้ อัตราการเจริญก็จะเริ่มน้อยลง ประกอบกับปริมาณของเชื้อที่ใช้มีช่วงไม่ห่างกันมาก ปริมาณของเชื้อที่ใช้จึงไม่แสดงผลแตกต่างกันอย่าง ชัดเจน

สำหรับสมบัติเชิงแสงของกระดาษ พบว่าค่าความขาวสว่างของกระดาษที่ได้จากการปรับสภาพไม่แตกต่างจากชุดควบคุมชัดเจน โดยกระดาษที่ได้มีความขาวสว่างต่ำซึ่งพบในกระดาษที่ผลิต ด้วยวิธีการคราฟต์ อันเป็นผลจากการเกิด alkaline darkening (Johnson และคณะ, 2002) ซึ่งความขาวสว่างจะเพิ่มขึ้นเมื่อผ่านการฟอก โดยจากการศึกษาที่ผ่านมารายงานว่าการปรับสภาพด้วยราในไม้ มีผลทำให้ความขาวสว่างของกระดาษทั้งเพิ่มและลดลงขึ้นกับชนิดของรา (Yang และคณะ, 2007) ซึ่งจากการทดลองในครั้งนี้ รา SK7 เพิ่มความขาวสว่างของกระดาษได้เล็กน้อย โดยมีรายงานว่าการที่รา มีการย่อยสลายลิกนินแต่ค่าความขาวสว่างของกระดาษเพิ่มขึ้นไม่มากหรือมีค่าลดลงอาจเป็นผลจาก เมลานินที่รามีการสร้างในระหว่างการเจริญ หรือราอาจมีการเปลี่ยนโครงสร้างของลิกนินให้ตอบสนอง ต่อการดูดกลืนแสงมากขึ้นส่งผลให้ค่าความขาวสว่างมีค่าลดลง (Fukui และคณะ, 1991)

5.3.3 การตรวจสอบปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินที่เหลืออยู่ในเยื่อคราฟต์ ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยรา

เยื่อที่ได้จากการต้มด้วยสารเคมี จะมีการละลายขององค์ประกอบต่างๆออกไป ซึ่งเป็นผลมาจากการเข้าทำปฏิกิริยาของสารเคมี ในที่นี้คือ S^- , SH^- และ OH^- ซึ่งเป็นโมเลกุลหลักในการทำปฏิกิริยาของการผลิตเยื่อคราฟต์ ซึ่งเมื่อผ่านการต้มเยื่อลิกนินจะถูกกำจัดออกไปโดยมีเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสบางส่วนถูกทำลายออกไปด้วยในระหว่างกระบวนการ (Casey, 1980) จากการเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีของเยื่อที่ผ่านการปรับสภาพพบว่า เมื่อผ่านการต้มเยื่อขององค์ประกอบต่างๆ ภายในไม่มีการเปลี่ยนแปลง โดยเซลลูโลสและลิกนินมีค่าลดลง แต่ลิกนินมีค่าลดลงมากกว่าซึ่งเป็นผลจากการทำปฏิกิริยาของสารเคมีที่เกิดขึ้นระหว่างการต้มเยื่อ และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณลิกนินในเยื่อภายในชุดการทดลองที่ผ่านการต้ม พบว่ามีค่าต่างกันเล็กน้อยแต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ซึ่งคาดว่ากรย่อยสลายลิกนินของราเกิดที่ชั้นมิดเดิลลามেলাเป็นหลัก จึงเป็นผลให้ลิกนินในเส้นใยมีค่าลดลงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับเยื่อที่ไม่ปรับสภาพ ซึ่งอาจเป็นผลจากการที่ราย่อยลิกนินในบริเวณเส้นใยเพียงเล็กน้อย แต่เมื่อนำไม้ที่มีการย่อยนั้นมาบดโครงสร้างที่ถูกย่อยบางส่วนจะทำให้การบดของชุดทดลองที่ปรับสภาพด้วยรามีประสิทธิภาพมากขึ้น โดยมีการแตกออกของผนังเส้นใยได้ดีขึ้นซึ่งมีผลต่อการเพิ่มดัชนีความต้านทานต่อแรงดึงของกระดาษดังกล่าวมาข้างต้น

5.3.4 การทดลองหาผลของขนาดชิ้นไม้ในการปรับสภาพที่มีต่อสมบัติกระดาษ

จากการทดลองปรับสภาพไม้ด้วยราโดยใช้ไม้ที่ผ่านการร่อนพบว่า ที่ระยะเวลาการบ่มเท่ากัน ค่าปริมาณต่างที่เหลือของชุดทดลองจากไม้ที่ผ่านการร่อนมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับปริมาณต่างที่เหลือของชุดทดลองที่ใช้ไม้ขนาดปกติ และส่งผลให้ค่าดัชนีความต้านทานต่อแรงดึงของกระดาษจากชุดทดลองที่ใช้ไม้ที่ผ่านการร่อน มีค่าสูงกว่าชุดทดลองที่ใช้ไม้ขนาดปกติเป็น 2.01 เท่า

และส่งผลให้ดัชนีความต้านทานต่อแรงดึงมีค่าลดลงเมื่อเทียบกับไม้ขนาดปกติ และมีแนวโน้มลดลงเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการปรับสภาพ สอดคล้องกับแนวโน้มของค่าที่ได้จากชุดการทดลองที่ใช้ไม้ขนาดปกติ

ซึ่งจากผลการผลิตเยื่อดังกล่าวสามารถอธิบายได้ว่า การใช้ไม้ขนาดเล็กลงทำให้เอนไซม์ของราที่มีพื้นที่ในการทำปฏิกิริยากับองค์ประกอบภายในไม้ได้ดีขึ้น ประสิทธิภาพในการปรับสภาพจึงเพิ่มขึ้นกว่าการใช้ไม้ขนาดปกติและส่งผลให้ค่าดัชนีความต้านทานต่อแรงดึงเพิ่มขึ้น โดยในการใช้ไม้ที่ผ่านการร่อนในการปรับสภาพด้วยราสามารถช่วยลดการใช้สารเคมีและเวลาในการต้มให้น้อยลงได้ เนื่องจากชิ้นไม้มีขนาดเล็กลงและสารเคมีสามารถทำปฏิกิริยาได้ง่ายขึ้น ดังนั้นการลดขนาดไม้ในการปรับสภาพจึงช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเยื่อ โดยให้กระดาษที่มีค่าความต้านทานต่อแรงดึงที่ดี และยังสามารถประหยัดสารเคมีและพลังงานที่ใช้ให้น้อยลงได้อีกด้วย

5.4 การเปรียบเทียบสมบัติกระดาษกับชุดการทดลองที่ปรับสภาพด้วยราสายพันธุ์อ้างอิง

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการใช้ *Phanerochaete chrysosporium* ในการผลิตเยื่อแบบชีวภาพช่วยพัฒนาสมบัติด้านความแข็งแรงของกระดาษที่ได้ (Singh และ Chen, 2008) โดยจากการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของราที่คัดเลือกกับสายพันธุ์อ้างอิงโดยพิจารณาจากปริมาณต่างที่เหลือและสมบัติด้านความแข็งแรงของกระดาษพบว่า ปริมาณต่างที่เหลือจากการต้มเยื่อที่ไม่ผ่านการปรับสภาพด้วยราในชุดการทดลองที่ใช้รา SK7 และ *P. chrysosporium* มีค่าต่างที่เหลือเพิ่มขึ้นใกล้เคียงกันโดยเพิ่มขึ้นคิดเป็น 21.8% และ 22.75% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ผ่านการปรับสภาพด้วยรา สำหรับค่าความขาวสว่าง (brightness) ของกระดาษที่ผ่านการปรับสภาพด้วยรา SK7 มีการลดลงจากชุดควบคุมน้อยกว่ากระดาษที่ได้จากการปรับสภาพด้วย *P. chrysosporium* ในขณะที่ความทึบแสงของไม้ทั้งสองขนาดไม่มีความแตกต่างกัน สำหรับสมบัติเชิงกลพบว่าค่าดัชนีความต้านทานต่อแรงดึงของเยื่อที่ผ่านการปรับสภาพด้วยรา SK7 และ *P. chrysosporium* มีค่าเพิ่มขึ้น 4.37% และ 4.31% ตามลำดับ ในขณะที่ค่าดัชนีความต้านทานต่อแรงฉีกมีค่าลดลง 9.39% และ 3.30% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ผ่านการปรับสภาพด้วยรา

ซึ่งจากผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการปรับสภาพด้วยราที่คัดเลือกและสายพันธุ์อ้างอิงดังกล่าวจึงสรุปได้ว่าราที่คัดเลือกให้ประสิทธิภาพในการปรับสภาพที่ดีใกล้เคียงกัน โดยราที่คัดเลือกให้กระดาษที่มีค่าดัชนีความต้านทานต่อแรงฉีกต่ำกว่า แต่ให้ค่าความขาวสว่างของกระดาษที่ดีกว่าเมื่อเทียบกับสายพันธุ์อ้างอิง ดังนั้นเมื่อพิจารณาผลโดยรวมพบว่าราที่

คัดเลือกให้ผลในการปรับสภาพที่ใกล้เคียงกันกับวาสายพันธุ์อ้างอิงและมีประสิทธิภาพในการปรับสภาพไม้อยูคาลิปตัสเพื่อผลิตเยื่อแบบชีวภาพ

จากผลการศึกษาในครั้งนี้ สามารถคัดเลือกรา SK7 ซึ่งมีการสร้างเอนไซม์ที่เหมาะสมต่อการปรับสภาพวัตถุดิบซึ่งในที่นี้คือไม้อยูคาลิปตัส และเมื่อผลิตเยื่อแบบชีวภาพด้วยราที่คัดเลือก ร่วมกับวิธีการคราฟต์สามารถเพิ่มค่าดัชนีความต้านทานต่อแรงดึงของกระดาษที่ได้ ช่วยลดการใช้สารเคมีในระบบดังกล่าวได้จากการเพิ่มขึ้นของปริมาณต่างที่เหลือในการผลิตเยื่อ นอกจากนี้เมื่อลดขนาดไม้ในการปรับสภาพด้วยรายังสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเยื่อให้สูงขึ้นได้ โดยให้กระดาษที่มีค่าความต้านทานต่อแรงดึงที่ดี ทั้งยังสามารถประหยัดสารเคมีและพลังงานที่ใช้ให้น้อยลงได้อีกด้วย ซึ่งจากผลการศึกษาครั้งนี้ถือเป็นการนำเชื้อที่มีในสิ่งแวดล้อมมาใช้ในเทคโนโลยีชีวภาพเพื่อให้เกิดประโยชน์ต่อกระบวนการผลิตในอุตสาหกรรม ซึ่งจากงานครั้งนี้ทำให้ทราบถึงแนวโน้มของความสามารถของเชื้อราในการใช้งานเพื่อผลิตเยื่อแบบชีวภาพ เนื่องจากการนำไปใช้งานจริงก็จะมีภาวะที่เหมาะสมซึ่งแปรผันไปตามแต่อุปกรณ์ ตลอดจนวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต ซึ่งจากผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่ารา SK7 ที่คัดเลือกได้สามารถใช้ในการผลิตเยื่อแบบชีวภาพได้ และให้แนวโน้มผลการปรับสภาพที่ดี ซึ่งสามารถนำไปศึกษาเพิ่มเติมเพื่อนำไปสู่การประยุกต์ใช้วิธีการทางชีวภาพร่วมกับกระบวนการผลิตเพื่อเป็นการพัฒนาเทคโนโลยีที่ยั่งยืนต่อไปในอนาคต

บทที่ 6

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

6.1 เลี้ยงราน่าขาวสายพันธุ์ต่าง ๆ และคัดเลือกราที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ที่เหมาะสม

จากการเลี้ยงราน่าขาวจากหน่วยปฏิบัติการวิจัยและใช้ประโยชน์จากชีวมวลพืช พบว่าราสามารถเจริญบนอาหารแข็งได้ทั้งสิ้น 14 ไอโซเลต และเมื่อทดสอบการสร้างเอนไซม์ลิกนินโนโลติกพบว่าราที่สามารถสร้างเอนไซม์ลิกนินโนโลติกได้มีจำนวน 7 ไอโซเลต ราที่สร้างแลคเคสได้มี 6 ไอโซเลต โดย SK7 มีค่าเส้นผ่านศูนย์กลางวงสีสูงที่สุด และ KK07 มีค่าเส้นผ่านศูนย์กลางวงสีต่ำที่สุด ราที่มีการสร้างลิกนินเปอร์ออกซิเดส มี 2 ไอโซเลตได้แก่ SK7 และ CUT3 และไม่มีราที่ตรวจพบการสร้างแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสในปริมาณที่จะตรวจสอบได้ด้วยวิธีนี้ จากนั้นเมื่อทดสอบการสร้างเซลลูเลสใน 3 ไอโซเลต ข้างต้น มีเพียง KK 66 ที่มีการสร้างเซลลูเลสเมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร CBM จากผลการทดสอบการผลิตเอนไซม์ดังกล่าวจึงคัดเลือกรา SK7 KK16 และ CUT3 เพื่อนำไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป

6.2 คัดเลือกรามีความเหมาะสมกับการปรับสภาพขี้เถ้า

จากการเตรียมไม้ยูคาลิปตัส ที่ได้จากบริษัท Double A พบว่ามีค่าเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน และเถ้า เป็น 48.38%, 15.49%, 26.93% และ 0.0041% ตามลำดับเมื่อตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีด้วยการวิเคราะห์ neutral detergent fiber และเมื่อทดสอบประสิทธิภาพในการปรับสภาพไม้ยูคาลิปตัสด้วยราที่คัดเลือกได้ โดยการปรับสภาพไม้ด้วยราทั้ง 3 ไอโซเลต SK7 ให้ค่าลิกนินที่ลดลงสูงที่สุด คือ 19.24% เมื่อเทียบกับไม้ที่ไม่ปรับสภาพ และพบว่า SK7 มีค่าแอกติวิตีเอนไซม์ลิกนินโนโลติกดีที่สุดโดยพบการสร้างแลคเคส ลิกนินเปอร์ออกซิเดส และแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสระหว่างการปรับสภาพในไม้ยูคาลิปตัส จากขั้นตอนนี้จึงคัดเลือก SK7 ไปใช้ในการปรับสภาพเพื่อผลิตเยื่อกระดาษในขั้นตอนต่อไป

6.3 การหาภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพขึ้นไม้เพื่อการผลิตเยื่อกระดาษแบบคราฟต์

จากการทดลองผลิตกระดาษจากเยื่อคราฟต์ชุดควบคุมจากขึ้นไม้ที่ไม่ผ่านการปรับสภาพพบว่า ความเข้มข้นสารเคมีที่เหมาะสมในการต้มเยื่อคราฟต์ ซึ่งให้ค่าสมบัติกระดาษและปริมาณต่างที่เหลือ (residual alkaline) เหมาะสมที่สุดคือการผลิตเยื่อที่ค่าซัลฟิไดต์ 25% และแอคทีฟอัลคาไลน์ 25% โดยใช้เวลาในการบดเยื่อ 50 นาที เมื่อนำมาผลิตกระดาษจะได้กระดาษสีน้ำตาลที่มีค่าความขาวสว่าง (brightness) ต่ำแต่มีค่าความแข็งแรง ได้แก่ ค่าดัชนีความต้านทานต่อแรงดึง (tensile index) และ ดัชนีความต้านทานต่อแรงฉีก (tear index) ที่สูง จากนั้นเมื่อปรับสภาพขึ้นไม้โดยแปรผันปัจจัยที่เกี่ยวข้องในการปรับสภาพไม้ยูคาลิปตัสด้วยวิธีที่คัดเลือกพบว่า ค่าดัชนีความต้านทานต่อแรงดึงของกระดาษที่ได้มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มระยะเวลาบ่มและปริมาณเชื้อ และทำให้ปริมาณต่างที่เหลือหลังการต้มมีค่าสูงขึ้น ซึ่งช่วยลดการใช้สารเคมีในระหว่างการผลิตให้น้อยลงได้ และจากการใช้ response surface methodology ร่วมในการศึกษา พบว่าสมการรีเกรสชันที่ใช้สามารถอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัย (ระยะเวลาบ่มและปริมาณเชื้อ) และค่าตอบสนองที่ศึกษา (ดัชนีความต้านทานต่อแรงดึงและปริมาณต่างที่เหลือ) ได้อย่างแม่นยำเมื่อตรวจสอบโดยการทดลองตามภาวะที่ได้จากสมการ โดยพบว่าระยะเวลาบ่มและปริมาณเชื้อที่เหมาะสมที่สุดคือระยะเวลาบ่มที่ 25 วัน โดยใช้ปริมาณเชื้อ 100 มิลลิกรัมแห้ง ซึ่งเป็นภาวะที่ให้ค่าตอบสนองทั้งสองดีที่สุด โดยมีค่าปริมาณต่างที่เหลือและค่าดัชนีความต้านทานต่อแรงดึงในช่วง 2.53-2.69 g/l และ 65.71-67.38 Nm/g ตามลำดับ

และเมื่อนำเยื่อที่ผ่านการต้มมาตรวจสอบปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินที่เหลืออยู่ พบว่ามีค่าเซลลูโลสและลิกนินลดลงโดยสามารถลดลิกนินได้สูงกว่า และเมื่อปรับสภาพด้วยวิธี SK7 และต้มด้วยวิธีการคราฟต์เยื่อที่ได้มีค่าลิกนินลดลงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับเยื่อของชุดควบคุม แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากนั้นเมื่อทดลองหาผลของขนาดขึ้นไม้ในการปรับสภาพที่มีต่อสมบัติกระดาษด้วยวิธีพบว่า การลดขนาดไม้ที่ใช้ในการปรับสภาพช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการปรับสภาพด้วยวิธี โดยพัฒนาค่าดัชนีความต้านทานต่อแรงดึงของกระดาษให้สูงขึ้นมากกว่าการใช้ไม้ขนาดปกติ ดัชนีความต้านทานต่อแรงฉีกมีค่าลดลงจากชุดควบคุมน้อยกว่าในไม้ปกติ และยังช่วยลดสารเคมีและพลังงานที่ใช้ในการต้มได้อีกด้วย

6.4 การเปรียบเทียบสมบัติกระดาษกับไม้ที่ได้จากการปรับสภาพด้วยราสายพันธุ์อ้างอิง

จากการบ่มขึ้นไม้ด้วยราที่คัดเลือกได้ (SK7) และสายพันธุ์อ้างอิง (*Phanerochaete chrysosporium*) พบว่าราทั้งสองสายพันธุ์มีการเจริญเติบโตและมีประสิทธิภาพในการปรับสภาพที่ใกล้เคียงกัน โดยมีผลลดดัชนีความต้านทานต่อแรงฉีก แต่ช่วยเพิ่มค่าดัชนีความต้านทานต่อแรงดึงและค่าปริมาณน้ำที่เหลือในระบบให้มากขึ้น

จึงสรุปได้ว่าในการศึกษาครั้งนี้ สามารถคัดเลือกรา SK7 ซึ่งมีการสร้างเอนไซม์ที่เหมาะสมต่อการปรับสภาพวัตถุดิบซึ่งในที่นี้คือไม้ยูคาลิปตัส และเมื่อผลิตเยื่อแบบชีวภาพร่วมกับวิธีการกราฟต์สามารถเพิ่มดัชนีความต้านทานต่อแรงดึงของกระดาษ ช่วยลดสารเคมีที่ใช้ในระบบ ตลอดจนเมื่อลดขนาดไม้ที่ใช้ในการปรับสภาพสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการปรับสภาพให้สูงขึ้นได้ อีกทั้งยังสามารถลดการใช้สารเคมีและพลังงานในการต้มให้น้อยลง ดังนั้นราที่คัดเลือกได้จึงมีประสิทธิภาพในการปรับสภาพ ซึ่งมีความน่าสนใจในการนำไปศึกษาเพื่อพัฒนาวิธีการผลิตเยื่อแบบชีวภาพต่อไป

ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่า การปรับสภาพด้วยราสามารถลดปริมาณการใช้สารเคมีในระบบและปรับปรุงคุณภาพของกระดาษได้ในระดับหนึ่ง ทั้งนี้หากมีการปรับปรุงในประเด็นต่างๆ จะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของการปรับสภาพให้สูงขึ้นได้ โดยควรพิจารณาถึงขึ้นไม้ที่เป็นวัตถุดิบในการปรับสภาพควรศึกษาลักษณะขึ้นไม้ที่ใช้เพิ่มเติม และควบคุมลักษณะของไม้ที่ใช้ให้มีความเหมาะสมกับกระบวนการผลิต นอกจากนี้ควรตรวจสอบเอนไซม์ที่มีผลต่อเฮมิเซลลูโลส และตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้หลังการย่อยสลายด้วยรา ตลอดจนศึกษาลักษณะของเส้นใยที่ได้หลังการปรับสภาพจะช่วยให้สามารถวิเคราะห์หากลไกที่เกิดขึ้นระหว่างการปรับสภาพได้ดียิ่งขึ้น

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

เกษมสุข เกษสกุล. 2533. ยูคาลิปตัส: พันธุ์ไม้เศรษฐกิจที่มีค่าทั้งปัจจุบัน และอนาคต. กรุงเทพฯ ;
โรงพิมพ์การศาสนา,

นฤมล ชูบัวทอง. 2550. ผลขององค์ประกอบทางเคมีของชีวมวลต่อไฟโรไลซิสและการเผาไหม้.
วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต, ภาควิชาเคมีเทคนิค คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์
มหาวิทยาลัย.

หรรษา ปุณณะพยัคฆ์. 2553. พฤกษศาสตร์เชิงอุตสาหกรรม. กรุงเทพฯ : ภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย,

ภาษาอังกฤษ

Archibald, S. F. 1992. A new assay for lignin-type peroxidase employing the Dye Azure
B. Applied and Environmental Microbiology 58 :3110-3116.

Akhtar, M., Blanchette, A.R. and Kirk, K.T., 1997. Fungal delignification and
biomechanical pulping of wood. Advances in Biochemical Engineering
Biotechnology 57 : 160-193.

Barneto, G. A., Hernández, B. R., and Berenguer, M. J. 2011 Thermogravimetric
characterization of eucalyptus wood. Revista O Papel 72 : 53-56.

Baldrian, P., 2006. Fungal laccase-occurrence and properties. FEMS Microbiology
Reviews 30 : 215-242.

- Bajpai, P., Bajpai, P.K., Akhtar, M., and Jauhari, B.M. 2001. Biokraft pulping of eucalyptus with selected lignin-degrading fungi. Journal of Pulp and Paper Science 7 : 235-239.
- Breen, A. and Singleton, L.F. 1999. Fungi in lignocellulose breakdown and biopulping. Current Opinion in Biotechnology 10 : 252-258.
- Canettieri, V. E., Rocha, J. M. G., Carvalho, A. J., and Silva, B. A. J. 2007. Evaluation of the kinetics of xylose formation from dilute sulfuric acid hydrolysis of forest residues of *Eucalyptus grandis*. Industrial & Engineering Chemistry Research 46 : 1938-1944.
- Casey, P.J., 1980. Pulp and paper chemistry and chemical technology. Volume 1. third edition. New York : A Wiley-Interscience publication,
- Chakar, S. F., and Ragauskas, J. A. 2004. Review of current and future softwood kraft lignin process chemistry. Industrial Crops and Products 20 : 131-141.
- Cowan, F.W. 1995. Explaining handsheet tensile and tear in term of fiber-quality numbers. Tappi Journal 78 : 101-106.
- Eggert, C. Temp, U. and Eriksson, K. E. 1996. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: Purification and characterization of the laccase. Applied Environmental and Microbiology 62 : 1151-1158.
- Ferraz, A. Baeza, J. Rodriguez, J., and Freer, J. 2000. Estimating the chemical composition of biodegraded pine and eucalyptus wood by DRIFT spectroscopy and multivariate analysis. Bioresource Technology 74 : 201-212.

- Ferraz, A., Córdova, M.A., and Machuca, A. 2002. Wood biodegradation and enzyme production by *Ceriporiopsis subvermispota* during solid-state fermentation of *Eucalyptus grandis*. Enzyme and Microbial Technology : 3259–3265.
- Field, A.J., Jong, D.E., Costa, F.G. and Bont, A.M.J. 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by new isolates of white rot fungi. Applied and Environmental Microbiology 58 : 2219-2226.
- Fragoero, I.S.S., 2005. Use of fungi in bioremediation of pesticide. Doctor of philosophy, Applied Mycology Group Institute of Bioscience and Technology, Cranfield University.
- Fujioka, Y. and Nishiyama, K. 1974 .Low sulfidity kraft pulping of domestic hardwoods. Japan TAPPI Journal 28 : 444-451.
- Gierer, J., 1980. Chemical aspects of kraft pulping. Wood Science and Technology. 14, 241–266.
- González, V., Mendonça, T.R. Jara, F.J., Elissetche P.J., and Freer, J. 2008. Evaluation of the white-rot fungi *Ganoderma australe* and *Ceriporiopsis subvermispota* in biotechnological applications. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 35 : 1323–1330.
- Guerra, A., Mendonca, R., Ferraz, A. 2005. Bio-chemimechanical pulps from *Eucalyptus grandis* : Strength properties, bleaching, and brightness stability . Journal of Wood Chemistry and Technology 25 : 203–216.
- Gullichsen, J. and Fogelholm, J. C. 1999. Chemical pulping. Papermaking Science and technology. Findland : Gummerus Printing,

- Gutiérrez, A., Martínez, J.M., Dekriä, C. J., Romeo, J., Canaval, J., Lenon, G. and Martínez, T.A. 2000. Fungal pretreatment of eucalyptus wood can strongly decrease the amount of lipophilic extractives during chlorine free kraft pulping Environmental Science and Technology 34 : 3705-3709.
- Hakala, K.T. 2007. Characterization of the lignin-modifying enzymes of the selective white-rot fungus *Physisporinus rivulosus*. Academic dissertation. Faculty of Agriculture and Forestry, University of Helsinki.
- Hatakka, A. Hofrichter, M. and Lundell, T. 2001. Conversion of milled pine wood by manganese peroxidase from *Phlebia radiata*. Applied Environmental and Microbiology. 67 : 4588-4593.
- Hatakka, A. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: Production and role from in lignin degradation. FEMS Microbiology Reviews 13 : 125–135.
- Heinzkill, M. Bech, L. Halkier, T., Schneider, P., and Anke, T. 1998. Characterization of laccases and peroxidases from wood-rotting fungi (family Coprinaceae). Applied and Environmental Microbiology 5 : 1601-1606.
- Johnson, D.A., Park, S., Genco, J.M., Gibson, A., Wajer, M., and Branch, B. 2002. "Hydrogen peroxide bleaching of TMP pulps using Mg(OH)₂". Proceedings of TAPPI Pulping and Engineering Conference, San Diego, Canada.
- Karlsson, H. 2007. Some aspects on strength properties in paper composed of different pulp. Faculty of Technology and Science Chemical Engineering Karlstad University.

- Kasana, C.R., Salwan, R, Dhar, H., Dutt, S., and Gulati, A. 2008. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's Iodine. Current Microbiology 57 : 503–507.
- Kirk, K.T. 1985. The discovery and promise of lignin-degrading enzymes. Marcus Wallenberg Foundation for Promoting Research in the Forest Industry, New Horizons for Biotechnological Utilization of the Forest Resource: Lectures Given at the 1985 Marcus Wallenberg Symposium in Falun, Sweden, 27-42. Sweden : Marcus Wallenberg Foundation,
- Kumar , P., Barrett, M.D., Delwiche, J.M. and Stroeve, P. 2009. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production 48 : 3713-3729.
- Levlin, E. J. and Soderhjelm, L., 1999. Pulp and paper testing. Papermaking Science and technology. Findland : Gummerus Printing,
- Lindedahl, K. 2008. Chemical reactions in kraft pulping. All K. Lindedahl. [Online]. Available from <http://www.h2obyki.com/images/Reactions%20in%20Kraft%20Pulping.pdf> [2013, Sep 10]
- Lindsay D. Pryor. 1976. Biology of Eucalypts. London : The Camelot Press Ltd,
- Machuca, A., and Ferraz, A. 2001. Hydrolytic and oxidative enzymes produced by white- and brown-rot fungi during *Eucalyptus grandis* decay in solid medium. Enzyme and Microbial Technology 29 : 386–391.

- Mendonça, T.R., Jara, F.J., González, V., Elissetche and P.J., Freer, J. 2008. Evaluation of the white-rot fungi *Ganoderma austral* and *Ceriporiopsis subvermispora* in biotechnological applications. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 35 : 1323–1330.
- Molina, G.J., Donoso, E.J., Garay, R., and Valenzuela, C. Yield increase with softwood kraft biopulp [online], 2000. http://www.tappi.org/Bookstore/Technical_Papers/Conference_Papers/2000/PULP00/Yield-Increase-with-Softwood-Kraft-Biopulp-2000-Pulping-Process--Product-Quality-Conference-Proc.aspx. [2013, Sep 10]
- Orth, B.A., Royse, J.D., and Tien, M.A., 1993. Ubiquity of lignin-degrading peroxidases among various wood-degrading fungi. Applied and Environmental Microbiology 59 : 4017-4023.
- Prasongsuk, S., Lotrakul, P., Imai, T. and Punnapayak, H. 2009. Decolourization of pulp mill wastewater using thermotolerant white rot fungi. Science Asia 35 : 37-41.
- Rahmati, H., Ardeh, N. S., and Aminian, H. 2001. Influence of sulfidity and active alkali charge on the properties of pulp produced from *Eucalyptus camaldensis* : Enzyme and Microbial Technology 29 : 386–391.
- Saparrat, C. N. M, Guillén, F., Arambarri, M. A., Martínez, T.A., and Martínez, J.M. 2002 . Induction, isolation, and characterization of two laccases from the white rot Basidiomycete *Coriolopsis rigida*. Applied and Environmental Microbiology 4 : 1534–1540.
- Segura, T.E.S., Zanao, M., Santos, J. R. S., Silva Jr, F.G. 2012. Kraft pulping of the main hardwood used around the world for pulp and paper production. TAPPI PEERS Conference 2012 : 1592-1601.

- Shrestha, P. 2008. Enhanced bioprocessing of lignocellulose: Wood-rot fungal saccharification and fermentation of corn fiber to ethanol. Graduate Thesis and dissertations to the degree of doctor of philosophy. Paper 11492. Iowa State University.
- Singh, P., Sulaiman, O., Hashim, R., Rupani, F.P. and Peng, C.L. 2010. Biopulping of lignocellulosic material using different fungal species: a review. Reviews in Environmental Science and Biotechnology 9 : 141-151.
- Speranza, M., Gutiérrez, A., Río, C. D. J., Bettucci, L., Martínez, T. A., and Martínez, J. M. 2009. Sterols and lignin in *Eucalyptus globules* labill. Wood: spatial distribution and fungal removal as revealed by microscopy and chemical analyses. Holzforschung 63 : 362-370.
- Su, C. U., Ho, L.C., Hsu, P.K., Chang, M.H., Farrell, R. and Wang, C.I.E. 2011. Screening of Ophiostoma species for removal of eucalyptus extractives. Journal of Wood Chemistry and Technology 31 : 282–297.
- Thongkred, P., Lotrakul, P., Prasongsuk, S., Imai, T. and Punnapayak, H., 2011. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a tropical isolate of *Pycnoporus coccineus* and its laccase. ScienceAsia 37, 225-233.
- Tuor, U., Winterhalter, K. and Fiechter, A. 1995. Review: Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. Journal of Biotechnology 41 : 1-17.
- Urrea, M.E. and Reddy, A.C. 2012. Chapter 2: Degradation of Chloro-organic Pollutants by White Rot Fungi. Singh, N.S., Microbial Degradation of Xenobiotics, 31-66. Berlin, Germany : Springer,

- Vicentim, P. A., Faria, A.R., Ferraz, A. 2009. High-yield kraft pulping of *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden biotreated by *Ceriporiopsis subvermispora* under two different culture conditions. Holzforschung 63 : 408–413.
- Vicentim, P.M. and Ferraz, A. 2006. Enzyme production and chemical alterations of *Eucalyptus grandis* wood during biodegradation by *Ceriporiopsis subvermispora* in cultures supplemented with Mn²⁺, corn steep liquor and glucose. Enzyme and Microbial Technology 40 : 645–652.
- Wolfaardt, F., Taljaard, L.J., Jacobs, A. Male, R.J., Rabie, J.C., 2004. Assessment of wood-inhabiting Basidiomycetes for biokraft pulping of softwood chips. Bioresource Technology 95 : 25–30 .
- Yadav, D.R., Chaudhry, S., Dhiman, S.S. 2010. Biopulping and its potential to reduce effluent loads from bleaching of hardwood kraft pulp. Bio Resources 5(1) : 159-171.
- Yang, R. and Lia, Z. A. 1997. The Influence of sulfidity in kraft pulping on the Nature of residual Lignin. Journal of Wood Chemistry and Technology 17 : 383-390.
- Zhang, Y. S., Fei, H. B., Yu. Y., Cheng, T. H., Wang. G. C. 2013. Effect of the amount of lignin on tensile properties of single wood fibers. Forest Science and Practice 15 : 56–60.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีเตรียม

1. Malt extract broth (MEB)

malt extracts	20	กรัม
peptone	5	กรัม
กลูโคส	10	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 900 มิลลิลิตร นำมาปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร ฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

2. Malt extract agar (MEA)

malt extracts	20	กรัม
peptone	5	กรัม
กลูโคส	10	กรัม
วุ้น	16	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 900 มิลลิลิตร นำมาปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร ฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

3. Lignin modifying enzyme basal medium (LBM)

KH_2PO_4	1	กรัม
$\text{C}_4\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_6$	0.5	กรัม

MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5	กรัม
Yeast Extract	0.01	กรัม
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.01	กรัม
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.001	กรัม
Fe ₂ (SO ₄) ₃	0.001	กรัม
MnSO ₄ ·H ₂ O	0.001	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 900 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งความดันไอ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที ใช้ LMB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติมสารตั้งต้นโดย

3.1 อาหารในการทดสอบแลคเคส เติม ABTS 0.1 กรัม

3.2 อาหารในการทดสอบแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส Phenol red 0.01 กรัม

3.3 อาหารในการทดสอบเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส เติม Azure-B 0.001 กรัม

เติมวุ้น 1.6 กรัม นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

4. Cellulose basal medium (CBM) (ภาคผนวก ก) โดยใช้ Carboxymethyl cellulose (CMC) เป็นสารตั้งต้นในการทดสอบ

C ₄ H ₁₂ N ₂ O ₆	5	กรัม
KH ₂ PO ₄	1	กรัม
Yeast Extract	0.1	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5	กรัม
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.001	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 900 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที นำ CBM 100 มิลลิลิตร เติมด้วย low viscosity carboxymethylcellulose (CMC) 1% น้ำหนักต่อปริมาตร และ ผงขี้ผึ้ง 1.6 กรัม นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

การเตรียมแอกติวิตีแลคเคส (Tuisel และคณะ, 1990)

1.1 การเตรียม reaction mixture ปริมาตร 1.2 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย

0.1 M Glycine HCl buffer (pH 3.5)	0.6 มิลลิลิตร
1 mM ABTS	0.2 มิลลิลิตร
Enzyme	0.4 มิลลิลิตร
420 nm	

1.2 นำส่วนผสมในข้อ 1.1 มาผสมกันในคิวเวต โดยเติมเอนไซม์เป็นลำดับสุดท้าย

1.3 ทำการวัด ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร เวลาในการทำปฏิกิริยา 1 นาที โดยใช้ reaction mixture ที่ไม่เติม ABTS เป็นชุดควบคุม

1.4 การคำนวณหาแอกติวิตีของแลคเคส

1 หน่วยแอกติวิตีของแลคเคส คือปริมาณของแลคเคสที่สามารถ ออกซิไดซ์ 1 ไมโครโมลของ ABTS ใน 1 นาที เมื่อได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตร แล้วนำมาแทนค่าตามสูตร

$$\text{แลคเคสแอกติวิตี (U/ml)} = \frac{\Delta A/\text{min} * \text{Volume reaction mixture} * 1000}{36,000 * 1 * \text{Volume enzyme solution}}$$

$$E_{420 \text{ นาโนเมตร}} = 36,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

2. การเตรียมแอกติวิตีลิกนินเปอร์ออกซิเดส

2.1 การเตรียม reaction mixture ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย

3.33 mM Veratryl alcohol (VA)	0.1 มิลลิลิตร
0.22 mM Sodium acetate buffer (pH 3.0)	0.6 มิลลิลิตร
mM H ₂ O ₂	0.1 มิลลิลิตร
Enzyme	0.2 มิลลิลิตร

2.2 นำส่วนผสมในข้อ 2.1 มาผสมกันในคิวเวต โดยเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นลำดับสุดท้าย

2.3 ทำการวัด ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร เวลาในการทำปฏิกิริยา 1 นาที โดยใช้ reaction mixture ที่ไม่เติม VA เป็นชุดควบคุม

2.4 การคำนวณหาแอกติวิตีของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส 1 หน่วยแอกติวิตีของลิกนินเปอร์ออกซิเดส คือปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถ ออกซิไดซ์ 1 ไมโครโมล ของ VA ใน 1 นาที เมื่อได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 310 นาโนเมตร แล้วนำมาแทนค่าตามสูตร

$$\text{ลิกนินเปอร์ออกซิเดสแอกติวิตี (U/ml)} = \frac{\Delta A/\text{min} * \text{Volume reaction mixture} * 1000}{93,000 * 1 * \text{Volume enzyme solution}}$$

$$E \text{ 310 นาโนเมตร} = 93,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

3. แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส

3.1 การเตรียม reaction mixture ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย

4 mM 2,6 Dimethoxyphenol	0.1 mL
0.1 M Sodium Tartrate buffer (pH 5.0)	0.2 mL
5 mM MnSO ₄	0.1 mL
1 mM H ₂ O ₂	0.1 mL
Enzyme	0.5 mL

3.2 นำส่วนผสมในข้อ 3.1 มาผสมกันในคิวเวต โดยเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นลำดับสุดท้าย

3.3 ทำการวัด ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร เวลาในการทำปฏิกิริยา 1 นาที โดยใช้ reaction mixture ที่ไม่เติม 2,6 Dimethoxyphenol เป็นชุดควบคุม

3.4 การคำนวณหาแอกติวิตีของแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส 1 หน่วยแอกติวิตีของแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสคือปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถ ออกซิไดซ์ 1 ไมโครโมล ของ VA ใน 1 นาที เมื่อได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 470 นาโนเมตร แล้วนำมาแทนค่าตามสูตร

$$\text{แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสแอกติวิตี (U/ml)} = \frac{\Delta A/\text{min} * \text{Volume reaction mixture} * 1000}{49,600 * 1 * \text{Volume enzyme solution}}$$

ภาคผนวก ค.

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ห้องค์ประกอบทางเคมี

1. Sodium lauryl sulfate (APS)
2. Disodium ethylenediamine tetraacetate (EDTA) (APS)
3. Sodium borate decahydrate ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) (APS)
4. Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4) (Merck)
5. 2-Ethoxyethanol (Ethylene glycol monoethyl ether) (Merck)
6. Sodium Sulfite (NaSO_3) (Scharlau)
7. Decahydronaphthalene (Fluka)
8. Acetone (Merck)
9. Sulfuric acid (Merck)
10. Cetyl trimethylammonium bromide (CTAB) (SERVA)
11. Potassium permanganate (KMnO_4) (Carlo Erba)
12. Silver sulfate (Ag_2SO_4) (Carlo Erba)
13. Ferric nitrate nonahydrate ($\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) (APS)
14. Silver nitrate (AgNO_3) (Merck)
15. Potassium acetate (Scharlau)
16. Acetic acid, glacial (Merck)
17. Tertiary butyl alcohol (Butanol) (APS)
18. Oxalic acid dehydrate (Carlo Erba)
19. 95% Ethanol
20. Hydrochloric acid (HCl) (Merck)

การเตรียมสารเคมีสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณองค์ประกอบของชีวมวลพืช

1. สารละลาย Neutral Detergent

1.1 ชั่ง Disodium ethylene diamine tetraacetate (EDTA) 16.18 กรัม และ Sodium borate decahydrate ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) 6.81 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ เติมน้ำกลั่นลงไปพอประมาณ นำไปต้มจนละลายหมด

1.2 ละลาย Sodium lauryl sulphate 30 กรัม ในน้ำ แล้วเติม 2-Ethoxyethanol (Ethylene glycol monoethyl ether)

1.3 นำสารละลายในข้อ 1,1 มาผสมกับสารละลายในข้อ 1,2

1.4 ชั่ง Disodium hydrogen phosphate anhydrous (Na_2HPO_4) 4.56 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ เติมน้ำกลั่นลงไปพอประมาณ แล้วนำไปต้มจนละลายหมด นำไปผสมกับสารละลายผสมที่ได้ในข้อ 1.3 จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น และปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 6.9-7.1

2. สารละลาย Acid detergent

ละลาย Cetyl trimethylammonium bromide (CTAB) 20 กรัม ในกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1 N แล้วปรับปริมาตรด้วยกรดนี้ให้ได้ 1 ลิตร

3. สารละลาย Saturated potassium permanganate

ละลาย Potassium permanganate (KmnO_4) 50 กรัม และ Silver sulphate (Ag_2SO_4) 0.05 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปริมาตรเป็น 1 ลิตร เก็บสารละลายนี้ในขวดแก้วสีชา อย่าให้โดนแสงแดด

4. สารละลาย Lignin buffer

สารละลาย ferric nitrate nanohydrate [$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$] 6 กรัม และ Silver nitrate (NgNO_3) 0.15 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เติม Acetic acid glacial 500 มิลลิลิตร เติม Potassium acetate 5 กรัม และเติม Tertiary butyl alcohol 400 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

5. สารละลาย Combined permanganate

ผสมสารละลาย Saturated potassium permanganate กับสารละลาย Lignin buffer ในอัตราส่วน 2.1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เก็บสารละลายผสมนี้ในขวดสีชา แขนงตู้เย็นไม่ให้ถูกแสงแดด ถ้าสารละลายเปลี่ยนสีเป็นสีแดงแล้วจะไม่สามารถนำมาใช้ได้อีก

6. สารละลาย Demineralizing

ละลาย Oxalic acid dehydrate 50 กรัม ในปริมาตร 700 มิลลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่น 250 มิลลิตร และ Hydrochloric acid (HCl) 50 มิลลิตร ผสมให้เข้ากัน

7. สารละลาย 80% ethanol

ผสม 95% Ethanol 843 มิลลิตร กับน้ำกลั่น 157 มิลลิตร แล้วเขย่าให้เข้ากัน

การหาปริมาณองค์ประกอบของชีวมวลพืช

1. การวิเคราะห์หาปริมาณองค์ประกอบของชีวมวลพืช (Goering and Van Soest, 1970)

1.1 การสกัดด้วยสารละลาย Neutral detergent

1) นำ Sintered glass crucible เบอร์ 1 ขนาด 50 มิลลิตร ไปอบในตู้อบแห้งที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำมาใส่ใน desiccator ทิ้งให้เย็นแล้วชั่งน้ำหนัก

2) ชั่งตัวอย่างที่แห้งและบดละเอียดขนาด 20-30 mesh หรือ 1 มิลลิเมตร ประมาณ 1 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ทรงสูงขนาด 600 มิลลิตร

3) เติมสารละลาย Neutral detergent 100 มิลลิตร Sodium sulfite 0.5 กรัม และ Decahydronaphthalene 2 มิลลิตร นำไป reflux เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยนับเวลาตั้งแต่เริ่มเดือด

4) ถ่ายส่วนผสมที่ reflux เสร็จแล้วลงใน Sintered glass crucible ที่วางอยู่บนชุดกรองล้างตัวอย่างใน crucible ด้วยน้ำร้อน (90-100 องศาเซลเซียส) 3-4 ครั้ง แล้วล้างด้วย Acetone 2 ครั้ง ดูดสารละลายออกด้วยเครื่อง vacuum pump จนแห้ง จากนั้นนำ crucible ไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

5) นำ crucible ออกมาทิ้งไว้ให้เย็นใน desiccator แล้วชั่งน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นคือปริมาณ Neutral detergent fiber (NDF)

วิธีคำนวณ

$$\% \text{ NDF} = \frac{[\text{น้ำหนัก crucible} + \text{น้ำหนัก NDF}] - \text{น้ำหนัก crucible}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างพืช}} \times 100$$

1.2 การสกัดด้วยสารละลาย Acid detergent

1) นำตัวอย่างพืชที่ผ่านการสกัดด้วย Neutral detergent มาถ่ายใส่ในปิกเกอร์เพื่อทำการ reflux ด้วย Acid detergent โดยเติม Acid detergent 100 มิลลิลิตรและ Decahydronaphthalene 2 มิลลิลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นับตั้งแต่เริ่มเดือด

2) กรองตัวอย่างพืชใน crucible ใบบดเพื่อลดการสูญเสียตัวอย่างให้น้อยที่สุด แล้วล้างด้วยน้ำร้อน (90-100 องศาเซลเซียส) 3-4 ครั้ง แล้วล้างด้วย 80% Ethanol 2 ครั้ง

3) นำ crucible ไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปล่อยให้เย็นใน desiccator แล้วชั่งน้ำหนัก น้ำหนักที่ได้คือ น้ำหนักของ Acid detergent fiber (ADF) น้ำหนักของเฮมิเซลลูโลส

วิธีคำนวณ

$$\% \text{ ADF} = \frac{[\text{น้ำหนัก crucible} + \text{น้ำหนัก ADF}] - \text{น้ำหนัก crucible}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างพืช}} \times 100$$

$$\% \text{ Hemicellulose} = \% \text{ NDF} - \% \text{ ADF}$$

1.3 การวิเคราะห์หา permanganate lignin (PML)

1) เติมสารละลาย Combined permanganate 25 มิลลิลิตร ลงใน crucible ที่มีตัวอย่างซึ่งผ่านการสกัดด้วย Acid detergent แล้ว แช่ crucible ลงในภาชนะที่มีตัวอย่างซึ่งผ่านการสกัดด้วย Acid detergent แล้ว แช่ crucible ลงในภาชนะที่มีน้ำเย็นสูงประมาณ 2 เซนติเมตร คนด้วยแท่ง

แก้วเพื่อไม่ให้ตัวอย่างจับเป็นก้อน ทิ้งไว้ 45 นาที โดยคนเป็นบางครั้ง จากนั้นดูดสารละลายออก ด้วยเครื่อง vacuum pump

2) เติมสารละลาย Combined permanganate 25 มิลลิลิตร ลงใน crucible อีกครั้ง ทิ้งไว้อีก 45 นาที แล้วดูดสารละลายออกให้หมดโดยใช้ vacuum pump

3) เติมสารละลาย Demineralizing 25 มิลลิลิตร ลงใน crucible อีกครั้ง ทิ้งไว้ 45 นาที แล้วดูดสารละลายออกให้หมดโดยใช้ vacuum pump ทำซ้ำจนตัวอย่างพืชเป็นสีขาวภายในเวลา 20 นาที จากนั้นล้างออกด้วย 80% Ethanol และ Acetone แล้วนำไปดูดออกให้หมดโดยใช้ vacuum pump

4) นำ crucible ไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปล่อยให้เย็นใน desiccator แล้วชั่งน้ำหนัก น้ำหนักที่แตกต่างกันระหว่าง Acid detergent fiber (ADF) และน้ำหนักของตัวอย่างพืชที่ผ่านการสกัดลิกนินออก คือ น้ำหนักของ น้ำหนักของลิกนิน

วิธีคำนวณ

$$\% \text{ Lignin} = \frac{(A-B)}{C} \times 100$$

C

$$A = \text{น้ำหนัก crucible} + \text{น้ำหนัก ADF}$$

$$B = \text{น้ำหนัก crucible} + \text{น้ำหนักตัวอย่างพืชที่ผ่านการสกัดลิกนินออก}$$

$$C = \text{น้ำหนักตัวอย่างพืช}$$

1.4 การวิเคราะห์หาปริมาณเซลลูโลสด้วยการเผาเถ้า

นำ crucible ที่มีตัวอย่างพืชซึ่งผ่านการสกัดลิกนินออกแล้วในข้อ 1.3 ไปเผาในเครื่องเผาเถ้า ที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำออกมาปล่อยให้เย็นใน desiccators แล้วชั่งน้ำหนัก น้ำหนักที่แตกต่างกันระหว่าง น้ำหนักตัวอย่างพืชหลังการสกัดลิกนิน

นออก และน้ำหนักหลังการเผาเ้า คือ น้ำหนักเซลลูโลส ส่วนน้ำหนักเ้าก็คือ ผลต่างระหว่าง น้ำหนักหลังการเผาเ้าและน้ำหนัก crucible

วิธีคำนวณ

$$\% \text{ Cellulose} = \frac{(B-D)}{C} \times 100$$

C

ภาคผนวก ง

รูปเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย



ง. 1 เครื่องวัดความชื้น (Moisture determination balance รุ่น KettFD-600, Kett Electric Laboratory/ USA)



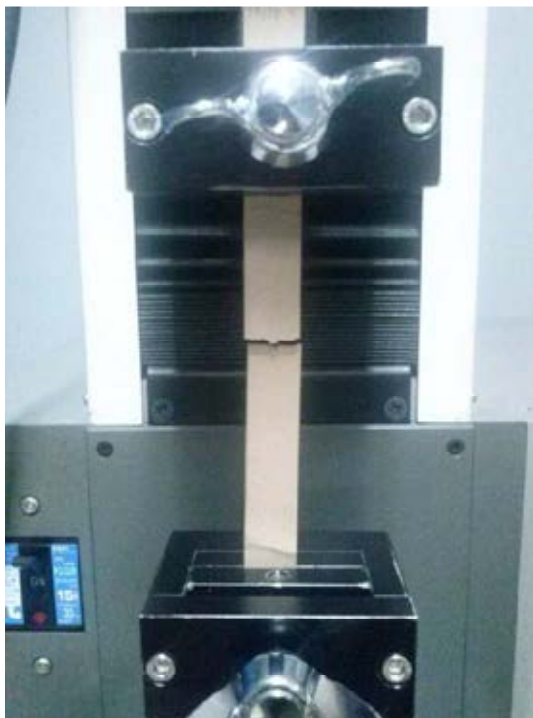
ง. 2 เครื่องบดเยื่อ (Valley beater รุ่น UEC-2018A Universal engineering corporation/ India)



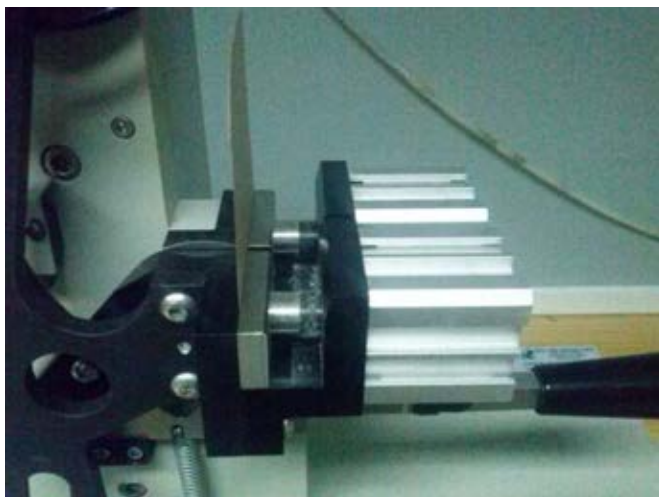
ง. 3 เครื่องขึ้นแผ่นกระดาษ (Sheet former) รุ่น Rapid-Köthen Blattbildner



ง.4 เครื่องตีกระจายเยื่อ (Disintegrator) รุ่น T-292 Adirondack Machine Corporation/ USA)



ง. 5 เครื่องวัดความแข็งแรงต่อแรงดึง (Tensile tester รุ่น Strongraph E-S) Toyoseiki Seisaku-SHO LTD/ Japan)



ง. 6 เครื่องวัดความแข็งแรงต่อแรงฉีกขาด (Tear tester) รุ่น Protear Thwing Albert Instrument/ USA

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาววิรัชฐา ศรีแพทย์ เกิดเมื่อวันที่ 4 มีนาคม พ.ศ. 2530 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีบัณฑิต สาขาวิชามัธยมศึกษาวิทยาศาสตร์ วิชาเอกชีววิทยา คณะครุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี 2553 จากนั้นได้ศึกษาต่อในระดับปริญญาโทบัณฑิต หลักสูตร เทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำเร็จการศึกษาในปี พ.ศ. 2555

ทุนสนับสนุนงานวิจัย

ขณะศึกษาได้รับทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์สำหรับนิสิต ครั้งที่ 1 ปีงบประมาณ 2556 จากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเสนอผลงาน

นำเสนอ oral presentation ในงานประชุม The 25th International Symposium on Chemical Engineering วันที่ 14-15 ธันวาคม พ.ศ. 2555 ณ Okinawa Convention Center จังหวัดโอกินาวา ประเทศญี่ปุ่น