อภินันทนาการ

สัญญาเลขที่ R2561B064

สำนักหอสมุด

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การย่อยลิกนินและการลดสีน้ำล้างเยื่อกระดาษ โดย *Bacillus* sp. ที่คัดแยกได้จากโรงงานเยื่อกระดาษ

คณะผู้วิจัย	สังกัด
1. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรสิทธิ์ โทจำปา	คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติ และสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร
2. นางสาวนิภัชราพร สภาพพร	คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน 7 มี.ค. 2565
เลขทะเบียน 1049635
เลขเรียกหนังสือ ว TS 933 .L5 ว2915 2561

สนับสนุนโดย
งบประมาณรายได้มหาวิทยาลัยนเรศวร
ปีงบประมาณ 2561

บทสรุปผู้บริหาร

ชื่อโครงการ การการย่อยลิกนินและการลดสีน้ำล้างเยื่อกระดาษ โดย *Bacillus* sp. ที่คัดแยกได้จากโรงงานเยื่อกระดาษ

ระยะเวลาดำเนินการ 9 ตุลาคม 2560 – 30 มิถุนายน 2562

ที่มาและความสำคัญ

น้ำล้างเยื่อกระดาษ ซึ่งเป็นที่รู้จักกันในชื่อ Black liquor มีองค์ประกอบของลิกนินอยู่โดยประมาณ 40 – 48% มีน้ำอยู่เพียง 10 – 15% ถือเป็นของเสียร้อยละ 90 – 95% ของโรงงานเยื่อกระดาษ และส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมโดยตรง การกำจัดน้ำล้างเยื่อกระดาษยังไม่มีกระบวนการที่แน่นอน เนื่องจากยังไม่มีวิธีการใดที่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมต่ำที่สุด ในขณะเดียวกันได้มีการนำวิธีทางชีวภาพมาประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำล้างเยื่อกระดาษ โดยการคัดแยกจุลินทรีย์ไม่ว่าจะเป็นเชื้อราแอคติโนมัยสีทและแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยลิกนิน ผลผลิตที่ได้จากการย่อยลิกนินเป็นสารที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ โดยสามารถนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในอุตสาหกรรมอื่นๆ ทดแทนสารประกอบอะโรมาติกโมเลกุลต่ำจากปิโตรเลียมต่อไป งานวิจัยนี้จึงทำการคัดแยกจุลินทรีย์จากความสามารถในการทนต่อสารพิษความเข้มข้นสูงและความสามารถในการเจริญได้บนอาหารที่มีองค์ประกอบของน้ำล้างเยื่อกระดาษ และศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญการย่อยลิกนิน และการเปลี่ยนแปลงเป็นสารโพลีเมอร์เพื่อนำสภาวะที่ได้มาประยุกต์ใช้กับน้ำล้างเยื่อกระดาษ

วัตถุประสงค์

1. เพื่อแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการเจริญได้ในน้ำล้างเยื่อกระดาษ
2. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยลิกนินทางการค้าโดยจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้
3. เพื่อศึกษาความเข้มข้นน้ำล้างเยื่อกระดาษที่เหมาะสมในการย่อยและเปลี่ยนแปลงเป็นสารโพลีเมอร์ลิกนินโดยจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้

ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ทำการคัดแยกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยลิกนินจากดินและน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตเยื่อกระดาษ ด้วยเทคนิคการเติมสารพิษลงในอาหารคัดแยก (toxic tolerance technique) ระบุสายพันธุ์ด้วยวิธีการทางชีวเคมีและวิธีการทางชีวโมเลกุล คัดเลือกความสามารถ

ในการย่อยลิกนินที่ ความเข้มข้นต่างๆ ในสภาวะที่มีการเติมและไม่เติมสารส่งเสริมการเจริญเติบโต เพื่อเลือกสายพันธุ์ที่เหมาะสมที่สุด มาทำการทดสอบปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อความสามารถในการย่อยลิกนิน ได้แก่ ความเข้มข้นลิกนิน แหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน และอุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ลิกนินทางการค้าเป็นส่วนประกอบ โดยตรวจวัดการเจริญเติบโตจากความขุ่นและเซลล์ที่มีชีวิต ปริมาณลิกนิน ค่าสีของน้ำหมัก แอคติวิตี้ของเอนไซม์แลคเคส เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมแล้ว จึงนำสภาวะที่ได้มาใช้กับการเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยน้ำล้างเยื่อกระดาษความเข้มข้นต่างๆ ในสภาวะที่มีการเติมและไม่เติมสารส่งเสริมการเจริญเติบโต โดยตรวจวัดการเจริญเติบโตจากความขุ่นและเซลล์ที่มีชีวิต ปริมาณลิกนิน ค่าสีของน้ำหมัก แอคติวิตี้ของเอนไซม์แลคเคส และนำน้ำหมักมาตรวจวิเคราะห์เพื่อระบุสารโมเลกุลต่ำที่สำคัญโดยใช้แก๊สโครมาโตกราฟีแมสสเปกโตรสโคปี และหามวลโมเลกุลของโพลิเมอร์โดยใช้ Gel permeation chromatography จากผลการทดลองพบว่าสามารถคัดแยกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการเติบโตได้ในอาหารที่เติมสารพิษลงไปได้ทั้งหมด 5 รหัสคัดแยก ได้แก่ 2B2-1LigB, 6B2-Al, mPDA 7, MXYP 5 และ MMX3 การทดสอบทางชีวเคมีและชีวโมเลกุลพบว่าจุลินทรีย์ทั้งหมดถูกระบุชื่ออยู่ในสกุล *Bacillus* sp. โดย 2B2-1LigB, 6B2-Al, mPDA 7 และ MMX3 ถูกระบุว่าเป็นสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกับ *B. subtilis* ในขณะที่ MXYP5 ถูกระบุว่าเป็นสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกับ *B. licheniformis* ซึ่งจุลินทรีย์รหัส 2B2-1LigB มีความสามารถในการย่อยลิกนินสูงสุด ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมกลูโคสและเปปโทนเป็นสารส่งเสริมการเติบโต จึงถูกเลือกมาทดลองต่อ ซึ่งพบว่าจุลินทรีย์รหัส 2B2-1LigB สามารถย่อยสลายลิกนินได้สูงสุดเท่ากับร้อยละ 79.23 ที่สภาวะความเข้มข้นลิกนิน 1 กรัมต่อลิตร โดยใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส จากนั้นนำสภาวะที่ได้ไปทดสอบการเลี้ยงเชื้อในน้ำล้างเยื่อกระดาษที่ความเข้มข้นร้อยละ 1-4 โดยปริมาตร พบว่าความเข้มข้นของน้ำล้างเยื่อกระดาษที่เหมาะสม คือร้อยละ 2 โดยปริมาตร สารมวลโมเลกุลต่ำที่ตรวจพบมีทั้งที่เกิดการสลายตัวและสร้างขึ้นใหม่จากการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และยังตรวจพบอีกว่าจุลินทรีย์สามารถย่อยสลายลิกนินและสร้างสารโพลิเมอร์ลิกนินที่มีขนาดเพิ่มขึ้นเท่ากับ 2,282.66 ดาลตัน ทำให้สรุปได้ว่าจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้มีความสามารถในการเติบโตในน้ำล้างเยื่อกระดาษ เกิดปฏิกิริยาสลายและสร้างเป็นโพลิเมอร์ลิกนินที่มีขนาดมวลโมเลกุลใหญ่ขึ้นได้

บทคัดย่อ

น้ำล้างเยื่อกระดาษเป็นของเสียจากกระบวนการผลิตเยื่อกระดาษของโรงงานอุตสาหกรรมที่จะต้องบำบัดก่อนที่จะปล่อยสู่สาธารณะ การบำบัดสามารถทำได้หลายวิธี โดยวิธีการทางชีวภาพเป็นวิธีการหนึ่งที่ได้รับความสนใจในปัจจุบัน โดยอาศัยการทำงานของจุลินทรีย์ในการย่อยลิกนินที่เป็นองค์ประกอบหลักในน้ำล้างเยื่อกระดาษและสามารถได้ผลผลิตที่เป็นสารอื่นที่มีมูลค่าเพิ่มได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อย่อยสลายลิกนินที่อยู่ในน้ำล้างเยื่อกระดาษและการเปลี่ยนแปลงเป็นสารโพลิเมอร์ลิกนิน โดยอาศัยจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยลิกนินที่คัดแยกได้จากดินและน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตเยื่อกระดาษ ด้วยเทคนิคการเติมสารพิษลงในอาหารคัดแยก (toxic tolerance technique) ระบุสายพันธุ์ด้วยวิธีการทางชีวเคมีและวิธีการทางชีวโมเลกุล คัดเลือกความสามารถในการย่อยลิกนินที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสภาวะที่มีการเติมและไม่เติมสารส่งเสริมการเจริญเติบโต เพื่อเลือกสายพันธุ์ที่เหมาะสมที่สุด มาทำการทดสอบปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อความสามารถในการย่อยลิกนิน ได้แก่ ความเข้มข้นลิกนิน แหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน และอุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ลิกนินทางการค้าเป็นส่วนประกอบ โดยตรวจวัดการเจริญเติบโตจากความขุ่นและเซลล์ที่มีชีวิต ปริมาณลิกนิน ค่าสีของน้ำหมัก แอคติวิตี้ของเอนไซม์แลคเคส เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมแล้ว จึงนำสภาวะที่ได้มาใช้กับการเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยน้ำล้างเยื่อกระดาษความเข้มข้นต่างๆ ในสภาวะที่มีการเติมและไม่เติมสารส่งเสริมการเจริญเติบโต โดยตรวจวัดการเจริญเติบโตจากความขุ่นและเซลล์ที่มีชีวิต ปริมาณลิกนิน ค่าสีของน้ำหมัก แอคติวิตี้ของเอนไซม์แลคเคส และนำน้ำหมักมาตรวจวิเคราะห์เพื่อระบุสารโมเลกุลต่ำที่สำคัญโดยใช้แก๊สโครมาโตกราฟีแมสสเปกโตรสโคปี และหามวลโมเลกุลของโพลิเมอร์โดยใช้ Gel permeation chromatography จากผลการทดลองพบว่าสามารถคัดแยกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการเติบโตได้ในอาหารที่เติมสารพิษลงไปได้ทั้งหมด 5 รหัสคัดแยก ได้แก่ 2B2-1LigB, 6B2-Al, mPDA 7, MXYP 5 และ MMX3 การทดสอบทางชีวเคมีและชีวโมเลกุลพบว่าจุลินทรีย์ทั้งหมดถูกระบุชื่ออยู่ในสกุล *Bacillus* sp. โดย 2B2-1LigB, 6B2-Al, mPDA 7 และ MMX3 ถูกระบุว่าเป็นสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกับ *B. subtilis* ในขณะที่ MXYP5 ถูกระบุว่าเป็นสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกับ *B. licheniformis* ซึ่งจุลินทรีย์รหัส 2B2-1LigB มีความสามารถในการย่อยลิกนินสูงสุด ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมกลูโคสและเปปโทนเป็นสารส่งเสริมการเติบโต จึงถูกเลือกมาทดลองต่อ ซึ่งพบว่าจุลินทรีย์รหัส 2B2-1LigB สามารถย่อยสลายลิกนินได้สูงสุดเท่ากับร้อยละ 79.23 ที่สภาวะความเข้มข้นลิกนิน 1 กรัมต่อลิตร โดยใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส จากนั้นนำสภาวะที่ได้ไปทดสอบการเลี้ยงเชื้อในน้ำล้างเยื่อกระดาษที่ความเข้มข้นร้อยละ 1-4 โดยปริมาตร พบว่าความเข้มข้นของน้ำล้างเยื่อกระดาษที่เหมาะสม คือร้อยละ 2 โดยปริมาตร สารมวลโมเลกุลต่ำที่ตรวจพบมีทั้งที่เกิดการสลายตัวและสร้าง

ขึ้นใหม่จากการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และยังตรวจพบอีกว่าจุลินทรีย์สามารถย่อยสลายลิกนินและสร้างสารโพลิเมอร์ลิกนินที่มีขนาดเพิ่มขึ้นเท่ากับ 2,282.66 ดาลตัน ทำให้สรุปได้ว่าจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้มีความสามารถในการเติบโตในน้ำล้างเยื่อกระดาษ เกิดปฏิกิริยาสลายและสร้างเป็นโพลิเมอร์ลิกนินที่มีขนาดมวลโมเลกุลใหญ่ขึ้นได้

คำสำคัญ: น้ำล้างเยื่อกระดาษ การย่อยทางชีวภาพ การเปลี่ยนแปลงเป็นสารโพลิเมอร์ *Bacillus* sp. โรงงานเยื่อกระดาษ

ABSTRACT

Black liquor (BL) is the effluent produced as a waste product from a pulping process. This effluent is required treatments before it is discarded into the environment. There are several possibilities for BL treatments. Until recently, the biological process is a remarkable BL treatment. Lignin is a major component in BL and is degraded by microorganisms enable to produce the subsequent value added products. This study presents biodegradation and polymerization of BL lignin by isolating microorganisms from soil, sediment and drain water at pulp mill using the toxic tolerance technique. The isolated strains were identified based on biochemical test and 16S rRNA gene sequencing. The best lignin-biodegradation strain was selected by with or without supplemented carbon and nitrogen sources screening. The effects of the lignin concentration, nitrogen source, nitrogen source concentration, and temperature on the lignin degradation were evaluated by selected strain using commercial lignin containing media. Cell growth, using two separate tests (A_{620} and CFU/mL), lignin concentration, color, and laccase activity were also determined. The final samples (collected at 144 h after inoculation) were analyzed for LMWACs using GC-MS and lignin MW using Gel permeation chromatography (GPC). The results indicate that the five bacterial strains isolated from the pulp mill samples were 2B2-1LigB, 6B2-Al, mPDA 7, MXYP5, and MMX3. The isolates identified using biochemical test and 16S rRNA sequencing were all in the *Bacillus* genus. 2B2-1LigB, 6B2-Al, mPDA 7, and MMX3 were identified as *B. subtilis* while MXYP5 was *B. licheniformis*. The best strain, 2B2-1LigB, was selected for investigating the optimum conditions. The optimum condition for highest lignin degradation was 79.23 % at lignin concentration of 1 g/l, urea concentration of 5 g/l, and temperature of 35 °C. Then, this condition was used to determine the bacterial growth and producing high MW lignin in 1% to 4% BL concentrations. The greatest amount of polymerization occurred in the 2% (v/v) BL solution. Some compounds in BL were degraded and produced as intermediate compounds by bacterial growth. The increasing of MW BL lignin was 2,282.66 Dalton. To summarize the current study, the isolated strain could degrade and change lignin to high molecular weight.

Keywords: Black liquor, Degradation, Polymerization, *Bacillus* sp., Pulp mill

สารบัญ

บทที่		หน้า
1	**บทนำ**	1
	ความเป็นมาของปัญหา	1
	จุดมุ่งหมายของการวิจัย	3
	ความสำคัญของการวิจัย	3
	ขอบเขตของการวิจัย	4
	ข้อตกลงเบื้องต้น	5
	สมมุติฐานของการวิจัย	5
2	**เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง**	7
	การผลิตเยื่อกระดาษ	7
	วัตถุดิบในการผลิตเยื่อกระดาษ	9
	กระบวนการผลิตเยื่อกระดาษ	9
	ของเสียที่เกิดจากกระบวนการผลิต	11
	ลิกโนเซลลูโลสและลิกนิน	13
	ชนิดลิกนินและคุณสมบัติทางเคมี	14
	การย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสและลิกนิน	22
	วิธีทางกายภาพและเคมี	25
	วิธีทางชีวภาพ	26
	การย่อยลิกนินโดยปฏิกิริยาของเอนไซม์	28
	เอนไซม์บริสุทธิ์	28
	ปัจจัยที่มีผลต่อปฏิกิริยาของเอนไซม์	32
	รูปแบบของการใช้งานเอนไซม์	33
	การย่อยสลายลิกนินด้วยจุลินทรีย์	33
	ชนิดของจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายลิกนิน	35
	การคัดเลือกจุลินทรีย์	42

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
	วัฏจักรสลายลิกนิน	52
	ปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลายลิกนินโดยจุลินทรีย์	56
	รูปแบบการประยุกต์ใช้จุลินทรีย์ในการย่อยสลายลิกนิน	61
	สารประกอบที่ได้จากการย่อยลิกนิน	66
	การวิเคราะห์ด้วย GC-MS	71
	การเปลี่ยนแปลงเป็นสารโพลีเมอร์ของลิกนิน (Polymerization of lignin)	77
3	วิธีดำเนินการวิจัย	85
	เครื่องมือและอุปกรณ์	85
	สารเคมี	85
	วิธีการวิจัย	86
4	ผลการวิจัย	94
	การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการเจริญในอาหารที่มีสารพิษ	94
	การระบุชื่อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้	98
	การคัดเลือกจุลินทรีย์	106
	การหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยลิกนินบริสุทธิ์	126
	การศึกษาความเข้มข้นน้ำล้างเยื่อกระดาษที่เหมาะสม	188
5	บทสรุป	223

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
บรรณานุกรม	225
ภาคผนวก	243

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
1	ลักษณะทางกายภาพของน้ำทิ้งจากโรงงานเยื่อกระดาษและกระดาษ	10
2	องค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลสในไม้แต่ละประเภท	13
3	ประเภทของหมู่ฟังชั่นที่แตกต่างกันในแต่ละค่าดูดกลืนแสงด้วยเทคนิค FTIR	19
4	การคัดเลือกเชื้อเพื่อหาความสามารถในการใช้สารประกอบอะโรมาติกมวลโมเลกุลต่ำเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน	48
5	การคัดเลือกเชื้อเพื่อหารูปแบบความทนทานต่อความเข้มข้นของลิกนินที่แตกต่างกันที่มีการเติมและไม่เติมลิกนินของเชื้อที่คัดแยกได้	50
6	แบคทีเรียคัดแยกจากอุตสาหกรรมลิกโนเซลลูโลส ซึ่งมีความสามารถในการย่อยลิกโนเซลลูโลส	64
7	ผลการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุล (HPSEC) แสดงค่าน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยน้ำหนัก (weight-average, Mw) น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยจำนวน (number-average, Mn) ค่าการกระจายน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight and polydispersity, Mw/Mn) ของลิกนิน	84
8	การระบุชื่อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ด้วยวิธีการทางชีวเคมี	100
9	จุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ในแต่ละรหัสโดยใช้ 16S rRNA gene	104
10	การคัดเลือกเชื้อโดยใช้ความสามารถในการใช้และไม่ใช้กลูโคสและเปปโทนบน Kraft lignin mineral medium (L-MSM agar)	108
11	การเจริญบนสารอะโรมาติกมวลโมเลกุลต่ำ ($LMWAC_s$) ของเชื้อแต่ละรหัส	109
12	สารประกอบที่สกัดได้โดยใช้ ethyl acetate ในตัวอย่างควบคุม และตัวอย่างน้ำล้างเยื่อกระดาษความเข้มข้นร้อยละ 10 หลังจากการย่อยของแบคทีเรียที่คัดแยกได้รหัสต่างๆ โดยไม่มีการแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน	113
13	การระบุชื่อสารประกอบในสารสกัด ethyl acetate และร้อยละการย่อยสารประกอบต่างๆ ในน้ำล้างเยื่อกระดาษโดยเทคนิค TMS derivatives ของตัวอย่างน้ำล้างเยื่อกระดาษความเข้มข้น 10 %(v/v) ซึ่งไม่เติมสารส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ ตามกราฟการเจริญในภาพ 35A	119

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตาราง **หน้า**

14 ค่าวัดลิกนินและสีของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำล้างเยื่อกระดาษร้อยละ 1 125

15 แบบแผนการหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยลิกนินบริสุทธิ์..... 127

16 ร้อยละการย่อยลิกนินในแต่ละการทดลอง 159

17 องค์ประกอบในน้ำล้างเยื่อกระดาษที่โรงงานเยื่อกระดาษ (EPPCO)..... 194

18 สารประกอบที่สกัดได้โดยใช้ ethyl acetate ในตัวอย่างควบคุมน้ำล้างเยื่อกระดาษร้อยละ 1 ที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ และตัวอย่างน้ำล้างเยื่อกระดาษความเข้มข้นร้อยละ 1-4 ก่อนและหลังการบ่มเป็นเวลา 144 ชั่วโมง 206

19 การระบุชื่อสารประกอบในสารสกัด ethyl acetate และร้อยละการย่อยสารประกอบต่างๆ ในน้ำล้างเยื่อกระดาษโดยเทคนิค TMS derivatives ของตัวอย่างน้ำล้างเยื่อกระดาษความเข้มข้น 1 – 4 %(v/v) ซึ่งเติมสารส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ แสดงกราฟการเจริญของเชื้อภาพ 68 216

20 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของอาหารเพาะเลี้ยงที่มีองค์ประกอบของน้ำล้างเยื่อกระดาษความเข้มข้นต่าง ๆ ด้วยเทคนิค GPC..... 218

21 เปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนไว้ กิจกรรมที่ดำเนินการมา และผลที่ได้รับตลอดโครงการ 249

สารบัญภาพ

ภาพ		หน้า
1	แผนภาพกระบวนการของโรงงานเยื่อกระดาษและกระดาษ	8
2	โครงสร้างของผนังเซลล์พืช a) โครงสร้างของผนังเซลล์พืชประกอบด้วย middle lamellaผนังเซลล์ลำดับแรก และ ผนังเซลล์ลำดับสอง b) โครงสร้างของผนังเซลล์ลำดับสองประกอบด้วยเซลลูโลสไฟเบอร์ที่ต่ออยู่กับลิกนินและเฮมิเซลลูโลส	14
3	โครงสร้างของลิกนิน	15
4	ขั้นตอนการสกัดและทำบริสุทธิ์ลิกนินจากน้ำย่อยฟางข้าวที่เกิดขึ้นจากอุตสาหกรรมการผลิตไบโอเอทานอลจากฟางข้าว	18
5	การสกัดลิกนินจาก Black liquor โดยใช้ $AlK(SO_4)_2.12H_2O$	20
6	FT-IR สเปกตรัมการดูดกลืนรังสีอินฟาเรดของลิกนิน lignin-SKKU (a) และ lignin-Aldrich (b)	21
7	ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในระหว่างการย่อยลิกโนเซลลูโลส อนุพันธุ์ฟูแรนและสารประกอบฟีโนลิกจะทำปฏิกิริยาเพื่อสร้างสารประกอบบางชนิด	23
8	กลไกการทำงานของ lignin peroxidase	30
9	กลไกการทำงานของ Manganese Peroxidase	31
10	กลไกการทำงานของ laccases	31
11	วัฏจักรการย่อยองค์ประกอบ β-aryl ether component ในลิกนิน ลำดับยีนของ *S. paucimobilis*	52
12	วัฏจักรการย่อยองค์ประกอบ biphenyl ในโมเลกุลลิกนินของเชื้อ *S. paucimobilis*	53
13	วัฏจักรการย่อย diaryl propane component ของลิกนิน	53
14	วัฏจักรการย่อยองค์ประกอบ penylcoumarane ในลิกนินของเชื้อรา	54
15	วัฏจักรการย่อย ferulic acid ของแบคทีเรีย	55
16	Ortho- และ meta-cleavage pathways สำหรับย่อย protocatechuic acid และ gallic acid	55

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ หน้า

17 วิถีการย่อยลิกนินและสารประกอบอะโรมาติกที่ได้จากลิกนิน โดย S. paucimobilis SYK-6 56

18 น้ำล้างเยื่อกระดาษถูกถ่ายเชื้อ *Paenibacillus* sp. บ่มที่ 34±1 °C , 120 rpm เป็นระยะเวลา 6 วันการเจริญและสี (a) การลดลงของค่าพารามิเตอร์ทางมลพิษต่างๆ (b) ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ (c) กิจกรรมเอนไซม์ laccase (d) 59

19 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบสองกราดของเซลล์ *P. aeruginosa* (DSMZ 03504) (A) และ (B) เซลล์ถูกเลี้ยงในน้ำทิ้งที่เกิดปฏิกิริยาการลดสี พบการรวมกลุ่มกันของเซลล์และมีการสร้างเยื่อโพลีแซคคาไรด์ (C) เซลล์ที่ไม่ได้ทำการเลี้ยงในน้ำทิ้ง (D) เซลล์เดี่ยวๆ ของ*P. Aeruginosa* 62

20 การประยุกต์ที่อาจเกิดขึ้นได้กับแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยลิกโนเซลลูโลส 67

21 ผลิตภัณฑ์หลากหลายชนิดที่ได้จากการย่อยลิกนินถูกนำเข้าสู่ภายในเซลล์และถูกนำไปใช้ผ่านทางวัฏจักรการย่อยสารอะโรมาติก สารประกอบที่ได้จากลิกนินจะถูกเปลี่ยนให้เป็น protocatechuic acid ซึ่งขึ้นอยู่กับจุลินทรีย์แต่ละชนิดอาจมีการย่อยผ่านทางกลไก meta- หรือ ortho- cleavage เพื่อเข้าสู่ citric acid cycle 70

22 สารประกอบที่ถูกสกัดด้วย ethyl acetate ของตัวอย่างควบคุม (a) และตัวอย่างที่ทำการบ่มเชื้อแบคทีเรียเป็นระยะเวลา 6 วัน *Paenibacillus* sp.(b), *A. aneurinilyticus* (c) และ *Bacillus* sp.(d) 71

23 โครมาโตกราฟของสารสกัดethyl acetate ในตัวอย่างควบคุม (a) และตัวอย่างที่ได้จากการย่อยของแบคทีเรีย (b) 74

24 โครมาโตกราฟของสารสกัด dichloromethane ในตัวอย่างควบคุม (a) และตัวอย่างที่ได้จากการย่อยของแบคทีเรีย (b) 75

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ หน้า

25 โครมาโตกราฟของสารประกอบที่สกัดได้โดย trichloromethane จากอาหารเพาะเลี้ยง kraft lignin ที่บ่มด้วย *Cupriavidus* sp.B-8 (a) 0d; (b) 3d; (c) 6d 76

26 โครมาโตกราฟของสารประกอบที่สกัดได้โดยใช้ethyl acetate ในตัวอย่างควบคุม (a) และตัวอย่างน้ำล้างเยื่อกระดาษหลังจากการย่อยของแบคทีเรีย *Paenibacillus* sp.(b) 77

27 ตำแหน่งเก็บตัวอย่างดินปนเปื้อนน้ำล้างเยื่อกระดาษ ในทางเดินท่อระบาย 94

28 ตำแหน่งการเก็บตัวอย่างตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสียแบบใช้อากาศของโรงงาน... 94

29 ตำแหน่งการเก็บตัวอย่างน้ำในคูน้ำรอบ ๆ กองชานอ้อย 95

30 แบคทีเรียที่คัดแยกได้รหัส 2B2-1LigB 95

31 แบคทีเรียที่คัดแยกได้รหัส 6B2-Al..... 96

32 แบคทีเรียที่คัดแยกได้รหัส mPDA 7 97

33 แบคทีเรียที่คัดแยกได้รหัส MXYP 5..... 97

34 แบคทีเรียที่คัดแยกได้รหัส MMX3 97

35 การเจริญของเชื้อที่คัดแยกได้บนอาหารBL-MSM broth ที่มีองค์ประกอบของน้ำล้างเยื่อกระดาษความเข้มข้นร้อยละ10 111

36 การเจริญของเชื้อที่คัดแยกได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีองค์ประกอบของน้ำล้างเยื่อกระดาษความเข้มข้นร้อยละ 10โดยปริมาตรที่มีการเติมสารส่งเสริมการเจริญ (กลูโคส0.5%(w/v)และเปปโทน 0.25%(w/v)) อุณหภูมิ 40 °C ความเร็ว 200 รอบต่อนาที..... 122

37 การเจริญของเชื้อที่คัดแยกได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีองค์ประกอบของน้ำล้างเยื่อกระดาษความเข้มข้นร้อยละ 1โดยปริมาตร ที่มีการเติมสารส่งเสริมการเจริญ (กลูโคส 0.5%(w/v)และเปปโทน 0.25%(w/v)) อุณหภูมิ 40 °C ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ปริมาณหัวเชื้อตั้งต้น 5 %(v/v) ในอาหารเดียวกัน สัญลักษณ์แทน..... 124

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ หน้า

38 ปฏิกิริยาของ 2B2-1 ligB ที่เกิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ไม่เติมลิกนิน กลูโคส 5 กรัมต่อลิตร และแหล่งไนโตรเจนความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร A) $NaNO_3$ B) Peptone 129

39 ปฏิกิริยาของ 2B2-1 LigB ที่เกิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ไม่เติมลิกนิน กลูโคส 5 กรัมต่อลิตร และแหล่งไนโตรเจนความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร A) $NaNO_3$ B) Peptone 131

40 ปฏิกิริยาของ 2B2-1LigB ที่เกิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เติมลิกนิน A) 1 กรัมต่อลิตร B) 2 กรัมต่อลิตร กลูโคส 5 กรัมต่อลิตร และไม่เติมแหล่งไนโตรเจน 133

41 ปฏิกิริยาของ 2B2-1LigB ที่เกิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เติมลิกนิน A) 1 กรัมต่อลิตร B) 2 กรัมต่อลิตร กลูโคส 5 กรัมต่อลิตร และเติม Peptone เป็นแหล่งไนโตรเจนความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร..... 135

42 ปฏิกิริยาของ 2B2-1 ligB ที่เกิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เติมลิกนิน A) 1 กรัมต่อลิตร B) 2 กรัมต่อลิตร กลูโคส 5 กรัมต่อลิตร และไม่เติมแหล่งไนโตรเจน..... 138

43 ปฏิกิริยาของ 2B2-1LigB ที่เกิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เติมลิกนิน A) 1 กรัมต่อลิตร B) 2 กรัมต่อลิตร กลูโคส 5 กรัมต่อลิตร และเติมPeptone เป็นแหล่งไนโตรเจนความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร 140

44 ปฏิกิริยาของ 2B2-1 ligB ที่เกิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ทำการเติมลิกนิน 1 กรัมต่อลิตร กลูโคส 5 กรัมต่อลิตร และมี $NaNO_3$เป็นแหล่งไนโตรเจน A) 2.5 กรัมต่อลิตร B) 5 กรัมต่อลิตร..... 142

45 ปฏิกิริยาของ 2B2-1 ligB ที่เกิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ทำการเติมลิกนิน 1 กรัมต่อลิตร กลูโคส 5 กรัมต่อลิตร และมี Urea เป็นแหล่งไนโตรเจน A) 2.5 กรัมต่อลิตร B) 5 กรัมต่อลิตร 144

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ หน้า

46 ปฏิกิริยาของ 2B2-1LigB ที่เกิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่อุณหภูมิ 40 องศา เซลเซียส ทำการเติมลิกนิน 1 กรัมต่อลิตร กลูโคส 5 กรัมต่อลิตร และมี $NaNO_3$เป็นแหล่งไนโตรเจน A) 2.5 กรัมต่อลิตร B) 5 กรัมต่อลิตร..... 147

47 ปฏิกิริยาของ 2B2-1LigB ที่เกิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่อุณหภูมิ 40 องศา เซลเซียส ทำการเติมลิกนิน 1 กรัมต่อลิตร กลูโคส 5 กรัมต่อลิตร และมี Urea เป็นแหล่งไนโตรเจน A) 2.5 กรัมต่อลิตร B) 5 กรัมต่อลิตร 149

48 ปฏิกิริยาของ 2B2-1 ligB ที่เกิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่อุณหภูมิ 35 องศา เซลเซียส ทำการเติมลิกนิน 2 กรัมต่อลิตร กลูโคส 5 กรัมต่อลิตร และมี $NaNO_3$ เป็นแหล่งไนโตรเจน A) 2.5 กรัมต่อลิตร B) 5 กรัมต่อลิตร..... 151

49 ปฏิกิริยาของ 2B2-1 ligB ที่เกิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่อุณหภูมิ 35 องศา เซลเซียส ทำการเติมลิกนิน 2 กรัมต่อลิตร กลูโคส 5 กรัมต่อลิตร และมี Urea เป็นแหล่งไนโตรเจน A) 2.5 กรัมต่อลิตร B) 5 กรัมต่อลิตร 153

50 ปฏิกิริยาของ 2B2-1 LigB ที่เกิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่อุณหภูมิ 40 องศา เซลเซียส ทำการเติมลิกนิน 2 กรัมต่อลิตร กลูโคส 5 กรัมต่อลิตร และมี $NaNO_3$เป็นแหล่งไนโตรเจน A) 2.5 กรัมต่อลิตร B) 5 กรัมต่อลิตร..... 155

51 ปฏิกิริยาของ 2B2-1LigB ที่เกิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่อุณหภูมิ 40 องศา เซลเซียส ทำการเติมลิกนิน 2 กรัมต่อลิตร กลูโคส 5 กรัมต่อลิตร และมี Urea เป็นแหล่งไนโตรเจน A) 2.5 กรัมต่อลิตร B) 5 กรัมต่อลิตร 157

52 ปฏิกิริยาของ 2B2-1 ligB ที่เกิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่อุณหภูมิ 45 องศา เซลเซียส ไม่เติมลิกนิน กลูโคส 5 กรัมต่อลิตร และแหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตรA) $NaNO_3$ B) Peptone..... 161

53 ปฏิกิริยาของ 2B2-1LigB ที่เกิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่อุณหภูมิ 45 องศา เซลเซียส เติมลิกนิน A) 1 กรัมต่อลิตร B) 2 กรัมต่อลิตร เติมกลูโคส 5 กรัมต่อลิตร และไม่เติมแหล่งไนโตรเจน..... 163

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ หน้า

54 ปฏิกิริยาของ 2B2-1 ligB ที่เกิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เติมลิกนิน A) 1 กรัมต่อลิตร B) 2 กรัมต่อลิตร กลูโคส 5 กรัมต่อลิตร และเติมเปปโทนเป็นแหล่งไนโตรเจนความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร..... 165

55 ปฏิกิริยาของ 2B2-1LigB ที่เกิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ทำการเติมลิกนิน 1 กรัมต่อลิตร กลูโคส 5 กรัมต่อลิตร และมี $NaNO_3$ เป็นแหล่งไนโตรเจน A) 2.5 กรัมต่อลิตร B) 5 กรัมต่อลิตร..... 167

56 ปฏิกิริยาของ 2B2-1LigB ที่เกิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ทำการเติมลิกนิน 1 กรัมต่อลิตร กลูโคส 5 กรัมต่อลิตร และมี Urea เป็นแหล่งไนโตรเจน A) 2.5 กรัมต่อลิตร B) 5 กรัมต่อลิตร 169

57 ปฏิกิริยาของ 2B2-1LigB ที่เกิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ทำการเติมลิกนิน 2 กรัมต่อลิตร กลูโคส 5 กรัมต่อลิตร และมี $NaNO_3$ เป็นแหล่งไนโตรเจน A) 2.5 กรัมต่อลิตร B) 5 กรัมต่อลิตร..... 171

58 ปฏิกิริยาของ 2B2-1 ligB ที่เกิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ทำการเติมลิกนิน 2 กรัมต่อลิตร กลูโคส 5 กรัมต่อลิตร และมี Urea เป็นแหล่งไนโตรเจน A) 2.5 กรัมต่อลิตร B) 5 กรัมต่อลิตร 173

59 ปฏิกิริยาของ 2B2-1LigB ที่เกิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ทำการเติมลิกนิน A) 1 กรัมต่อลิตร B) 2 กรัมต่อลิตร กลูโคส 5 กรัมต่อลิตร และมี $NaNO_3$ เป็นแหล่งไนโตรเจน 1 กรัมต่อลิตร 175

60 ปฏิกิริยาของ 2B2-1LigB ที่เกิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ทำการเติมลิกนิน A) 1 กรัมต่อลิตร B) 2 กรัมต่อลิตร กลูโคส 5 กรัมต่อลิตร และมี $NaNO_3$ เป็นแหล่งไนโตรเจน 1 กรัมต่อลิตร 177

61 ปฏิกิริยาของ 2B2-1LigB ที่เกิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ทำการเติมลิกนิน A) 1 กรัมต่อลิตร B) 2 กรัมต่อลิตร กลูโคส 5 กรัมต่อลิตร และมี $NaNO_3$ เป็นแหล่งไนโตรเจน 1 กรัมต่อลิตร 179

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ		หน้า
62	ปฏิกิริยาของ 2B2-1 LigB ที่เกิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ทำการเติมลิกนิน A) 1 กรัมต่อลิตร B) 2 กรัมต่อลิตร กลูโคส 5 กรัมต่อลิตร และมี Urea เป็นแหล่งไนโตรเจน 7.5 กรัมต่อลิตร	181
63	ปฏิกิริยาของ 2B2-1LigB ที่เกิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ทำการเติมลิกนิน A) 1 กรัมต่อลิตร B) 2 กรัมต่อลิตร กลูโคส 5 กรัมต่อลิตร และมี Urea เป็นแหล่งไนโตรเจน 7.5 กรัมต่อลิตร	183
64	ปฏิกิริยาของ 2B2-1LigB ที่เกิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ทำการเติมลิกนิน A) 1 กรัมต่อลิตร B) 2 กรัมต่อลิตร กลูโคส 5 กรัมต่อลิตร และมี Urea เป็นแหล่งไนโตรเจน 7.5 กรัมต่อลิตร	185
65	ตะกอนแห้งที่ได้จากการตกตะกอนน้ำล้างเยื่อกระดาษด้วยกรด	189
66	การเปรียบเทียบค่าความยาวคลื่น (FT-IR) ระหว่างลิกนินที่สกัดได้จากน้ำล้างเยื่อกระดาษและลิกนินทางการค้า	190
67	ปฏิกิริยาของ 2B2-1LigB ที่เกิดในน้ำล้างเยื่อกระดาษความเข้มข้นต่าง ๆ A) 1%(v/v) B) 2%(v/v) C) 3%(v/v) D) 4%(v/v) ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ไม่เติมกลูโคสและยูเรีย	197
68	ปฏิกิริยาของ 2B2-1LigB ที่เกิดในน้ำล้างเยื่อกระดาษความเข้มข้นต่าง ๆ A) 1%(v/v) B) 2%(v/v) C) 3%(v/v) D) 4%(v/v) ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เติมกลูโคส 5 กรัมต่อลิตร และยูเรีย 5 กรัมต่อลิตร	201
69	การเปรียบเทียบค่าพีเอชในการศึกษาผลการเลี้ยงเชื้อในน้ำล้างเยื่อกระดาษ A) ที่ไม่เติมสารส่งเสริมการเจริญ และ B) เติมสารส่งเสริมการเจริญได้แก่กลูโคสและยูเรีย	204

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาของปัญหา

โรงงานเยื่อกระดาษและกระดาษเป็นผู้ผลิตของเสียจากลิกโนเซลลูโลสอันดับต้นๆ โดยมีการใช้สารเคมีต่างๆ เพื่อแยกลิกนินออกจากเยื่อเซลลูโลส ทำให้ได้ของเสียที่มีลิกนินอยู่ในน้ำเรียกว่า น้ำล้างเยื่อกระดาษ ซึ่งเป็นที่รู้จักกันในชื่อ Black liquor มีองค์ประกอบของลิกนินอยู่โดยประมาณ 40 – 48% มีน้ำอยู่เพียง 10 – 15% ถือเป็นของเสียร้อยละ 90 – 95% ของโรงงานเยื่อกระดาษ และส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมโดยตรง (Pokhrel, & Viraraghavan, 2004) การกำจัดน้ำล้างเยื่อกระดาษยังไม่มีกระบวนการที่แน่นอน เนื่องจากยังไม่มีวิธีการใดที่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมต่ำที่สุด ในขณะเดียวกันได้มีการนำวิธีทางชีวภาพมาประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำล้างเยื่อกระดาษ โดยการคัดแยกจุลินทรีย์ไม่ว่าจะเป็นเชื้อราแอคติโนมัยสีทและแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยลิกนิน ลิกนินเป็นสารประกอบจำพวกฟีนอลมวลโมเลกุลใหญ่ เมื่อทำการวิเคราะห์ผลผลิตที่ได้จากการย่อยลิกนิน พบว่าผลผลิตเหล่านี้มีคุณค่าทางเศรษฐกิจโดยสามารถนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในอุตสาหกรรมอื่นๆ ได้อีกมากมายทดแทนสารประกอบอะโรมาติกโมเลกุลต่ำจากปิโตรเลียมต่อไป

ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยลิกนินยังไม่มีแบบแผนที่แน่นอนขึ้นอยู่กับวิถีการย่อยของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ Ulmer, Leisola, Schmidt, & Fiechter (1983) ศึกษาการย่อยลิกนินโดยเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Phanerochaete chrysosporium* พบว่า เชื้อรามีความสามารถในการย่อยลิกนิน 3 ประเภท ได้แก่ purified kraft lignin, alkali straw lignin และ dioxin straw lignin ที่ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตรได้อย่างรวดเร็ว สังเกตจากการลดลงของค่าดูดกลืนแสงยูวีของลิกนินที่ไม่ละลายในสารละลายกรด (acid insoluble lignin) เท่ากับ 90 – 100% และการเพิ่มขึ้นของค่าการดูดกลืนแสงยูวีของลิกนินที่ละลายในสารละลายกรด (acid soluble lignin) อธิบายโดยปฏิกิริยา oxidation reaction หลังจากวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อ Zhu et al. (2017) ศึกษาการย่อยลิกนิน (alkaline lignin) ของ *Bacillus ligniniphilus* L1 คัดแยกจากตะกอนในทะเลจีนตอนใต้ พบว่า L1 สามารถเจริญได้เล็กน้อยในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีลิกนินเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงแหล่งเดียวที่อุณหภูมิ 50 °C แต่ไม่พบการเจริญที่อุณหภูมิ 30 °C แสดงว่าลิกนินช่วยส่งเสริมการเจริญของเชื้อโดยทำหน้าที่เป็นแหล่งคาร์บอนที่อุณหภูมิสูงได้ดีกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ เมื่อทำการเพาะเลี้ยง L1 ในอาหารที่มีการเติมกลูโคสและลิกนิน พบว่า กลูโคสจะถูกใช้หมดภายใน 48 ชั่วโมง จากนั้นลิกนินจะให้

พลังงานโดยทำหน้าที่เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อส่งเสริมการเจริญของเชื้อที่อุณหภูมิ 50 °C แสดงด้วยการลดลงของค่าดูดกลืนแสงยูวี 280 นาโนเมตร (A_{280}) จาก 0.36 ถึง 0.22 คิดเป็น 38.8 % เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน ทำการวิเคราะห์ GC-MS พบสารประกอบอะโรเมติกจำนวน 14 ชนิด และชนิดที่เด่น ได้แก่ phenylacetic acid, 4-hydroxy-benzoic acid และ vanillic acid ในประเทศอินเดียตัวอย่างดินของโรงงานเยื่อกระดาษและกระดาษถูกนำมาทำการคัดแยกและระบุชื่อแบคทีเรียพบ *Paenibacillus* sp. มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์แลคเคส (Laccases) ให้ประสิทธิภาพในการลดสารมลพิษต่างๆ ในน้ำล้างเยื่อกระดาษได้ดังนี้ ลดสี 68% ลดลิกนิน 54% ลดฟีนอล 86% BOD 83% และ COD 78% หลังจาก 144 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 34±1 °C ความเร็ว 120 rpm ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสสูงสุดชั่วโมงที่ 96 และทำการวิเคราะห์สารประกอบมวลโมเลกุลต่ำหลังจากเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในน้ำล้างเยื่อกระดาษ ได้แก่ 2-methoxyphenol, 2, 6-dimethoxy phenol, 2-methoxy-4-ethyl-phenol, 3-allyl-6-methoxyphenol, ethanone 1-(-4-hydroxy-3, 5-dimethoxyphenyl), benzoic acid, 2-methoxy-4-(1-propenyl) phenol และ 4-methoxycinnamic acidสารประกอบมวลโมเลกุลต่ำเหล่านี้ลดลงเมื่อเทียบกับตัวควบคุม (Raj, Kumar, Haq, & Singh, 2014)

นอกจากการย่อยลิกนิน (degradation) เพื่อลดสารพิษหรือผลิตสารประกอบมวลโมเลกุลต่ำแล้ว กระบวนการเปลี่ยนแปลงเป็นสารโพลีเมอร์ลิกนิน (polymerization) ยังคงเป็นอีกทางเลือกในอนาคตของการนำลิกนินไปใช้ประโยชน์โดยการเพิ่มมวลโมเลกุลของลิกนินที่มีขนาดเล็กเนื่องจากการย่อยเนื้อไม้หรือลิกโนเซลลูโลสด้วยด่างในกระบวนการเตรียมเยื่อกระดาษ ปฏิกิริยาการเพิ่มขนาดลิกนิน (polymerization) เป็นคุณสมบัติหนึ่งของเอนไซม์แลคเคส โดยในช่วงแรกที่เอนไซม์แลคเคสเริ่มเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของหมู่ phenolic end group ให้เป็นอนุมูลอิสระที่เสถียร (stabilized radicals) เรียกปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นว่า radical-radical coupling ทำให้เกิดการสร้างพันธะ phenyl ether – carbon และ carbon – carbonbonds โดยพันธะเหล่านี้จะถูกสร้างภายในโมเลกุลของลิกนินขนาดใหญ่และเชื่อมโมเลกุลของลิกนินหนึ่งกับโมเลกุลอื่นทำให้ค่าน้ำหนักโมเลกุลของลิกนินเพิ่มขึ้น (Areskogh, Li, Gellerstedt, & Henriksson, 2010) ลิกนินโพลิเมอร์ที่ได้สามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็น กาว คาร์บอนไฟเบอร์และ thermally-stable copolyester ทำให้มีความต้องการในการศึกษาวิจัยหาสภาวะของกระบวนการ polymerization ที่เหมาะสม (Wells , Kosa, & Ragauskas, 2013) เช่น การออกซิไดซ์ลิกโนซัลโฟเนตความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร บ่มเป็นระยะเวลา 6 วัน ด้วยเอนไซม์แลคเคสความเข้มข้น 0.6 U/ml พีเอช 5 อุณหภูมิ 50 °C ความเร็วในการกวน 80 rpm พบว่า ในช่วงแรกของการบ่มลิกนินด้วยเอนไซม์

เกิดปฏิกิริยาการย่อยลิกนิน (depolymerization) จากนั้นตามด้วยกระบวนการเปลี่ยนแปลงเป็นสารโพลีเมอร์ (polymerization) ทำให้น้ำหนักมวลโมเลกุลลิกโนซัลโฟเนตเพิ่มขึ้น 1700 Da (Kim et al., 2009) Gouveia, Fernández-Costas, Sanromán, & Moldes (2013) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเปลี่ยนแปลงเป็นสารโพลีเมอร์ (polymerization) ของ Kraft lignin (KL) โดยการทำปฏิกิริยาออกซิไดซ์ของเอนไซม์แลคเคส พบสภาวะที่เหมาะสมที่พีเอช 7.3 อุณหภูมิ 70 °C กิจกรรมของเอนไซม์ 2 U/ml เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง ได้ผลผลิตขนาดเพิ่มขึ้น 69 เท่า เมื่อเทียบกับขนาดเริ่มต้น

จากงานวิจัยข้างต้นทำให้ผู้วิจัยเล็งเห็นถึงประโยชน์และความสำคัญของการใช้จุลินทรีย์เข้ามามีส่วนร่วมในการนำลิกนินในน้ำล้างเยื่อกระดาษไปใช้ประโยชน์ ซึ่งยังคงมีการค้นหาจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพ โดยแหล่งจุลินทรีย์ที่ผู้วิจัยสนใจคือ ตัวอย่างจากโรงงานเยื่อกระดาษจากซานอ้อย ณ ตำบลหนองโพ จังหวัดนครสวรรค์ โดยทำการคัดแยกจุลินทรีย์จากความสามารถในการทนต่อสารพิษความเข้มข้นสูง และความสามารถในการเจริญได้บนอาหารที่มีองค์ประกอบของน้ำล้างเยื่อกระดาษ จากนั้นศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ การย่อยลิกนิน และการเปลี่ยนแปลงเป็นสารโพลีเมอร์ เพื่อนำสภาวะที่ได้มาประยุกต์ใช้กับน้ำล้างเยื่อกระดาษ

จุดมุ่งหมายของการวิจัย

1. เพื่อแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการเจริญได้ในน้ำล้างเยื่อกระดาษ
2. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยลิกนินทางการค้าโดยจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้
3. เพื่อศึกษาความเข้มข้นน้ำล้างเยื่อกระดาษที่เหมาะสมในการย่อยและเปลี่ยนแปลงเป็นสารโพลีเมอร์ลิกนินโดยจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้

ความสำคัญของการวิจัย

งานวิจัยนี้มีความสำคัญต่อสิ่งแวดล้อมและเศรษฐศาสตร์ เนื่องจากน้ำล้างเยื่อกระดาษ (black liquor) เป็นเศษเหลือทิ้งจากภาคอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษมีลักษณะสีน้ำตาลดำ อุณหภูมิสูง กลิ่นแรง พีเอชเป็นด่างจัด มีค่า COD ประมาณ 200,000 mg/l และค่า BOD ประมาณ 40,000 – 50,000 mg/l โดย 1 ตันของกระดาษจะมีการปลดปล่อยน้ำทิ้ง 150 ลูกบาศก์เมตร ซึ่งมีผลกระทบรุนแรงต่อสิ่งแวดล้อม (Pokhrel, & Viraraghavan, 2004) จากงานวิจัยของ Rana et al. (2004) ศึกษาความเป็นพิษของน้ำล้างเยื่อกระดาษโดยให้หนูกินน้ำทิ้งเป็นระยะเวลา 15 วัน พบว่าน้ำหนักของอัณฑะลดลง และกิจกรรมของเอนไซม์ epididymal α-glucosidase ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับหนูควบคุม ซึ่งได้ทำการเก็บตัวอย่างสเปิร์มปรากฏปริมาณสเปิร์มทั้งหมดลดลง ระดับการหมุนเวียน

ของฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนต่ำลง ซึ่งไม่ส่งผลต่อฮอร์โมน โปรเจสเตอโรน และ oestradiol ผลตรวจทางเลือดและซีรัม พบว่า น้ำล้างเยื่อกระดาษก่อให้เกิดโรคภาวะโลหิตจาง การทำงานที่ผิดปกติของตับและไต โดยกระตุ้นความเข้มข้นของ bilirubin และยูเรียในเลือดและมีกิจกรรมของ GOT และ GPT ในซีรัมสูง เป็นผลมาจากสารพิษโดยทั่วไปที่อยู่ในน้ำล้างเยื่อกระดาษ ส่วนผลทางสิ่งแวดล้อมเกิดขึ้นกับสัตว์น้ำ พบว่าเกิดผลกระทบโดยตรงในปลาเพศผู้โดยเจริญเป็นตัวเต็มวัยล่าช้าและมีพฤติกรรมการสืบพันธุ์ผิดปกติ ปริมาณไข่ที่ฟักเป็นตัวลดลง และรบกวนต่ออัตราการเกิดเพศในระยะเอ็มบริโอจากการศึกษาดังกล่าวทำให้เล็งเห็นถึงผลกระทบของน้ำล้างเยื่อกระดาษที่มีต่อสิ่งแวดล้อม

ในขณะเดียวกันเทคโนโลยีที่นำน้ำล้างเยื่อกระดาษมาใช้ให้เกิดประโยชน์ยังคงอยู่ในช่วงการวิจัยและพัฒนา ซึ่งน้ำล้างเยื่อกระดาษสามารถสร้างเม็ดเงินกลับคืนสู่โรงงานเยื่อกระดาษและกระดาษได้ Sun, Qiu, & Liu (2013) ศึกษาการดัดแปลงโครงสร้าง (modification) ของลิกนินด้วยเอนไซม์แลคเคส ซึ่งเป็นการใช้วิธีทางชีวภาพที่มีประโยชน์ในด้านปฏิกิริยาที่เกิดไม่รุนแรง ใช้สารเคมีน้อย สามารถนำไปใช้ได้จริงในอนาคต จากงานวิจัยดังกล่าว งานวิจัยพื้นฐานที่จะทำให้การนำลิกนินในน้ำล้างเยื่อกระดาษไปใช้ประโยชน์ได้จริง คือ การคัดแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์จากซับเตรท (ลิกนิน) ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง จึงทำการคัดแยกเชื้อที่มีความสามารถในการทนต่อสารพิษมาทำการบำบัดน้ำล้างเยื่อกระดาษหรือเปลี่ยนแปลงโครงสร้างลิกนินในน้ำล้างเยื่อกระดาษเพื่อนำลิกนินไปใช้ประโยชน์

ขอบเขตของการวิจัย

การเก็บตัวอย่างเพื่อทำการคัดแยกเชื้อที่มีคุณสมบัติในการย่อยลิกนิน และการเก็บตัวอย่างน้ำล้างเยื่อกระดาษซึ่งเป็นวัตถุดิบตั้งต้น จะดำเนินการเก็บตัวอย่างจากบริษัท เอ็นไวรอนเม็นท์พัลพ์ แอนด์ เปเปอร์ จำกัด (EPPCO) หมู่ที่ 11/253 ตำบลหนองโพ อำเภอตาคลี นครสวรรค์ 60140 ทำการระบุชื่อจุลินทรีย์โดยใช้ 16S rRNA gene จากนั้นทำการเก็บรักษาเชื้อโดยการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (lyophilization) ฝากเก็บรักษาจุลินทรีย์ที่ศูนย์จุลินทรีย์ (TISTR) สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ทำการหาสภาวะที่เหมาะสมในระดับฟลาสก์ โดยศึกษาปัจจัย ได้แก่ อุณหภูมิ ความเข้มข้นของลิกนิน (lignin, alkaline) แหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนความเข้มข้นของแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน โดยทำการเลือกสภาวะที่เหมาะสม ซึ่งส่งเสริมการเจริญของเชื้อ การย่อยลิกนินและการเปลี่ยนแปลงโพลิเมอร์ลิกนิน

ข้อตกลงเบื้องต้น

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์หลักเพื่อนำน้ำล้างเยื่อกระดาษไปใช้ประโยชน์โดยจุลินทรีย์

สมมุติฐานของการวิจัย

ลิกนินเป็นโพลิเมอร์ขนาดใหญ่มีโครงข่าย 3 มิติ ประกอบด้วยโพพานอยด์พื้นฐาน 3 หน่วย ได้แก่ guaiacyl, para-hydroxyphenyl และ syringyl เชื่อมต่อกันโดยการสร้างพันธะอีเทอร์ และพันธะคาร์บอนกับคาร์บอน ลิกนินมีความทนทานต่อการย่อยโดยจุลินทรีย์ เนื่องจากน้ำหนักโมเลกุลสูงและมีพันธะทางชีวภาพที่แข็งแรงหลากหลายพันธะ อย่างไรก็ตามจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยลิกนินมีอยู่อย่างมากมายสามารถพบได้ในธรรมชาติประกอบไปด้วยเชื้อรา แอคติโนมัยซีท และแบคทีเรีย การย่อยลิกนิน ถูกศึกษาอย่างมากในเชื้อราขาวและราน้ำตาลทำลายไม้ แต่ยังไม่มีกระบวนการเร่งปฏิกิริยาการย่อยลิกนินทางการค้าออกมาใช้แต่อย่างใด (T. D. H. Bugg, Ahmad, Hardiman, & Singh, 2010) แบคทีเรียมีวิถีการย่อยสารประกอบอะโรมาติกอย่างหลากหลายจากฟีนอลเดี่ยวๆ ไปจนถึงลิกนินที่เป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีความซับซ้อนสูงและสารเคมีพิเศษที่มีความเกี่ยวข้องกับสิ่งมีชีวิต แบคทีเรียมีอัตราการปรับตัวทางพันธุกรรมสูงซึ่งจะช่วยเพิ่มความสามารถโดยกระบวนการวิวัฒนาการ แหล่งของลิกนินมีอยู่อย่างมากมายในอุตสาหกรรมกระดาษ โดยพบลิกนินอยู่ในรูปของเสีย ทำให้มีการปล่อยน้ำเสียออกสู่สิ่งแวดล้อมอย่างมาก โดยอุตสาหกรรมกระดาษและเยื่อกระดาษถูกจัดอยู่ในอุตสาหกรรมที่ปลดปล่อยมลพิษ ลักษณะของน้ำเสียมีสีดำ กลิ่นแรง พีเอชสูง ค่า COD และ BOD สูง มีชื่อเรียกว่า น้ำล้างเยื่อกระดาษ หรือ Black liquor (Raghukumar, & Rivonkar, 2001) ประกอบด้วยลิกนิน เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ฟีนอล เรซิน กรดไขมัน และแทนนิน (Chandra, & Abhishek, 2011) ดังนั้นผู้วิจัยจึงเล็งเห็นถึงความสำคัญของการใช้จุลินทรีย์เข้ามามีส่วนร่วมในการกำจัดลิกนิน Zhang, Ong, Li, & Wu (2013) ทำการคัดแยก *Enterobacter* sp. FDS8 จากดิน ด้วยอาหารเพาะเลี้ยง PDA ประกอบด้วย furfural, potato extract, glucose, agar ปริมาณ 2, 5, 20 และ 20 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ พีเอชอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 6.0 พบ *Enterobacter* sp. FDS8 มีความสามารถในการล้างหรือย่อยสารยับยั้งทั้ง furfural และ 5-hydroxyl methyl furfural (HMF) ในน้ำย่อยจากทะลายปาล์มน้ำมันอัตรา 0.54 g/l/h และ 0.12 g/l/h ตามลำดับ ซึ่งให้อัตราการล้างพิษที่สูงที่สุดเท่าที่มีการรายงาน นอกจากนี้ยังใช้น้ำตาลน้อยกว่า 5% และสามารถนำเซลล์มาใช้ซ้ำอย่างน้อยที่สุดจำนวน 5 ครั้ง โดยไม่สูญเสียศักยภาพการล้างสารพิษ จากงานวิจัยนี้ทำให้ผู้วิจัยทราบว่าเชื้อที่

มีความสามารถในการย่อยสารพิษที่ปนเปื้อนในน้ำย่อยลิกโนเซลลูโลสสามารถคัดแยกได้จากสิ่งแวดล้อม โดยจะต้องเติม furfural ลงในอาหารคัดแยกความเข้มข้นสูง 2 ml/l เพื่อให้ได้เชื้อที่มีความสามารถในการเจริญได้บนอาหารที่มีองค์ประกอบของน้ำล้างเยื่อกระดาษ และศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยลิกนินบริสุทธิ์ เพื่อนำสภาวะที่ได้มาประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำล้างเยื่อกระดาษ

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การผลิตเยื่อกระดาษ

การผลิตกระดาษประกอบด้วย 5 ขั้นตอน โดยมีจุดประสงค์หลัก เพื่อแยกลิกนินออกจากเยื่อกระดาษ (cellulosic fibers) วิธีผลิตเยื่อกระดาษขั้นแรกคือ กระบวนการ sulfate process พัฒนาโดย C.F. Dahl พบว่า ซัลไฟด์จะเร่งปฏิกิริยาการทำลายลิกนินของลิกโนเซลลูโลสในกระบวนการผลิตเยื่อกระดาษแข็ง ซึ่งได้ทำการจดลิขสิทธิ์เมื่อปี 1884 และได้ถูกนำมาใช้เป็นเทคนิคในการผลิตเยื่อกระดาษทั่วโลก (Zakzeski et al., 2010) กระบวนการผลิตเยื่อกระดาษ (Kraft pulping) มีการใช้สารเคมี ได้แก่ sodium hydroxide และ sodium sulfide ให้ความร้อนสูงถึง 180 °C ที่พีเอช 10 - 14 เพื่อย่อยชิ้นไม้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แสดงดังภาพ 1 ในระหว่างการต้มเยื่อโดยประมาณ 80% ของลิกนิน, 50% ของเฮมิเซลลูโลส, 10% เซลลูโลส โดยร้อยละ90เป็นสารสกัดละลายอยู่ในน้ำย่อยเยื่อกระดาษ พันธะ Aryl-alkyl ถูกตัด และโมเลกุลข้างเคียงถูกดัดแปลงโดยปฏิกิริยาของ hydroxide และ hydrosulfide กับลิกนิน ทำให้ใช้น้ำน้อยและเศษชิ้นส่วนลิกนินจะละลายอยู่ในน้ำด่าง ซึ่งในแต่ละขั้นตอนจะใช้วิธีการที่แตกต่างกัน ดังนั้นน้ำเสียสุดท้ายเป็นการรวมกันจากในแต่ละขั้นตอน โดยน้ำเสียจะขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ เช่น วัตถุดิบที่ใช้และกระบวนการผลิต ซึ่งจะมีค่า COD สูง มีค่าการย่อยสลายต่ำ และมีสารประกอบอินทรีย์และอนินทรีย์อยู่โดยประมาณ 700 ชนิด (Raj et al., 2014) โดยจะอธิบายในแต่ละขั้นตอนดังนี้

1. Debarking เป็นกระบวนการแยกเปลือกไม้ออกจากเนื้อไม้แล้วตัดให้เป็นชิ้นไม้ขนาดเล็กเรียก chips โดยมีวัตถุดิบที่ใช้ ได้แก่ ไม้เนื้อแข็ง ไม้เนื้ออ่อน กากเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเกษตร เป็นผลให้เกิดการแยกแทนนิน กรดเรซิน ที่มีในส่วนของเปลือกไม้ เช่น ไม้เนื้ออ่อนจะมีกรดเรซินมากกว่าไม้เนื้อแข็ง ในขณะที่กากเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเกษตรไม่มีกรดเรซินอยู่เลย

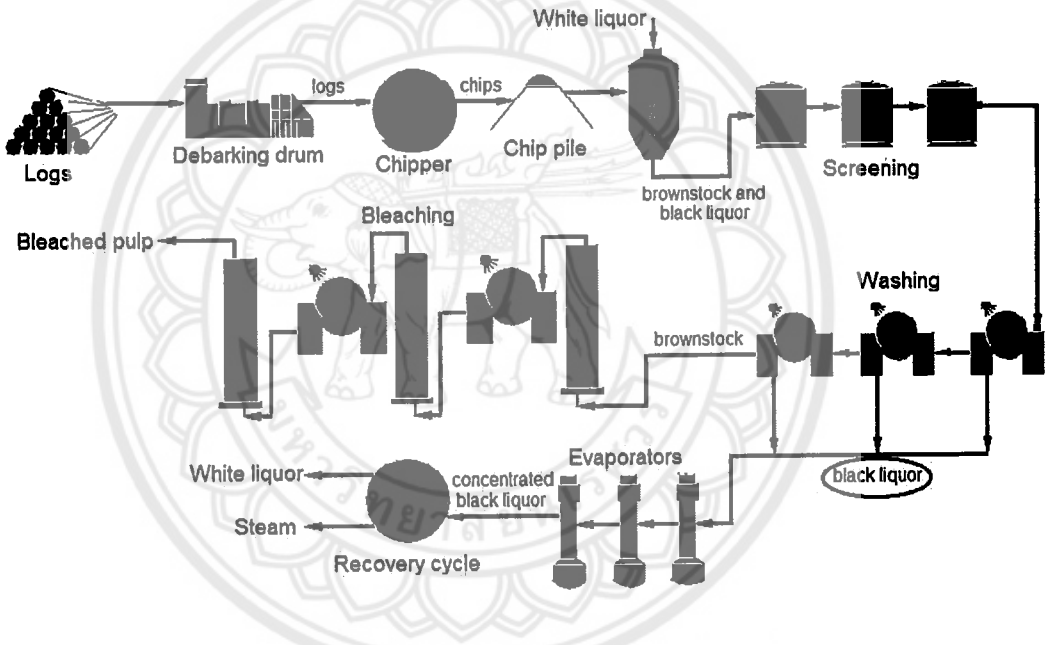
2. Pulping หรือการต้มเยื่อ หรือการสกัดเยื่อกระดาษ เป็นการเปลี่ยนชิ้นไม้จากขั้นตอนแรกเปลี่ยนเป็นเยื่อกระดาษ โดยจะทำการแยกลิกนินและเฮมิเซลลูโลสออกจากเยื่อเซลลูโลส เยื่อกระดาษที่ได้อาจจะมาจากหลายกระบวนการ เช่น การทำเยื่อกระดาษเชิงกล, กึ่งเคมี,kraft, sulfite pulping และอื่น ๆ

3. Bleaching เป็นการฟอกเยื่อกระดาษสีน้ำตาลที่ได้หลังจากการต้มเยื่อ เพื่อที่จะให้ได้สีที่ตรงตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์ โดยจะมีการเติมสารฟอกสีชนิดเดียวหรือผสมลงไป เช่น chlorine, chlorine dioxide, hydrogen peroxide, oxygen, ozone และอื่นๆ ในขั้นตอนนี้ลิกนิน

ฟีนอล กรดเรซินจะทำปฏิกิริยากับคลอรีน และเปลี่ยนรูปเป็นสารแปลกปลอมที่เข้าไปในเซลล์สิ่งมีชีวิตและมีความรุนแรงสูง

4. Washing การล้างเยื่อ เป็นกระบวนการล้างสารฟอกสีออกจากเยื่อกระดาษ โดยทั่วไปจะใช้ alkali caustic soda สกัดสีและสารฟอกสีออกจากเยื่อกระดาษ ซึ่งเป็นที่รู้จักกันในชื่อ alkali extraction stage

5. Paper and paper product การขึ้นรูปกระดาษ เป็นขั้นตอนผสมเยื่อกระดาษที่ผ่านการฟอกสีแล้วกับสารเติมเต็ม เช่น clay, titanium dioxide และ calcium carbonate และสารขึ้นรูป (sizing agents) เช่น rosin และ แป้ง



ภาพ 1 แผนภาพกระบวนการของโรงงานเยื่อกระดาษและกระดาษ

ที่มา: Mathews, Pawlak, & Grunden, 2015

โรงงานเยื่อกระดาษและกระดาษมีการใช้ทรัพยากรธรรมชาติในปริมาณมาก ทั้งสารอนินทรีย์และอินทรีย์และน้ำในขั้นตอนที่แตกต่างกันของกระบวนการ การสกัดเยื่อ (pulping) และการฟอกเยื่อกระดาษ (Bleaching) เป็นกระบวนการหลักในการสกัดเยื่อกระดาษ ชิ้นไม้จะถูกทำให้ร้อนที่อุณหภูมิสูงภายใต้แรงดัน สารเคมีจะสามารถแยกลิกนินและเฮมิเซลลูโลสออกจากเซลลูโลส เซลลูโลสที่ได้จะถูกใช้ในการทำกระดาษ ในประเทศอินเดียอุตสาหกรรมส่วนใหญ่นิยมใช้โซดาไฟ (NaOH) และ sodium sulphide เป็นสารเคมีในขั้นตอนการเพิ่มความร้อน น้ำทิ้งจากขั้นตอน

การสกัดเยื่อกระดาษ จะมีสีน้ำตาลดำ (Black liquor) เนื่องจากมีลิกนิน และสารต่างๆ จากการสกัด เช่น เฮมิเซลลูโลส กรดเรซิน (resin acids) และฟีนอลละลายอยู่ เยื่อกระดาษที่ได้ถูกนำมาฟอกสี โดยใช้สารเคมี เช่น คลอรีน (Chlorine), hydrogen peroxide, ozone และอื่นๆ น้ำทิ้งที่ได้จากกระบวนการฟอกจะมี absorbable organic halogens (AOX), peroxides และอนุพันธ์อื่นๆ ของลิกนินและเฮมิเซลลูโลส โดยประมาณ 1 ตันของกระดาษจะเกิดน้ำทิ้ง 150 ลูกบาศก์เมตร ซึ่งเป็นพิษรุนแรงในธรรมชาติ โดยทั่วไปน้ำทิ้งที่เข้มข้นจะถูกนำไปเผาเพื่อสร้างกระแสไฟฟ้า ซึ่งในขณะเผาจะเกิดสารประกอบอินทรีย์ระเหยได้หลายชนิด

วัตถุดิบในการผลิตเยื่อกระดาษ

วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตกระดาษ ไม้เป็นวัตถุดิบที่มีความสำคัญที่สุดในอุตสาหกรรมกระดาษแบ่งเป็น 2 ประเภท ตามลักษณะของเส้นใย ไม้เนื้ออ่อน (soft wood) เป็นไม้ที่มีเส้นใยยาว (ประมาณ 3 – 4 มม.) ส่วนใหญ่เป็นไม้ประเภทไม้สน (cone-bearing tree) และไม้เนื้อแข็ง (hard wood) เป็นไม้ที่มีเส้นใยสั้น (ประมาณ 1-1.5 มม.) ส่วนใหญ่เป็นไม้ผลัดใบในฤดูใบไม้ร่วง (deciduous tree) นอกจากนี้วัตถุดิบจำพวกลิกโนเซลลูโลสทางการเกษตรอื่นๆ เช่น ชานอ้อยและฟางข้าว เป็นต้น ชานอ้อยเป็นวัตถุดิบที่สำคัญในการผลิตเยื่อกระดาษในประเทศไทย

กระบวนการผลิตเยื่อกระดาษ

การสกัดเยื่อกระดาษในอุตสาหกรรมประกอบไปด้วย 2 กระบวนการหลัก คือ การย่อยไม้และการฟอกสี ในกระบวนการย่อยไม้ ชิ้นไม้จะถูกต้มในสารละลายโซดาไฟ (sodium hydroxide) และ sodium sulphate ที่อุณหภูมิและความดันสูง ทำให้เกิดการทำลายชิ้นไม้ให้กลายเป็นมวลเยื่อกระดาษ สารละลายจะทำละลายเนื้อไม้ซึ่งยากต่อการย่อยสลาย ในขั้นตอนการล้างจึงมีสารสกัดหลายชนิดออกมาผสมกัน เช่น ลิกนิน เซลลูโลส ฟีนอลิก เรซิน กรดไขมัน และ แทนนิน ทำให้เกิดน้ำเสียที่มีลักษณะดำ ข้นหนืด มีค่าความเป็นด่างสูง เรียกว่า น้ำล้างเยื่อกระดาษหรือ Black liquor ซึ่งมีองค์ประกอบของน้ำเพียง 10 - 15% อีก 90 - 95% เป็นมลพิษ ทำให้ในน้ำล้างเยื่อกระดาษมีค่า pH, BOD, COD และความเข้มข้นสีสูงแสดงดังตารางที่ 1 ซึ่งเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม ดังนั้นการบำบัดน้ำล้างเยื่อกระดาษก่อนที่จะปล่อยลงสู่สิ่งแวดล้อมมีความจำเป็นอย่างยิ่ง

ปัจจุบันการบำบัดน้ำเสียทั้งทางกายภาพและเคมี หรือการรวมวิธีการบำบัดแบบต่อเนื่องของโรงงานเยื่อกระดาษ ได้แก่ electrocoagulation (Zaied, & Bellakhal, 2009), ozonation, ultrafiltration (Pokhrel, & Viraraghavan, 2004) ยังมีประสิทธิภาพไม่ดีพอ เนื่องจากลิกนินเกิดการเปลี่ยนรูปไปเป็นสารที่มีความยากต่อการบำบัด โดยวิธีที่มีประสิทธิภาพสำหรับการจัดการน้ำล้างเยื่อ

กระดาษ คือ การเผาแล้วนำเอาโซดาไฟกลับมาใช้ใหม่ ซึ่งโดยเบื้องต้นต้องทำน้ำล้างเยื่อกระดาษให้เข้มข้นจากนั้นจึงนำไปเผา โดยสารอินทรีย์จะถูกเผาและโซเดียมจะถูกนำกลับมาใช้ซ้ำ (Grover et al., 1999) อย่างไรก็ตามโรงงานเยื่อกระดาษขนาดเล็กทั่วโลก ไม่สามารถนำโซเดียมและพลังงานจากน้ำล้างเยื่อกระดาษกลับมาใช้ได้ ดังนั้นวิธีพื้นฐานสำหรับการบำบัดน้ำล้างเยื่อกระดาษโรงงานขนาดเล็กจึงมีความจำเป็นอย่างมาก

ตาราง 1 ลักษณะทางกายภาพของน้ำทิ้งจากโรงงานเยื่อกระดาษและกระดาษ

พารามิเตอร์	Raj et al. (2014)	Gupta, Minocha, & Jain (2001)	Chandra & Abhishek (2011)	Paliwal, Uniyal, & Rai (2015)	Yadav, & Chandra (2015)	เกรฑ์อนุญาต (USEPA, 2000)
pH	8.2 ± 1.0	11.36	8.8 ± 0.2	11.3 ± 0.40	8.5 ± 1.0	5-9
TDS (mg/l)	850 ± 30		402.68 ± 53.92	1261.91 ± 84.59	977 ± 7.2	-
COD (mg/l)	792 ± 70	$5.4x10^3$	12245 ± 439.5	10140.79 ± 142.32	16550 ± 507.2	120
BOD (mg/l)	385 ± 12		5100 ± 167.6	4092.40 ± 68.84	7250 ± 132.0	40.0
Colour (CU)	2242 ± 56	7640	3100 ± 22.32		2538 ± 53.3	colorless
Lignin (mg/l)	436 ± 18	2.18	663 ± 4.23		800 ± 18.4	-
Total nitrogen (mg/l)	116 ± 32	3.13			126 ± 32.8	25.0
Sulphate(mg/l)	993 ± 6		1762 ± 41.11		1003 ± 5.3	-
Phosphate(mg/l)	8.3 ± 0.3		BDL		7.3 ± 0.4	-
Phosphorus (mg/l)		0.06				
Nitrate(mg/l)	73.3 ± 6				193.30 ± 6.1	10.0
Total phenol (mg/l)	42 ± 2.5		38.54 ± 2.61	542 ± 36.77		
Heavy metals						
Cd(mg/l)			0.06 ± 0.03		BDL	0.01
Cr(mg/l)			0.255 ± 0.04		BDL	-
Cu(mg/l)	0.09 ± 0.1		0.105 ± 0.05		0.09 ± 0.14	0.20
Fe(mg/l)	10.22 ± 9		3.99 ± 0.91		10.22 ± 9.02	5.00
Ni(mg/l)	5.03 ± 1		2.84 ± 0.06		5.03 ± 1.02	0.20
Zn(mg/l)	9.83 ± 1		1.5 ± 0.3		9.83 ± 1.13	2.00
Mn(mg/l)	0.04 ± 0				0.04 ± 0.04	0.20
Pb(mg/l)					BDL	0.05

หมายเหตุ: BDL: below detection limit

USEPA(2000): Permissible limit of trace elements in wastewaters

(-): not specified

ของเสียที่เกิดจากกระบวนการผลิต

อุตสาหกรรมกระดาษเป็นอุตสาหกรรมที่มีการปล่อยน้ำเสียออกสู่สิ่งแวดล้อมอย่างมาก โดยเป็นอุตสาหกรรมที่ปล่อยมลพิษมากเป็นอันดับ 6 รองจากอุตสาหกรรมน้ำมัน อุตสาหกรรมซีเมนต์ อุตสาหกรรมเครื่องหนัง อุตสาหกรรมเหล็กกล้า (Ali, & Sreekrishnan, 2000) โดยน้ำเสียจะมีลักษณะสีดำ มีกลิ่นแรง พีเอชสูง ค่า COD และ BOD สูง (Raghukumar, & Rivonkar, 2001) มีองค์ประกอบของลิกนิน เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ฟีนอล เรซิน กรดไขมัน และแทนนิน (Chandra, & Abhishek, 2011) นอกจากนี้ยังพบสารองค์ประกอบอื่นของพืช เกลือ และสารอาหารในน้ำย่อยชานอ้อยที่เกิดขึ้นจากอุตสาหรรมกระดาษ จากรายงานน้ำเสียที่เกิดขึ้นมีผลโดยตรงต่อสัตว์น้ำ โครงสร้างดินทำให้ดินเค็มเป็นสาเหตุให้เกิดความไม่สมดุลในการปลูกพืชธัญหาร วิธีดั้งเดิมที่ใช้ในการลดสีของน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมให้ผลลัพธ์ที่ไม่เป็นที่พึงพอใจ เช่น เป็นวิธีการบำบัดที่ใช้งบประมาณมาก ไม่เสถียรในขณะดำเนินการ และสร้างปัญหาทางสิ่งแวดล้อมเพิ่มมากขึ้น

Kraft lignin เป็นโพลิเมอร์เหลือทิ้งของกระบวนการผลิตเยื่อกระดาษ เพื่อให้ได้เยื่อกระดาษเกรดสังเคราะห์ (rayon grade pulp, RGP) เยื่อกระดาษคุณภาพสูงทำมาจากชิ้นไม้ด้วยกระบวนการทางเคมีที่พิเศษที่ย่อยชิ้นไม้เบื้องต้นที่อุณหภูมิและความดันสูงตามด้วยการย่อยด้วยด่าง ภายใต้สภาวะนี้เยื่อกระดาษซึ่งเป็นของแข็งจะถูกแยกออกและล้างทำความสะอาด โดยเยื่อกระดาษจะมีสีน้ำตาลดำ เนื่องจากมีลิกนินและเซลลูโลสละลายอยู่ น้ำทิ้งที่เกิดขึ้นจากระยะการสกัดเยื่อกระดาษนี้ประกอบด้วยลิกนิน เฮมิเซลลูโลส ฟีโนลิก เรซิน กรดไขมัน โซเดียมคาร์บอเนต โซเดียมซัลเฟตและเกลืออนินทรีย์อื่น ๆ ซึ่งมีอยู่อย่างเข้มข้นในน้ำทิ้ง โดยปริมาณน้ำทิ้งที่เกิดขึ้นเท่ากับ 60,000 - 95,000 แกลลอนต่อตัน (Pokhrel, & Viraraghavan, 2004)

ลิกนินถูกย่อยและละลายอย่างสมบูรณ์ในน้ำล้างเยื่อกระดาษ (black liquor) ถ้าไม่ผ่านกระบวนการบำบัดน้ำเสีย ลิกนินจะก่อให้เกิดปัญหาที่รุนแรงต่อสิ่งแวดล้อมและเพิ่มสารพิษตกค้างในระบบนิเวศทางน้ำ เนื่องจากการย่อยทางชีวภาพเกิดขึ้นได้น้อยและมีสีเข้ม วิธีการบำบัดลิกนินทางกายภาพและทางเคมีได้ถูกนำมาใช้ในโรงงานเยื่อกระดาษแต่ยังไม่มีวิธีการบำบัดใดที่ได้ผลและคุ้มค่า ดังนั้นการบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพจึงเป็นวิธีที่น่าจะเป็นประโยชน์และมีประสิทธิภาพคุ้มค่ามากกว่าวิธีที่กล่าวมาและส่งผลต่อสิ่งแวดล้อมต่ำ ในระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพได้มีการนำจุลินทรีย์มาใช้สำหรับย่อยลิกนินและลดสีน้ำทิ้งทั้งเชื้อรา แอคติโนมัยซีท และแบคทีเรีย เช่น การนำเชื้อราขาวมาใช้ในการย่อยลิกนิน แต่เชื้อราไม่เสถียรภายใต้สิ่งแวดล้อมและสารอาหารที่มีความเข้มข้นสูง เช่น พีเอชสูง ออกซิเจนจำกัด ความเข้มข้นของลิกนิกและสารสกัดอื่นๆ สูง ทำให้มีการศึกษาในแบคทีเรียโดยเฉพาะความสามารถในการย่อยลิกนิน เนื่องจากแบคทีเรียมีความสามารถในการปรับตัวต่อสิ่งแวดล้อมได้ดีและปฏิกิริยาทางชีวเคมีมีอยู่หลากหลาย โดยลิกนิ

นจะกระตุ้นให้แบคทีเรียสร้างเอนไซม์ peroxidase ทั้งภายนอกและภายในเซลล์ เช่น *Streptomyces* spp.

Perestelo et al. (1996; Morii et al., 1995) ศึกษาการย่อยลิกนินด้วยแบคทีเรียที่คัดแยกจากปุ๋ย ได้แก่ *Azotobacter*, *Bacillus megaterium* และ *Serratia marcescens* พบว่าแบคทีเรียมีความสามารถในการลดค่าสีและย่อยลิกนินได้ เช่น *S. marcescens* สร้างเอนไซม์ laccases ตัดพันธะระหว่างโมเลกุล มีผลทำให้เกิดการย่อยและละลายของลิกนินและสามารถใช้ลิกนินโมเลกุลต่ำเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน ลิกนินเป็นโพลิเมอร์อะโรมาติก 3 มิติเชิงซ้อน ประกอบด้วยหน่วย dimethoxylated phynylpropanoid, monomethoxylated phynylpropanoid และ non-methoxylated phynylpropanoid พบอยู่ในผนังเซลล์พืชชั้นที่สอง ซึ่งจะไปเติมเต็มช่องว่างระหว่างองค์ประกอบของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และเพคติน ทำให้ผนังเซลล์พืชมีความแข็งแรงและไม่มีขั้ว (hydrophobic) ลิกนินช่วยให้พืชมีความทนทานต่อแรงกดและปกป้องเซลล์พืชจากเชื้อก่อโรคพืช ปัจจุบันลิกนินและสารประกอบที่มีความใกล้เคียงกับลิกนินถูกผลิตและอยู่ในรูปน้ำทิ้งในอุตสาหกรรมกระดาษ สารเหล่านี้ถูกคาดหวังว่าจะถูกนำมาใช้ในอนาคตทดแทนแหล่งฟอสซิลด้วยมวลลิกโนเซลลูโลสสำหรับการผลิตพลังงานและสารเคมี โดยทั่วไปกระบวนการทางชีวภาพใช้เพียงส่วนของเซลลูโลส ส่วนลิกนินก็ยังคงเป็นของเสียที่มีมูลค่าต่ำ ซึ่งจะนำไปเผาเพื่อสร้างความร้อนและพลังงาน ลิกนินที่ได้จากอุตสาหกรรมกระดาษน้อยกว่า 10,000 ตันต่อเอเคอร์ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในทางการค้า การนำลิกนินมาใช้ประโยชน์เป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตสารเคมีที่มีมูลค่า เช่น สารทดแทนอะโรมาติกจากปฏิกิริยา valorization ซึ่งมีการควบคุมการย่อยลิกนินซึ่งถูกยับยั้งโดยสารเคมีและการย่อยทางชีวภาพ ลิกนินถูกย่อยได้โดยวิธี thermochemical methods เช่น pyrolysis หรือ thermolysis, chemical oxidation, hydrogenolysis, gasification และ hydrolysis ภายใต้สภาวะวิกฤติ อย่างไรก็ตามวิธีต่างๆ เหล่านี้เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อมและเกิดขึ้นในสภาวะที่รุนแรงต้องการพลังงานป้อนเข้าไปในระบบปริมาณมาก เอนไซม์จึงเป็นทางเลือกที่มีความจำเพาะต่อซับสเตรทและมีประสิทธิภาพสูงสำหรับการย่อยลิกนิน การเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพของเอนไซม์จะเกิดขึ้นภายใต้สภาวะที่ไม่รุนแรง ใช้พลังงานต่ำและลดผลกระทบทางสิ่งแวดล้อม อย่างไรก็ตามปัจจัยที่เกี่ยวข้องสำหรับการย่อยลิกนิน คือ การดัดแปลงโครงสร้างของลิกนินในระหว่างกระบวนการย่อยลิกโนเซลลูโลส ดังนั้นลิกนินที่เป็นของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมจึงดีกว่าลิกนินจากธรรมชาติ เนื่องจากเอนไซม์จะไม่มีประสิทธิภาพในการควบคุมการย่อยเหมือนลิกนินที่ได้จากอุตสาหกรรม

ลิกโนเซลลูโลสและลิกนิน

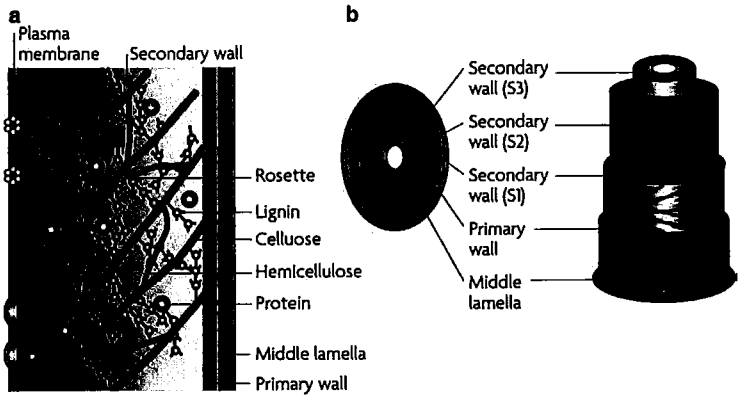
ลิกโนเซลลูโลส หมายถึง เนื้อไม้ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์พืช โดยผนังเซลล์เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของเซลลูโลส ลิกโนเซลลูโลส และลิกนิน นอกจากนี้ยังพบขี้ผึ้ง (waxes) และโปรตีน ลิกโนเซลลูโลสเป็นโพลิเมอร์ชีวภาพมีอยู่มากที่สุดบนโลก หลายอุตสาหกรรมใช้ลิกโนเซลลูโลสเป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตผลิตภัณฑ์มากมาย เช่น เยื่อกระดาษ กระดาษ สารเคมี และน้ำมัน โดยใช้กระบวนการเปลี่ยนแปลงที่แตกต่างกันหลายกระบวนการ ได้แก่ อุณหภูมิ เชิงกล และสารเคมี การจัดวางองค์ประกอบของผนังเซลล์พืชมีความแตกต่างกันในระหว่างพืชแต่ละประเภท ตาราง 2 แสดงองค์ประกอบทางเคมีโดยทั่วไปของหญ้า ไม้เนื้อแข็ง และไม้เนื้ออ่อน

ตาราง 2 องค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลสในไม้แต่ละประเภท

ประเภทของไม้	Lignin (%)	Cellulose (%)	Hemicellulose (%)
ไม้เนื้อแข็ง	18-25	45-55	24-40
ไม้เนื้ออ่อน	25-35	45-50	25-35
หญ้า	10-30	25-40	25-50

ที่มา: Malherbe, & Cloete, 2002

โดยทั่วไปไม้เนื้ออ่อนมีลิกนินเป็นองค์ประกอบอยู่สูง ในขณะที่ไม้เนื้อแข็งและหญ้าจะมีโพลีแซคคาร์ไรด์สูงกว่า ทั้งไม้เนื้อแข็งและไม้เนื้ออ่อนมีโครงสร้างผนังเซลล์ลำดับที่สองคล้ายคลึงกัน โครงสร้างผนังเซลล์ของไม้แสดงดังภาพ 2a ผนังเซลล์พืชประกอบด้วย middle lamella และผนังเซลล์ลำดับที่หนึ่ง และลำดับที่สอง middle lamella มีลักษณะบางแต่มีความเข้มข้นของลิกนินอยู่สูงสุด ผนังเซลล์ลำดับหนึ่งประกอบด้วยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และเพคติน ผนังเซลล์ลำดับที่สองสามารถแบ่งออกเป็นสามส่วน คือ S1, S2, และ S3 ขึ้นอยู่กับโครงสร้างและองค์ประกอบของโพลิเมอร์ที่มีอยู่ การวิเคราะห์ทางเคมีของเยื่อผนังเซลล์ลำดับที่สองพบว่า เยื่อ S1 มีความเข้มข้นลิกนินสูงสุด ในขณะที่เยื่อ S2 ประกอบด้วยปริมาณของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส สายโซ่เซลลูโลสเชื่อมต่อกันในผนังเซลล์ลำดับที่สองโดยการสร้างพันธะไฮโดรเจนหลาย ๆ หน่วยประกอบกันได้โครงสร้างที่เรียกว่า microfibril ส่วนเยื่อ S3 สร้างอยู่ด้านนอกของ lamella และมีปริมาณของลิกนินอยู่ต่ำ แสดงดังภาพ 2



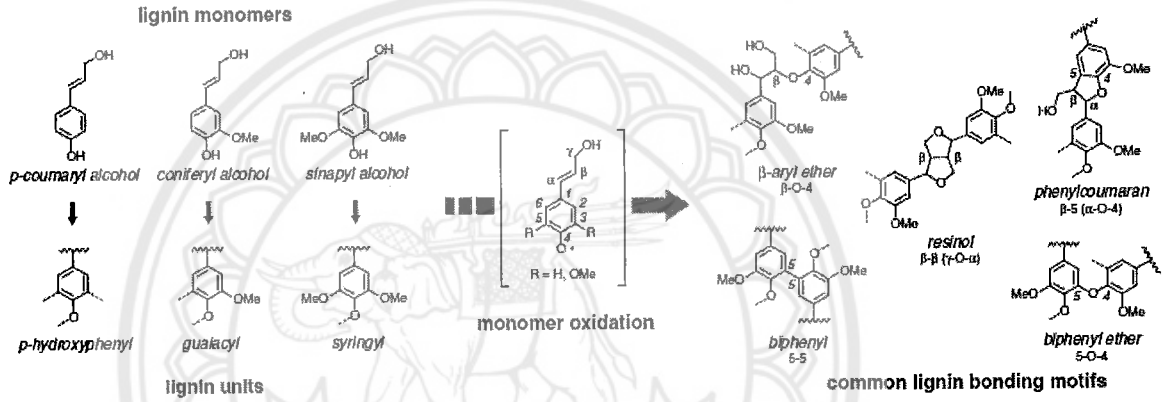
ภาพ 2 โครงสร้างของผนังเซลล์พืช a) โครงสร้างของผนังเซลล์พืชประกอบด้วย middle lamella ผนังเซลล์ลำดับแรก และ ผนังเซลล์ลำดับสอง b) **โครงสร้างของผนังเซลล์ลำดับสองประกอบด้วยเซลลูโลสไฟเบอร์ที่ต่ออยู่กับลิกนินและเฮมิเซลลูโลส**

ที่มา: Sticklen, 2008

ชนิดลิกนินและคุณสมบัติทางเคมี

ลิกโนเซลลูโลสที่เป็นองค์ประกอบผนังเซลล์พืช เป็นมวลชีวภาพที่สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต 2 ชนิด คือ เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสและองค์ประกอบที่ไม่ใช่คาร์โบไฮเดรต คือ ลิกนิน ซึ่งเป็นโพลิเมอร์ของสารประกอบอะโรมาติก โดยลิกนินเป็นโพลิเมอร์ลำดับสองของโลก รองจากเซลลูโลส โดยมีองค์ประกอบร้อยละ 30 โดยมวลของการตรึงคาร์บอนทั้งหมดจากการสังเคราะห์แสง คำว่าลิกนินมาจากภาษาลาตินที่มีชื่อว่า lignum แปลว่าไม้ ซึ่งเป็นหนึ่งในองค์ประกอบของชีวมวลลิกโนเซลลูโลส ประกอบด้วยเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส ลิกนินเป็นวัตถุสารที่อยู่ในธรรมชาติมากเป็นลำดับที่ 2 รองจากเซลลูโลส ประมาณ $5x10^6$ เมตริกตันของลิกนิน ซึ่งถูกสร้างขึ้นจากโรงงานอุตสาหกรรม นอกจากนี้ลิกนินเป็นแหล่งของอะโรเมติกโพลิเมอร์มากที่สุดบนโลก ซึ่งการย่อยสลายลิกนินทำให้เกิดการหมุนวนวัฏจักรคาร์บอน ลิกนินเป็นโพลิเมอร์อะโรมาติกเชิงซ้อน ซึ่งมีความหนาแน่นและแข็งแรงต่อเนื้อเยื่อของพืชที่มีท่อลำเลียง (vascular plants) โมเลกุลขนาดใหญ่นี้แตกกิ่งก้านสูงและมีโครงสร้าง 3 มิติ ซึ่งไม่ขึ้นอยู่กับประเภทหรือชนิดของพืชเท่านั้นยังขึ้นอยู่กับสภาวะในการปลูกพืช ลิกนินประกอบด้วยหน่วย phenyl-propane unit เชื่อมอยู่กับพันธะอีเทอร์หรือพันธะคาร์บอนที่ต่อกับคาร์บอนทำให้ได้โครงสร้างที่มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยสูงอยู่ในช่วง 8,000 - 11,000

ลิกนินถูกสังเคราะห์จากโมโนเมอร์หรือ monolignols3 ชนิด ได้แก่ *p*-coumaryl alcohol ไม่มีหมู่ OCH_3, coniferyl alcohol มีหมู่ aryl-OCH_3 group และ sinapyl alcohol มีหมู่ aryl-OCH_3group จำนวน 2 หมู่ โดยโมโนเมอร์เหล่านี้จะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้เป็นโอลิโกเมอร์ (oligomers) ประกอบเป็นหน่วยที่ชื่อว่า phenylpropanoid subunits ได้แก่ *p*-hydroxyphenol (H), guaiacyl (G) และ Syringyl (S) (จาก *p*-coumaryl alcohol, coniferyl alcohol และ sinapyl alcohol ตามลำดับ) แตกต่างกันที่ระดับของหมู่ methoxy group ซึ่งจะมีหน่วย phenylpropanoid subunits แตกต่างกันในพืชแต่ละชนิด แสดงดังภาพ 3



ภาพ 3 โครงสร้างของลิกนิน

ที่มา: Brown, & Chang, 2014

ลิกนินในไม้เนื้ออ่อน (softwood) มีองค์ประกอบของ coniferyl alcohols (80%) ในขณะที่ไม้เนื้อแข็งมีองค์ประกอบของ coniferyl alcohols 56% และ sinapyl alcohols 40% ลิกนินในหญ้ามีองค์ประกอบของ *p*-coumaryl alcohol มากกว่าในไม้เนื้ออ่อนและไม้เนื้อแข็ง (สูงถึง 10%) และมีปริมาณของ coniferyl alcohol และ sinapyl alcohol ใกล้เคียงกัน หน่วย phenylpropanoid subunits เหล่านี้ถูกเชื่อมโดยพันธะ β-aryl ether, di-aryl propane, biphenyl, diaryl ether, phenylcoumarane, spirodienone และ pinoresinol ลิกนินไดเมอร์จะถูกนำมาเชื่อมต่อกันเพื่อได้เป็นโพลิเมอร์ ลิกนินถูกสร้างโดยปฏิกิริยาของเอนไซม์ peroxidase และ laccase ในเซลล์พืช โดยปฏิกิริยาการสูญเสียอิเล็กตรอน (oxidation) ของโมโนเมอร์ได้สารตัวกลางที่เรียกว่า phenoxy intermediate หรือ oxidized monomer และอนุมูลอิสระที่ β-carbon

การย่อยลิกนินจะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์หรือสารตัวกลางที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น โฟม ยาง ฟิล์ม พลาสติก ขัดเงา สารเพิ่มรสชาติอาหาร (vanillin และ ferulic acid) ดังนั้นลิกนินจึงสามารถถูกใช้เป็นแหล่งของสารเคมีอินทรีย์ซึ่งเป็นทางเลือกของอุตสาหกรรมปัจจุบันที่พึ่งพาการผลิตสารเคมีเหล่านี้จากปิโตรเลียม

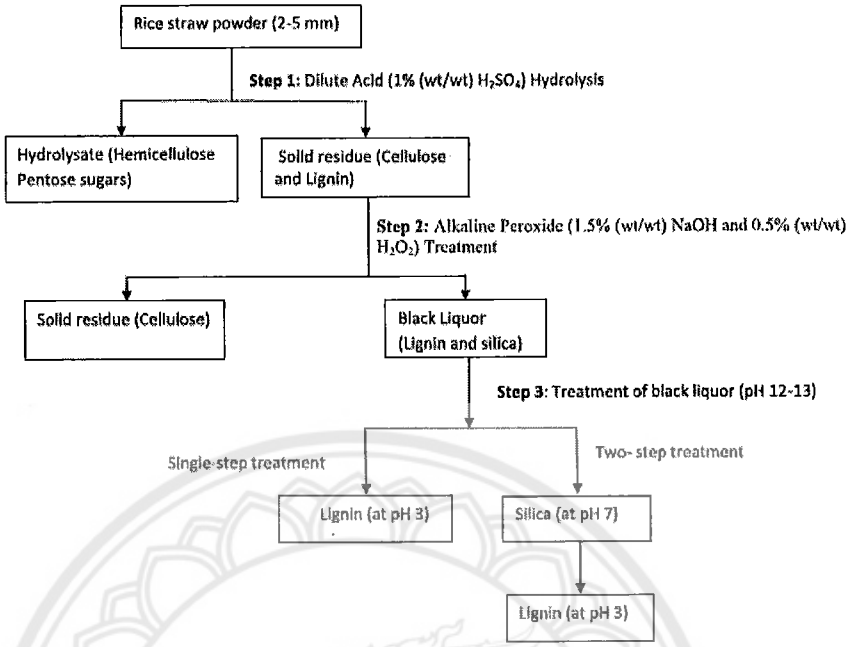
ไม้หรือวัตถุดิบทางการเกษตรอื่นๆ ถูกใช้ในการผลิตเยื่อกระดาษเซลลูโลส อย่างไรก็ตามการมีเศษลิกนินปนเปื้อนเป็นผลเสียต่อคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากโรงงานเยื่อกระดาษและกระดาษ ดังนั้นลิกนินจะถูกแยกออกในช่วงการสกัดเยื่อกระดาษ โดยไม่ทำให้เกิดการย่อยของเยื่อกระดาษ การแยกลิกนินออกขึ้นอยู่กับกระบวนการสกัดเยื่อและการใช้วัตถุดิบ ในกระบวนการผลิตเยื่อกระดาษมีชื่อเรียกทั่วไปว่า Kraft and soda digestion processes น้ำทิ้งที่ได้จากกระบวนการนี้เรียกว่า black liquor ซึ่งมีลักษณะเป็นด่างสูง มีปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำอยู่มาก เช่น ลิกนินและผลพลอยได้อื่นๆ ถ้าน้ำล้างเยื่อกระดาษนี้ไม่ถูกนำไปเผาในหน่วยการนำด่างกลับมาใช้ใหม่จะเป็นแหล่งน้ำทิ้งที่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ซึ่งไม่เพียงจะไปสร้างพันธะกับสารเคมีในธรรมชาติเท่านั้น แต่ยังทำให้น้ำมีสีเข้มขึ้น ซึ่งจะลดปริมาณออกซิเจนอิสระในน้ำและส่งผลเสียต่อสิ่งมีชีวิตประจำถิ่นในน้ำ การลดแหล่งปนเปื้อนและน้ำทิ้งเป็นประเด็นที่เกี่ยวข้องหลักในอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษและกระดาษ ซึ่งมีความพยายามในการพัฒนากระบวนการสกัดเยื่อกระดาษ การฟอกสี และการขึ้นรูปกระดาษ ซึ่งได้มีการทำให้น้ำย่อยเข้มข้นและนำไปเผา ทำให้ได้สารอินทรีย์ที่สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้และพลังงานที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันสารเคมีขององค์ประกอบที่เป็นสารอินทรีย์ ทำให้ลิกนินถูกเผา สารอนุพันธ์ที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจจึงสูญเสียไป

ลิกนินมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 10,000 ดาลตัน สร้างขึ้นโดยกระบวนการ condensation polymerization คือ กระบวนการสร้างโพลิเมอร์ผ่านปฏิกิริยา condensation เป็นการนำเอาโมเลกุลมาเชื่อมต่อกันทำให้เกิดการสูญเสียโมเลกุลขนาดเล็ก เช่น น้ำหรือเมทานอล ทำให้ลิกนินมีความคงทนต่อการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ เนื่องจากมีน้ำหนักโมเลกุลสูงและมีพันธะเสถียรมากมาย เช่น พันธะคาร์บอนต่อกับคาร์บอนและพันธะอีเทอร์ จุลินทรีย์ย่อยลิกนินผ่านทางกระบวนการออกซิเดชัน ได้แก่ เชื้อรา แอกติโนมัยซิส และแบคทีเรีย ผนังเซลล์พืชประกอบด้วย 3 องค์ประกอบหลัก ได้แก่ เซลลูโลส ลิกนิน และเฮมิเซลลูโลส ลิกนินจะสร้างพันธะโควาเลนท์จับกับสายของไซแลนของผนังเซลล์ ซึ่งเป็นอุปสรรคต่อการย่อยสลายโครงสร้างคาร์โบไฮเดรตทั้ง 2 ชนิด เนื่องจากมีตัวกีดขวางทางกายภาพของจุลินทรีย์และมีผลเสียต่อกิจกรรมของจุลินทรีย์ เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิก การบำบัดเชิงกลและทางเคมีของลิกโนเซลลูโลสจากของเหลือทิ้งทางการเกษตรโดยนำมาทำเป็นอาหารหยาบคุณภาพต่ำ อย่างไรก็ตามวิธีเหล่านี้มีราคาแพง หรือมี

ผลกระทบที่อันตรายต่อสิ่งแวดล้อม ในทางตรงกันข้ามการบำบัดทางชีวภาพเป็นวิธีการใหม่ ซึ่งไม่เพียงจะมีประสิทธิภาพดีแต่ยังพัฒนาคุณภาพวัตถุดิบผ่านทางการย่อยสลายลิกนินและเยื่อใยที่ไม่สามารถย่อยได้ แล้วยังมีผลกระกระทบต่อสิ่งแวดล้อมต่ำ

คราฟท์ลิกนิน (Kraft lignin, KL) เป็นโพลิเมอร์ของเหลือทิ้งจากกระบวนการย่อยซัลไฟด์เบส (alkaline sulfide treatment) ของลิกโนเซลลูโลสในอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษและกระดาษ ซึ่งเป็นสารที่ทำให้เกิดสีและสารพิษในน้ำทิ้งของโรงงาน แตกต่างจากลิกนินธรรมชาติ เนื่องจากเกิดจากปฏิกิริยาหลากหลาย ประกอบด้วยการตัดของพันธะ aryl-alkyl (aryl-alkyl cleavages) การดัดแปลงหมู่ข้างเคียง และการตัดหรือลดขนาดสารประกอบขนาดใหญ่ให้ได้สารประกอบขนาดเล็กที่ละลายน้ำหรือละลายในสารละลายด่าง

Minu, Jiby, & Kishore (2012) ทำการสกัดและทำลิกนินให้บริสุทธิ์จากน้ำย่อยฟางข้าว (Black liquor) ที่ได้จากอุตสาหกรรมการผลิตไบโอเอทานอลจากฟางข้าว โดยทำการเปรียบเทียบ 2 วิธี ได้แก่ single-step process และ two-step process แสดงดังภาพ 4 ใน single-step process นำน้ำย่อยฟางข้าวปริมาตร 1,000 ml (pH12 – 13) มาทำการตกตะกอนลิกนินโดยการปรับพีเอช 1 ด้วย 2%(v/v) sulphuric acid ทิ้งไว้เพื่อให้เกิดการตกตะกอน จากนั้นนำไปกรองโดยใช้เครื่องกรองสุญญากาศ (vacuum filtration) อบตะกอนให้แห้งที่ 105 °C ข้ามคืน เพื่อนำไปชั่งน้ำหนักแห้ง ส่วน two-step process เพิ่มวิธีการตกตะกอน silica ที่พีเอช 7 ทำการกรองครั้งแรกโดยเครื่องกรองสุญญากาศจากนั้นนำตะกอนที่ได้มาทำการปรับพีเอชด้วยกรดอีกครั้งให้ได้พีเอช 3.0 เพื่อตกตะกอนลิกนิน พบว่าการแยกและทำลิกนินให้บริสุทธิ์โดย two-step process ให้ลิกนินที่มีคุณภาพ คุ้มค่า และน้ำทิ้งที่ได้สะอาดกว่าวิธี single-step process โดยให้ค่าความร้อน (calorific value) มากกว่าลิกนินทางการค้า

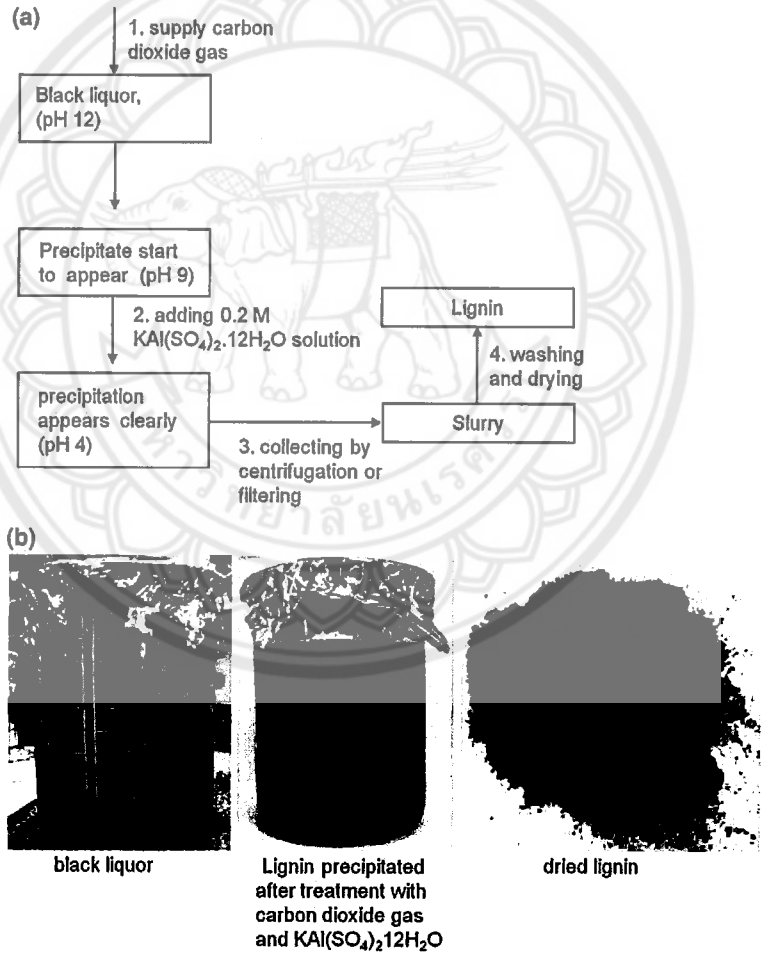


ภาพ 4 ขั้นตอนการสกัดและทำบริสุทธิ์ลิกนินจากน้ำย่อยฟางข้าวที่เกิดขึ้นจากอุตสาหกรรมการผลิตไบโอเอทานอลจากฟางข้าว

ที่มา: Minu et al., 2012

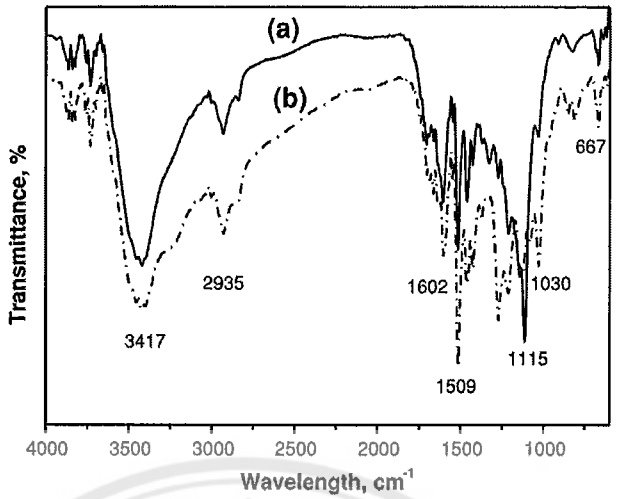
การเปรียบเทียบคุณสมบัติที่แตกต่างกันของลิกนินที่ได้จากการตกตะกอนกับลิกนินทางการค้าโดยการเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง FTIR Spectra (Fourier Transform Infra-Red Spectroscopy) ให้ค่าการดูดกลืนแสงในรูปของ %transmittance ระหว่างค่าช่วงคลื่นที่ 4,000-500 cm^{-1} ให้ค่าความเหมือนลิกนินทางการค้าร้อยละ 77 โดยทำการแปลผลค่าดูดกลืนแสงและหมู่ฟังชั่นที่ได้แสดงดังตาราง 3 พบว่า ในลิกนินทุกชนิดจะให้ค่าดูดกลืนแสงกว้างระหว่าง 3500 -3100 cm^{-1}ระบุว่าเป็น OH stretching vibrations โดยจะพบอยู่ในหมู่ไฮดรอกซิลของแอลกอฮอล์และฟีนอลรวมถึงพันธะไฮโดรเจน ค่าดูดกลืนแสงที่ 1600 cm^{-1}และ 1500 cm^{-1} ระบุว่าเป็นวงแหวนอะโรมาติก (aromatic rings) ส่วนค่าดูดกลืนแสงที่แสดงให้เห็นหมู่ syringyl rings และ guaiacyl rings พบในช่วงคลื่นที่ 1340 – 1330 cm^{-1}และ 1272-1220 cm^{-1} ตามลำดับ การปรากฏค่าดูดกลืนแสงในช่วง 870-850 cm^{-1} และ 781 cm^{-1} ระบุให้เห็นถึงการเสียรูปร่างของ C-H ในวงแหวนอะโรมาติก (Minu et al., 2012)

เป็นเวลา 24 ชั่วโมง) ปรับพีเอชด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นเวลา 30 นาที อุณหภูมิ 60 °C พีเอชลดลงประมาณ 9 ลิกนินจะเริ่มตกตะกอน สีน้ำล้างเยื่อกระดาษจะค่อยๆ เปลี่ยนเป็นสีเหลืองทึบ จากนั้นเติม 5,000 ml ของ 0.2M $AlK(SO_4)_2.12H_2O$ ลงไปอย่างรวดเร็วและคนให้เข้ากันด้วยเครื่องกวนที่อุณหภูมิห้อง พีเอชลดลงที่ 4 ตั้งทิ้งไว้ 1 คืน เพื่อให้ลิกนินตกตะกอนในสารละลาย ซึ่งจะเห็นตะกอนได้อย่างชัดเจนและง่ายต่อการเก็บเกี่ยวลิกนินโดยการกรองหรือการปั่นเหวี่ยง ทำการล้างตะกอนด้วยน้ำปราศจากไอออนหลายๆ รอบ เพื่อกำจัดสิ่งปนเปื้อน ลิกนินที่ได้จะถูกทำให้แห้งที่สุญญากาศเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จึงวิเคราะห์ FT-IR เพื่อเปรียบเทียบโครงสร้างกับลิกนินทางการค้า (ภาพ 6)



ภาพ 5 การสกัดลิกนินจาก Black liquor โดยใช้ $AlK(SO_4)_2.12H_2O$

ที่มา: Luong et al., 2012



ภาพ 6 FT-IR **สเปกตรัมการดูดกลืนรังสีอินฟาเรดของลิกนิน** lignin-SKKU (a) **และ** lignin-Aldrich (b)

ที่มา: Luong et al., 2012

จากภาพ 6 การเปรียบเทียบค่าดูดกลืนแสงของลิกนินที่สกัดได้ให้รหัสเป็น lignin-SKKU และลิกนินทางการค้า (lignin-Aldrich) พบว่าค่าดูดกลืนแสงที่ได้มีลักษณะของพีคใกล้เคียงกับลิกนินทางการค้า เช่น ค่าดูดกลืนแสงที่ 2,935 cm^{-1} ระบุว่าเป็น CH stretching ของหมู่ methyl หรือ methylene groups นอกจากนี้ค่าดูดกลืนแสงที่ 1,509 และ 1,602 cm^{-1} เป็นลักษณะพีคของ benzene rings พีคแหลมคมและกว้างที่ 3,417 cm^{-1} ระบุว่าเป็นหมู่ OH groups หรือ phenolic compounds ค่าดูดกลืนแสงที่ 1,115 cm^{-1} ระบุว่าเป็น ether stretching พีคที่ 667 cm^{-1} ระบุว่าเป็นหมู่ CS group ซึ่งถูกสร้างขึ้นในระหว่างกระบวนการต้มเยื่อกระดาษ (Kraft pulping processes) (Luong et al., 2012)

J.D. Coral Medina et al. (2016) ศึกษาคุณสมบัติของลิกนินที่ได้จากการปรับสภาพด้วยกรดด่างจากทลายปาล์ม (sequential acid-alkaline pretreatment) ได้แก่ คุณสมบัติทางกายภาพ (thermal behavior) และคุณสมบัติทางชีววิทยา เช่น สารต้านแอนตี้ออกซิเดนซ์ ความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ ความสามารถในการยับยั้งโรคเบาหวาน พบว่าความเข้มข้นของลิกนิน 2 mg ให้ความสามารถในการยับยั้ง DPPH ได้ร้อยละ 50 ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* serovar Thyphimurium, *Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus* และให้ผลการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ α-amylase ร้อยละ 20 คุณสมบัติ

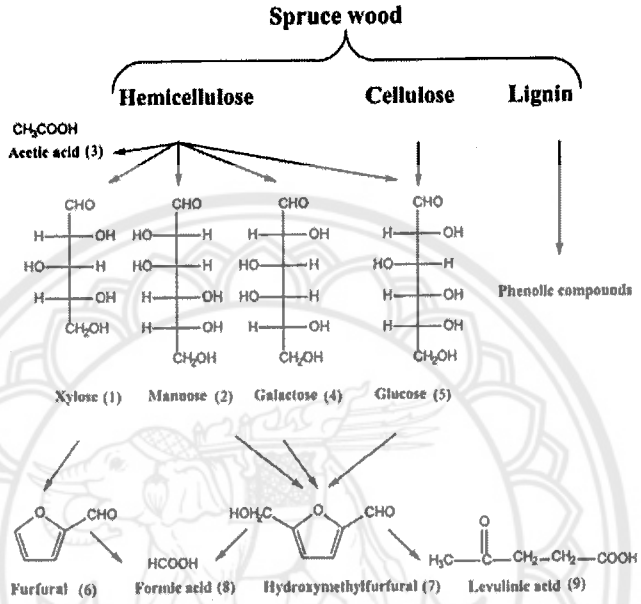
เหล่านี้เป็นผลมาจากโครงสร้าง syringyl aromatic structure และวงแหวนอะโรมาติกที่พบในลิกนิน ส่วนคุณสมบัติทางกายภาพให้พีคที่ 230 °C และ 350 °C และ glass transition temperature ที่ 70 °C จากผลที่กล่าวมาข้างต้นแสดงให้เห็นถึงศักยภาพของลิกนินในการเป็นตัวกลางของสารเคมีที่มีมูลค่าของกระบวนการกลั่นทางชีวภาพจากทลายปาล์ม (oil palm empty fruit bunches)

การย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสและลิกนิน

กระบวนการกลั่นทางชีวภาพส่วนใหญ่จะเน้นที่เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส หรือที่เรียกว่าฐานการผลิตน้ำตาลในขณะที่ลิกนินถูกนิยามเป็นผลผลิตที่มีมูลค่าต่ำ โดยวัตถุประสงค์หลักของกระบวนการกลั่นชีวภาพ คือ การเปลี่ยนลิกโนเซลลูโลสไปเป็นผลผลิตที่มีมูลค่า โดยการแก้ไขข้อจำกัด เช่น โครงสร้างที่ไม่เป็นระเบียบปฏิกิริยาทางเคมีที่จำเพาะ และการมีสารเคมีอินทรีย์และอนินทรีย์ไม่บริสุทธิ์อย่างหลากหลายในลิกนินตัวอย่างการควบคุมการแตกพันธะ C-C และ C-O ในลิกนิน โดยกระบวนการย่อยที่จำเพาะจะให้โมโนเมอร์และสารประกอบอะโรเมติกที่หลากหลาย ดังนั้นลิกนินจึงเป็นตัวแทนแหล่งของสารอะโรเมติกที่สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้

สารพิษที่ได้จากการย่อยลิกโนเซลลูโลส Palmqvist, & Hahn-Hägerdal (2000) กล่าวว่าในระหว่างการย่อยลิกโนเซลลูโลสจะมีสารประกอบหลายชนิดที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ถูกสร้างและปลดปล่อยออกมา ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มหลัก คือ กลุ่มกรดอ่อน (weak acids) กลุ่มอนุพันธุ์ฟูแรน (furan derivatives) และกลุ่มสารประกอบฟีนอล (phenolic compounds) ซึ่งสารประกอบเหล่านี้จะไปจำกัดการใช้น้ำตาลเป็นผลให้ลดความสามารถในการใช้น้ำตาลที่ได้จากการย่อยลิกโนเซลลูโลส ตัวอย่างที่เห็นได้ชัดเจน เช่น *Saccharomyces cerevisiae* ในอุตสาหกรรมการหมักเอทานอล ทำให้ผลได้เอทานอลและอัตราการผลิตลดลง เนื่องจากตัวยับยั้งดังกล่าว องค์ประกอบของไม้ประกอบด้วยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน เซลลูโลสเป็นโพลิเมอร์เส้นตรงน้ำหนักโมเลกุลสูงเกิดจากการเรียงต่อกันของน้ำตาลกลูโคส (D-glucose) ด้วยพันธะ β-1,4-linked มีลักษณะเป็นผลึก เฮมิเซลลูโลสเป็นโพลิเมอร์ของน้ำตาลที่มีการแตกแขนง ได้แก่ D-xylose และ L-arabinose และน้ำตาลหกคาร์บอน ได้แก่ D-mannose, D-glucose, D-galactose และ uronic acids ส่วนลิกนินสังเคราะห์ขึ้นจากโพลิเมอร์อะโรมาติกสารตัวกลางที่ชื่อ phenylpropanoid precursors แบ่งออกเป็น 2 คลาส ชื่อว่า guaiacyl lignins และ guaiacyl-syringyl lignins ซึ่งแตกต่างกันที่หน่วยโครงสร้างของฟีนิวโพพานอยด์ การย่อยของลิกโนเซลลูโลสมีอยู่หลากหลายวิธี เช่น dilute-acid hydrolysis และ enzymatic hydrolysis ก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์โครงสร้างของเซลลูโลสจำเป็นจะต้องถูกทำให้ง่ายต่อการย่อยด้วย

เอนไซม์ จึงต้องมีกระบวนการที่เรียกว่า pretreatment ก่อน โดยล้างเฮมิเซลลูโลสออกจากเยื่อเซลลูโลส ขั้นตอนการย่อยลิกโนเซลลูโลสที่อุณหภูมิสูงภายใต้สภาวะกรดทำให้เกิดการสร้างและปลดปล่อยสารประกอบหลายชนิดแสดงดังภาพ 7



ภาพ 7 ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในระหว่างการย่อยลิกโนเซลลูโลส อนุพันธุ์ฟูแรนและสารประกอบฟีโนลิกจะทำปฏิกิริยาเพื่อสร้างสารประกอบบางชนิด

ที่มา: Palmqvist, & Hahn-Hägerdal, 2000

เมื่อเฮมิเซลลูโลสถูกย่อยจะได้ ไซโลส แมนโนส กรดอะซิติก กาแล็คโตส และกลูโคสออกมา เซลลูโลสถูกย่อยได้กลูโคส ไซโลสถูกย่อยแล้วเปลี่ยนเป็นฟูฟิวรอล (furfural) ที่อุณหภูมิและความดันสูงในขณะเดียวกัน 5-hydroxymethyl furfural (HMF) ถูกสร้างจากการย่อยน้ำตาลหกคาร์บอน กรดฟอมิก (formic acid) ถูกสร้างเมื่อ furfural และ HMF ถูกทำลาย กรดลิวูลินิก (Levulinic acid) ถูกสร้างโดยการย่อยของ HMF สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compound) ถูกสร้างขึ้นจากการทำลายพันธะของลิกนินและได้มีการรายงานว่าเกิดขึ้นในระหว่างการย่อยคาร์โบไฮเดรต

กลไกการยับยั้งของกรดอ่อน กรดถูกจัดตามค่า dissociation constant หรือ Ka ส่วนกลับของลอกกาลิทึมเขียนในรูปของ pKa คือ ค่า pH และความสามารถในการเป็นบัฟเฟอร์ของ

กรดสูง ตัวอย่างกรดอ่อนที่มีค่า pKa ที่ 0 ได้แก่ acetic acid, formic acid, octanoic acid และ levulinic acid เท่ากับ 4.75 (25°C), 3.75 (20 °C), 4.89 (25 °C), 4.66 (25 °C) ตามลำดับ กรดอ่อนจะไปยับยั้งการเจริญของเซลล์จึงถูกนำไปใช้เป็นสารถนอมอาหาร การแตกตัวเป็นไอออนได้ไม่หมดจะทำให้เกิดสารละลายไขมัน (liposoluble) และสามารถเข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์มีผลในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ เนื่องจากการเข้าไปแตกตัวของกรดอ่อนภายในไซโตซอล (cytosol) การแตกตัวของกรดอ่อนเกิดขึ้นได้เนื่องจากของเหลวภายในเซลล์มีพีเอชเป็นกลาง เป็นผลให้ของเหลวภายในมีพีเอชลดลง ความเข้มข้นของกรดอ่อนในน้ำย่อยลิกโนเซลลูโลสขึ้นอยู่กับค่าพีเอช ดังนั้นค่าพีเอชจึงมีความสำคัญอย่างมากในระหว่างกระบวนการหมัก ค่าพีเอชของการหมักต่ำจะยับยั้งการเพิ่มจำนวนและความมีชีวิตของเซลล์ เนื่องจากการเพิ่มความเข้มข้นของโปรตอนของเยื่อหุ้มเซลล์เป็นผลให้เกิดการเพิ่มอัตราการดึงโปรตอนเข้าสู่ภายในเซลล์ การรักษาค่าพีเอชเป็นกลางภายในเซลล์จึงมีความจำเป็นสำหรับความมีชีวิตของเซลล์ กิจกรรมการเพิ่มจำนวนของเซลล์ลดลงตามการเพิ่มขึ้นของค่าพีเอชภายในเซลล์ ช่วงค่าพีเอชภายนอกเซลล์ที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของ *S. cerevisiae* คือ 5.0 - 5.5 แต่สามารถเจริญได้ที่พีเอชต่ำสุดเท่ากับ 2.5 ในกระบวนการหมักที่ไม่มีกรดอะซิติก แต่ถ้ามีกรดอะซิติก (10 g/l) อยู่ในกระบวนการหมักเชื้อจะเจริญได้ที่พีเอชต่ำสุดเท่ากับ 4.5 กลไกการยับยั้งของกรดอ่อนเกิดจากการยับยั้งของกรดอ่อนด้วยการรวมตัวกันของแอนไอออนภายในเซลล์และที่ถูกปล่อยออกนอกเซลล์ (uncoupling and intracellular anion accumulation) เป็นผลให้พีเอชภายในเซลล์ต่ำลง เนื่องจากการไหลของกรดอ่อนเข้าสู่เซลล์ผ่านการทำงานของ plasma membrane ATPase ซึ่งมีหน้าที่ในการปั๊มโปรตอนออกนอกเซลล์ผ่านการย่อยสลาย ATP

S. cerevisiae มีความสามารถในการนำ furfural และ HMF ไปใช้ได้ทั้งภายใต้สภาวะที่มีอากาศ มีออกซิเจนที่จำกัด และสภาวะไร้อากาศในระหว่างการหมัก furfural จะถูกรีดิวซ์เปลี่ยนเป็น furfuryl alcohol ส่วน HMF จะถูกเปลี่ยนเป็น 5-hydroxymethyl furfuryl alcohol ให้ค่าผลได้สูง แต่ furfuryl alcohol สามารถยับยั้งการเจริญของ *Pichia stipites* อย่างไรก็ตาม furfural และ HMF มีผลต่อการลดอัตราการเจริญ ผลได้มวลเซลล์ต่อพลังงาน อัตราการผลิตเอทานอลและอัตราต่อปริมาตร การลดการเจริญของจุลินทรีย์เป็นผลมาจาก furfural มากกว่าผลต่อการผลิตเอทานอล เนื่องด้วยในกระบวนการหมักมีเอนไซม์ NADH-dependent yeast alcohol dehydrogenase ซึ่งเชื่อว่าทำหน้าที่รีดิวซ์เฟอฟิวรอล ในขณะที่การยับยั้งของ furfural จะมีผลต่อเอนไซม์ในกระบวนการไกลโคไลซิส และมีผลยับยั้ง ADH ในการทำหน้าที่ปลดปล่อย acetaldehyde ทำให้เกิดการสะสมของ acetaldehyde ภายในเซลล์ทำให้การเจริญในการ

ว TS
933
.L3
ว2915
2561
1049635

นำมาเข้าสมุด
17 มี.ค. 2565

เพาะเลี้ยงที่มี furfural พบช่วงระยะพัก (lag-phase) ส่วน HMF ทำให้เกิดระยะพักที่ยาวนานกว่า furfural

Okuda, Soneura, Ninomiya, Katakura, & Shioya (2008) พบวิธีการบำบัดสารพิษทางชีวภาพ (biological detoxification) ในน้ำย่อยลิกโนเซลลูโลสชื่อว่า Waste House Wood Hydrolysate, WHW โดยกรดซัลฟิวริกเจือจางที่มีสารพิษที่ยับยั้งการหมักของ *S. cerevisiae* และ *Escherichia coli* KO11 พบว่า การบำบัดน้ำย่อยลิกโนเซลลูโลสด้วยแบคทีเรียที่ *Ureibacillus thermosphaericus* เจริญได้ในอุณหภูมิสูง ที่ 50 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สามารถช่วยเพิ่มอัตราการผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* ได้อย่างมีนัยสำคัญเปรียบเทียบกับน้ำย่อยที่ผ่านการบำบัดด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ (overliming) จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารพิษในน้ำย่อยลิกโนเซลลูโลสที่ผ่านการบำบัดด้วยแบคทีเรีย พบว่า *U. thermosphaericus* ย่อย furfural หรือ 5-hydroxymethyl furfural อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของสารพิษทั้งสองไม่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ทำให้ทราบว่าแบคทีเรียย่อยสารขนาดเล็ก ซึ่งมีสารพิษหรือสารประกอบฟีนอลจำนวนมากในน้ำย่อยลิกโนเซลลูโลส การรวมกระบวนการบำบัดโดยแบคทีเรียและการปรับด่าง ทำให้อัตราการผลิตเอทานอลโดย *E. coli* KO11 เพิ่มขึ้น ดังนั้นการบำบัดน้ำย่อยลิกโนเซลลูโลสทางชีวภาพจะเป็นประโยชน์สำหรับการผลิตเอทานอลชีวภาพจากลิกโนเซลลูโลส เนื่องด้วยแบคทีเรีย *U. thermosphaericus* เจริญอย่างรวดเร็วและไม่ใช้น้ำตาล

วิธีทางกายภาพและเคมี

วิธีทางกายภาพและเคมีที่ใช้ในการย่อยลิกโนเซลลูโลสเพื่อแยกลิกนินออกจากเยื่อเซลลูโลสมีอยู่หลากหลายวิธี ได้แก่ การใช้คลื่นไมโครเวฟ (microwave) รังสี (ionizing radiation) การแตกตัวโดยใช้แรงดันไอน้ำ (steam explosion) การย่อยด้วยกรด ด่าง และปฏิกิริยาออกซิเดชั่น หรือใช้หลายวิธีร่วมกันทำให้ต้องใช้พลังงานสูง ไม่ว่าจะเป็นพลังงานไอน้ำหรือไฟฟ้าและถังปฏิกรณ์ที่ทนต่อการกัดกร่อน ทนแรงดันสูงได้ ส่งผลถึงต้นทุนการผลิตหรือต้นทุนการปรับสภาพวัตถุดิบมีราคาสูง ซึ่งข้อดีของการใช้วิธีทางกายภาพและทางเคมีคือ มีประสิทธิภาพสูงและใช้ระยะเวลาสั้น (Guan, G. et al., 2015)

อุตสาหกรรมกระดาษในประเทศจีนร้อยละ 90 ใช้กระบวนการซัลไฟด์เบส และคราฟท์ ลิกนินเป็นผลพลอยได้หลักจากกระบวนการนี้ อยู่ในรูป black liquor โดยประมาณ 10 - 15% ของน้ำทิ้งทั้งหมด มีองค์ประกอบที่เป็นมลพิษอยู่ประมาณ 90 - 95% และส่งผลเสียต่อสิ่งแวดล้อม วิธีที่มีประสิทธิภาพที่สุดในการกำจัดน้ำล้างเยื่อกระดาษ โดยกระบวนการนำด่างกลับมาใช้ใหม่ (alkali recovery process) สารอินทรีย์ในน้ำเสียจะถูกเผาเพื่อให้เกิดความร้อนและด่าง อย่างไรก็

ตามกระบวนการนำด่างกลับมาใช้ใหม่ต้องใช้เงินทุนสูงและมีเพียงโรงงานขนาดใหญ่เท่านั้นที่ใช้กระบวนการนี้ ส่วนโรงงานขนาดกลางและขนาดเล็กซึ่งมีสัดส่วนมากในจีน มีการปล่อยน้ำล้างเยื่อกระดาษ (black liquor) ออกสู่สิ่งแวดล้อม ซึ่งก่อให้เกิดปัญหามลพิษทางสิ่งแวดล้อมที่รุนแรง ดังนั้นวิธีการบำบัดที่สามารถใช้ได้จริง จึงจำเป็นสำหรับการบำบัดน้ำเสียของโรงงานเยื่อกระดาษขนาดเล็ก

วิธีทางชีวภาพ

การย่อยลิกนินทางชีวภาพเกิดขึ้นจากการทำงานของเชื้อรา แบคทีเรีย และแอคติโนมัยซีท โดยสามารถย่อยน้ำย่อยซานอ้อยทางชีวภาพได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในธรรมชาติจุลินทรีย์เหล่านี้ใช้เอนไซม์ที่มีคุณสมบัติออกซิเดชั่นหรือเกิดการสูญเสียอิเล็กตรอนได้ผลผลิตและอิเล็กตรอน เช่น lignin peroxidase (Lip), Manganese peroxidase (MnP) และ laccase (LAC) สำหรับย่อยโพลิเมอร์ของลิกนินที่ย่อยได้ยาก ถึงแม้ว่าเชื้อราจะถูกรายงานสำหรับปฏิกิริยาการย่อยลิกนินที่ไม่จำเพาะอย่างมากมาย แบคทีเรียก็ยังมีความสามารถในการย่อยลิกนินได้ดี เนื่องจากมีความสามารถในการปรับตัวต่อสิ่งแวดล้อมได้กว้าง และมีความสามารถในการใช้สารเคมีทางชีวภาพได้หลายชนิด การย่อยลิกนินทางชีวภาพเป็นกระบวนการย่อยโดยเอนไซม์ 3 ชนิดหลัก และเอนไซม์ประกอบอื่นๆ เพื่อทำให้เกิดการย่อยลิกนินที่สมบูรณ์ (Paliwal, Rawat, Rawat, & Rai, 2012) อย่างไรก็ตามการปรากฏของเอนไซม์ที่จำเป็นทุกชนิดในจุลินทรีย์เพียงสปีชีร์เดียวนั้นเป็นไปได้ยาก ปัญหานี้สามารถแก้ไขได้โดยการทำงานร่วมกันของจุลินทรีย์สองชนิดหรือหลากหลายชนิด (Oliveira, Duarte, Ponezi, & Durrant, 2009a)

ในปัจจุบันมีรายงานการพบสายพันธุ์แบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยลิกนินและสารประกอบอื่นที่มีความใกล้เคียงลิกนิน (Raj, Chandra, Reddy, Purohit, & Kapley, 2007) ได้แก่ *Panibacillus* sp. (AY952466) *Aneurinibacillus aneurinilyticus* (AY856831) และ *Bacillus* sp. (AY952465) ทำการแยกเชื้อเหล่านี้จากตะกอนเยื่อกระดาษ แล้วทดสอบการย่อยและลดสีของลิกนินสังเคราะห์ความเข้มข้น 500 mg/l ทำการตรวจวัดผลที่ได้โดยการวิเคราะห์ด้วย GC-MS พบว่า *Citrobacter* sp. มีศักยภาพในการย่อยสารพิษหลายชนิด เช่น azo, anthraquinone และสารพิษอื่นๆ ได้ (Wang et al., 2009; Khalid et al., 2009) แม้ว่าจุลินทรีย์จะมีศักยภาพในการย่อยที่ดี แต่ยังไม่ถูกนำมาใช้ในการบำบัดน้ำล้างเยื่อกระดาษ เนื่องจากมีการรายงานถึงเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยลิกนิน เช่น MnP น้อย Chandra, & Abhishek (2011) รายงานการลดสีน้ำล้างเยื่อกระดาษทั้งรูปแบบการใช้เชื้อเดี่ยวและเชื้อผสม และทำการระบุชื่อผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยด้วยเชื้อ *Citrobacter freundii* (FJ581026) และ *Citrobacter* sp. (FJ581023) พบว่า การใช้

เชื้อผสมมีประสิทธิภาพดีกว่าการใช้เชื้อเดี่ยว โดยลดค่า COD, AOX, สี และลิกนิน หลังจากบ่มเป็นเวลา 144 ชั่วโมง เท่ากับ 82%, 79%, 79% และ 60% ตามลำดับ โดยระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ manganese peroxidase เท่ากับ 96 ชั่วโมง ทั้งนี้การย่อยโดยเชื้อเดี่ยวจะพบ 2,4,6-trichlorophenol, 2,3,4,5-tetrachlophenol และ pentachlorophenol ในน้ำย่อย ในขณะที่การย่อยโดยเชื้อผสมไม่พบสารเหล่านี้ เนื่องจาก Chlorophenol จะยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชั่น จึงเป็นเหตุผลหลักที่ทำให้การใช้เชื้อเดี่ยวมีประสิทธิภาพการย่อยต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้เชื้อผสม

H. Li, Zhang, Tang, Zhang, & Mao (2014) ศึกษาการล้างสีและล้างสารพิษของสี Azure B โดยใช้แบคทีเรียที่คัดแยกใหม่สายพันธุ์ *Bacillus* sp. MZS10 พบการล้างสีขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเซลล์ โดยล้างสีสูงสุด 93.55% (0.04 g/l) หลังจาก 14 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยงในถังหมักปริมาตร 5 ลิตร โดยมีความเข้มข้นของ yeast extract 2g/l และแป้ง (soluble strach) 6.0 g/l และปริมาณเกลือแร่อีกเล็กน้อย ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการล้างสีถูกวิเคราะห์โดย ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectroscopy (UPLC-MS) โดยกลไกการล้างสี พบพันธะ C=N ในสี Azure B ถูกตัดให้เหลือเพียง –NH โดยเอนไซม์ nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-dependent quinone dehydrogenase และ –NH ทำปฏิกิริยาร่วมกับ –OH ที่ได้จากกลูโคสเป็นสารประกอบที่มีความเสถียร ไม่มีสี ผ่านทางปฏิกิริยา dehydrogenation การทดสอบความเป็นพิษของสี Azure B และสารประกอบย่อยที่ได้ พบว่ามีความเป็นพิษต่ำกว่าสีดั้งเดิม ประสิทธิภาพในการล้างสี และกลไกการล้างสีโดย *Bacillus* sp. MZS10 ทำให้สามารถนำไปประยุกต์ใช้สำหรับการบำบัดทางชีวภาพของสี Azure B ได้ Jadhav, Jadhav, Dawkar, & Govindwar (2008) ศึกษาการใช้เชื้อผสมของ *Galactomyces geotrichum* MTCC 1360 และ *Bacillus* sp. VUS ที่มีความสามารถในการย่อยซัลเฟอร์ที่เป็นองค์ประกอบของสี Brilliant Blue G ในสภาวะที่เหมาะสมพีเอช 9 อุณหภูมิ 50 °C มีแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนคือ malt extract peptone และ beef extract การใช้เชื้อผสมช่วยให้เชื้อมีความสามารถในการทำงานได้ที่อุณหภูมิสูงมีพีเอชในการทำงานกว้างจึงสามารถล้างสีที่อยู่ในน้ำทิ้งของโรงงานทอผ้า สี Brilliant Blue G เป็นตัวกระตุ้นการสร้าง riboflavin reductase และปล่อย 4-ethoxy-phenyl-phenyl-amine และ 3-ethylaminomethyl-benzenesulfonic acid เป็นผลผลิตสุดท้าย เมื่อวิเคราะห์ GC-MS ทำให้ทราบว่าการสร้าง 3-benzenesulfonic acid เกิดจากกิจกรรมของ *Galactomyces geotrichum* MTCC 1360 และ 4-benzylidene-3-methyl-cyclohexa-2,5-dienylidene-methyl-amine จากกิจกรรมของ *Bacillus* sp. VUS และ พบว่า ผลผลิตที่ได้ไม่เป็นพิษต่อ

สิ่งแวดล้อม จากเหตุผลดังกล่าวทำให้การใช้เชื้อผสมมีความเหมาะสมในการนำไปใช้ล้างสี Brilliant Blue G

Patil (2014) ศึกษาการผลิตและการทำเอนไซม์ lignin peroxidase ให้บริสุทธิ์จาก *Bacillus megaterium* มีสภาวะที่เหมาะสมดังนี้ ใช้ลิกนินความเข้มข้น 1.5% เป็นแหล่งคาร์บอน peptone 2% เป็นแหล่งไนโตรเจน pH 7 อุณหภูมิ 37 °C ปริมาตรหัวเชื้อ 6%(v/v) ความเร็วในการเขย่า 180 rpm นำน้ำเลี้ยงเชื้อมาทำบริสุทธิ์โดยใช้ ultra filtration ตกตะกอนโดย ammonium sulfate และ dialysis เช็คความบริสุทธิ์โดย SDS-PAGE และวัดมวลโมเลกุลเท่ากับ 65 kDa นอกจากนี้ *B. megaterium* ยังสามารถกำจัดสี congo red, methylene blue และ malachite green เท่ากับ 94.90%, 63.23%, และ 6.40% ภายใน 96 ชั่วโมงของการบ่ม ซึ่งนำไปประยุกต์ใช้กับกระบวนการในการบำบัดสารมลพิษของน้ำเสียโรงงานเยื่อกระดาษตัวอย่างน้ำเสียสีแดงและตัวอย่างน้ำเสียสีน้ำเงินจากโรงงานทอผ้า ให้ค่าการกำจัดสีเท่ากับ 93.70%, 48.57% และ 31.64% ตามลำดับ ภายในระยะเวลา 96 ชั่วโมงของการบ่ม

การย่อยลิกนินโดยปฏิกิริยาของเอนไซม์

การย่อยลิกนินโดยใช้เอนไซม์ส่วนใหญ่จะใช้เอนไซม์ที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นภายนอกเซลล์ (extracellular enzyme) หลายชนิดร่วมกัน ซึ่งจะเร่งปฏิกิริยาโดยอาศัยค่ารีดอกซ์ที่แตกต่างกัน โดยมีเอนไซม์หลายกลุ่ม เอนไซม์พื้นฐานที่ย่อยลิกนินอยู่ในกลุ่ม peroxidase และ laccase ทำให้ได้อนุมูลอิสระ ซึ่งถูกออกซิไดซ์ต่อโดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

เอนไซม์บริสุทธิ์

ลิกนินเป็นโพลิเมอร์ธรรมชาติของ phenylpropanoid เชิงซ้อนหลายชนิดประกอบด้วยชีวมวลโดยประมาณ 25 - 30% ของพืช ลิกนินยากต่อการทำลายโดยจุลินทรีย์ภายใต้ภาวะธรรมชาติ เชื้อราขาวทำลายไม้เป็นที่ทราบกันดีว่ามีความสามารถในการย่อยลิกนินของชิ้นไม้ ข้าวสาลี และตะเกียบไม้ไผ่ การตรวจหาการย่อยลิกโนเซลลูโลสและลิกนินดำเนินการโดยการวิเคราะห์การเจริญบนอาหารที่มีลิกนินเป็นแหล่งคาร์บอน สารที่มีโครงสร้างคล้ายลิกนิน เช่น สี ถูกนำมาใช้ในการศึกษา เนื่องจากโครงสร้างของสีปราศจากการปนเปื้อนของโพลีแซคคาร์ไรด์ จึงถูกนำมาใช้ในการคัดแยกเชื้อทำให้สีเจือจาง ทำให้ทราบถึงศักยภาพในการย่อยสารที่มีโครงสร้างคล้ายลิกนินโพลิเมอร์ นำมาสู่การวัดกิจกรรมการย่อยสลายลิกนินโดยเอนไซม์ที่แบคทีเรียสร้างขึ้น

การย่อยลิกนินต้องใช้เอนไซม์ภายนอกเซลล์และไม่จำเพาะเจาะจงเนื่องจากโครงร่างสุ่มและมีน้ำหนักมวลโมเลกุลสูง โดยเอนไซม์จำพวก lignolytic enzyme จะตัดพันธะจำเพาะได้อย่างหลากหลาย ซึ่งแต่ละเอนไซม์จะมีความแม่นยำในการตัดพันธะเคมีที่หลากหลายทำให้ยากต่อการตัดที่จำเพาะที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ แต่ละเอนไซม์จึงมีความจำเพาะเจาะจงต่อบริเวณเร่งที่แตกต่างกัน เอนไซม์สำหรับการย่อยลิกนิน ได้แก่ lignin peroxidase (LiP) manganese peroxidase (MnP) และ laccase (LAC) เชื้อราและแบคทีเรียมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์เหล่านี้ หรือสร้างตัวใดตัวหนึ่ง หรือทั้งสองตัวก็เป็นได้

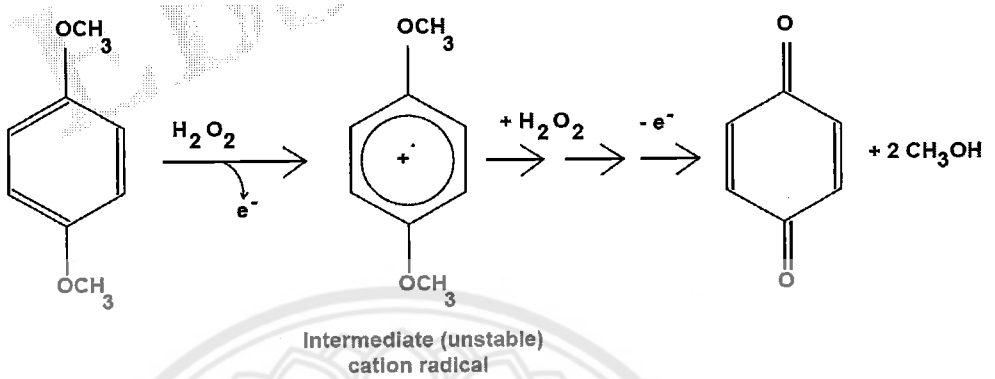
รายงานวิจัยไม่มากนักที่รายงานการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ทั้ง 3 ตัวนี้ ในระหว่างการย่อยเศษเหลือทิ้งลิกโนเซลลูโลสในธรรมชาติ เอนไซม์ ligninperoxidase (EC1.11.1.14) เป็นไกลโคโปรตีนขนาด 38 - 46 kDa ประกอบด้วย 1 โมล ของ iron protoporphyrin IX ต่อ 1 โมลของโปรตีน เร่งการย่อยลิกนินโดยต้องอาศัยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ปฏิกิริยาแสดงดังนี้

1,2-bis(3,4-dimethoxyphenyl)propane-1,3-diol+H_2O_2↔3,4-dimethoxybenzaldehyde+1-(3,4-dimethoxyphenyl)ethane-1,2-diol+H_2O (1) (Pollegioni, Tonin, & Rosini, 2015)

Lignin peroxidase (LiP) (ligninase ; EC 1.11.1.14) เร่งปฏิกิริยาการตัดหรือปฏิกิริยาออกซิเดชั่นที่ต้องมีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ของสารประกอบลิกนิน ได้แก่ non-phenolic lignin model compound, β-O-4-linked lignin model compound, other methoxybenzenes, aromatic ring cleavages และ C_α-C_β cleavages เอนไซม์ LiP พบได้ในแบคทีเรียเชื้อราพืชและสัตว์ เป็นเอนไซม์ peroxidase ที่มี heme และทำงานภายนอกเซลล์ ซึ่งต้องอาศัย H_2O_2 มีค่า redox potential สูง น้ำหนักโมเลกุลต่ำ (18 KDa) จะจำเพาะต่อซับเตรทและย่อยสารประกอบลิกนินได้อย่างหลากหลาย ซึ่งโปรตีนหรือเอนไซม์ที่มี heme นี้จะง่ายต่อการยับยั้งโดยตัวยับยั้งฮีม (heme inhibitor) เช่น potassium cyanide และ sodium azide เมื่อพิจารณาความเหมือนของลำดับยีนและความหลากหลายของโครงสร้างประกอบไปด้วยคลาสหลักๆ 3 คลาส ได้แก่ mitochondrial yeast cytochrome c peroxidase, chloroplast และ cytosol ascorbate peroxidase และยีน ได้แก่ bacterial peroxidase (class I), secretory fungal peroxidase (classII) และ classical, secretory plant peroxidase (III)

เอนไซม์ LiP ออกซิไดซ์ซับเตรทที่บริเวณกลางวงแหวนอะโรเมติก โดยขั้นตอนอิเล็กตรอนออกซิเดชั่น 1 อิเล็กตรอน และอีก 1 อิเล็กตรอน ตามลำดับ ด้วยการสร้างอนุมูลอิสระที่เป็นตัวกลาง

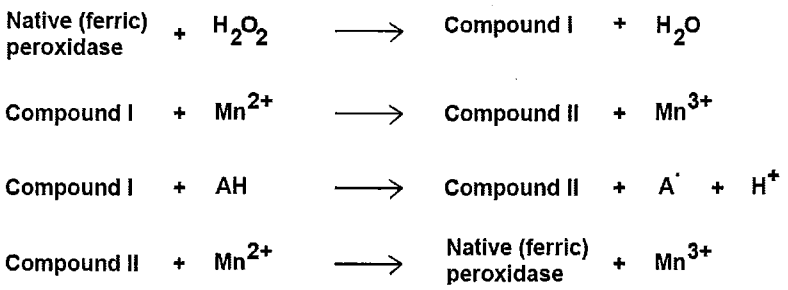
ซึ่งไม่เสถียรโดยอนุมูลอิสระนี้จะเกิดปฏิกิริยาต่อไป ซึ่งไม่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ โดยจะตัดพันธะ Cβ – Cβในโมเลกุลของลิกนินและสามารถแตกวงแหวนอะโรเมติกและปฏิกิริยาอื่นๆ แสดงดังรูป



ภาพ 8 กลไกการทำงานของ lignin peroxidase

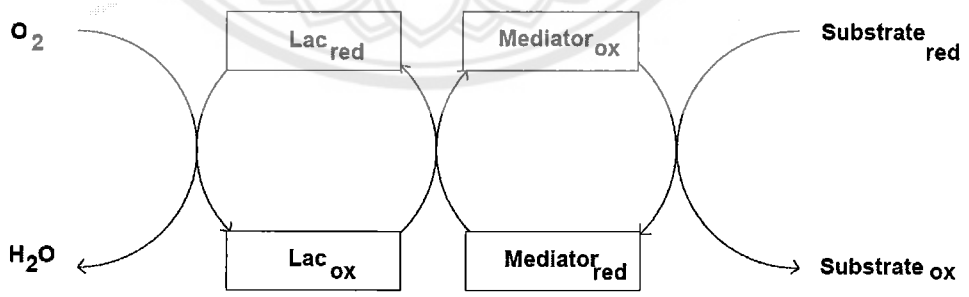
ส่วน Manganese peroxidase (MnP) (EC 1.11.1.13) เป็น glycosylated heme protein มีคุณสมบัติทั้ง oxidase และ peroxidase ซึ่งไม่เพียงแต่เร่ง lignin และ phenolic model compounds แต่ยังเร่ง non phenolic model compounds ที่มีในสารประกอบ polycyclic aromatic hydrocarbons เอนไซม์ MnP เป็น peroxidase ที่มี heme มีมวลโมเลกุลสูง (32 และ 62.5 kDa) มีหลายรูปร่าง อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อภายนอกเซลล์โดยเฉพาะ white rot fungi แมงกานีส (Mn) ออกซิไดส์ซับเตรท โดยได้อิเล็กตรอน 1 ตัวอย่างต่อเนื่องด้วยการสร้างอนุมูลอิสระที่ไม่เสถียร MnP ต้องการ H_2O_2เป็นโคซับเตรทและออกซิไดซ์ Mn^{2+}ที่พบในเนื้อไม้เป็น Mn^{3+} โดย Mn^{3+}ที่ได้มีปฏิกิริยาสูง ซึ่งจะไปเกาะติดกับกรดอินทรีย์ ทำให้ได้สารเบื้องต้นในปฏิกิริยาการย่อยลิกนินของอนุมูลอิสระที่ไม่เสถียร ทำให้เกิดการย่อยอย่างต่อเนื่อง

สารตัวกลางที่เกิดจากการทำงานของ MnP เรียก Compound I ซึ่งถูกรีดิวซ์โดย Mn^{2+} และฟีนอล ได้เป็น compound II จากนั้น compound II จะกลับเข้าสู่สภาวะพัก โดย Mn^{2+} ดังนั้น Mn^{2+} จึงมีความจำเป็นต่อการย่อยที่สมบูรณ์ลักษณะผลึกของ MnP คล้ายคลึงกับ LiP บริเวณเร่งจะมี His ligand ที่สร้างพันธะไฮโดรเจนกับ Asp และ peroxide ประกอบไปด้วยบริเวณเร่งจะมี His และ Arg โดยตำแหน่งของแมงกานีสที่เกาะคือ Asp-179, Glu-35, Glu-39 และ propionate ที่มีฮีม



ภาพ 9 กลไกการทำงานของ Manganese Peroxidase

Laccases (LAC) (*p*-benzenediol: oxygen oxidoreductase EC 1.10.3.2) มีซับเตรทที่จำเพาะเจาะจงหลายชนิดและสามารถออกซิไดซ์ phenol และ polyphenols หลายชนิด มีบทบาทสำคัญในการล้างสีของโรงงานย้อมผ้าและการบำบัดสารพิษ สามารถพบ laccase ในแบคทีเรียที่ทนอุณหภูมิสูงและมีพีเอชเป็นด่าง ได้แก่ *B. halodurans*, *B. subtilis* SF, *Bacillus* sp. HR03, *Azospirillum lipoferum*, *P. desmolyticum* NCIM 2112, *B. pumilus*, *B. subtilis* WP1 และ *P. putida* ตามลำดับ (Narayanan P. Muthukumarasamy, & Murugan, 2014) ในขณะที่ laccases จากเชื้อราจะหยุดเร่งปฏิกิริยาอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิสูงและพีเอชเป็นด่าง เอนไซม์ LAC เป็น multicopper oxidase ประกอบด้วย ascorbate oxidase, ceruloplasmin และ bilirubin oxidases เอนไซม์ Lac จะเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของสารประกอบอะโรเมติกหลายชนิด โดยเฉพาะฟีนอล (phenol) โดยการดึงออกซิเจนออกให้ได้น้ำ



ภาพ 10 กลไกการทำงานของ laccases

อะตอมคอปเปอร์ (4 อะตอม) มีบทบาทสำคัญในกลไกการเร่งปฏิกิริยาทำให้เอนไซม์ LAC เป็นโมเลกุลขนาดใหญ่ (MW 70 kDa) จึงไม่สามารถแทรกซึมผ่านไปยังเนื้อไม้ได้ เนื่องจากค่า

redox potential ต่ำ (0.5 – 0.8 V) ถ้าค่า>1.5V ทำให้สามารถออกซิไดซ์ลิกนินที่มีพันธะ C-4-ether หรือ non-phenolic lignin ได้ ดังนั้นสารตั้งต้นในการทำปฏิกิริยาออกซิเดชั่นจะเป็นโมเลกุลขนาดเล็กสารประกอบอินทรีย์และอนินทรีย์หลายชนิด เช่น thiol และ phenol aromatic derivatives

ปัจจัยที่มีผลต่อปฏิกิริยาของเอนไซม์

Oliveira et al. (2009a) ศึกษาการทำเอนไซม์ manganese peroxidase (MnP) ให้บริสุทธิ์โดยศึกษาตัวเหนี่ยวนำ (inducers) ได้แก่ indulin AT, guaiacol, veratryl alcohol, lignosulfonic acid และ lignosulfonic acid desulfonated พบว่า Indulin AT ช่วยเพิ่มกิจกรรมเอนไซม์ MnP จาก *Bacillus pumilus* มากถึง 31.66 U/l หลังจาก 8 ชั่วโมง แต่ไม่มีผลต่อ *Paenibacillus* sp. ซึ่งให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดที่ 20 ชั่วโมง เท่ากับ 12.22 U/l นำเอนไซม์ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ใน phenyl sepharose resin พบว่ามีเพียง MnP จาก *B. pumilus* ยังคงมีกิจกรรมของเอนไซม์ โดยกิจกรรมเอนไซม์บริสุทธิ์สูงสุดของ *B. pumilus* และ *Paenibacillus* sp. เท่ากับ 4.3 U/l, pH 8.0, 25 °C และ 11.74 U/l pH 9.0 อุณหภูมิ 35 °C ตามลำดับ หามวลโมลาร์โดย SDS-PAGE เท่ากับ 25 kDa และ 40 kDa ตามลำดับ

Sondhi, Sharma, Saini, Puri, & Gupta (2014) ศึกษาการทำบริสุทธิ์และระบุลักษณะเอนไซม์ภายนอกเซลล์ laccase (SN4LAC) คุณสมบัติเด่น คือ เสถียรที่พีเอชเป็นด่าง และที่อุณหภูมิสูงจาก *Bacillus tequilensis* SN4 มีน้ำหนักโมเลกุล 32 KDa มีกิจกรรมในการย่อยซับเสตรทที่เป็นฟีนอลและไม่ใช่ฟีนอลอย่างหลากหลาย (phenolic and non-phenolic substrates) เอนไซม์ SN4LAC เร่งปฏิกิริยาที่อุณหภูมิสูง โดยมีอุณหภูมิที่เหมาะสม 85 °C และยังคงรักษาความมีกิจกรรมของเอนไซม์ไว้มากกว่า 80% ที่ 70 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พีเอชที่เหมาะสมของกิจกรรมการเร่งปฏิกิริยา 2, 6-dimethoxyphenol, 2, 2'-azino bis[3-ethylbenzthiazoline-6- sulfonate], syringaldazine และ guaiacol เท่ากับ 8.0, 5.5, 6.5, และ 8.0 ตามลำดับ กิจกรรมของเอนไซม์ถูกส่งเสริมได้โดยตัวเหนี่ยวนำ ได้แก่ Cu^{2+}, Co^{2+}, SDS และ CTAB ในขณะเดียวกันให้ค่ากิจกรรมความเสถียรเมื่อมีสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีหมู่เฮโลเจน (halogens) ไอออนโลหะ และสารลดแรงตึงผิว ตัวยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ ได้แก่ sodium azide cysteine, dithiothreitol และ β-mercaptoethanol ดังนั้นเอนไซม์ SN4LAC มีความเสถียรในการเร่งปฏิกิริยาในสภาวะที่รุนแรง (extreme condition) เช่น ที่อุณหภูมิสูง พีเอชสูง มีไอออนโลหะหนัก มีสารประกอบไฮโดรคาร์บอนและสารทำละลาย จึงเป็นเอนไซม์ที่มีความน่าสนใจในการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม

รูปแบบของการใช้งานเอนไซม์

ปัจจุบันเอนไซม์ย่อยลิกโนเซลลูโลสถูกนำไปประยุกต์ใช้ในหลายๆ อุตสาหกรรม เช่น อุตสาหกรรมทอผ้า เครื่องสำอาง โรงงานกระดาษและเยื่อกระดาษ และยังมีการใช้เอนไซม์เหล่านี้ในการลดสารพิษและลดสีของน้ำทิ้ง การย่อยยา ยาฆ่าแมลง หรือสารก่อมะเร็ง เป็นต้น ซึ่งเป็นการบำบัดสารมลพิษทางชีวภาพ การสังเคราะห์สารประกอบอินทรีย์ การผลิตกาวติดเนื้อไม้ ตัวชี้วัดคุณภาพทางชีวภาพ และ ขั้วรับส่งไฟฟ้าในอุตสาหกรรมพลังงานชีวภาพ

Laccases ถูกนำไปประยุกต์ใช้เพื่อรักษาความเสถียรในอุตสาหกรรมเบียร์ ไวน์ น้ำผลไม้ เจลาติน ตัวชี้วัดทางชีวภาพ การอบขนมปัง และอื่นๆ (Minussi et al., 2002) ในอุตสาหกรรมการทอผ้า laccase ถูกใช้ในการตกแต่งผ้าตามสูตรทางการค้า (denim finishing) นอกจากนี้ยังนำ laccase และ peroxidase ไปใช้ย่อยสีย้อมในน้ำเสียที่ได้หลังจากการทอผ้า หรือมีการนำเอนไซม์แลคเคสไปใช้ในการรักษาหรือใช้เป็นผลิตภัณฑ์บำรุงส่วนบุคคลเช่น เป็นส่วนผสมของสีย้อมผม น้ำยาดับกลิ่นกาย ใช้เป็นส่วนผสมของยาต้านมะเร็ง หรือแม้กระทั่งส่วนผสมในเครื่องสำอาง (Kunamneni et al., 2008)

อุตสาหกรรมกระดาษและเยื่อกระดาษเป็นอุตสาหกรรมหลักที่จะใช้เอนไซม์ย่อยลิกนิน เนื่องจากมีขั้นตอนการผลิตหลายกระบวนการ เช่น การปรับสภาพไม้หรือชิ้นไม้ก่อนการต้มเยื่อหรือที่นิยมเรียกว่า biopulping จะช่วยพัฒนาคุณภาพของผลิตภัณฑ์สุดท้ายและลดการใช้พลังงานในขั้นตอนต้มเยื่อ (Singh et al., 2010) น้ำทิ้งที่ได้จากกระบวนการต้มเยื่อถูกย่อยได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยใช้เอนไซม์ laccase และขั้นตอนการฟอกเยื่อกระดาษด้วยเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติย่อยลิกนิน หรือ biobleaching การนำเอนไซม์ peroxidase และ laccases ที่มีศักยภาพไปใช้อย่างกว้างขวางในช่วงทศวรรษที่ผ่านมานำไปสู่การวิจัยกันอย่างแพร่หลาย แต่ยังมีบางข้อจำกัด เช่น ปัญหาด้านการผลิตเอนไซม์ในปริมาณมาก พบว่าการผลิต peroxidase ในปริมาณมากยังไม่ประสบผลสำเร็จเนื่องจากให้ผลผลิตต่ำ ส่วน laccases มีการนำมาใช้ในทางการค้าใน heterologous expression systems แต่ให้ค่าศักย์รีดักชันไฟฟ้าต่ำ จากปัญหาการใช้เอนไซม์บริสุทธิ์โดยตรงทำให้มีการวิจัยการใช้เซลล์จุลินทรีย์ทางชีวภาพมากขึ้น

การย่อยสลายลิกนินด้วยจุลินทรีย์

น้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษถ้าถูกปล่อยลงสู่แหล่งน้ำเป็นผลกระทบในเชิงลบต่อสังคมและสิ่งแวดล้อม เนื่องจากปริมาณวัตถุอินทรีย์และอนินทรีย์ที่มากเกินจะกระตุ้นให้เกิดปรากฏการณ์ยูโทรฟิเคชั่น (eutrophication) องค์ประกอบของลิกโนซัลโฟเนตจะไปยับยั้งแพลงตอนสาหร่ายและพืช โดยไปลดการผ่านของแสงลงสู่แหล่งน้ำ นอกจากนี้ในหลายประเทศ

ที่กำลังพัฒนา เช่น อินเดียไม่มีระบบการซลประทาน เกษตรกรจึงปลูกพืชด้วยน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม ซึ่งมีระดับของโลหะหนักอยู่สูง ทำให้เกิดผลเสียต่อสุขภาพของมนุษย์ผ่านทางห่วงโซ่อาหาร ดังนั้นวิธีการบำบัดน้ำเสียทางกายภาพและเคมีหลายวิธีจึงถูกนำมาใช้ แต่มีน้อยวิธีที่จะได้ผลที่น่าพึงพอใจ วิธีการบำบัดน้ำทิ้งที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมวิธีหนึ่ง คือ วิธีทางชีวภาพ โดยการใช้เชื้อราขาวทำลายไม้เนื่องจากมีระบบเอนไซม์ย่อยลิกนินภายนอกเซลล์ที่ไม่จำเพาะ Daljit Singh Arora, Chander, & Gill (2002) ใช้เชื้อรา (*Daedalea flavida* และ *Phlebia* spp) ศึกษาศักยภาพการย่อยฟางข้าวสาลีเพื่อเปรียบเทียบกับเชื้อราอ้างอิง (*Phanerochaete chrysosporium*) พบว่าเชื้อราทั้งสองสปีชีร์ สามารถย่อยลิกนินอย่างจำเพาะและมีความเป็นไปได้ในการนำไปประยุกต์ใช้มากกว่าเชื้อราอ้างอิง โดย *Phlebiaradiate* และ *P. floridensis* สามารถสร้างเอนไซม์ manganese peroxidase และ laccase ได้ดีที่สุด ตามลำดับ ในขณะที่ *P. chrysosporium* สร้างเอนไซม์ lignin peroxidase ได้ดี

อย่างไรก็ตามแบคทีเรียมีประสิทธิภาพในการบำบัดมลพิษมากกว่าเชื้อรา เนื่องจากแบคทีเรียมีการปรับตัวต่อสิ่งแวดล้อมและปฏิกิริยาทางชีวเคมีที่หลากหลาย กากลิกนิน จากโรงงานเยื่อกระดาษ อนุพันธ์สารประกอบคลอโรฟีนอล และลิกนินที่เชื่อมอยู่กับคลอรีน (chlorinated lignin) เป็นสารพิษหลักที่พบในน้ำทิ้งโรงงานกระดาษ ซึ่งเป็นพิษสูงและคงทนอยู่ในดินและน้ำได้นานเป็นผลเสียต่อสัตว์ประจำถิ่น พบว่าเชื้อราสามารถลดสีและลดสารประกอบลิกนินได้แต่ไม่มีประสิทธิภาพในการลด chloro-organics ในขณะที่แบคทีเรียถูกรายงานว่าสามารถใช้สารลิกโนเซลลูโลสและลดปริมาณ chloro-organics ของน้ำทิ้งเยื่อกระดาษได้ เช่น *Aeromonas* (Gupta et al., 2001), *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas* (Vora, Singh, & Modi, 1988) และ *Xanthomonas* นอกจากนี้แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากปุ๋ย เช่น *Azotobacter* และ *Serratia marcescens* สามารถย่อยและลดสีลิกนินได้ สอดคล้องกับ *Paenibacillus* sp. *Aneurinibacillus aneurinilyticus* และ *Bacillus* sp. ที่มีรายงานถึงความสามารถในการลดลิกนินสังเคราะห์ ซึ่งแยกได้จากตะกอนเยื่อกระดาษ (Chandra, Raj, Purohit, & Kapley, 2007; Raj, Krishna Reddy, & Chandra, 2007a) อย่างไรก็ตามในทุกการศึกษาข้างต้นดำเนินการโดยใช้สารประกอบสังเคราะห์ ซึ่งไม่ได้อธิบายถึงกระบวนการย่อย Kraft lignin ที่พบในน้ำทิ้งของโรงงานเยื่อกระดาษเนื่องจากมีมลพิษร่วมหลายชนิด การย่อยลิกนินโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์แต่ในธรรมชาติอยู่ร่วมกันแบบเชื้อผสม เนื่องจากสารอาหารหรือสารประกอบมีอยู่หลากหลายชนิด บทบาทของการใช้เชื้อผสมสำหรับการย่อยสารมลพิษในธรรมชาติในงานของ Yadav, & Chandra (2015) รายงานการใช้เชื้อผสมระหว่าง *B. subtilis* และ *Klebsiella pneumonia* สำหรับการย่อยน้ำทิ้ง Kraft lignin จากโรงงานอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษเกรดสังเคราะห์ พบการใช้เชื้อผสมมีประสิทธิภาพดีกว่าการใช้เชื้อเดี่ยวให้ประสิทธิภาพ

การลดสีเท่ากับ 80% และลดค่ามลพิษ COD และ BOD เท่ากับ 73% และ 62%บ่งชี้ถึงการส่งเสริมการเจริญร่วมกันมากกว่าที่จะมีผลยับยั้ง

ชนิดของจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายลิกนิน

ลิกนินเป็นโพลิเมอร์อะโรมาติกเชิงซ้อนประกอบไปด้วยหน่วย phenylpropanoid aryl-C3 เชื่อมต่อกันด้วยพันธะอีเทอร์และคาร์บอน ลิกนินมีน้ำหนักแห้งอยู่ประมาณร้อยละ 15 – 30 % ในลิกโนเซลลูโลส ซึ่งเป็นโครงสร้างเชิงซ้อนคล้ายกับเส้นใยเซลลูโลสและสร้างพันธะโควาเลนท์กับเฮมิเซลลูโลส ลิกนินถูกสร้างขึ้นมาจากการเรียงต่อกันของอนุมูลอิสระของ guaiacyl (G) units จากสารตัวกลาง coniferyl alcohol, syringyl (S) units จากสารตัวกลาง sinapyl alcohol และ p-hydroxy phenyl (H) units จากสารตัวกลาง p-coumaryl alcohol ในอัตราส่วน G:S:H ที่แตกต่างกันตามแต่ละสปีชีร์โดยไม้เนื้ออ่อนส่วนใหญ่ประกอบด้วย G type lignin ในขณะที่ไม้เนื้อแข็งโดยทั่วไป GS type lignins คือการผสมของ guaiacyl (G) units และ syringyl (S) units ส่วนลิกนินในหญ้าจะมีองค์ประกอบ G type lignin ที่มีสัดส่วนของ H units สูงกว่า ซึ่งพันธะส่วนใหญ่ คือ β-aryl ether ประกอบด้วยพันธะอีเทอร์ต่ออยู่กับ aryl unit ที่ C-2 ของสายโซ่ C3 พบร้อยละ 45-50% ในไม้เนื้ออ่อน และ 60% ในไม้เนื้อแข็ง การเชื่อมพันธะในไม้เนื้ออ่อนส่วนใหญ่เป็นการเชื่อมด้วยพันธะ biphenyl linkage ที่มีพันธะ aryl-aryl C-C ซึ่งพบในไม้เนื้ออ่อนร้อยละ 20-25% แต่พบในไม้เนื้อแข็งเพียง 3-9% พันธะ diaryl propane ที่มีพันธะ C-C ที่ตำแหน่ง C2 ของสายโซ่ C3 กับวงแหวน aryl ring ลำดับที่ 2 ในขณะที่ diaryl ether ประกอบด้วยพันธะ ether ที่อยู่ระหว่างวงแหวน aryl ring ทั้งสอง

การนำเชื้อราขาวทำลายไม้สกุล basidiomycetes มาใช้ในการย่อยลิกนิน เนื่องจากเป็นจุลินทรีย์ที่มีความสามารถย่อยลิกนินในธรรมชาติได้ เชื้อรานี้สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยลิกนินได้หลายชนิด เช่น laccase, lignin peroxidase และ manganese peroxidase โดยเอนไซม์เหล่านี้ต้องการโคแฟกเตอร์หรือ mediators ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ได้แก่ manganese organic acids, veratryl alcohol และ สารอะโรมาติกอื่นๆ (substituted aromatics) (4-hydroxybenzyl alcohol, aniline, 4-hydroxybenzoic acid) ซึ่งสารตัวกลางเหล่านี้ทำหน้าที่เป็นตัวออกซิเดนซ์ที่แท้จริงในปฏิกิริยาการย่อยลิกนิน และสามารถแทรกเข้าไปยังชั้นของลิกโนเซลลูโลสที่มีขนาดจำกัด การย่อยลิกนินโดยเชื้อราให้สารประกอบอะโรมาติกที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำหลายชนิด เช่น guaiacol, coniferyl alcohol, *p*-coumarate, ferulate, protocatechuate, *p*-hydroxybenzoate และ vanillate แบคทีเรียย่อยลิกนินมีอยู่หลายชนิด เช่น ในกลุ่ม α-proteobacteria; *Sphingomonas* sp.,

γ-proteobacteria; *Pseudomanas* sp. และ actinomycetes; *Rhodococcus*, *Norcardia* และ *Streptomyces* sp. นอกจากเอนไซม์ที่ได้กล่าวไปแล้วยังมี laccases, glutathione S-transferase, ring cleaving dioxygenases, monooxygenase และ phenol oxidases โดยจะมีส่วนร่วมในการย่อยสาร polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายคลึงและทนทานต่อการย่อยสลายเช่นเดียวกับลิกนิน ดังนั้นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยลิกนินยังคงมีการค้นหาและเอนไซม์ย่อยลิกนินชนิดใหม่อีกหลายชนิดยังคงรอการค้นพบ ซึ่งเอนไซม์จากแบคทีเรียเหล่านี้มีคุณสมบัติดีกว่าเอนไซม์ที่ได้จากเชื้อราในด้านความจำเพาะเจาะจง (specificity) สามารถทำงานได้ที่อุณหภูมิสูง (thermostability) และอาศัยตัวกลาง (mediator dependency) ซึ่งมีประโยชน์ที่จำเพาะสำหรับการย่อยหรือการดัดแปลงลิกนินเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษหรือการผลิตสารเคมีที่สามารถใช้ในอุตสาหกรรมพลังงานหรือสารเคมีพื้นฐานในขั้นต่อจากการย่อยลิกนิน

เชื้อราถือว่ามีการย่อยลิกนินได้รวดเร็วและรุนแรงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ชนิดอื่น (Dix, & Webster, 1995) สกุลของเชื้อราที่ย่อยลิกนิน คือ basidiomycetes และ ascomycetes โดยจำพวกที่ย่อยไม้เช่น brown and white rot fungi ที่มีการย่อยลิกนินได้สมบูรณ์ให้อัตราการย่อยสูงสุดและมีการศึกษากันอย่างแพร่หลาย โดยเชื้อราในสกุล basidiomycetes จะย่อยลิกนินในไม้, ธัญพืช และหญ้าได้ดีกว่าสกุล ascomycetes เชื้อราที่มีกิจกรรมการย่อยลิกนิน ได้แก่ *Cariolus pruinosum*, *Cereporiopsis subvermispora*, *Cyathus bulleri*, *C. stercoreus*, *Dichomitus squalens*, *Lentinus edodes*, *Oudemansiella radicata*, *Panus tigrinus*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Phlebia radiate*, *P. tremellosus*, *P. ochraceofulva*, *Pleurotus ostreatus*, *P. eryngii*, *P. sajorcaju*, *P. florida*, *Polyporus pletenis*, *P. brumalis*, *Pycnosporus sanguineus*, *P. cinnabarinus*, *Rigidosporus lignisus*, *Sporotrichium thermophile* , *Tremetes versicolor* เป็นต้น พบว่า ซับเตรทที่เชื้อราเหล่านี้ใช้ในการเจริญคือเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส แต่การย่อยลิกนินจะเกิดที่ช่วงท้ายของการเจริญโดยเป็นกระบวนการเมตาบอลิซึมในสภาวะขาดแคลนสารอาหาร เช่น ไนโตรเจน คาร์บอนหรือซัลเฟอร์ เชื้อราจะย่อยลิกนินโดยกระบวนการออกซิเดชั่นและไม่จำเพาะ ซึ่งช่วยลดปริมาณหมู่เมทิล ฟีนอล และ อัลลิฟาติก ที่เป็นองค์ประกอบของลิกนิน โดยการตัดวงแหวนอะโรเมติกและสร้างหมู่คาร์บอนิล จากการวิเคราะห์การย่อยไม้โดยเชื้อราพบว่าการย่อยเกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชั่นอย่างรุนแรงพร้อมกับการสร้างหมู่คาร์บอกซิลจำนวนมาก การเปลี่ยนแปลงนี้ทำให้เกิดการย่อยลิกนิน และสร้างคาร์บอนไดออกไซด์ นอกจากนี้ออกซิเจนจะกระตุ้นการย่อยลิกนินโดยเชื้อรา ทำให้สามารถทำลาย

ลิกนินได้ร้อยละ 75 ของลิกนินทั้งหมด โดยสปีชีส์หลักๆ ที่เจริญบนไม้เนื้อแข็ง เช่น *Heterobasidion annosum*, *Phellinus pini* และ *Phlebia radiate*

เชื้อราจำพวก brown rot fungi ย่อยเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสจากไม้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ พร้อมด้วยกลไกการย่อยซึ่งจะแตกต่างจากจุลินทรีย์อื่นเนื่องจากเป็นปฏิกิริยาที่ไม่ได้เกิดจากเอนไซม์และไม่มี exoglucanases การมีลิกนินอยู่ในเนื้อไม้จะกระตุ้นให้เชื้อราย่อยเซลลูโลส แม้ว่าลิกนินถูกย่อยในปริมาณที่น้อยกว่า การย่อยหลักๆ เกิดจากการดึงหมู่เมทิลและย่อยผนังเชื่อมยึดระหว่างเซลล์พืช (middle lamella) กิจกรรมการดึงหมู่เมทิลออกของลิกนินทำให้เชื้อราเข้าถึงเนื้อไม้ได้ โดย *P. ostreiformis* สร้าง manganese peroxidase (MnP) และ lignin peroxidase (LiP) ซึ่งคล้ายกับ white rot fungi แต่ความสามารถในการย่อยลิกนินของ brown rot fungi จะต่ำกว่าไม้ที่ถูกย่อยโดย brown rot fungi จะเป็นการดัดแปลงโครงสร้างของลิกนินมากกว่าการย่อยลิกนิน ทำให้เกิดเศษซากสีน้ำตาลในปริมาณมากซึ่งจะคงค้างอยู่ในป่าไปเป็นระยะเวลานานโดยไม่มีการย่อยต่อ เนื่องจากเป็นลิกนินที่เกิดปฏิกิริยาได้ยากกว่าลิกนินธรรมชาติ เชื้อราจำพวก brown rot fungi เจริญบนไม้เนื้ออ่อนได้ดีกว่าไม้เนื้อแข็ง โดยเฉพาะบริเวณผิวดินด้านบนในป่าสน

เชื้อราจำพวก gasteromycete ที่ชื่อ *Cyathus stercoreus* มีความสามารถในการย่อยลิกนินในฟางข้าวสาลี และมีบางสปีชีร์ที่ย่อยลิกนินในหญ้า แต่สกุล *Nidula* และ *Crucibulum* ไม่มีความสามารถนี้ เชื้อราจำพวก Ectomycorrhizal fungi ได้แก่ *Cenococcum* , *Amanita*, *Tricholoma* และ *Rhizopogon* มีความสามารถในการย่อยลิกนินและลิกนินจากข้าวโพดได้ต่ำ เชื้อราในกลุ่ม Ascomycetes ได้แก่ *Xylaria hypoxylon*, *X. polymorpha*, *Ustulina vulgaris* เคยถูกรายงานว่ามีความสามารถในการย่อยลิกนิน

ในดินและในปุ๋ยเชื้อราจำพวก soft rot fungi เป็นเชื้อราย่อยลิกนินที่สำคัญที่สุด ได้แก่ *Chaetomium globosum*, *Daldinia concentrica*, *Lecythophora cellulolyticum*, *Fusarium oxysporum*, *Neurospora crassa*, *Penicillium pinophilum* และ *Pialophora mutabilis* โดยเชื้อราจะเจริญบนพื้นผิวด้านบนของเนื้อไม้ต้องการความชื้นและปริมาณไนโตรเจนสูง โดยจะย่อยไม้ทั้งหมดแต่การย่อยลิกนินจะเกิดขึ้นช้า ซึ่งเกิดผ่านปฏิกิริยาการดึงหมู่เมทิลออกบางส่วน เชื้อราย่อยเซลลูโลสจึงสามารถย่อยหญ้าและลิกนินในไม้ได้อย่างจำกัด อย่างไรก็ตามความสามารถในการย่อยลิกนินของเชื้อราขนาดเล็กยังไม่ชัดเจน เชื้อราจำพวก soft rot fungi ย่อยองค์ประกอบของไม้ได้ทั้งหมด แต่การย่อยลิกนินเป็นไปได้ช้า เช่น *Fusarium oxysporum*, *Xylaria* และ *Alternaria* sp. สร้างเอนไซม์ peroxidase และ *Botrytis cinerea*, *Mycelophthora thermophile*,

Chaetomium thermophilium และ *Paecilomyces farinosus* สามารถสร้างเอนไซม์ laccase กิจกรรมของเอนไซม์ laccase ในเชื้อราจำพวก soft rot fungi มีกิจกรรมต่ำกว่าเชื้อราจำพวก basidiomycetes เชื้อราย่อยลิกนินที่สำคัญที่สุดในขณะหมักปุ๋ย คือ เชื้อราที่ชอบอุณหภูมิสูง ได้แก่ *Thermoascus aurantiacus* และ *Thermomyces lanuginosus*

เอนไซม์เชื้อราจำพวก white rot และ brown rot ที่มีการศึกษากันอย่างมากในเห็ดรา เกี่ยวกับการดัดแปลงและการย่อยลิกนิน จำพวก basidiomycetes ซึ่งหนึ่งในหลากหลายกลไก คือ การโจมตีลิกนิน เชื้อราย่อยไม้จำพวก white rot basidiomycetes มีความสามารถในการย่อยลิกนิน, เฮมิเซลลูโลส และเซลลูโลส พบในเนื้อไม้มีองค์ประกอบของเซลลูโลส ส่วนเชื้อราจำพวก brown rot จะพบในไม้เนื้ออ่อนและพบในไม้ได้เพียงร้อยละ 7 ซึ่งสามารถย่อยเนื้อไม้ได้หลังจากทำการดัดแปลงลิกนินบางส่วน ทำให้ในชิ้นไม้สีน้ำตาลประกอบไปด้วยลิกนินที่ถูกออกซิไดซ์ ซึ่งเป็นแหล่งของสารประกอบอะโรเมติก

เอนไซม์ extracellular fungal lignin และ Mn peroxidase เชื้อราจำพวก white rot สร้างเอนไซม์ภายนอกเซลล์ได้หลายประเภท (oxidoreductase) ย่อยลิกนินที่เป็นองค์ประกอบผนังเซลล์พืช ได้แก่ laccases และ lignilytic peroxidase (lignin peroxidase, manganese peroxidase และ versatile peroxidase) เอนไซม์ lignin peroxidase และ manganese peroxidase ถูกพบเมื่อกลางปี 1980 โดย *Phanerochate chrysosporium* ซึ่งย่อยหน่วยของลิกนินที่ไม่มีองค์ประกอบที่เป็นฟีนอล (มีร้อยละมากกว่า 90% ของโพลิเมอร์) ในขณะที่ MnP จะสร้าง Mn^{3+} ที่เป็นตัวออกซิไดซ์ที่หน่วยฟีนอลและไม่ใช่ฟีนอลของลิกนินโดยปฏิกิริยา lipid peroxidation เอนไซม์ versatile peroxidase (VP) พบได้ใน *Pleurotus* และเชื้อราอื่นๆ ซึ่งเป็นเอนไซม์ Peroxidase ที่เกิดจากการรวมกันของ Lip, MnP และ peroxidase จากพืชและจุลินทรีย์ วัฏจักรการเร่งปฏิกิริยาของ LiP และ MnP มีความคล้ายคลึงกับเอนไซม์ peroxidase อื่นๆ ซึ่งในระหว่างระยะพักจะมี ferric heme ทำปฏิกิริยากับ H_2O_2 เพื่อสร้าง compound I oxo-ferryl intermediate (two-electron oxidized form) และสารประกอบ compound II intermediate (one-electron oxidized form) แสดงดังสมการ

(1)..... Ferriperoxidase + H_2O_2 → Compound I + H_2O

(2)..... Compound I + AH_2 → Compound II + AH

(3)..... Compound II + AH_2 → Ferriperoxidase + AH + H_2O

การเร่งปฏิกิริยาของ MnP คล้ายคลึงกับการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ peroxidase อื่นๆ เช่น horseradish peroxidase (HRP) และ lignin peroxidase รวมถึงปฏิกิริยาของ ferric enzyme ที่สร้างสารประกอบ I (Compound I) จาก H_2O_2 ซึ่งทำปฏิกิริยากับ Mn^{2+} สร้าง Compound II และ Mn^{3+} โดยที่บริเวณเร่งจะมี proximal histidine ligand (His 173) สร้างพันธะไฮโดรเจนกับกรด aspartic acid (Asp-242) และ His46 ซึ่งจะให้โปรตอนเพื่อสร้าง compound I และ Arg 42

Singhal, & Thakur (2009) ศึกษาการบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพโดยการคัดแยกเชื้อรา 4 สายพันธุ์ จากตะกอนของโรงงานเยื่อกระดาษและกระดาษโดยใช้ MSM-effluent medium ประกอบด้วย (g/l) $Na_2HPO_4.2H_2O$, 7.8; KH_2PO_4, 6.8; $MgSO_4$, 0.2; $Fe(CH_3COO)_3NH_4$, 0.01; $Ca(NO_3)_2.4H_2O$, 0.05 ผสมกับน้ำทิ้งที่ได้จากขั้นตอนการสกัดเยื่อกระดาษ 10%(v/v) บ่มที่ 30 °C pH 7 ความเร็ว 125 rpm เป็นเวลา 10 วัน พบว่าเชื้อรหัส PF4 สามารถลดสีและปริมาณลิกนินในน้ำทิ้งเท่ากับ 30% และ 24% ตามลำดับ ใน 3 วัน เมื่อระบุชื่อเชื้อโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ rDNA ITS1 และ rDNA ITS2 ระบุว่าเป็นเชื้อรา *Emericella nidulans* var. nidulans (anamorph: *Aspergillus nidulans*) เมื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการลดสีโดยวิธีของ Taguchi ที่อุณหภูมิ (30 - 35 °C) บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ (125 rpm) กลูโคส (0.25%) tryptone (0.1%) ปริมาณหัวเชื้อ (7.5%) พีเอช (5) ระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า การลดสีของน้ำทิ้งเท่ากับ 31% และลดลิกนินเท่ากับ 66.66% และ 37% พีเอชลดลงจาก 6 เป็น 5 สีลดลง 71% โดยอุณหภูมิไม่มีผลต่อการลดสี

เอนไซม์ laccase เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของซับเตรทฟีนอลหลายชนิดโดยการตัดออกซิเจนให้ได้น้ำเกิดขึ้น และเร่งปฏิกิริยากับสารตั้งต้นหรือซับเตรทที่ไม่ใช่ฟีนอล เช่น 2,2'-azinibis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) และ 1-hydroxybenzotriazole (HBT) เอนไซม์ laccases สามารถพบได้ในแบคทีเรียและเชื้อรา พืช และแมลง โดยในพืชจะใช้สังเคราะห์ลิกนิน แต่ในเชื้อราจะมีบทบาทย่อยลิกนิน เอนไซม์ laccase ประกอบด้วย copper 4 อะตอม โดยมีคุณสมบัติการดูดกลืนแสงและค่าแม่เหล็กแตกต่างกันเรียก T1 หรือ Type 1 copper มีลักษณะเป็นแสงสีน้ำเงินให้ค่าดูดกลืนแสงที่ 600 nm ส่วน T2 copper มีลักษณะเป็น EPR spectrum และ T3 copper ให้ค่าดูดกลืนแสง 320 nm ปฏิกิริยาการออกซิเดชั่นสารตั้งต้นจะเกิดขึ้นที่ T1 copper จากนั้นอิเล็กตรอนจะถูกเคลื่อนย้ายไปยัง T2/T3 centre ออกซิเจนจึงถูกเปลี่ยนไปเป็นน้ำ

แบคทีเรียหลายชนิดมีความสามารถในการย่อยลิกนิน ได้แก่ *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Aerobacter*, *Agrobacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Nocardia*, *Serratia*

และ *Xanthomonas* กลไกการย่อยลิกนินของแบคทีเรียมีความจำเพาะเจาะจงมากกว่าเชื้อรา แบคทีเรียสามารถตัดพันธะประเภทเดียวของโพลิเมอร์ลิกนินได้และให้ค่าการย่อยลิกนินจากวัสดุเซลลูโลสต่ำ แบคทีเรียย่อยไม้ได้ช้าและการย่อยจะเกิดขึ้นที่พื้นผิวของไม้ที่มีความชื้นสูง ทำให้สามารถทำลายไม้ได้ทั้งไม้เนื้ออ่อนและไม้เนื้อแข็งโดยการเจริญที่ผนังเซลล์บริเวณเนื้อเยื่อพาเรงคิมา แบคทีเรียย่อยไม้มีกิจกรรมการย่อยเซลลูโลสและเพคตินและการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสามารถทำได้ง่าย อย่างไรก็ตามแบคทีเรียย่อยลิกโนเซลลูโลสจะเกิดได้ช้ากว่าการเพาะเลี้ยงแบบผสมระหว่างแบคทีเรียกับเชื้อรา ทั้งนี้เกิดจากแบคทีเรียไม่มีความสามารถในการแทรกผ่านไปยังเนื้อวัตถุ แม้ว่าแบคทีเรียจะสามารถเข้าทำลายไฟเบอร์ท่อลำเลียง และเทรคีตได้โดยตรง แต่มีอยู่ไม่กี่สปีชีส์หรือสายพันธุ์ที่จะสามารถย่อยองค์ประกอบของผนังเซลล์ได้

แบคทีเรียย่อยไม้มีความทนทานต่ออุณหภูมิ พีเอช ออกซิเจนได้ในช่วงกว้างกว่าเชื้อรา ดังนั้นการย่อยลิกนินของแบคทีเรียจึงพบได้เมื่อการเจริญของเชื้อราลดลงหรือเข้าสู่สภาวะขาดแคลนสารอาหาร เช่น เนื้อไม้ที่อิ่มตัวไปด้วยน้ำจะมีออกซิเจนจำกัด ปริมาณสารสกัดสูง ความเข้มข้นของลิกนินสูงหรือสารเคมีปกป้องเนื้อไม้สูง ซึ่งการย่อยลิกนินจะสร้างโปรตีนหรือเอนไซม์จำพวก copper oxidase ลักษณะในการย่อยผนังเซลล์พืชของแบคทีเรีย คือ tunneling, erosion และ cavitation แบคทีเรียจำพวก tunneling bacteria พบได้ยากในไม้ที่ชุ่มน้ำ เนื่องจากความต้องการออกซิเจนโดยจะสร้างโพรงขนาดเล็ก เพื่อเคลื่อนที่ผ่านผนังเซลล์ แบคทีเรียจำพวก erosion bacteria มีความโดดเด่นในการย่อยเนื้อไม้ชุ่มน้ำ เนื่องจากสามารถอยู่ในสภาวะไม่มีออกซิเจนได้โดยส่วนใหญ่จะมีรูปร่างเป็นท่อนและทำลายผนังจากช่องด้านใน แบคทีเรียจำพวก cavitation bacteria จะอยู่บริเวณช่องว่างภายในเซลล์เนื้อไม้ โดยจะใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกิจกรรมของผู้ย่อยสลายไม้

Woo, Hazen, Simmons, & DeAngelis (2014) ทำการศึกษาแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลส ซึ่งจะมีความสำคัญในฐานะเป็นแหล่งของเอนไซม์แหล่งใหม่สำหรับอุตสาหกรรมการผลิตพลังงานเชื้อเพลิงจากลิกโนเซลลูโลส โดยศึกษาในป่า Puerto Rican เป็นแหล่งของจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายชีวมวลได้อย่างรวดเร็ว โดยทำการเลี้ยงจุลินทรีย์ลงในอาหาร cellulose minimal media และ lignin minimal media คัดแยกเชื้อได้ทั้งหมด 75 สายพันธุ์ จากนั้นทำการทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ย่อยลิกโนเซลลูโลส ได้แก่ phenol oxidase, peroxidase, β-D-glucosidase, cellobiohydrolase, β-xylopyranosidase, chitinase, CMCase, และ xylanase เชื้อที่คัดแยกได้จะมีความสามารถในการใช้เซลลูโลสให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ต่างๆ ได้แก่ β-D-glucosidase, CMCase, cellobiohydrolase มีผลกดการทำงานของ

phenol oxidase และ peroxidase ในขณะที่สายพันธุ์ที่ย่อยลิกนินโดยแท้จริงจะดำรงชีวิตด้วยเซลลูโลสหรือลิกนิน อัตราการเกิดกิจกรรม cellobiohydrolase และ phenol oxidase สามารถใช้เป็นเกณฑ์ในการจัดแบ่งเชื้อที่คัดแยกได้ออกเป็นสายพันธุ์ที่ใช้ลิกนิน หรือสายพันธุ์ที่ใช้เซลลูโลส ด้วย16S rRNA gene มีค่าความถูกต้อง 61% พบว่าเชื้อที่คัดแยกได้อยู่ในกลุ่ม Proteobacteria , Firmicutes และ Actinobacteria ได้แก่ สกุล *Aquitalea*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Cupriavidus*, *Gordonia* และ *Paenibacillus* ซึ่งเป็นสปีชีร์ที่มีความสามารถในการย่อยเซลลูโลสและลิกนิน

Renugadevi, Aryyappadas, Preethy, & Savetha (2011) ศึกษาการผลิตเอนไซม์lignin peroxidase (LiP) จากแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* LPTK ที่ทำให้กลายพันธุ์โดยสารเคมี EMS และหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ Lip ของสายพันธุ์กลาย พบว่าแบคทีเรียใช้ lactose เป็นแหล่งคาร์บอน ใช้ peptone เป็นแหล่งไนโตรเจน อุณหภูมิที่ 37 °C pH 6 บ่มเป็นเวลา 36 ชั่วโมง โดยให้อัตราการผลิตเอนไซม์ที่สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม Narayanan P. Muthukumarasamy, Beenie Jackson, Antony Joseph Raj, & Sevanan (2015) ศึกษาการผลิตเอนไซม์ laccases จากแบคทีเรียภายนอกเซลล์ *B. subtilis* MTCC 2414 โดยใช้รำข้าวเจ้ากับรำข้าวสาลีเป็นซับเตรท พบว่าการเติมน้ำตาลซูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน 3% (w/v) เท่ากับ 275±3.11 U/ml, 247.4±3.51 U/ml ตามลำดับและใช้เปปโทนเป็นแหล่งไนโตรเจน 3% (w/v) เท่ากับ 352.2±4.32 U/ml, 328±3.33 U/ml ตามลำดับอุณหภูมิ 30 °C (270±2.78 U/ml) พีเอช 7 (345±3.14U/ml) เป็นระยะเวลาการบ่ม 96 ชั่วโมง (267± 2.64U/ml) จะให้การผลิตเอนไซม์ laccases สูงสุด มวลโมเลกุลของเอนไซม์ที่ได้มีการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนเท่ากับ 52 kDa จากการใช้รำข้าวเจ้าและ 55 kDa จากการใช้รำข้าวสาลี สภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ที่ 70 °C (260.3±6.15 U/ml), พีเอช 9.0 (266±4.02 U/ml) และเติมไอออนเหล็ก $CuSO_4$ (141.4±6.64 U/ml)

แอคติโนมัยซีทจะอาศัยอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่มีสารลิกโนเซลลูโลสจำนวนมาก เช่น ดิน, ปุ๋ย, ฟางข้าว, ซัง และชิ้นไม้ แอคติโนมัยซีทมีความสามารถในการย่อยลิกนิน ซึ่งจะไม่รวดเร็วและสมบูรณ์เท่าเชื้อรา การย่อยลิกนินของแอคติโนมัยซีททำให้ได้สารที่มีลิกนินความเข้มข้นสูงละลายน้ำได้เรียกว่า acid precipitable polymeric lignin ชิ้นส่วนลิกนินนั้นจะมีหมู่โพลีฟีนอลและเป็นโพลิเมอร์มีมวลโมเลกุลต่ำ มีหมู่เมทิลต่ำกว่าลิกนินในธรรมชาติ อย่างไรก็ตามการย่อยลิกนินโดยแอคติโนมัยซีทจะไม่มีประสิทธิภาพเท่าเชื้อรา แต่ยังคงมีประสิทธิภาพสูงกว่าแบคทีเรีย เนื่องจากความสามารถในการสร้างเอนไซม์ peroxidase ภายนอกเซลล์ เช่น การสร้างเอนไซม์

phenol oxidase โดย *Streptomyces cyaneus* มีส่วนในการย่อยลิกนินได้ดีกว่าเอนไซม์ peroxidase เอนไซม์ laccase ที่พบใน *S. griseus* และ *S. lavendulae* โดย *S. cyaneus* สร้าง laccase ในระหว่างการเจริญภายใต้สภาวะการหมักในอาหารแข็ง ทำให้เอนไซม์มีส่วนร่วมในการละลายและย่อยลิกนินในฟางข้าวสาลี

การคัดเลือกจุลินทรีย์

แบคทีเรียที่มีความสามารถในการดัดแปลงและย่อยลิกนิน จะอยู่ในกลุ่ม α-proteobacteria, γ-proteobacteria, Firmicutes บางชนิด และโดยเฉพาะ actinomycetes (Brown, & Chang, 2014; T. D. Bugg, Ahmad, Hardiman, & Rahmanpour, 2011; Zimmermann, 1990; Ahmad et al., 2010) เช่น *Streptomyces viridosporus* T7A สร้างเอนไซม์ peroxidase หลายชนิดภายนอกเซลล์ ซึ่งตัดพันธะ β-aryl ether bonds เป็นผลให้เกิดการปลดปล่อยฟีนอลมวลโมเลกุลต่ำ และสารตัวกลางที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชั่นมวลโมเลกุลสูง คือ acid precitable polymeric lignin (AAPL) (Crawford, 1980) แบคทีเรียในดินสกุล *Rhodococcus* และ *Nocardia* จะปล่อย Cl_4-CO_2 จากลิกนินที่ทำการติดฉลากด้วยรังสี (Zimmermann W, 1990) แบคทีเรียย่อยเซลลูโลสที่อุณหภูมิสูง คือ *Thermobifida fusca* สามารถย่อยลิกนินเมื่อบ่มเยื่อกระดาษลิกโนเซลลูโลสที่อุณหภูมิสูง โดยการทำงานของ tat-dependent secreted thermostable DyP และสามารถสร้าง APPL ได้มากกว่า *S. viridosporus* T7A(Adav SS et al., 2010) การตรวจหากิจกรรมเอนไซม์ peroxidase ของ *S. viridosporus* T7A พบว่าปฏิกิริยาขึ้นกับ H_2O_2 ในขณะที่ *Pseudomonas putida* mt-2 และ *R. jostii* RHA1 กิจกรรมของเอนไซม์ไม่ขึ้นกับ H_2O_2 (Ahmad et al., 2010) ซึ่งกิจกรรมนี้จะไม่พบในเชื้อรา

Alexander, B., & Priest (1989) คัดแยก *Bacillus glucanolyticus* จากตัวอย่างดิน เป็นแบคทีเรียรูปท่อน แกรมบวก เจริญในสภาวะที่มีและไม่มีอากาศ สร้างเอนโดสปอร์ที่ด้านปลายของเซลล์ เคลื่อนที่ได้ และสามารถย่อยสลาย β-glucans โดยสามารถย่อย carboxymethyl cellulose (β, 1-4 linked glucose), curdlan (β, 1-3 linked glucose), pustulan (β, 1-6 linked glucose) และ xylose ถูกเก็บรักษาไว้ที่ศูนย์จุลินทรีย์ DSMZ รหัสสายพันธุ์ที่ 5162 และเปลี่ยนชื่อเป็น *Paenibacillus glucanolyticus* 5162 ในปี 1997 โดย Shida, Takagi, Kadowaki, Nakamura, & K. (1997) เนื่องจากความคล้ายคลึงกันของ 16S rDNA จากนั้นMathews, Ayoub, Pawlak, & Grunden (2013) ได้ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของ *P. glucanolyticus* พบว่าเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37 °C พีเอช 9.0 และสามารถย่อยเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสเพื่อการเจริญ

และสามารถเจริญในอาหารที่มีลิกนินเป็นแหล่งคาร์บอนในสภาวะที่มีและไม่มีอากาศ ทำให้ทราบว่า *P. glucanolyticus* สามารถผลิตเอนไซม์ซึ่งย่อยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินได้ และ Mathews, Grunden, & Pawlak (2016) ยังพบว่า *P. glucanolyticus* สามารถย่อยสารประกอบอะโรมาติกที่มีลักษณะคล้ายลิกนินภายใต้สภาวะที่มีและไม่มีอากาศ

Chandra et al. (2007) ทำการคัดแยกแบคทีเรียย่อยลิกนินจากตะกอนของโรงงานเยื่อกระดาษ ได้แก่ *Serratia*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Paenibacillus*, *Aneurinibacillus* และ *Bacillus* โดยศึกษาการย่อยลิกนินและผลผลิตที่ได้จากการย่อย (Raj et al., 2007a,b,c) Abhay Raj, M. M. Krishna Reddy, Ram Chandra, Hemant J. Purohit, & Atya Kapley (2007) ทำการคัดแยกแบคทีเรีย 8 สายพันธุ์บนอาหาร L-MSM agar ที่มีการเติมกลูโคสและเปปโทนจากตะกอนของโรงงานเยื่อกระดาษและกระดาษ ได้เชื้อรหัส ITRC-S8 จึงนำมาศึกษาการย่อยลิกนิน เนื่องจากมีการเจริญอย่างรวดเร็วที่ความเข้มข้นของลิกนินสูงสุดและใช้สารประกอบอะโรมาติกน้ำหนักโมเลกุลต่ำหลายชนิดเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน (ตาราง 4) เมื่อทำการระบุชื่อแบคทีเรียทางชีวเคมีพบเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อน ไม่เคลื่อนที่ และการระบุทางโมเลกุล (16S rRNA gene) มีความใกล้เคียงกับสกุล *Bacillus* sp. 95% ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่มีความเข้มข้นลิกนิน 500 mg/l ที่มีการเติมกลูโคสและเปปโทน ปรับพีเอช 7.6 อุณหภูมิ 30 °C ความเร็ว 120 rpm เป็นเวลา 6 วัน ให้ค่าลดสีและลิกนินเท่ากับ 65 % และ 37% ตามลำดับ การย่อยลิกนินถูกยืนยันโดยการวิเคราะห์ GC-MS แสดงให้เห็นถึงการสร้างสารประกอบอะโรมาติกมวลโมเลกุลต่ำหลายชนิด เช่น t-cinnamic acid, 3,4,5-trimethoxybenzaldehyde และ ferulic acid เป็นผลิตภัณฑ์จากการย่อยลิกนิน ซึ่งไม่พบในตัวควบคุม

Abhay Raj, M. M. Krishna Reddy, & Ram Chandra (2007a) ใช้เชื้อที่มีความสามารถในการลดสีของคราฟท์ลิกนิน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Paenibacillus*, *Aneurinibacillus aneurinilyticus* และ *Bacillus* sp. เพาะเลี้ยงลงอาหาร MSM ประกอบด้วย (g/l) Kraft lignin, 0.5; Na_2HPO_4, 2.4; K_2HPO_4, 2.0; NH_4NO_3, 0.1; $MgSO_4$, 0.01; $CaCl_2$, 0.01; D-glucose, 10; peptone, 5.0 (pH7.6) ความเข้มข้นหัวเชื้อ $9.5x10^4$, $1.05x10^5$และ $1.05x10^6$ CFU/ml ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C ความเร็ว 120 rpm เป็นระยะเวลา 6 วัน พบว่า ตัวอย่างที่ย่อยโดย *A. aneurinilyticus* และ *Bacillus* sp. มีการสร้างสารประกอบที่เกี่ยวข้องกับลิกนินหลายชนิดซึ่งไม่พบในตัวควบคุม สารประกอบในตัวอย่างที่ย่อยโดย*A. aneurinilyticus* ได้แก่ guaiacol, acetoguiacone, gallic acid และ ferulic acid ในขณะที่ t-cinnamic acid, 3,4,5 trimethoxy benzaldehyde และ ferulic acid พบในตัวอย่างที่ย่อยโดย *Bacillus* sp. เป็นผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาออกซิเดชันของ coniferylic

(G units) และ sinapylic (S units) alcohol ซึ่งเป็นโมโนเมอร์ของลิกนิน โดยสารประกอบที่ได้จากการย่อยจะมีความจำเพาะเจาะจงกับสปีชีร์ สารที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมการถนอมอาหาร การแต่งกลิ่น และน้ำหอมคือ ferulic acid และ 3,4,5 trimethoxy benzaldehyde

Abhay Raj, & Ram Chandra (2007) ทำการคัดแยกแบคทีเรีย *Aneurinibacillus aneurinilyticus* แสดงการย่อยลิกนินจากตะกอนของโรงงานเยื่อกระดาษและกระดาษ โดยใช้อาหาร Mineral salt medium (MSM) ประกอบด้วย (g/l) Na_2HPO_4 2.4; K_2HPO_4, 2.0; NH_4NO_3, 0.1; $MgSO_4$, 0.01; $CaCl_2$, 0.01; D-glucose, 10; peptone, 5;Trace element solution ปริมาตร 1 ml/l และ kraft lignin 0.25 โดยไม่ได้ใช้ลิกนินเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานหลัก แต่มีความสามารถในการลดสีและปริมาณลิกนินเท่ากับ 58% และ 43% ในอาหาร Kraft lignin-mineral salt medium ที่มีการเติมกลูโคส พีเอช 7.6 อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 6 วัน การวิเคราะห์ผลได้ที่เกิดจากการย่อยลิกนินโดย GC-MS พบว่ามีการสร้างสารประกอบอะโรมาติกน้ำหนักโมเลกุลต่ำ เช่น guaiacol, acetoguaiacone, gallic acid และ ferulic acid ปงชี้ว่าแบคทีเรียสามารถออกซิไดซ์ sinapylic alcohol units (G units) และ coniferylic alcohol units (S units) ซึ่งเป็นโครงสร้างพื้นฐานของลิกนินในไม้เนื้อแข็ง

Chandra et al. (2007) ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ สำหรับการย่อยลิกนินจากของเสียอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษ โดยทำการคัดแยกแบคทีเรียจากตะกอนน้ำทิ้งของโรงงานเยื่อกระดาษโดยใช้อาหาร mineral salts medium (MSM) ประกอบด้วย (g/l deionized water) D-glucose, 10; peptone, 5; Na_2HPO_4, 2.4; K_2HPO_4, 2.0; NH_4NO_3, 0.1; $MgSO_4$, 0.01; $CaCl_2$, 0.01; Trace element solution 1ml/l pH7.6 ได้แบคทีเรียทั้งหมด 8 สายพันธุ์ พบว่า มีเพียง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Paenibacillus* sp. (AY952466,ITRC S_6), *Aneurinibacillus aneurinilyticus* (AY856831, ITRC S_7), *Bacillus* sp. (AY952465, ITRC S_8) ทำการลดสีและย่อยลิกนินใน mineral salt medium pH7.6 หลังจากวันที่ 6 ที่ 30°C พบว่า *Bacillus* sp. ลดสีและย่อยลิกนินได้เท่ากับ 65%, 37% *A. aneurinilyticus* ลดได้ 56%, 33% และ *Paenibacillus* sp. ลดได้ 43%, 30% ตามลำดับ ในขณะที่การใช้เชื้อผสมลดสีและลิกนินได้เท่ากับ 69%, 40% ตามลำดับ ซึ่งการใช้เชื้อผสมทั้งสามที่กล่าวมานี้ลดสีได้ 69% ลดลิกนินได้ 40% และลดซับเตรททั้งหมดได้ 50% ภายใต้สภาวะเดียวกัน การย่อยทางชีวภาพของลิกนินไม่มีผลต่อปริมาณออกซิเจนละลายต่ำ (<0.2 mg/l) ดังนั้นผลการยับยั้งของออกซิเจนจะขึ้นกับอัตราการแมทาบอลิซึมโดยที่ 48 ชั่วโมง จะเกิดการลดลงของสีอย่างช้าพร้อมกับการลดลงของ พีเอช และการลดลงของสีจะเกิดได้อย่าง

รวดเร็วถ้าค่อยๆ เพิ่มพีเอชขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับพีเอชตั้งต้น โดยการเพิ่มปริมาณเชื้อ การหาปริมาณลิกนินโดย HPLC พบมีการย่อยอย่างสมบูรณ์มากกว่าการเปลี่ยนรูปสาร

Abd-Elsalam, & El-Hanafy (2009) ทำการคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยลิกนินจากดินในประเทศอียิปต์บริเวณ Kafr El-Dawar (latitude 31.1397 and 30.1292) โดยได้กล่าวว่า แบคทีเรียมีความสามารถในการทนต่ออุณหภูมิ พีเอช และปริมาณออกซิเจนจำกัดได้กว้างกว่าเชื้อรา และการประยุกต์ใช้เชื้อราในกระบวนการฟอกสีเยื่อกระดาษนั้นเป็นไปได้ยาก เนื่องจากปัญหาด้านโครงสร้างเซลล์ของเชื้อราที่มีลักษณะเป็นเส้นใย พบเชื้อรหัส KafAH19 มีความสามารถในการย่อยลิกนินสังเคราะห์ (lignin Alkali) และใช้เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปท่อนระบุชื่อเป็น *Bacillus* sp. (EU978470) ให้ค่าการย่อยในวันที่ 6 pH 6 เท่ากับ 81.4% อัตราการย่อยต่ำสุดที่ pH 13 เท่ากับ 34.2% ในวันสุดท้ายของการบ่ม

Comamonas sp. B-9 มีความสามารถในการใช้คราฟท์ลิกนินเป็นแหล่งคาร์บอนหลัก โดยทำการเพาะเลี้ยงลงใน Kraft lignin mineral salt medium (KL-MSM) ประกอบด้วย (g/l de-ionized water) Kraft lignin, 3; $(NH_4)_2SO_4$, 2; K_2HPO_4, 1; KH_2PO_4,1; $MgSO_4$, 0.2; $CaCl_2$, 0.1; $FeSO_4$, 0.05; $MnSO_4$, 0.02 พีเอช 7.0 อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 7 วัน พบว่าค่าซีโอดี (COD) ลดลง 32% กิจกรรมของเอนไซม์ manganese peroxidase (MnP) สูงสุดเท่ากับ 2903.2 U/l และ laccase (Lac) เท่ากับ 1250 U/l ในวันที่ 4 และ 6 ของการบ่ม ตามลำดับ โดยพบสารประกอบน้ำหนักโมเลกุลต่ำ เช่น ethanediol, 3,5-dimethyl-benzaldehyde และ phenethyl alcohol ถูกสร้างขึ้นในการย่อยคราฟท์ลิกนิน (Y. H. Chen et al., 2012)

Chen Y. et al. (2012) คัดแยกเชื้อ *Novosphingobium* sp. B-7 จากกระดาษชิ้นเล็กที่ทำจากไม้ไผ่ซึ่งผุกร่อนโดยใช้คราฟท์ลิกนินเป็นแหล่งคาร์บอนหลัก เชื้อสามารถเจริญในสารประกอบลิกนินโมเลกุลเดี่ยวได้หลากหลาย เช่น Guaiacol, vanillin, *p*-coumaric acid, cinnamic acid, furulic acid, sinapic acid และ veratraldehyde พบว่า หลังจาก 7 วัน ของการบ่ม ค่า COD ลดลงได้ถึง 34.7% ใน KL mineral salt medium กิจกรรมของเอนไซม์ manganese peroxidase (MnP) สูงสุดเท่ากับ 3229.8 U/l และ laccase (Lac) เท่ากับ 1275 U/l ในวันที่ 4 และ 5 ของการบ่ม ตามลำดับ พบ ethanediol, *p*-hydroxybenzoic acid และ vanillic acid ถูกสร้างขึ้นในระบบ

Ko et al. (2007) ทำการคัดแยกแบคทีเรีย *Paenibacillus campinasensis*, BL11 ที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงจาก Black liquor พบเป็นเชื้อเด่นและมีอยู่มากในน้ำล้างเยื่อกระดาษ คุณสมบัติ คือ มีความสามารถในการใช้น้ำตาลสายสั้นๆ และโพลีแซคคาร์ไรด์เป็นแหล่ง

คาร์บอนได้เกือบทุกชนิด ยกเว้นลิกนิน โดยการสร้างเอนไซม์หลายชนิด ได้แก่ ไซลาเนส 1 หน่วย เซลลูเลส 3 หน่วย เพคติเนส 1 หน่วย และ cyclodextrin glucanotransferase 1 หน่วย โดยไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ lipase และ protease แบคทีเรียสามารถเจริญได้ในช่วงพีเอชกว้าง แต่เจริญได้ดีในช่วงพีเอชเป็นกลางที่อุณหภูมิ 55 °C

Oliveira, Duarte, Ponezi, & Durrant (2009b) นำแบคทีเรีย *Bacillus pumilus* และ *Paenibacillus* sp. มาใช้ในการบำบัดสีน้ำทิ้งจากโรงงานเยื่อกระดาษที่ pH 7.0, 9.0 และ 11 ให้ผลการลดสีและ COD โดยเชื้อ *B. pumilus* ลดลงเท่ากับ 41.87% และ 22.08% และ *Paenibacillus* sp. เท่ากับ 42.30% และ 22.89% ตามลำดับ หลังจากบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง pH 9.0 ใช้ Gel permeation chromatography สำหรับยืนยันมวลของสารประกอบในน้ำทิ้งที่ได้รับการบำบัดและควบคุมทำให้ทราบว่า สารประกอบที่ทำให้เกิดสีในน้ำทิ้งลดลง

การคัดแยก ระบุชื่อแบคทีเรียทนด่าง และการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการลดสีและการลดสารพิษของน้ำทิ้งจากโรงงานเยื่อกระดาษและกระดาษโดยวิธีการของ Taguchi พบว่าแบคทีเรียรหัส LP1 ที่ถูกระบุชื่อว่าเป็น *Bacillus* sp. โดยการใช้ 16s RNA gene สำหรับสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการลดค่าสีคัดเลือกจากปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญ 7 ปัจจัย ได้แก่ แหล่งคาร์บอน (1.5, 2.5%w/v) ปริมาณน้ำล้างเยื่อกระดาษ (7.5, 10 %v/v) ระยะเวลาการบ่ม (24, 48 h) พีเอช (7, 8) อุณหภูมิ (30, 35 °C) อัตราการเขย่า (200, 250 rpm) และ ปริมาณหัวเชื้อตั้งต้น (4, 5%w/v) พบว่า สภาวะที่เหมาะสมคือ pH 8, 35 °C, 200 rpm, 2.5% sucrose เป็นเวลา 48 ชั่วโมงปริมาณหัวเชื้อตั้งต้น 5% (w/v) และความเข้มข้นน้ำล้างเยื่อกระดาษ (black liquor) 10% สามารถลดสีและลดลิกนินได้เท่ากับ 25 - 69% และ 28 - 53% ตามลำดับ มีกิจกรรมเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการลดสีน้ำทิ้ง คือ เอนไซม์ xylanase และ manganese peroxidase เท่ากับ 54 U/ml และ 28 U/ml ตามลำดับ (Mishra, & Thakur, 2010)

Bandounas, Wierckx, de Winde, & Ruijssenaars (2011) ทำการคัดแยกและระบุชื่อสายพันธุ์แบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยลิกนินจากดินในป่า ซึ่งใกล้กับตำบล Austerlitz ด้วยอาหาร mineral salts medium (MSM) ปรับพีเอช 7 ที่มีการเติม Kraft lignin 5 g/l, copper sulfate 0.5 mg/l และ yeast extract 0.1 g/l บ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 °C ความเร็ว 200 rpm ถ่ายอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 5 ml ลงในอาหาร MML ขวดใหม่ โดยทำเช่นนี้จำนวน 7 ซ้ำ จึงทำการเขี่ยเชื้อลงใน Luria Broth agar (LB) เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ จากนั้นใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริเวณ 16S rRNA และลักษณะทางฟีโนไทด์ในการระบุชื่อสายพันธุ์ สามารถแยกได้เชื้อ *Pandoraea norimbergensis* LD001, *Pseudomonas* sp.LD002 และ *Bacillus* sp LD003

ซึ่งสามารถเจริญบนอาหารที่มีลิกนินน้ำหนักโมเลกุลสูงและต่ำได้ โดย *P. norimbergensis* LD001, *Pseudomonas* sp.LD002 เจริญได้ดีในอาหารที่มีลิกนินเป็นองค์ประกอบแต่มีความสามารถในการลดสีย้อมได้จำกัด อย่างไรก็ตาม *Bacillus* sp LD003 เจริญได้ต่ำในอาหารที่มีลิกนินเป็นองค์ประกอบแต่มีความสามารถในการลดความเข้มสีย้อม phenothiazine dry class (Azure B, Methylene Blue และ Toluidene Blue O) ได้

Taylor et al. (2012) ได้พัฒนาวิธีการตรวจหาแบคทีเรียจากตัวอย่างธรรมชาติที่สามารถย่อยลิกนินได้ ซึ่งก่อนหน้านี้ได้มีการพัฒนาวิธีการ UV-vis assay method สำหรับวิเคราะห์กิจกรรมการย่อยลิกนินที่ได้ทำการพัฒนาสำหรับใช้ตรวจหาบนจานอาหารเพาะเชื้อ โดยตัวอย่างที่ใช้คือ ดินในป่า บ่มในอาหารที่มีสารอาหารอย่างอุดมสมบูรณ์ประกอบด้วย ลิกโนเซลลูโลสจากฟางข้าว พบว่า สามารถแยกแบคทีเรียได้ 9 สายพันธุ์ ได้แก่ *Microbacterium* จำนวน 4 สายพันธุ์สกุล *Micrococcus* จำนวน 2 สายพันธุ์*Rhodococcuserythropolis* (Actinobacteria) และ *Ochrobactrum* จำนวน 2 สายพันธุ์ และคัดแยกจากปุ๋ยฟางข้าวที่หมักด้วยกระบวนการแบบแข็ง (solid state fermentation) ที่อุณหภูมิสูง 45 °C สามารถแยกแบคทีเรียได้ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Thermobifida fusca*, *Rhizobiales* และ *Sphingobacterium* (Bacteroidetes) โดยสายพันธุ์สุดท้ายมีกิจกรรมการย่อยลิกนินได้สูงกว่าสายพันธุ์อื่นที่กล่าวมา 10 เท่า แต่แบคทีเรียทุกสายพันธุ์ที่กล่าวมาสามารถย่อยลิกนินที่มีมวลโมเลกุลต่ำ (biphenyl, m-cresol, p-cresol, vanillic acid และ veratryl alcohol) และลิกนินที่มีมวลโมเลกุลสูงได้ โดยให้ผลผลิตเป็น oxalic acid และ protocatechuic acid จากการเพาะเลี้ยงในลิกโนเซลลูโลสจากฟางข้าว

ตาราง 4 การคัดเลือกเชื้อเพื่อหาความสามารถในการใช้สารประกอบอะโรมาติกมวลโมเลกุลต่ำเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน

รหัสเชื้อ	การเจริญของเชื้อบนอาหาร lignin-related $LMWAC_s$ agar ที่ความเข้มข้น 50 mg/l โดยไม่เติมกลูโคสและเปปโทน						
	Vanillin	Ferulic acid	*p*-hydroxy benzoic acid	*t*-Cinnamic acid	Gallic acid	Guaiacol	Syringic acid
ITRC S1	-	-	+	-	-	+	-
ITRC S2	-	+	+	-	-	+	+
ITRC S3	-	+	-	-	-	+	+
ITRC S4	-	+	+	+	-	-	-
ITRC S5	-	++	++	-	-	-	+
ITRC S6	-	-	+	-	-	+	-
ITRC S7	-	-	+	-	-	-	-
ITRC S8	+	++	+	-	++	++	++

หมายเหตุ: สัญลักษณ์ + คือ การเจริญอย่างเชื่องช้ามาก; ++ คือ การเจริญอย่างช้า; +++ คือการเจริญอย่างรวดเร็ว; – คือ ไม่มีการเจริญ

ที่มา: Raj et al., 2007

Shi, Chai, Tang, Yang, & Zheng (2013) ทำการศึกษาการย่อย kraft lignin โดย *Pandoraea* sp. B-6 ที่แยกได้จากกระดาษไม้ไผ่ พบว่า แบคทีเรียนี้สามารถย่อยลิกนินได้โดยไม่ต้องใช้สารอาหารอื่นร่วมในสภาวะด่างสูง สามารถลดค่า COD และลดสี ภายใน 7 วัน ที่ความเข้มข้นของลิกนิน 1 - 6 g/l เท่ากับ 38.2% และ 41.6% ตามลำดับ พีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการย่อยลิกนิน เท่ากับ pH 10 และ 30 °C ให้กิจกรรมของเอนไซม์ manganese peroxidase และ laccase สูงสุดที่พีเอช 10 เท่ากับ 2,249.2 U/l และ 1,120.6 U/l ในวันที่ 3 และ 5 ของการบ่ม ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบสารประกอบโมเลกุลขนาดเล็กถูกสร้างขึ้นในระหว่างการย่อยลิกนิน ได้แก่ cinnamic acid, ferulic acid, 2-hydroxy benzyl alcohol และ vinillyl methyl ketone

Wang et al. (2013) ศึกษาการอยู่ร่วมกันของแบคทีเรียย่อยลิกนิน ทำให้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษได้ โดยเก็บตัวอย่างจากตะกอนในบึงกก (reeds ponds) พบแบคทีเรียต่างๆ ได้แก่ *Clostridiales* (9.1%), *Geovibrio thiophilus* (5.1%), *Desulfomicrobium* (10.9%), *Pseudomonas* sp. (25.2%), *Azoarcus* sp. (5.1%), *Paenibacillus* (5.1%), *Cohnella* sp. (2.2%), *Acinetobacter* sp. (3.1%), *Microbacterium* (7.8%) และแบคทีเรียที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ (21.3%)

ตาราง 5 การคัดเลือกเชื้อเพื่อหารูปแบบความทนทานต่อความเข้มข้นของลิกนินที่แตกต่างกันที่มีการเติมและไม่เติมลิกนินของเชื้อที่คัดแยกได้

รหัสเชื้อ	100 ppm lignin		200 ppm lignin		300 ppm lignin		400 ppm lignin		500 ppm lignin		600 ppm lignin	
	1% glucose and 0.5% peptone[a]	0% glucose and 0% peptone[b]	1% glucose and 0.5% peptone[a]	0% glucose and 0% peptone[b]	1% glucose and 0.5% peptone[a]	0% glucose and 0% peptone[b]	1% glucose and 0.5% peptone[a]	0% glucose and 0% peptone[b]	1% glucose and 0.5% peptone[a]	0% glucose and 0% peptone[b]	1% glucose and 0.5% peptone[a]	0% glucose and 0% peptone[b]
ITRC S1	+++[c]	-[d]	++	-	++[b]	-	+[a]	-	-	-	-	-
ITRC S2	++	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ITRC S3	+++	-	++	-	+	-	-	-	-	-	-	-
ITRC S4	++	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ITRC S5	++	-	++	-	+	-	-	-	-	-	-	-
ITRC S6	+++	-	+++	-	+++	-	+++	-	+++	-	-	-
ITRC S7	+++	-	+++	-	+++	-	+++	-	+++	-	-	-
ITRC S8	+++	-	+++	-	+++	-	+++	-	+++	-	-	-
Control	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ: a + คือ การเจริญอย่างเชื่องช้ามาก; b ++ คือ การเจริญอย่างช้า; c +++ คือการเจริญอย่างรวดเร็ว; d – คือ ไม่มีการเจริญ

ที่มา: Chandra et al., 2007

Shi, Chai, Tang, Yang, & Zhang (2013) ทำการคัดแยกแบคทีเรีย *Cupriavidus basilensis* B-8 จากกระดาษไม้ไผ่ที่กำลังผุ โดยเลี้ยงด้วย Luria-Bertani broth บ่มที่ 30 °C ด้วยความเร็ว 120 rpm ที่ OD 600 = 1 จากนั้นถ่ายเชื้อ 2ml ลงใน Klaft lignin (KL) mineral salt medium ปริมาตร 100 ml ประกอบด้วย Klaft lignin 3 g/l, $[NH_4]_2SO_4$ 2 g/l, K_2HPO_4 1 g/l, KH_2PO_4 1 g/l, $MgSO_4$ 0.2 g/l, $CaCl_2$ 0.1 g/l, $FeSO_4$ 0.05 g/l และ $MnSO_4$ 0.02 g/l pH 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C ด้วยความเร็ว 120 rpm เป็นเวลา 7 วัน สามารถย่อยลิกนินที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 0.5 - 6 g/l โดยที่ Kraft lignin ลดลงต่ำสุด 31.3% ภายใน 7 วัน อัตราการย่อยสูงสุดเท่ากับ 44.4% ที่ความเข้มข้นของลิกนินเริ่มต้น 2g/l อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อการย่อยลิกนินเท่ากับ 7 และ 30 °C ตามลำดับ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ manganese peroxidase และ laccase สูงสุดเท่ากับ 1685.3 U/l และ 815.6 U/l ในวันที่ 3 และ 4 ตามลำดับ และจากการวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรม พบวิถีเมตาบอลิซึมหลัก ได้แก่ β-ketoadipate, phenol degradation และ gentisate pathways

แบคทีเรียดั้งเดิมที่มีความสามารถในการลดสีน้ำล้างเยื่อกระดาษ เช่น *Bacillus subtilis* และ *Micrococcus luteus* ช่วยลดค่า BOD, COD และลิกนิน ได้มากถึง 87.2%, 94.7% และ 97% ตามลำดับ เป็นระยะเวลา 9 วัน ความเร็วรอบ 200 rpm นอกจากนี้ยังสามารถลดค่าพีเอชของน้ำล้างเยื่อกระดาษให้อยู่ที่พีเอชปานกลางและช่วยเพิ่มค่าการละลายของออกซิเจนในน้ำล้างเยื่อกระดาษจาก 0.8-6.8 mg/l (Tyagi et al., 2014)

Chang Y.-C. et al. (2014) ทำการคัดแยกเชื้อ *Bacillus* sp. ที่มีความสามารถในการย่อยลิกนิน รหัส CS-1 และ CS-2 ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 0.05 - 2.0 g/l ซึ่งสามารถย่อยลิกนินที่มีอยู่ในเศษเหลือทิ้งประเภทลิกโนเซลลูโลสภายใน 48 ชั่วโมง ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ laccase สูง จึงช่วยเพิ่มค่าผลได้สุทธิของน้ำตาลหลังจากการย่อยโดยเอนไซม์เซลลูเลส โดยวิธีการนำเชื้อที่คัดแยกได้ไปใช้คือ การย่อยลิกนินโดย *Bacillus* sp.CS-1 ก่อน แล้วตามด้วยแบคทีเรียผลิตกรด (lactic acid bacteria) ให้ผลได้สุทธิของน้ำตาลเท่ากับ 68.6% และช่วยเร่งการย่อยเซลลูโลสของเอนไซม์เซลลูเลสได้ Abhishek, Dwivedi, Tandan, & Kumar (2015) ทำการเปรียบเทียบการย่อยและการล้างพิษลิกนินทางการค้าและลิกนินที่สกัดได้จากน้ำทิ้งจากโรงงานเยื่อกระดาษด้วยเชื้อ *Citrobacter freundii* และ *Serratia marcescens* และบ่งชี้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยลิกนิน (2,000 mg/l) พบว่า การใช้เชื้อผสมลดสีได้เท่ากับ 87% และ 70% ตามลำดับ ในขณะที่การใช้เชื้อเดี่ยวๆ *Citrobacter freundii* และ *Serratia marcescens* ลดสีได้ 64% และ 60% สำหรับลิกนินทางการค้า 50% และ 55% สำหรับลิกนินที่สกัดได้ที่สภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสม 34 °C, pH 8.2,

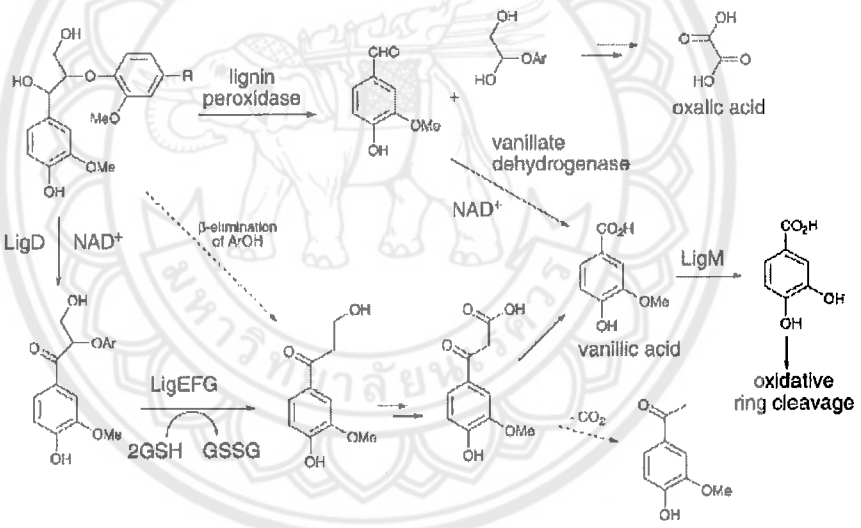
140 rpm นอกจากนี้การใช้เชื้อผสมให้ค่า TOC ลดลง 76%, 61%, COD ลดลง 80%, 67% และลิกนินลดลง 87%, 65% จากลิกนินทางการค้าและลิกนินที่สกัดได้ ตามลำดับ

วัฏจักรสลายลิกนิน

วัฏจักรการย่อยองค์ประกอบลิกนินแยกตามพันธะของลิกนินและชนิดของตัวกลางที่เกิดขึ้น แบ่งได้เป็น 6 รูปแบบ ดังนี้

1. วิถีการย่อยพันธะ β-Aryl ether

ปฏิกิริยาออกซิเดชั่นเบื้องต้นของ α-hydroxyl group ไปเป็น ketone ถูกเร่งด้วย NAD-dependent dehydrogenase (LigD) จากนั้นปฏิกิริยาการตัดพันธะอีเทอร์เกิดขึ้นโดย glutathione-dependent B etherase enzyme ซึ่งแสดงออกจาก LigEFG gene ซึ่งจะให้ vanilic acid เป็นผลิตภัณฑ์

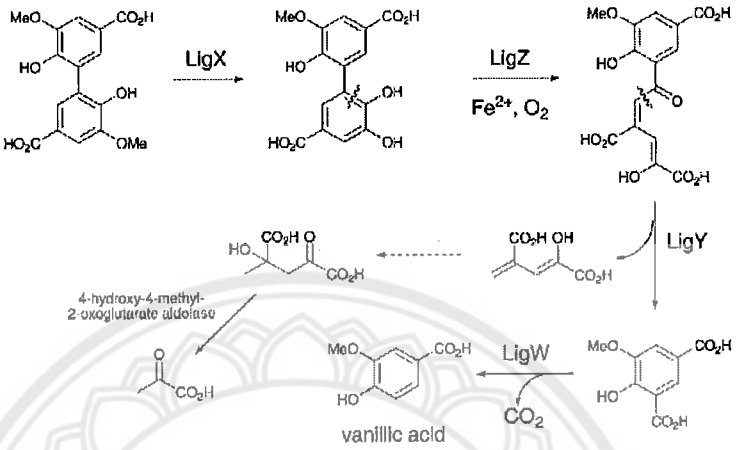


ภาพ 11 วัฏจักรการย่อยองค์ประกอบ β-aryl ether component ในลิกนิน ลำดับยีนของ *S. paucimobilis*

2. **วิถีการย่อยพันธะ** Biphenyl

พันธะ biphenyl linkage เป็นหนึ่งในองค์ประกอบสำคัญของลิกนินอยู่ระหว่างหน่วย guaiacyl unit 2 หน่วย การตัดพันธะ C3 ที่ติดกับ biphenyl จะได้ 2,2'-dihydroxy-3,3'-dimethoxy-5,5'-dicarboxy biphenyl ซึ่งถูกใช้ในการเจริญของ *S. paucimobilis* เริ่มจากปฏิกิริยาการดึงหมู่ methyl ออก เร่งปฏิกิริยาโดย non-heme iron-dependent demethylase enzyme ligX

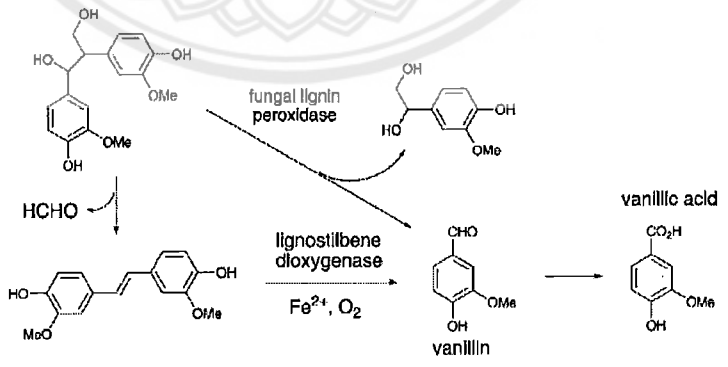
ต่อด้วย meta-cleavage โดย extradiol dioxygenase LigZ จากนั้นย่อยพันธะ C-C ด้วยน้ำ LigY เพื่อสร้าง 5-carboxyvanilic acid และ 4-carboxy-2-hydroxypentadienoic acid



ภาพ 12 วัฏจักรการย่อยองค์ประกอบ biphenyl ในโมเลกุลลิกนินของเชื้อ *S. paucimobilis*

3. **วิถีการย่อยพันธะ** Diarylpropane

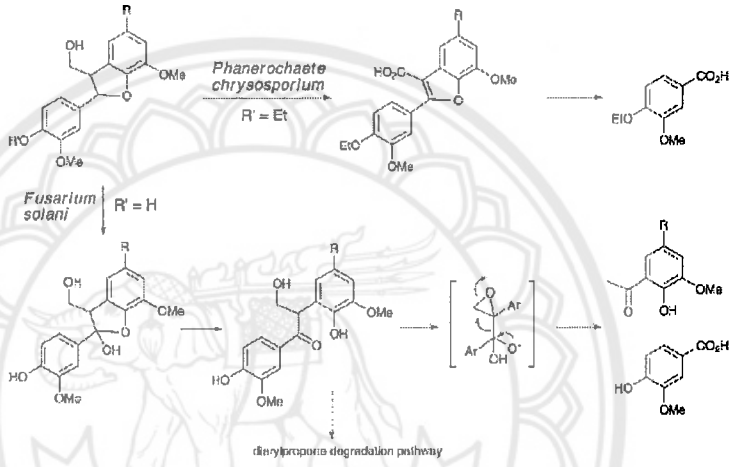
การตัดพันธะ C_α-C_β ให้สารประกอบ aromatic aldehyde product ปฏิกิริยานี้จะตัดด้วยเอนไซม์ lignin peroxidase ได้สารประกอบ formaldehyde และน้ำ จากนั้นถูกตัดด้วย lignostilbene ให้ vanillin 2 โมเลกุล



ภาพ 13 วัฏจักรการย่อย diaryl propane component **ของลิกนิน**

4. **การย่อย** phenylcoumanane

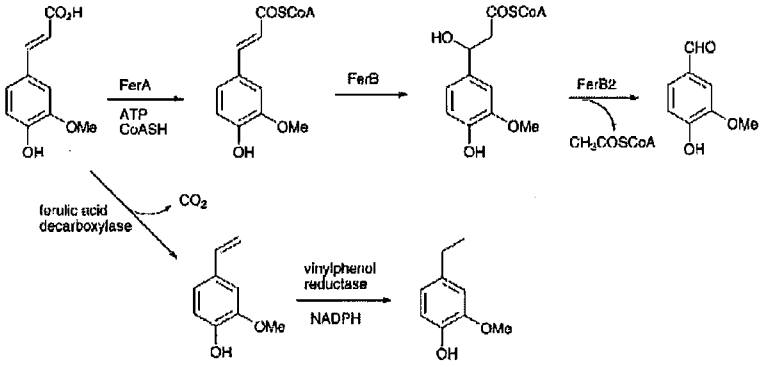
การย่อยองค์ประกอบ phenylcoumarane ในลิกนิน ซึ่งศึกษากันอย่างมากใน *Phanerochaete chrysosporium* และ *Fusarium solani* ด้วยกระบวนการออกซิเดชั่นวงแหวน heterocyclic ring ได้เป็น furan และการตัดพันธะ $C_\alpha - C_\beta$ ได้เป็น 5-acetylvanillone ทำให้เกิดการสูญเสียหมู่ β-hydroxyl group โดยการสร้าง epoxide intermediate ตามด้วย hydrolytic cleavage ตัดพันธะ $C_\alpha - C_\beta$



ภาพ 14 วัฏจักรการย่อยองค์ประกอบ penylcoumarane ในลิกนินของเชื้อรา

5. **การย่อย** ferulic acid **ของแบคทีเรีย**

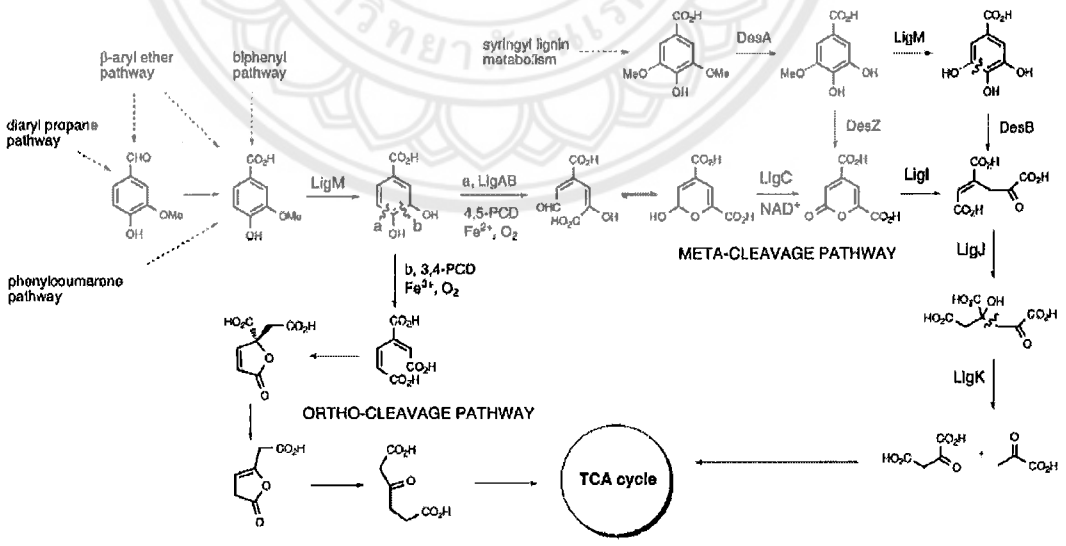
องค์ประกอบฟีนอลของลิกโนเซลลูโลสคือ กรด ferulic acid ซึ่งต่ออยู่กับเฮมิเซลลูโลสด้วยพันธะเอสเทอร์ ซึ่งถูกตัดออกด้วยเอนไซม์ esterase พบได้ในเชื้อราและแบคทีเรีย เอนไซม์ ferulic acid esterase ถูกทำให้บริสุทธิ์และระบุชื่อในเชื้อ *Aspergillus niger* ซึ่ง ferulic acid ถูกย่อยในแบคทีเรียโดย 2 วัฏจักร เอนไซม์ feruloyl CoA synthetase enzyme (Fer A) เปลี่ยน ferulic acid ไปเป็น furuloyl CoA จากนั้นจะเปลี่ยนไปเป็น vanillin และ acetyl CoA โดยเอนไซม์ feruloyl CoA hydratase / lyase (FerB) แบคทีเรียอื่นมีเอนไซม์ decarboxylase สามารถเปลี่ยน hydrocinnamic acid ไปเป็น 4-vinyl aromatic compound ซึ่ง *Bacillus* sp. ถูกรายงานว่าสร้างเอนไซม์นี้



ภาพ 15 วัฏจักรการย่อย ferulic acid ของแบคทีเรีย

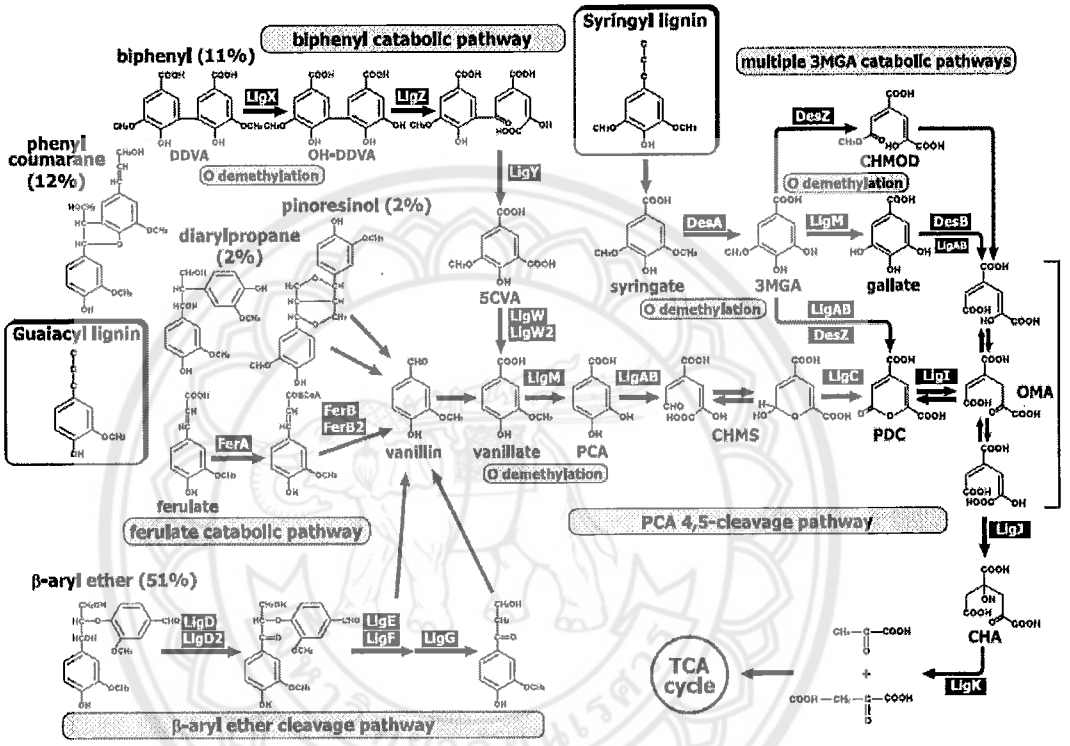
6. **การตัดแบบใช้ออกซิเจนของ** protocatechuic acid

protocatechuic acid สามารถถูกย่อยโดยแบคทีเรียในดินด้วยการตัดวงแหวนโดยใช้เอนไซม์ non heme iron dependent catechol dioxygenase ซึ่งถูกรายงานก่อนหน้านี้ การตัดแบบออกซิไดส์มี 2 ประเภท ได้แก่ การตัดภายในระหว่างหมู่ phenolic hydroxyl group โดยเอนไซม์ iron (III) – dependent dioxygenase และการตัดภายนอกที่เชื่อมต่อกันของหมู่ phenolic hydroxyl groups โดยเอนไซม์ iron (II) – dependent dioxygenase



ภาพ 16 Ortho- และ meta-cleavage pathways สำหรับย่อย protocatechuic acid **และ** gallic acid

งานวิจัยที่ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยลิกนิน เช่น *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6 สามารถเจริญในสารประกอบที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกับลิกนินได้อย่างหลากหลาย คุณสมบัตินี้เป็นหนึ่งในคุณสมบัติที่ดีของแบคทีเรียย่อยลิกนิน แสดงดังภาพ 17



ภาพ 17 วิถีการย่อยลิกนินและสารประกอบอะโรมาติกที่ได้จากลิกนิน
โดย S. paucimobilis SYK-6

ที่มา: Masai, Katayama, & Fukuda, 2007

จากภาพ 17 เชื้อ *S. paucimobilis* SYK-6 สามารถเจริญบน biaryls และ monoaryls ได้อย่างหลากหลายทาง PCA 4,5-cleavage pathway และวิถี 3MGA catabolic pathways ค่าเปอร์เซ็นต์คืออัตราส่วนของพันธะที่เชื่อมระหว่างโมโนเมอร์ในลิกนินตามธรรมชาติ ตัวย่อ: DDVA, 5,5'-dehydrodivanillate; OH-DDVA, 2,2' ,3-trihydroxy-3'-methoxy-5,5'-dicarboxybiphenyl; 5CVA, 5-carboxyvanillate; PCA, protocatechuate; CHMS, 4-carboxy-2-hydroxymucanate-6-semialdehyde; PDC, 2-pyrone-4,6-dicarboxylate; OMA, 4-oxalomesaconate; CHA, 4-

carboxy-4-hydroxy-2-oxoadipate; 3MGA, 3-O-methylgallate; CHMOD, 4-carboxy-2-hydroxy-6-methoxy-6-oxohexa-2,4-dienoate; TCA, tricarboxylic acid

ปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลายลิกนินโดยจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยลิกนินมีอยู่อย่างมากมายสามารถพบได้ในธรรมชาติประกอบด้วย เชื้อรา แอคติโนมัยซีท และแบคทีเรีย แต่การย่อยลิกนินมีการศึกษาอย่างมากในเชื้อราขาวและราน้ำตาลทำลายไม้ โดยพบว่าเบซิดิโอมายซีสเป็นราที่ย่อยสลายลิกนินได้อย่างมีประสิทธิภาพที่สุดในธรรมชาติ แม้ว่ามีการศึกษาการย่อยลิกนินโดยเชื้อราตั้งแต่กลางปี 1980 แต่ยังไม่มีกระบวนการเร่งปฏิกิริยาการย่อยลิกนินทางการค้า (T. D. H. Bugg et al., 2010)

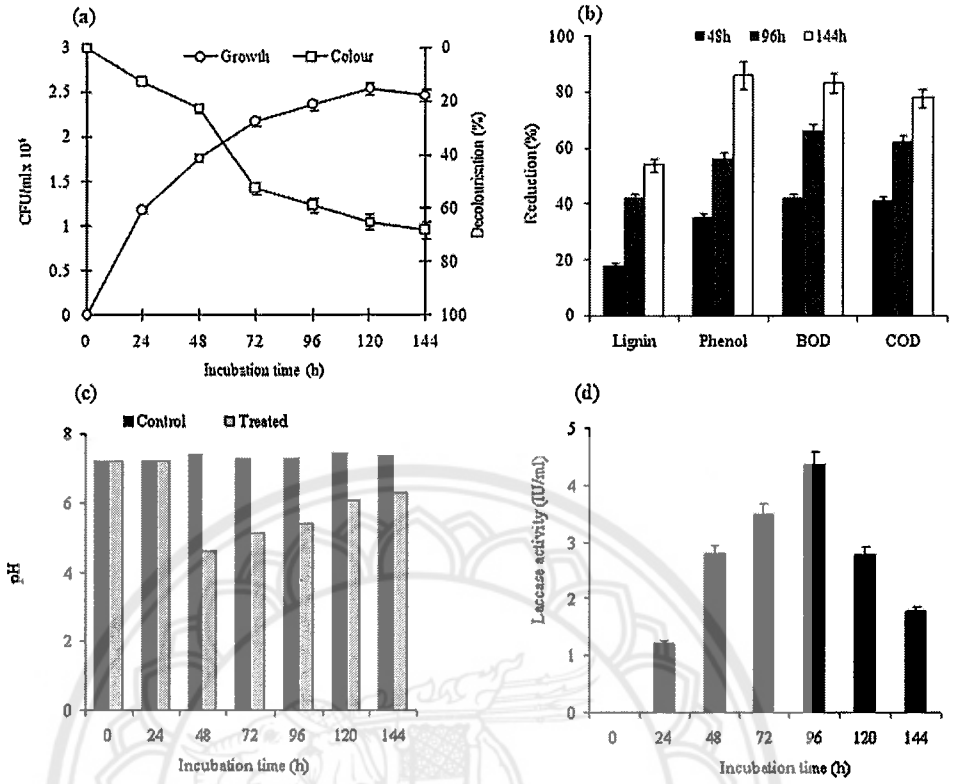
Rajwar, & Rai (2015) คัดแยกเชื้อรา *Nigrospora* sp. โดยมีการเจริญสูงสุด 1.2 เซนติเมตรต่อวัน และมีเส้นผ่านศูนย์กลางการลดสี 0.9 เซนติเมตรต่อวันใน malt extract agar medium ที่ประกอบไปด้วย 10% black liquor แต่เมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มีองค์ประกอบของ 20% black liquor ให้การเจริญลดลง แต่ให้การลดลงของสีสูงสุดและลดซีโอดี (COD) เท่ากับ 61% และ 58.7% ตามลำดับ นอกจากนี้การใช้เชื้อราผสมจะช่วยเพิ่มค่าการลดลงของซีโอดีและสีเท่ากับ 71.5% และ 73% ตามลำดับ ทำให้การย่อยลิกนินที่ความเข้มข้นสูงเป็นที่น่าสนใจในเวลาต่อมา

การย่อยลิกนินโดยแบคทีเรีย มีวิถีการย่อยสารประกอบอะโรมาติกอย่างหลากหลายจากฟีนอลเดี่ยวๆ ไปจนถึงลิกนินที่เป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีความซับซ้อนสูงและสารเคมีพิเศษที่มีความเกี่ยวข้องกับสิ่งมีชีวิต แบคทีเรียมีอัตราการปรับตัวทางพันธุกรรมสูงจะช่วยเพิ่มความสามารถโดยกระบวนการวิวัฒนาการ นอกจากนี้แบคทีเรียยังมีบทบาทในการเป็นผู้ย่อยสลายลิกนินในระบบนิเวศทางน้ำ เนื่องจากมีความทนทานต่ออุณหภูมิ พีเอช และออกซิเจนที่จำกัดเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อรา และได้มีงานวิจัยที่บ่งชี้ว่าแบคทีเรียสามารถย่อยลิกนินและมีแบคทีเรียหลายชนิดที่มีกระบวนการเมตาบอริซึมในการเปลี่ยนแปลงสารประกอบอะโรมาติกที่มีความใกล้เคียงกับลิกนิน

กระบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์และอนินทรีย์ที่มีอยู่ในน้ำเสีย โดยแบคทีเรียที่คัดแยกได้ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ ได้แก่ พีเอชของน้ำเสีย การเติมแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน การเขย่าผสมให้อากาศ ขนาดหัวเชื้อ และกลไกที่ใช้สำหรับการลดสี

ผลของพีเอชต่อลักษณะสีและความขุ่นของน้ำทิ้ง พบว่าพีเอชมีบทบาทสำคัญอย่างมากในน้ำเสียที่ได้จากโรงงานเยื่อกระดาษ A.Raj et al. (2014) ทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียรหัส LD1 (*Paenibacillus* sp.) และศึกษาการลดสีน้ำล้างเยื่อกระดาษ ซึ่งมีคุณลักษณะดังนี้ ลิกนิน 436 mg/l ค่า COD 792 mg/l พีเอช 7.2 พบว่า ปริมาณเซลล์เปลี่ยนแปลงสอดคล้องกับการลดลงของสีน้ำล้างเยื่อกระดาษ โดยปริมาณเซลล์จะค่อยๆ เพิ่มขึ้นจนถึงวันที่ 5 ของการบ่ม จากนั้นจะลดลง

เล็กน้อย ในขณะเดียวกันสีน้ำล้างเยื่อกระดาษจะลดลง โดยสีจะเริ่มลดลงหลังจากบ่มเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมงจนถึงค่าสูงสุดที่ 144 ชั่วโมง เนื่องจากช่วงเริ่มต้นการเจริญแบคทีเรียจะใช้แหล่งคาร์บอน (กลูโคส) และแหล่งไนโตรเจน (เปปโทน) ที่ถูกเติมลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการเจริญ เนื่องจากการเจริญในช่วงต้นของแบคทีเรียจำเป็นต้องปรับตัวต่อลิกนินและการย่อยของลิกนินจะเริ่มต้นต่อจากนี้โดยจะเพิ่มค่าการลดสี สอดคล้องกับรายงานของ Singhal, & Thakur (2009; Chandra et al., 2007) ที่กล่าวว่าการลดลงอย่างรวดเร็วของกลูโคสในช่วงเริ่มต้นของการเจริญจะตามด้วยการใช้ลิกนินเป็นลำดับต่อไป El-Hanafy et al. (2008) กล่าวว่าการเจริญในช่วงเริ่มต้นหรือภายใน 24 ชั่วโมง ลิกนินจะถูกใช้เป็นแหล่งคาร์บอนต่ำ ทำให้ค่าการย่อยของลิกนินต่ำด้วย อาจเนื่องมาจากแบคทีเรียยังไม่มีการปรับตัวและขาดแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากเซลล์แบคทีเรียเริ่มที่จะใช้ลิกนินเป็นแหล่งคาร์บอนหลังจาก 48 ชั่วโมง การลดสีโดยวิธีทางชีวภาพมีความสัมพันธ์กับการย่อยลิกนินและสารประกอบฟีนอลที่มีความใกล้เคียงกับลิกนินได้ ซึ่งลิกนินและสารประกอบฟีนอลเป็นองค์ประกอบหลักของน้ำล้างเยื่อกระดาษซึ่งทำให้ค่า COD สูง การลดลงของลิกนินและการลดลงของ COD หลังจาก 144 ชั่วโมง เท่ากับ 54% และ 78% ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียสามารถลดค่ามลพิษในน้ำล้างเยื่อกระดาษได้ ค่า BOD ลดลง 83% หลังจากผ่านการบำบัด ความเข้มข้นของฟีนอลและ chlorinated phenol ความเข้มข้นต่ำสุดที่จะส่งผลกระทบต่อสัตว์น้ำเท่ากับ 10-12 mg/l พบว่า ปริมาณฟีนอลทั้งหมดของน้ำล้างเยื่อกระดาษที่ไม่เติมแบคทีเรีย (ควบคุม) และน้ำล้างเยื่อกระดาษที่มีการเติมแบคทีเรียลงไปเท่ากับ 42 mg/l และ 5.9 mg/l ตามลำดับ ลดลงเท่ากับ 86% หลังจากการบ่มเป็นเวลา 6 วัน เนื่องจากความสามารถของแบคทีเรียในการใช้ฟีนอลเป็นแหล่งคาร์บอนได้ ในช่วงการลดสีค่าพีเอชของน้ำล้างเยื่อกระดาษจะเกิดการเปลี่ยนแปลงเนื่องจากกิจกรรมเมตาบอลิซึมของแบคทีเรีย โดยในช่วงเริ่มต้นจะมีการลดลงของพีเอช 7.2 เป็นพีเอช 4.6 หลังจาก 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นจะเพิ่มขึ้นจนถึง 6.3 ในชั่วโมงสุดท้ายของการทดลอง ในขณะที่ตัวอย่างควบคุมมีพีเอชคงที่ การเปลี่ยนแปลงของพีเอชจากสภาวะกรดเข้าสู่สภาวะด่างในช่วงการลดสี อาจเนื่องมาจากผลของการไหลออกของอะซิเตรทซึ่งเป็นสารตัวกลางที่อยู่ในวิถี TCA (Yang et al., 2008) และในสภาวะขาดแคลนแหล่งคาร์บอนแบคทีเรียจึงเปลี่ยนกลับมาใช้สารตัวกลางในกระบวนเมตาบอลิซึมที่ตัวเองสร้างขึ้น เช่น อะซิเตรท ทำให้พีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้นซึ่งส่งเสริมการย่อยลิกนินของแบคทีเรียเนื่องจากลิกนินจะละลายได้ดีที่พีเอชสูงทำให้เกิดการลดลงของสีและค่า COD แสดงดังภาพ 18 a,b,c



ภาพ 18 น้ำล้างเยื่อกระดาษถูกถ่ายเชื้อ *Paenibacillus* sp. บ่มที่ 34±1 °C , 120 rpm เป็นระยะเวลา 6 วันการเจริญและสี (a) การลดลงของค่าพา**รามิเตอร์ทาง**มลพิษต่างๆ (b) ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ (c) กิจกรรม**เอนไซม์** laccase (d)

ที่มา: A. Raj et al., 2014

จากภาพ 18d แสดงระดับของกิจกรรมเอนไซม์ laccase ซึ่งถูกเหนี่ยวนำให้สร้างในระหว่างการลดสีน้ำล้างเยื่อกระดาษของแบคทีเรีย โดยกิจกรรมของเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นสูงสุดที่ 96 ชั่วโมง เท่ากับ 4.4 IU/ml ซึ่งหลังจากนั้นจะลดลง เอนไซม์ laccase (EC 1.10.3.2) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชั่น โดยมีคอปเปอร์เป็นองค์ประกอบสามารถออกซิไดซ์ได้ทั้งสารประกอบที่มีฟีนอลและสารประกอบที่ใกล้เคียงลิกนินอื่นๆ โดยในน้ำล้างเยื่อกระดาษมีองค์ประกอบทั้งลิกนินและฟีนอลซึ่งจะเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียสร้างเอนไซม์ย่อยลิกนิน เชื้อราถูกเหนี่ยวนำการสร้าง LiP, MnP และ laccase ในช่วงการลดสีน้ำล้างเยื่อกระดาษ (D'Annibale, Rita Stazi, Vinciguerra, Di Mattia, & Giovannozzi Sermanni, 1999; Wu, Xiao, & Yu, 2005) และมีการรายงานการสร้างเอนไซม์ laccase ในแบคทีเรียแต่ยังไม่ถูกนำไปประยุกต์ใช้ในการย่อยลิกนินและลดสีน้ำล้างเยื่อ

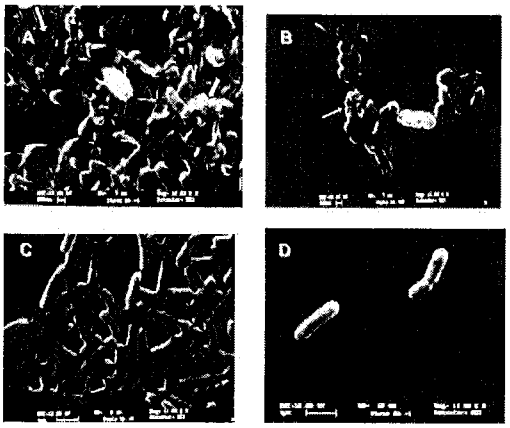
กระดาษ เช่น *Bacillus licheniformis* (Koschorreck et al., 2008), *Pseudomonas putida* F6 (McMahon, Doyle, Brooks, & O'Connor, 2007), *γ-Proteobacterium* JB (Singh, Capalash, Goel, & Sharma, 2007), *Bacillus subtilis* (Hullo, Moszer, Danchin, & Martin-Verstraete, 2001) และ *Azospirillum lipoferum* (Diamantidis, Effosse, Potier, & Bally, 2000)

ส่วนผลของการเติมแหล่งคาร์บอน แหล่งคาร์บอนที่ถูกเติมลงไปมีบทบาทสำคัญในกระบวนการย่อยสลาย โดยได้มีการศึกษาความสามารถในการลดสีของน้ำเสียเพิ่มขึ้นเมื่อมีการเติม กลูโคสหรือซูโครสลงไป 20-25% ทำให้พีเอชต่ำกว่า 4.0 หลังจาก 24 ชั่วโมง คล้ายคลึงกับผลของประจุลบเนื่องจากการเติมแหล่งคาร์บอนจะไปส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์อย่างมากทำให้มีความขุ่นสูง Chandra, Abhishek, & Sankhwar (2011) ศึกษาการลดสีของน้ำล้างเยื่อกระดาษ (Black liquor) จากโรงงานเยื่อกระดาษเกรดสังเคราะห์โดยแบคทีเรียที่ทำการคัดแยกจากตะกอนของโรงงานเยื่อกระดาษและกระดาษ โดยใช้อาหาร Mineral salt media (MSM) ประกอบด้วย (g/l) lignin, 0.2; D-glucose, 10; peptone, 5; Na_2HPO_4, 2.4; K_2HPO_4, 2.0; NH_4NO_3, 0.1; $MgSO_4$, 0.01; $CaCl_2$, 0.01 ตามวิธีของ Chandra et al., 2007 โดยเลี้ยงเชื้อผสม *Serratia marcescens* (GU193982, IITRBL1) *Citrobacter* sp. (HQ873619, IITRBL4) และ *Klebsiella pneumonia* (GU193983, IITRBL3) พบกิจกรรมการย่อยลิกนินและลดค่า COD, BOD และสีได้ เท่ากับ 83%, 74% และ 85% ตามลำดับ การวิเคราะห์ด้วย HPLC พบว่าตัวอย่างหลังการย่อยมีพื้นที่ใต้กราฟเมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุมลดลง นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์ด้วย GC-MS พบว่า สารที่พบในตัวอย่างควบคุมหายไปหลังจากการบำบัดด้วยเชื้อผสม และพบสารตัวใหม่ที่ไม่พบในตัวอย่างควบคุมหรือ new metabolites ได้แก่ formic acid hydrazide, 4-cyclohexane-1,2-dicarboxylic acid, carbamic acid, 1,2-benzenedicarboxylic acid และ erythropentanoic acid ทดสอบน้ำที่ได้โดยการเพาะถั่วเขียว (*Phaseolus aureus*) พบน้ำล้างเยื่อกระดาษมีพิษลดลง ส่วนการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการลดสีและการย่อยลิกนินในน้ำล้างเยื่อกระดาษ โดยใช้ MSM broth ด้วยการใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน (glucose, galactose, sucrose, fructose) ที่ 1.0% (w/v) แหล่งไนโตรเจน (beef extract, peptone, sodium nitrate, ammonium nitrate) ที่ 0.5% (w/v) และปัจจัยทางกายภาพ ได้แก่ ปริมาณหัวเชื้อตั้งต้น (0.5-8%) อัตราความเร็วในการเขย่าให้อากาศ (100-200 rpm) อุณหภูมิ (30-35 °C) และ พีเอชเริ่มต้น (5-10) พบว่า แหล่งคาร์บอนที่มีประสิทธิภาพเรียงลำดับ คือ glucose >galactose > sucrose > fructose แหล่งไนโตรเจนที่มีประสิทธิภาพเรียงลำดับ คือ peptone>beef extract>sodium nitrate โดยแหล่งไนโตรเจนที่ไม่ลดสี คือ ammonium nitrate และสภาวะทางกายภาพที่เหมาะสม คือ การใช้อัตราส่วนเชื้อผสม

IITRBL1: IITRBL3: IITRBL4 เท่ากับ 1:1:2 ความเข้มข้นหัวเชื้อร้อยละ 4% ความเร็ว 180 rpm พีเอชเริ่มต้น 8 และอุณหภูมิ 35 °C

ผลของการเขย่าต่อการบำบัดน้ำล้างเยื่อกระดาษ การศึกษาการลดสีน้ำเสียที่มีการใช้ค่าการเขย่า 50-200 rpm Paliwal, Uniyal, Verma, Kumar, & Rai (2016) ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการย่อยน้ำล้างเยื่อกระดาษทางชีวภาพโดยการตรึงแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* ETLB-1 และ *Pseudomonas plecoglossicida* ETLB-3 ร่วมกัน โดยมี dextrose เป็นแหล่งคาร์บอน โซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน อัตรา C:N เท่ากับ 2.5:1 อุณหภูมิ 35 °C พีเอช 8 ความเร็วในการปั่นกวน 160 rpm เป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการลดสี ลิกนิน BOD และ COD ของน้ำล้างชานอ้อยได้ถึง 96.1%, 91.5%, 96.7% และ 86.4% ตามลำดับ และสามารถลด chlorophenols ได้สูงสุดเท่ากับ 90.7% (มากถึง 10 mg/l) โดยมีการปลดปล่อยคลอไรด์ไอออน 1,233 mg/l พบกิจกรรมของเอนไซม์ lignin peroxidase (Lip), Manganese peroxidase (MnP) และ laccase (LAC) เท่ากับ 6.94 U/ml, 9.35 U/ml และ 8.96 U/ml ที่ 120, 144 และ 96 ชั่วโมง ตามลำดับ

กลไกการลดสี การดูดซับ (adsorption) มีบทบาทหลักต่อการลดสีโดย *Pseudomonas aeruginosa* หลังจากวิเคราะห์ด้วย scanning electron microscopy (ภาพ 19) พบว่า เซลล์แบคทีเรียได้จับวัตถุที่ทำให้เกิดสีในน้ำทิ้งไว้ เห็นได้จากสารคัดหลั่งที่มองเห็นได้รอบผิวเซลล์ ซึ่งจะไม่พบในเซลล์ของตัวแปรควบคุม พื้นผิวของเซลล์ที่เจริญในน้ำเสียไม่เรียบเหมือนพื้นผิวเซลล์ในตัวแปรควบคุม เนื่องจากเซลล์ได้ทำการดูดซับสีออกจากน้ำเสีย (Tiku et al., 2010)



ภาพ 19 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของเซลล์ *P. aeruginosa* (DSMZ 03504) (A) และ (B) เซลล์ถูกเลี้ยงในน้ำทิ้งที่เกิดปฏิกิริยาการลดสี พบการรวมกลุ่มกันของเซลล์และมีการสร้างเยื่อโพลีแซคคาไรด์ (C) เซลล์ที่ไม่ได้ทำการเลี้ยงในน้ำทิ้ง (D) เซลล์เดี่ยว ๆ ของ*P. aeruginosa*

ที่มา: Tiku et al. 2010

รูปแบบการประยุกต์ใช้จุลินทรีย์ในการย่อยสลายลิกนิน

Gupta et al. (2001) ศึกษาการบำบัดน้ำล้างเยื่อกระดาษ (Black liquor) จากโรงงานกระดาษและเยื่อกระดาษ โดยกระบวนการบำบัดแบบกะ (batch) และแบบต่อเนื่อง (continuous) โดย *Aeromonas formicans* พบว่า สามารถลดค่า COD และลิกนิน เท่ากับ 71% และ 78% ตามลำดับ ในขณะที่ประสิทธิภาพการลดลงของสีภายใน 10 วัน เท่ากับ 86% การวิเคราะห์ผลผลิตที่ได้จากการย่อยโดย GC หลังจาก 20 วันของการบ่มทำให้ทราบว่ามีการสร้างกรดฟีนอล เป็นผลให้พีเอชในระหว่างกระบวนการบำบัดแบบกะลดลง ส่วนประสิทธิภาพในการลด COD สี และลิกนินสำหรับกระบวนการบำบัดแบบต่อเนื่องเท่ากับ 73%, 88% และ 77% ตามลำดับ เป็นระยะเวลา 8 วัน

สำหรับการประยุกต์ในทางอุตสาหกรรมการใช้สารละลายเซลล์ในกระบวนการบำบัดมักไม่ค่อยได้ผล จึงได้มีการนำเทคโนโลยีการตรึงเซลล์เข้ามาใช้ ซึ่งมีประโยชน์หลายด้าน เช่น ให้ค่าความมีชีวิตได้ยาวนาน มีความสะดวกต่อการใช้งานได้อย่างมีประสิทธิภาพ เพิ่มความเสถียรของกระบวนการ ช่วยรักษาความมีกิจกรรมของเอนไซม์ Paliwal et al. (2015) ทำการตรึงเซลล์จุลินทรีย์บนซังข้าวโพดขนาด 1x1x1 ลูกบาศก์เซนติเมตร โดยใช้จุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากดินที่ปนเปื้อนน้ำทิ้งโรงงานเยื่อกระดาษ 2 ชนิด คือ *Bacillus megaterium* ETLB-1 และ *Pseudomonas*

plecoglossicida ETLB-3 เพื่อศึกษาความสามารถในการย่อยน้ำย่อยซานอ้อย (black liqour) ทางชีวภาพ พบว่า ลดสีและลิกนินได้ถึง 913.46 Co-Pt และ 531.45 mg/l ตามลำดับ ลดปริมาณคลอโรฟีนอลมากถึง 12 mg/l ปลดปล่อยคลอไรด์ไอออนมากถึง 1,290 mg/l กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดในระหว่างการบำบัดสำหรับ lignin peroxidase (Lip), Manganese peroxidase (MnP) และ laccase (LAC) เท่ากับ 5.06, 8.13 และ 8.23 U/ml ตามลำดับ พบการสร้างสารตัวกลางที่มีขนาดโมเลกุลต่ำ เช่น 4-hydroxybenzoic acid, 3-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde, ferulic acid และ t-cinnamic acid และได้มีการย้ายสารประกอบหลักออก เช่น teratogenicphthalate derivatives

ตาราง 6 แบคทีเรียคัดแยกจากอุตสาหกรรมลิกโนเซลลูโลส ซึ่งมีความสามารถในการย่อยลิกโนเซลลูโลส

สายพันธุ์แบคทีเรีย	แหล่งที่ใช้ในการคัดแยก	ลิกโนเซลลูโลสที่ใช้ในการส่งเสริมการเจริญ	คุณสมบัติที่สำคัญ	สภาวะในการเจริญ	อ้างอิง
Aneurinibacillus aneurinilyticus (AY856831)	น้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษ	Kraft lignin	ลดสีของลิกนิน ผลิตสารประกอบที่มีมวลโมเลกุลต่ำ	เจริญได้ทั้งสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (Facultative anaerobe)/ ต้องการอากาศต่ำ(Microarophilic)	Chandra et al. (2007) Raj, Reddy, and Chandra (2007b)
Bacillus sp. AY952465	ตะกอนเยื่อกระดาษ	Kraft lignin	ลดสีของลิกนิน ผลิตสารประกอบที่มีมวลโมเลกุลต่ำ	เจริญได้ทั้งสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (Facultative anaerobe), 10% NaCl	Chandra et al. (2007) Abhay Raj, M. M. Krishna Reddy, and Ram Chandra (2007b)
Citrobacter freundii	น้ำทิ้งจากโรงงานเยื่อกระดาษ	10% Black liquor	ลดสีลิกนิน	ต้องการอากาศต่ำ(Microarophilic)	Chandra and Abhishek (2011)
Citrobacter sp.	น้ำทิ้งจากโรงงานเยื่อกระดาษ	10% Black liquor	ลดสีลิกนิน	ต้องการอากาศต่ำ(Microarophilic)	Chandra and Abhishek (2011)
Citrobacter sp.	น้ำย่อยเยื่อกระดาษเกรดสังเคราะห์	10% Black liquor		ต้องการออกซิเจน	Chandra et al. (2011)
Cupriavidus basilensis B-8	กระดาษเยื่อไผ่ (Bamboo slips)	Kraft lignin	ย่อย Kraft lignin, ผลิตสารประกอบที่มีมวลโมเลกุลต่ำ, สร้างเอนไซม์ย่อยลิกโนเซลลูโลส	เจริญในสภาวะที่มีอากาศ (aerobic)	Shi, Chai, Tang, Yang, Zhang, et al. (2013)

ตาราง 6 (ต่อ)

สายพันธุ์แบคทีเรีย	แหล่งที่ใช้ในการคัดแยก	ลิกโนเซลลูโลสที่ใช้ในการส่งเสริมการเจริญ	คุณสมบัติที่สำคัญ	สภาวะในการเจริญ	อ้างอิง
Halomonas campisalis, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus* (Consortium)	สระเก็บน้ำทิ้งจากฟางข้าวสาลี	vanillin	สร้างกรดอะซิติก, แลกติก, ฟอมิก		Yang et al. (2008)
Klebsiella pneumoniae	น้ำย่อยเยื่อกระดาษสังเคราะห์	10% Black liquor		ต้องการออกซิเจน	Chandra et al. (2011)
Novosphingobium sp. B-7	กระดาษเยื่อไผ่ผุ (Bamboo slips)	Kraft lignin, vanillin, p-coumaric acid, cinnamic acid, ferulic acid, sinapic acid, veratraldehyde	ใช้ Kraft lignin เป็นแหล่งคาร์บอนหลัก, ผลิตเอนไซม์ Manganese peroxidase ที่มีมวลโมเลกุลต่ำ	ต้องการอากาศ	Y. Chen et al. (2012)
Paenibacillus campinasensis	Black liquor	Cellulose, hemicellulose	ผลิตเอนไซม์ Xylanase, cellulose pectinase, cyclodextrin glucanotransferase		Ko et al. (2007)
Paenibacillus glucanolyticus	Black liquor	Black liquor, Cellulose, hemicellulose, lignin	เจริญที่ pH 9.0	เจริญได้ทั้งสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (Facultative anaerobe), pH 9.0	Mathews, Pawlak, and Grunden (2014)

ตาราง 6 (ต่อ)

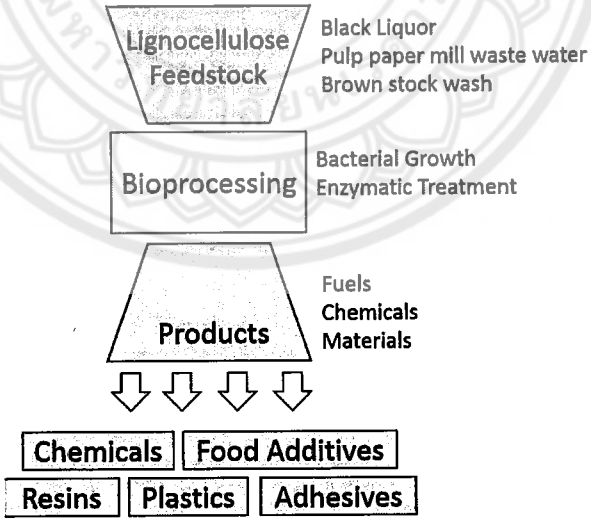
สายพันธุ์แบคทีเรีย	แหล่งที่ใช้ในการคัดแยก	ลิกโนเซลลูโลสที่ใช้ในการส่งเสริมการเจริญ	คุณสมบัติที่สำคัญ	สภาวะในการเจริญ	อ้างอิง
Paenibacillus sp. (AY952466)	ตะกอนจากโรงงานเยื่อกระดาษ	Kraft lignin, phenol (glucose)	ลดสีของลิกนิน ผลิตสารประกอบที่มีมวลโมเลกุลต่ำ	เจริญได้ทั้งสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (Facultative anaerobe), 3% NaCl	Chandra et al. (2007) Abhay Raj, M. M. Krishna Reddy, and Ram Chandra (2007b)
Pandoraea sp. B-6	กระดาษเยื่อไผ่ (Bamboo slips)	Kraft lignin	ลดสี, ลด COD, ผลิตสารประกอบที่มีมวลโมเลกุลต่ำ, ผลิตเอนไซม์ย่อยลิกโนเซลลูโลส	ต้องการอากาศ, pH10	Shi, Chai, Tang, Yang, Zheng, et al. (2013)
Pantoea sp.	น้ำทิ้งโรงงานเยื่อกระดาษ		ลดสี, ลด COD และ BOD, ย่อยลิกนินและคลอโรฟีนอล, ผลิตเอนไซม์ย่อยลิกโนเซลลูโลส	ต้องการอากาศ, pH7	Chandra and Singh (2012)
Serratia marcescens	ดินที่ปนเปื้อนน้ำย่อยเยื่อกระดาษเกรดสังเคราะห์	10% Black liquor	ลดสีและละลายลิกนิน	ต้องการออกซิเจน	Chandra et al. (2011)
แบคทีเรียที่ยังไม่ได้ระบุชื่อ 8 สายพันธุ์	ตะกอนน้ำทิ้งเยื่อกระดาษ	Kraft lignin	สร้างสารประกอบฟีนอลและกรดอินทรีย์มวลโมเลกุลต่ำ, เร่งปฏิกิริยา phenol oxidase	ต้องการออกซิเจน	Chandra et al. (2008)

ที่มา: ดัดแปลงจาก Mathews, S. L. et al., 2015

สารประกอบที่ได้จากการย่อยลิกนิน

ปัจจุบันมีหลายเทคโนโลยีที่เปลี่ยนลิกนินให้เป็นสารประกอบอะโรมาติก เช่น hydrolysis, pyrolysis และ oxidation โดยวิธีดั้งเดิมที่ใช้นิยมใช้ คือ ใช้ด่าง (NaOH) หรือกรด (H_2SO_4) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา หรือใช้อุณหภูมิและความดันสูง Wahyudiono et al. (2008) ศึกษาการย่อยลิกนินโดยใช้น้ำที่อุณหภูมิใกล้เคียงจุดวิกฤต และอุณหภูมิที่จุดวิกฤต จาก 623 ถึง 673 เคลวิน โดยใช้ถังปฏิกิริยาแบบกะ พบผลผลิตหลัก ได้แก่ catechol (28.4% โดยน้ำหนัก) phenol (7.5 % โดยน้ำหนัก) m, p-cresol (7.9 % โดยน้ำหนัก) และ o-cresol (3.8 % โดยน้ำหนัก)

ของเสียจากอุตสาหกรรมลิกโนเซลลูโลสยังไม่ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลาย เนื่องจากมีองค์ประกอบของสารพิษ มีน้ำตาลน้อย และมีพีเอชสูง (Kirk, Jeffries, & Leatham, 1983) ซึ่งสภาวะเหล่านี้ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา ทำให้มีการคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยองค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลสภายใต้สภาวะดังกล่าว จึงมีการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีที่เกี่ยวกับการย่อยหรือการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างสารประกอบลิกโนเซลลูโลสโดยการใช้ชีวบำบัด ตามหลักการเทคโนโลยีชีวบำบัดจะใช้ของเสียจากอุตสาหกรรมที่ยังไม่ได้ทำการดัดแปลงและแบคทีเรีย เพื่อผลิตพลังงานและสารเคมี แสดงดังภาพ 20 ภาพนี้มีความคล้ายคลึงกับกระบวนการกลั่นน้ำมัน ซึ่งผลิตผลิตภัณฑ์หลายชนิดจากผลิตภัณฑ์ตั้งต้นเพียงตัวเดียว



ภาพ 20 การประยุกต์ที่อาจเกิดขึ้นได้กับแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยลิกโนเซลลูโลส

ที่มา: Mathews et al., 2015

Kamm, & Kamm (2004)กล่าวว่าในอนาคตโรงงานเยื่อกระดาษจะกลายเป็นโรงกลั่นชีวภาพ ซึ่งจำนวนผลิตภัณฑ์ที่สามารถผลิตจากลิกโนเซลลูโลสเป็นสารที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจ การกลั่นชีวภาพใช้ของเสียในอุตสาหกรรมจากลิกโนเซลลูโลสและมีการเติมสารอาหารที่จำกัดเพื่อส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรีย ที่มีคุณสมบัติดังนี้ คือ เจริญได้ที่พีเอชสูง ย่อยองค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลสที่ความเข้มข้นสูงได้ และต้องการออกซิเจนจำกัด จากการย่อยและการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างลิกโนเซลลูโลสของแบคทีเรีย ทำให้แต่ละองค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลสถูกเปลี่ยนไปเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่า เช่น

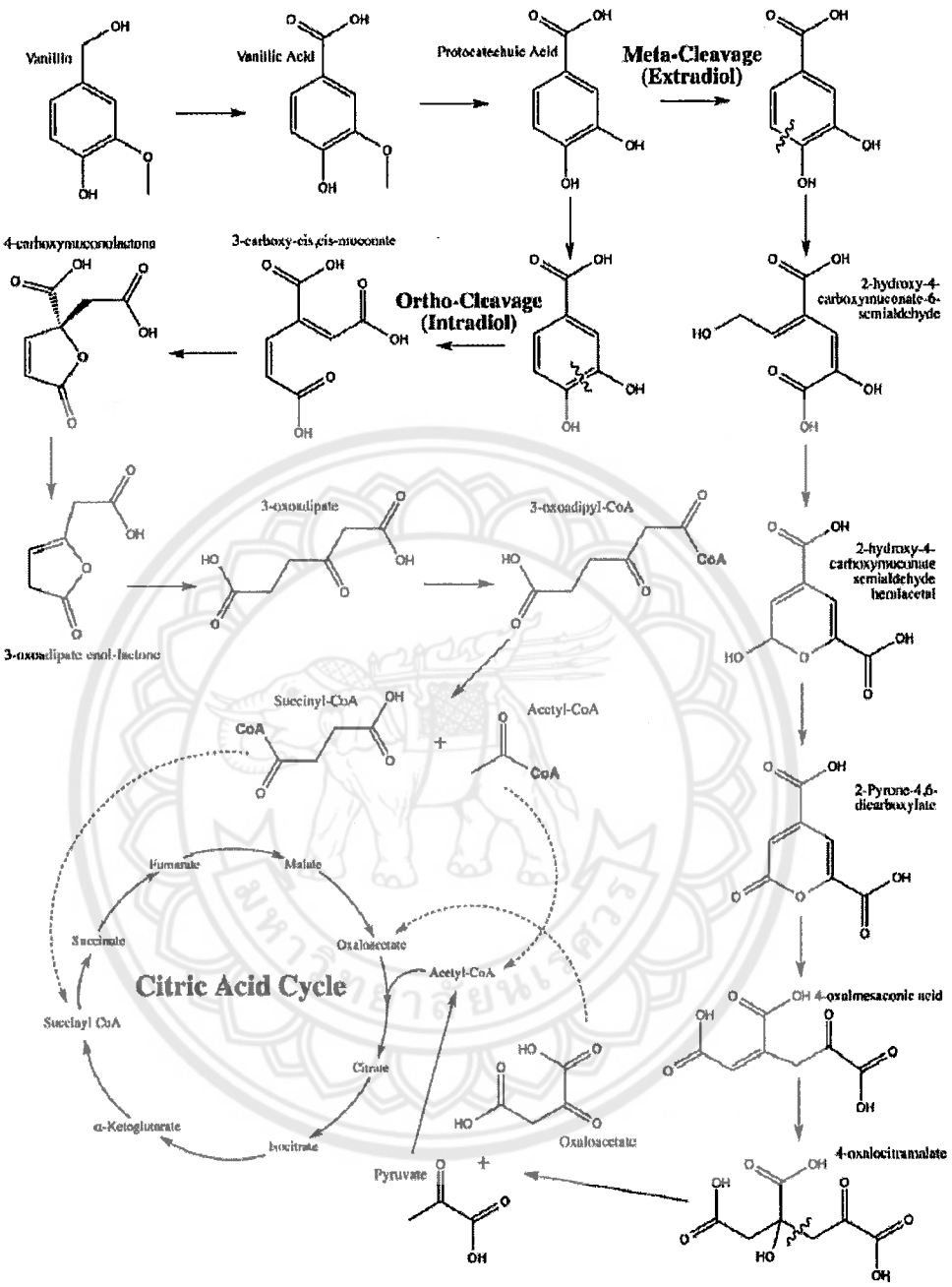
1. succinic acid เป็นสารตั้งต้นของพลาสติกชีวภาพ (polybutylene succinate), polyester polyols, plasticizers, polyurethane และ 1,4-butanediol
2. lignin สามารถถูกเปลี่ยนไปเป็น phenol, aromatic และ olefins เช่น การผลิตกาวติดเนื้อไม้ (phenol-formaldehyde resins), พลาสติกและเรซิน (phenol), สารให้ความหวานในอาหารทางการค้า (cinnamic acids), สารแต่งกลิ่น และสารตัวกลางจากอุตสาหกรรมยา
3. vanillin เป็นสารแต่งกลิ่นในอาหาร
4. ferulic acid ถูกใช้เป็นสารปรุงแต่งอาหารและสารป้องกันปฏิกิริยาออกซิเดชั่น

ลิกนินมีโครงสร้างที่สามารถถูกใช้เป็นแหล่งของสารเคมีอินทรีย์ เป็นพลังงานทางเลือกที่สามารถทดแทนการใช้ปิโตรเลียมในการผลิตสารเคมีอินทรีย์เหล่านี้ โดยประมาณ 90% ของสารเคมีในอุตสาหกรรมผลิตได้จากปิโตรเลียมสร้างรายได้มากกว่า 1.5 พันล้านดอลลาร์สหรัฐ ลิกโนเซลลูโลสมีข้อได้เปรียบในด้านราคาถูกและเป็นวัตถุดิบที่ยั่งยืนสำหรับการผลิตสารเคมีอินทรีย์ต่างๆ

แบคทีเรีย หรือ เอนไซมที่ได้จากแบคทีเรียถูกใช้ในการเติมลงไปในกระบวนการ ได้แก่ กระบวนการสกัดเยื่อกระดาษ (pulping) กระบวนการเตรียมลิกโนเซลลูโลสและการฟอกสีเยื่อกระดาษ ในปัจจุบันอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษได้มีการใช้เอนไซม์สำหรับการฟอกเยื่อกระดาษ ซึ่งใช้พลังงานน้อย และให้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพสูงเป็นผลมาจากการแยกลิกนินผ่านการย่อยโดยจุลินทรีย์ และจุดประสงค์อื่นๆ เพื่อล้างสี (deinking), การแยก (refining), การกำจัดสารสกัดและไขมัน การย่อยยางเหนียว การย่อยเปลือกไม้ การย่อยเฮมิเซลลูโลสก่อนนำเยื่อกระดาษไปฟอกสี

ความหลากหลายของโครงสร้างทางเคมีของลิกนินและวิธีการย่อยลิกนินโดยเอนไซม์ ทำให้ได้สารประกอบมวลโมเลกุลต่ำถูกปลดปล่อยออกมาการย่อยลิกนินจากไม้สน พบสารประกอบ 28 ชนิด ได้แก่ aromatic carboxylic acid 10 ชนิด และ acyclic 2,4-hexadiene-1,6-dioic acids 13 ชนิด ซึ่งได้จากการตัดตรงวงแหวน (Chen, C. et al., 1982; 1983) aromatic carboxylic acid

คือ กรดเบนโซอิกเกิดจากการตัดที่ชื่อว่า C_{α}-C_{β} oxidative cleavage ในแบคทีเรียสารประกอบฟีนอลิกที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกันในปฏิกิริยาการเปลี่ยนสารทางชีวภาพ (biotransformation) โดยใช้ *P. putida*, *R. jostii* RHA1 และ *Sphingomonas paucimobilis* (Masai et al., 2007) *S. paucimobilis* SYK-6 ในวัฏจักรการย่อยสารอะโรมาติก (aromatics catabolism) โดยเป็นวัฏจักรเมตาบอลิซึมของสารประกอบคาร์บอน 2 อะตอม เช่น β-aryl ethers, biphenyl, diarylpropanes, phenylcoumarane, pinoresinol และ ferulic acid ซึ่งการย่อยสารประกอบลิกนินจะได้สารเหมือนกัน คือ vanillin และ vanillic acid โดยจะถูกดึงคาร์บอนออกไปให้กับ protocatechuic acid ซึ่งมีแบคทีเรียในดินหลายชนิดมีความสามารถในการย่อยโดยใช้เอนไซม์ non-heme iron-dependent catechol dioxygenase (ภาพ 21) เปลี่ยนแปลงไปตามปฏิกิริยารีดอกซ์ (redox state) การแตกของ dioxygenase ring หรือผ่านการตัดพันธะภายใน (intradiol cleavage) ระหว่าง phenolic hydroxyl groups (protocatechuate 3,4-dioxygenase; iron (III)-dependent) หรือการตัดพันธะภายนอก (extradiol cleavage) ที่ใกล้กับหมู่ hydroxyl group (protocatechuate 4,5-dioxygenase; iron(II)-dependent) หรืออาจเกี่ยวเนื่องกับ ortho- และ meta-cleavage ตามลำดับ (T. D. Bugg et al., 2011) การย่อย protocatechuic acid เกิดโดยการตัดแบบ meta-cleavage โดยการทำงานของ 4,5-dioxygenase enzyme LigAB ได้ผลผลิตเป็น pyruvate และ oxaloacetate (Masai, E. et al., 1999) *P. putida* และ *Acinetobacter calcoaceticus* สามารถใช้ 3,4-dioxygenase และมี ortho-cleavage pathway โดยเปลี่ยน protocatechuic acid เป็น 3-oxoadipate ซึ่งจะเข้าสู่ TCA cycle ผ่านทางกระบวนการ β-ketoadipate catabolism (Harwood, CS., & Parales, RE., 1996) การวิเคราะห์โดยใช้เทคโนโลยีสารสนเทศของทั้งเอนไซม์ย่อยลิกนินและวิถีการย่อยสารอะโรมาติกในแบคทีเรียได้ยืนยันยีนที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายลิกนินที่มีอยู่ในคลาส proteobacteria และ actinobacteria อย่างไรก็ตามผลการวิเคราะห์โดยใช้เทคโนโลยีสารสนเทศช่วยส่งเสริมความหลากหลายของวิธีการย่อยสารประกอบอะโรมาติกและลิกนิน เอนไซม์และวิถีการย่อย เพื่อช่วยเพิ่มวิธีการบำบัดทางชีวภาพ

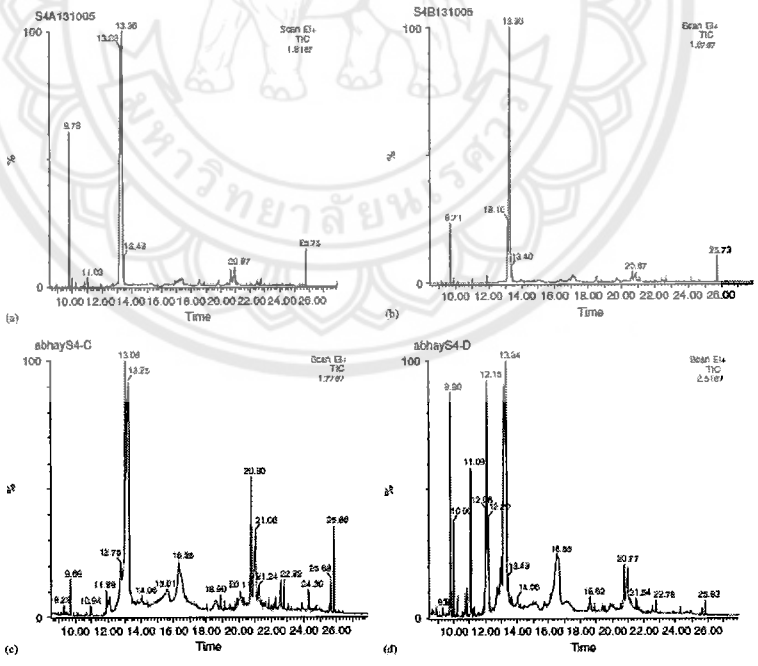


ภาพ 21 ผลิตภัณฑ์หลากหลายชนิดที่ได้จากการย่อยลิกนินถูกนำเข้าสู่ภายในเซลล์และถูกนำไปใช้ผ่านทางวัฏจักรการย่อยสารอะโรมาติก สารประกอบที่ได้จากลิกนินจะถูกเปลี่ยนให้เป็น protocatechuic acid ซึ่งขึ้นอยู่กับจุลินทรีย์แต่ละชนิดอาจมีการย่อยผ่านทางกลไก meta- หรือ ortho- cleavage เพื่อเข้าสู่ citric acid cycle

ที่มา: Fisher, & Fong, 2014

การวิเคราะห์ด้วย GC-MS

GC-MS เป็นวิธีที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์สารประกอบมวลโมเลกุลต่ำที่ถูกปลดปล่อยออกจากการย่อยลิกนินของจุลินทรีย์ (Hernandez-Coronado et al., 1998; Ksibi et al., 2003; Raj, A. et al., 2007) แสดงโคมาโตกราฟเปรียบเทียบระหว่างตัวอย่างควบคุมกับตัวอย่างที่ได้ทำการลงเชื้อ *Paenibacillus* sp., *Aneurinibacillus aneurinilyticus* และ *Bacillus* sp. แสดงภาพ 22 พีค RT ที่ 11.9 ถูกระบุว่าเป็น guaiacol ซึ่งเป็นสารประกอบอะโรมาติกเดี่ยวที่พบในตัวอย่างควบคุมและได้มาจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของลิกนินเนื่องจากการเขย่าเพื่อให้อากาศ (aeration) และการปั่นกวน (agitation) นอกจากนี้ยังพบสารประกอบของกรดหลายชนิดได้มากจากการย่อยลิกนินบางส่วนในระหว่างกระบวนการบำบัดแบบไม่ใช้อากาศและใช้อากาศในอุตสาหกรรม (Hernandez et al., 1997) ทำให้ทราบว่า kraft lignin ที่ใช้ในงานวิจัยสกัดได้มาจากน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมกระดาษและเยื่อกระดาษ ซึ่งถูกรายงานว่าปฏิกิริยา cupric oxide degradation ของลิกนินธรรมชาติจากเนื้อเยื่อพืชที่แตกต่างกันแสดงถึงสารประกอบอัลดีไฮด์พบในปริมาณที่มากกว่าสารประกอบคีโตนและสารประกอบของกรด

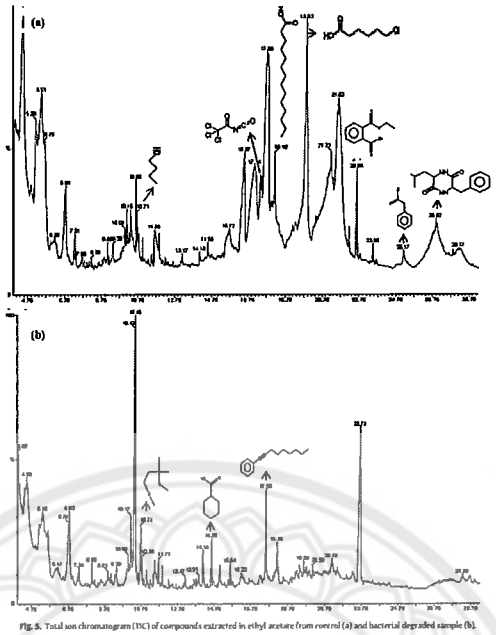


ภาพ 22 สารประกอบที่ถูกสกัดด้วย ethyl acetate **ของตัวอย่างควบคุม** (a) **และตัวอย่างที่ทำการบ่มเชื้อแบคทีเรียเป็นระยะเวลา** 6 **วัน** *Paenibacillus* sp.(b), *A. aneurinilyticus* (c) **และ** *Bacillus* sp.(d)

สารประกอบที่พบในสารสกัดที่ถูกย่อยโดย *Paenibacillus* sp. มีความคล้ายคลึงกับตัวควบคุม ซึ่งพบการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยที่แสดงในภาพ 22b บ่งชี้ว่าแบคทีเรียมีความสามารถทางชีวเคมีต่ำที่จะย่อยหรือเปลี่ยนแปลงโมเลกุลของลิกนิน ในการศึกษาก่อนหน้านี้แบคทีเรียแสดงปฏิกิริยาการลดลงของลิกนินต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับ *A. aneurinilyticus* และ *Bacillus* sp. (Chandra et al., 2005) ในทางตรงกันข้ามสารประกอบอะโรมาติกหลายชนิดที่พบในตัวอย่างสารสกัดที่ลงเชื้อโดย *A. aneurinilyticus* และ *Bacillus* sp. ซึ่งไม่พบในตัวอย่างควบคุม ภาพ 22c แสดงสารประกอบที่ได้จากการย่อยของ *A. aneurinilyticus* ให้ผลจำนวนของพีคเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญหลังจากการบ่มเป็นระยะเวลา 6 วัน ซึ่งพีคที่แสดงพบสารดังนี้ guaiacol (RT11.9) acetoguiacone (RT15.6) gallic acid (RT 21.2) และ furulic acid (RT 22.6) ได้จากลิกนินที่ถูกย่อยโดย *Bacillus* sp. (ภาพ 22d) สารประกอบอะโรมาติกที่พบมีความสัมพันธ์กับปฏิกิริยาออกซิเดชันของหน่วย sinapylic (G units) alcohol และ Coniferylic (S units) alcohol เนื่องจากสารประกอบเหล่านี้เป็นหน่วยฟังก์ชั่นพื้นฐานซึ่งเป็นโครงสร้างลิกนินในไม้เนื้อแข็ง เมื่อแยกส่วนสารประกอบอะโรมาติกออก พบว่า สารประกอบกรดพบมากกว่าหมู่อัลดีไฮด์และคีโตน เนื่องจากการย่อยลิกนินและกรดเหล่านี้เคยพบในระหว่างการย่อยลิกนินและน้ำทิ้งจากโรงงานเยื่อกระดาษ (Hernández, Hernández-Coronado, Ball, & Arias 2001; Gupta et al., 2001) นอกจากนี้ยังพบสารประกอบ dibutyl phthalate, bis-(2-methoxy ethyl) phthalate และ dio-octyl phthalate ซึ่งเคยถูกรายงานว่าได้จากการย่อยของเอนไซม์ fungal peroxidase จาก lignosulfonate (Shin, & Lee, 1999) และจากปฏิกิริยาการย่อยลิกนินจากน้ำล้างเยื่อกระดาษด้วยแสง (Ksibi et al., 2003) กรด cinnamic acid มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเชื่อมต่อของลิกนินและลิกโนเซลลูโลส ซึ่งเป็นองค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลส ถูกพบในสารสกัดที่ได้จากการย่อยโดย *Bacillus* sp. เช่นเดียวกับการพบ *t*-cinnamic acid, *p*-coumaric acid (4-hydroxycinnamic acid) และ ferulic acid (4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid) ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีหมู่ฟังก์ชั่นสองหมู่ ซึ่งจะสร้างพันธะเอสเทอร์และอีเทอร์โดยเกิดปฏิกิริยากับหมู่คาร์บอกซิลและหมู่ฟีนอลิก ตามลำดับ (Jeffries, 1990) ในระหว่างการย่อยเยื่อกระดาษด้วยด่างพันธะเอสเทอร์ส่วนใหญ่จะถูกทำลาย แต่มี cinnamic acid บางส่วนยังคงต่ออยู่กับลิกนินด้วยพันธะอีเทอร์ (Hernandez et al., 1997) ซึ่งจะถูกย่อยหรือปลดปล่อยโดยแบคทีเรีย สารประกอบที่ได้จากการย่อยของลิกนินโดยแบคทีเรีย ได้แก่ ferulic acid สามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการถนอมอาหารเนื่องจากความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยา peroxidation ของกรดไขมันและเป็นสารผสมโลชั่นทาผิวและครีมกันแดด ช่วยลดการอักเสบซึ่งเป็นผลข้างเคียงจากการรักษาทางเคมีและรังสี

(Graf, 1992) และ 3,4,5-trimethoxy benzaldehyde สามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมกลิ่นและน้ำหอม (Raj, A. et al., 2007)

Chandra R., & Singh R. (2012) ศึกษาการกำจัดสีและการล้างพิษของน้ำทิ้งที่ได้จากโรงงานเยื่อกระดาษเกรดสังเคราะห์โดยใช้เชื้อผสมสามสายพันธุ์ ได้แก่ *Pseudochrobactrum glaciale* (IITRP1,FJ581024), *Providencia rettgeri* (IITRP2, GU193984) และ *Pantoea* sp. (RCT2, FJ755943) ลดค่าสี ค่า COD และ BOD ได้เท่ากับ 96.02%, 91% และ 92.59% ตามลำดับ เป็นระยะเวลา 9 วัน กิจกรรมเอนไซม์ lignin peroxidase, manganese peroxidase และ laccase สูงสุดในชั่วโมงที่ 48, 72 และ 144 ชั่วโมง ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ GC-MS พบว่าจำนวนพีคในตัวอย่างที่เลี้ยงเชื้อผสมลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ไม่ได้ลงเชื้อ (ควบคุม) โดยพบพีคขนาดใหญ่ที่พบในตัวอย่างควบคุมที่สกัดโดย ethyl acetate ไม่ปรากฏหลังจากถูกย่อย ได้แก่ butane-1-ol (RT10.71), pyrrolo(1,2A)pyrazine-1,4-dione, hexahydro(RT17.14), tetradecanoic acid (RT18.18) 6-chlorohexanoic acid (RT19.93), 2,5-piperazinedione,3,6-bis (2-methyl propyl)(RT21.23), pyrrolo(1,4-dione,hexahydro-3-(phenyl methyl)(RT-21.63), 1,2 benzene carboxylic acid(RT22.65), benzeneacetic acid (RT25.17) และ cyclo-(L-leucyl-l-phenylalanyl)(RT26.92) และพบพีคใหม่จำนวนน้อยบ่งชี้ถึงสารผลิตภัณฑ์ที่ถูกสร้างขึ้น ได้แก่ 2,5-piperazinedione,3,6-bis (2-methyl propyl)(RT21.23) ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงหลังจากบ่มด้วยเชื้อผสมซึ่งเป็นธรรมชาติของสารประกอบนี้และเคยถูกนำมาใช้เป็นสารควบคุมการสร้างเมือกของจุลินทรีย์ในอุตสาหกรรมกระดาษ ในขณะที่ 4,5 octane diol(RT10.78), 2-methyl-2,4dimethoxy butane (RT10.74), 1 phenyl nonyne(RT17.58) อย่างไรก็ตาม 1 phenyl nonyne เป็นผลผลิตที่ได้จากการย่อยของ alkylphenol polyethoxylate ซึ่งถูกใช้เป็น non-ionic surfactant ในกระบวนการผลิตกระดาษ ซึ่งคล้ายกับ cyclohexane carboxylic acid (RT14.60) เป็นสารที่ถูกสร้างขึ้นในระหว่างการย่อยเนื้อไม้ที่อุณหภูมิและพีเอชสูง



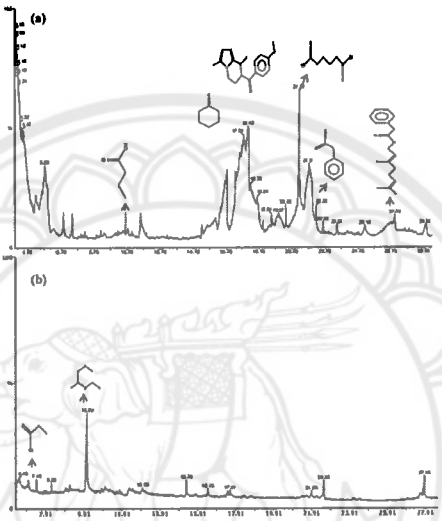
ภาพ 23 โครมาโตกราฟของสารสกัดethyl acetate ในตัวอย่างควบคุม (a) **และตัวอย่างที่ได้จากการย่อยของแบคทีเรีย** (b)

ที่มา: Chandra, R., & Singh, R., 2012

จากภาพ 24a พีคที่ได้จากสารสกัด dichloromethane ที่พบในตัวอย่างควบคุม ได้แก่ cyclohexanone (RT17.83), pyrrolo(1,2-A)pyrazine-1,4-dione,hexahydro-3(RT 18.11), 1-hexanedioic acid (RT21.22), benzene acetic acid(RT 22.33), 1-chloroheptacosane (RT23.51), geranyl phenylacetate (RT 27.00) สารประกอบส่วนใหญ่ที่พบมีความคล้ายคลึงกับสารประกอบฟาราฟิน (paraffin compounds) resin acid 3-dodecene (RT25.18), monoterpenes เช่น geranyl phenyl acetate (RT27.00) และกรดบางชนิดถูกสร้างขึ้นในกระบวนการสกัดเยื่อกระดาษโดยปฏิกิริยาออกซิเดชั่น เช่น butanoic acid (RT10.67), hexanedioic acid (RT21.22) oxalic acid (RT24.12)

Belem et al. (2008) รายงานว่าพบสารเหล่านี้ในน้ำทิ้งจากโรงงานเยื่อกระดาษ ในขณะที่หลังจากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียพบสาร 2 ชนิด คือ 1,1-diethoxy ethane (RT10.09) และ propanoic acid (RT 7.43) เป็นสารประกอบมวลโมเลกุลต่ำถูกสร้างเนื่องจากการย่อยสารประกอบเอลเครนสายยาว (long chain alkane compounds) (ภาพ 24b) จำนวนสารประกอบที่พบในน้ำทิ้งโรงงานเยื่อกระดาษเกรดสังเคราะห์เป็นที่ทราบกันดีว่าเป็นพิษ

มีสารประกอบหลายชนิด เช่น di, tri terpenoids, resin acids, aliphatic acids, amono ethanols และอื่นๆ ซึ่งล้วนเป็นสารประกอบที่ยับยั้งฮอร์โมนในต่อมไร้ท่อ (endocrine hormone disrupting compound) ซึ่งในระหว่างกระบวนการย่อยสารประกอบมวลโมเลกุลสูงที่พบในน้ำทิ้งจะถูกทำลายโดยจุลินทรีย์ได้เป็นสารประกอบมวลโมเลกุลต่ำและหน่วยฟีนอลขนาดเล็กจะถูกย่อยต่อโดยการตัดวงแหวนอะโรเมติก (Kukkota J. et al., 2006)

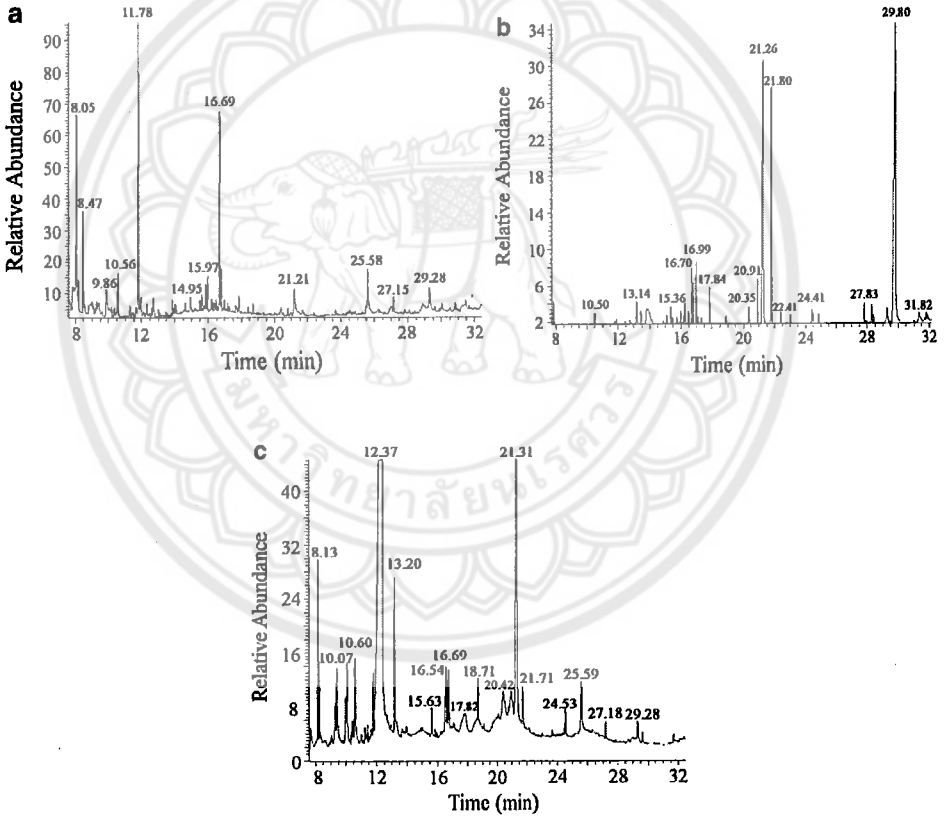


ภาพ 24 โครมาโตกราฟของสารสกัด dichloromethane ในตัวอย่างควบคุม (a) และตัวอย่างที่ได้จากการย่อยของแบคทีเรีย (b)

ที่มา: Chandra, R., & Singh, R., 2012

Shi, Chai, Tang, Yang, & Zhang (2013) ทำการเลี้ยงเชื้อ *Cupriavidus basilensis* B-8 ในอาหารที่มีองค์ประกอบของ Kraft lignin เข้มข้น 3g/l, $[NH_4]_2SO_4$ 2 g/l, K_2HPO_4 1 g/l, $MgSO_4$ 0.2 g/l, $CaCl_2$ 0.1 g/l, $FeSO_4$ 0.05 g/l และ $MnSO_4$ 0.02 g/l, pH 7.0 บ่มที่ 30 ^{o}C ความเร็ว 120 rpm ทำการเก็บตัวอย่างเป็นช่วงเวลา ได้แก่ วันที่ 0 , 3 และ 6 พบ acetic acid และ phenol ในระยะเวลาที่ RT=8.1 และ 10.6 ตามลำดับ เนื่องจากเป็นสารตัวกลางที่มีความสำคัญในช่วงการย่อยลิกนินของจุลินทรีย์ ซึ่งเกี่ยวเนื่องกับปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของลิกนินเนื่องจากการให้อากาศและการปั่นกวน อย่างไรก็ตามยังพบสารประกอบที่มีความเกี่ยวข้องกับลิกนินอื่นๆ ด้วย ระบุว่าเกิดจากลิกนินถูกย่อยบางส่วนในช่วงกระบวนการผลิตในอุตสาหกรรม จำนวนพีคจากโครมาโตกราฟหลังการบ่มด้วยแบคทีเรียเป็นระยะเวลา 3 และ 6 วันเมื่อเทียบกับ 0 วันเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ

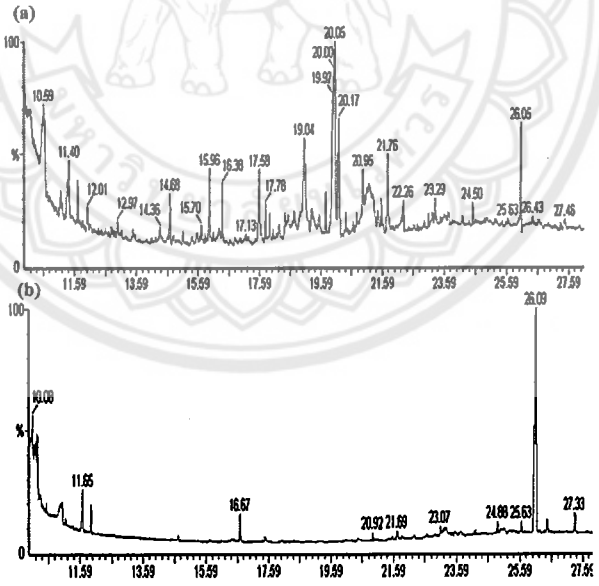
(ภาพ 25) พบพีคของสารประกอบมวลโมเลกุลต่ำ เช่น 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4-pyrone; 3,5-dimethylbenzaldehyde; 2-methylnaphthalene; cinnamic acid และ gentisate ซึ่งไม่พบในตัวอย่างควบคุม การพบสาร guaiacol –related compound และ cinnamic acid จะมีความเกี่ยวเนื่องกับปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของ guaiacyl units จากสารตัวกลางที่เป็น coniferyl alcohol และ *p*-hydroxyphenyl units ซึ่งเกิดจาก *p*-coumaryl alcohol สารเหล่านี้เป็นหน่วยพื้นฐานของ syringyl units โดยมีสารตัวกลางเป็น synapyl alcohol ทำหน้าที่เป็นองค์ประกอบของลิกนิน แต่อย่างไรก็ตามไม่พบสารประกอบที่ใกล้เคียงกับ syringyl นอกจากนี้พบสารประกอบอะโรมาติกและกรดต่างๆ มากกว่าสารประกอบที่เป็นอัลดีไฮด์และคีโตน



ภาพ 25 โครมาโตกราฟของสารประกอบที่สกัดได้โดย trichloromethane จากอาหารเพาะเลี้ยง kraft lignin ที่บ่มด้วย *Cupriavidus* **sp.B-8 (a) 0d; (b) 3d; (c) 6d**

Raj, A. et al. (2014) พบสารประกอบฟีนอลมวลโมเลกุลต่ำในตัวอย่างน้ำล้างเยื่อกระดาษที่ยังไม่ได้ทำการเติมเชื้อหลายชนิดและทำการระบุชื่อโดยใช้ NIST mass spectral database ได้แก่ 2-methoxyphenol (guaiacol) RT=14.68, 2,6-dimethoxy phenol (syringol)

RT=15.96, 2-methoxy-4-ethyl-phenol (4-ethyl guaiacol) RT=16.38, 3-allyl-6-methoxyphenol (m-eugenol) RT=19.04, ethanone 1-(-4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl) (acetosyringone) RT=19.97, benzoic acid RT=20.17, 2-methoxy-4-(1-propenyl) phenol (isoeugenol) RT=22.26 และ 4-methoxycinnamic acid RT=24.50 ซึ่งสารประกอบเหล่านี้เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยของลิกนินหน่วยย่อย (*p*-hydroxyphenyl, guaiacyl (G), และ syringyl(S)) (Gutiérrez, Rodríguez, & del Río, 2006) ซึ่งอาจจะได้มาจากอุตสาหกรรมการผลิตเยื่อกระดาษ (Gupta et al., 2001) นอกจากสารประกอบฟีนอลแล้ว ยังมีสารประกอบกรดอนุพันธุ์ phthalate และสารสกัดอื่นๆ เช่น acetic acid RT=11.4, benzene acetic acid RT=17.58, hexadecanoic acid RT=21.68, octadecane RT=23.07 และ octadecanoic acid RT=23.29, phthalic anhydride RT=15.70 และ 1,2-benzenedicarboxylic acid (phthalic acid) RT=20.95 และ clionasterol acetate RT=22.29 การวิเคราะห์โดย GC-MS (ภาพ 26) พบสารประกอบในตัวอย่างที่ยังไม่ได้ทำการย่อยด้วยแบคทีเรียจำนวนมาก เป็นผลยืนยันความสามารถของแบคทีเรียในการใช้น้ำล้างเยื่อกระดาษเป็นแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน และพลังงานได้ (Raj et al., 2014)



ภาพ 26 โครมาโตกราฟของสารประกอบที่สกัดได้โดยใช้ethyl acetate ในตัวอย่างควบคุม (a) และตัวอย่างน้ำล้างเยื่อกระดาษหลังจากการย่อยของแบคทีเรีย *Paenibacillus* sp.(b)

การเปลี่ยนแปลงเป็นสารโพลีเมอร์ของลิกนิน (Polymerization of lignin)

โมเลกุลลิกนินประกอบด้วย non-phenilic subunit ร้อยละ 80-90 และ phenolic subunits ร้อยละ 10-20 (Schoemaker, Harvey, Bowen, & Palmer, 1985) ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสเกิดที่หน่วย phenolic subunit เนื่องจากหน่วย non-phenolic subunit มีค่ารีดอกซ์ (redox potential) สูงกว่า (>1.5 V vs.NHE) ทำให้ไม่สามารถถูกออกซิไดซ์ได้ด้วยเอนไซม์แลคเคส ซึ่งถือเป็นข้อจำกัดของเอนไซม์แลคเคส ซึ่งสามารถแก้ไขข้อจำกัดนี้ได้โดยการใช้สารตัวกลาง หรือ mediator (Rochefort et al., 2004) สารตัวกลางนี้เป็นสารประกอบเคมีขนาดเล็กซึ่งจะถูกออกซิไดซ์อย่างต่อเนื่องโดยเอนไซม์แลคเคสและถูกรีดิวซ์โดยซับเตรทตามลำดับ เนื่องจากขนาดของซับเตรทไม่สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับเอนไซม์แลคเคสที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ได้ สารตัวกลางจึงทำหน้าที่นำอิเล็กตรอนระหว่างเอนไซม์และซับเตรทเพื่อเอาชนะปัญหาด้านขนาดของโมเลกุลขนาดใหญ่ที่ขัดขวางการเข้าทำปฏิกิริยา (K. Li, Xu, & Eriksson, 1999) ดังนั้นเอนไซม์แลคเคสที่มีสารตัวกลางอยู่ในปฏิกิริยา (Laccase mediator systems หรือ LMS) จึงมีความสามารถในการออกซิไดซ์สูงกว่าเอนไซม์แลคเคสเพียงอย่างเดียว การเพิ่มความสามารถในการออกซิไดซ์ของเอนไซม์ถ้าสารตัวกลางถูกออกซิไดซ์โดยเอนไซม์แลคเคสด้วยการให้อิเล็กตรอนแก่บริเวณเร่งของเอนไซม์และจะออกซิไดซ์หน่วย non-phenilic subunit ของลิกนิน สารประกอบหลายชนิดถูกรายงานว่าเป็นสารตัวกลางของเอนไซม์แลคเคส แบ่งเป็นสารตัวกลางธรรมชาติ (natural compounds) และสารตัวกลางที่ได้จากการสังเคราะห์ (synthetic compounds) (Christopher, Yao, & Ji, 2014) สารในธรรมชาติเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยลิกนินทำให้ยากต่อการระบุความสามารถของเอนไซม์แลคเคสอย่างเดียวกับความสามารถของเอนไซม์แลคเคสที่มีสารตัวกลาง ยกตัวอย่างสารตัวกลางธรรมชาติที่ทำหน้าที่เป็น laccase mediators ในการย่อยลิกนิน เช่น acetosyringone, syringaldehyde, *p*-coumaric acid, vanillin, acetovanillone (Andreu, & Vidal, 2011) สารประกอบสารตัวกลางที่ได้จากการสังเคราะห์ (synthetic compounds) ได้แก่ HBT (1-hydroxybenzotriazole) ABTS (2,2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate)) TEMPO (2,2,6,6-trtramethylpiperidine 1-oxyl) และ violuric acid เป็นต้น เอนไซม์แลคเคสที่มีสารตัวกลางอยู่ในปฏิกิริยา (LMS) สามารถเร่งปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระ (radicals) นอกเหนือจากอนุมูลฟีนอคซี (phenoxy radicals) ขึ้นอยู่กับปฏิกิริยาของเอนไซม์แลคเคสที่ได้จาก *T. versicolor* และ HBT ทำให้ได้ non-phenolic β-o-4' lignin model dimer

Kawai, Nakagawa, & Ohashi (2002) ศึกษา β-aryl radical cation และ benzylic radical เป็นสารตัวกลางในปฏิกิริยาการตัดแบบสุ่ม ได้แก่ Cβ-ether cleavage, C_{α}-Cβ cleavage,

C_α-oxidation และ aromatic ring cleavages การศึกษานี้บ่งชี้ว่าเอนไซม์แลคเคสที่มีสารตัวกลางอยู่ในปฏิกิริยา (LMS) สามารถดัดแปลงและตัดพันธะของ non-phenolic subunit ของลิกนิน ได้Shleev et al. (2006)พบการเปลี่ยนแปลงที่เกิดกับน้ำหนักโมเลกุลในปฏิกิริยาที่มีสารตัวกลาง ABTS และ HBT จากนั้น Hernández Fernaud et al. (2006) ได้ผลเช่นเดียวกับงานของ Shleev ทำให้เขาทั้งสองให้ข้อสรุปว่า สารตัวกลางและประเภทของสารตัวกลางมีผลต่อกิจกรรมการเร่งปฏิกิริยา ดังนั้นอาจจะมีความเป็นไปได้ที่จะควบคุมผลิตภัณฑ์การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์แลคเคสในการย่อยลิกนินผ่านทางการใช้สารตัวกลาง นอกจากนี้ทั้งสองการทดลองใช้ kraft lignin ซึ่งเป็นสารที่มีโครงสร้างโมเลกุลลิกนินขนาดใหญ่ แต่เอนไซม์แลคเคสที่มีสารตัวกลางอยู่ในปฏิกิริยา (LMS) ยังคงสามารถตัดพันธะเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการแตกโมเลกุลพอลิเมอร์ (depolymerization) และความสามารถในการออกซิไดซ์สารตัวกลางบางชนิด เช่น TEMPO และ acetosyringone ทำให้เกิดปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงเป็นสารโพลิเมอร์ลิกนิน (Polymerization of lignin) (Moya et al., 2011)

Nugroho Prasetyo et al. (2010) พบการเปลี่ยนแปลงเป็นสารโพลิเมอร์ลิกนินโดยการใช้เอนไซม์แลคเคสที่มีสารตัวกลางอยู่ในปฏิกิริยาทั้ง ABTS และ HBT Li et al. (2007) กล่าวว่าการแข่งขันระหว่างปฏิกิริยาการแตกพันธะโพลิเมอร์ลิกนิน (depolymerization) และการต่อสายโพลิเมอร์ลิกนิน (repolymerization) เกิดขึ้นเมื่อการแตกพันธะ β-O-4' ด้วยการระเบิดพันธะด้วยไอน้ำ (stream explosion) ของไม้แอสเพน และไม่สามารถคาดการณ์ผลจากสภาวะและสารตัวกลางได้

Moldes et al. (2008; Barneto et al., 2012) ศึกษาผลของเอนไซม์แลคเคสที่มีสารตัวกลางอยู่ในปฏิกิริยา (LMS) ในการย่อยกากลิกนินที่ติดอยู่กับเยื่อกระดาษเกิดการแข่งขันระหว่างปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของลิกนิน (mediated oxidation) กับปฏิกิริยาควบคู่ (oxidative coupling) ของสารตัวกลาง หรือ grafting ซึ่งผลของปฏิกิริยาอาจขึ้นอยู่กับสารตัวกลางจำเพาะ (mediator identity)

Mattinen et al. (2008) เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงเป็นสารโพลิเมอร์ของลิกนินที่แตกต่างกัน ได้แก่ Flax Soda lignin, Spruce EMAL และ Eucalyptus dioxane lignin โดยเอนไซม์แลคเคสของ *Trametes hirsute* พบว่า ระดับในการเปลี่ยนแปลงเป็นสารโพลิเมอร์ของลิกนิน (degree of polymerization) เพิ่มขึ้นตามลำดับดังนี้ Spruce EMAL < Eucalyptus dioxane lignin < Flax Soda lignin ซึ่งจะเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการใช้เอนไซม์ในการเพิ่มคุณสมบัติของลิกนิน

Kim et al. (2009) กล่าวถึงคุณสมบัติเอนไซม์แลคเคสจากเชื้อราในกลุ่มแอสโคมายซิส (*Myceliophthora*) 2 รูปแบบ ได้แก่ คุณสมบัติในการแตกพันธะลิกนินและคุณสมบัติในการเปลี่ยนแปลงเป็นสารโพลิเมอร์ลิกนิน โดยศึกษาปฏิกิริยาการออกซิไดซ์ลิกโนซัลโฟเนตโดยการเร่งปฏิกิยาของเอนไซม์แลคเคส แสดงด้วยค่าประจุพื้นผิว (zeta potential values) เพิ่มขึ้นหลังจากหลายวันของการบ่มในช่วงการเกิดปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงเป็นสารโพลิเมอร์และการเพิ่มขึ้นของมวลโมเลกุล 1700 Da ของลิกโนซัลโฟเนต

Areskogh et al. (2010) ศึกษาปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงเป็นสารโพลิเมอร์ลิกนิน (polymerization) โดยการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักโมเลกุลของลิกโนซัลโฟเนต โดยการเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์แลคเคส พร้อมอธิบายรูปแบบในการเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงเป็นสารโพลิเมอร์ลิกนินโดยเอนไซม์แลคเคสว่าในช่วงเริ่มต้นปฏิกิริยาจะเกิดการออกซิเดชั่นหมู่ฟีนอลให้ได้เป็นอนุมูลอิสระที่เสถียร จากนั้นเกิดปฏิกิริยาควบคู่ของอนุมูลอิสระ (radical-radical coupling) ผ่านทางการสร้างพันธะ phenyl ether-carbon และ carbon-carbon bonds โดยพันธะเหล่านี้ถูกสร้างเชื่อมต่อภายในโมเลกุลของลิกโนซัลโฟเนตขนาดใหญ่ และเชื่อมหนึ่งโมเลกุลของลิกโนซัลโฟเนตขนาดใหญ่กับอีกหนึ่งโมเลกุลเป็นผลทำให้มีการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักโมเลกุล

Gouveia, Fernández-Costas, Sanromán, & Moldes (2012) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงเป็นสารโพลิเมอร์ลิกนินของลิกนินในน้ำล้างเยื่อกระดาษจากไม้ยูคาลิปตัส (Eucalypyus globulus) โดยเอนไซม์แลคเคสจาก *Myceliopthora thermophile* แบ่งเป็น 2 ปัจจัย คือ การเติมและไม่เติมสารประกอบมวลโมเลกุลต่ำ พบมวลโมเลกุลเพิ่มขึ้นอยู่ในช่วง 4 –21 เท่า และปัจจัยการเติมสารประกอบมวลโมเลกุลต่ำไม่ช่วยส่งเสริมระดับการเปลี่ยนแปลงเป็นสารโพลิเมอร์ลิกนิน (polymerization degree) ต่อมา Gouveia et al. (2013) ศึกษาสภาวะในด้านปัจจัยของพีเอช อุณหภูมิ ความเข้มข้นเอนไซม์และระยะเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงเป็นสารโพลิเมอร์ลิกนินของน้ำล้างเยื่อกระดาษจากไม้ยูคาลิปตัส (*E. globulus*) และส่วนผสมของน้ำล้างเยื่อกระดาษจากสนและไม้ยูคาลิปตัส (*Pinus pinaster*/*E. globulus*) พบสภาวะที่เหมาะสมพีเอช 7.3 อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสความเข้มข้นเอนไซม์ 2 U/ml เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง ให้โพลิเมอร์มวลโมเลกุลเพิ่มขึ้น 69 เท่าเมื่อเทียบกับมวลโมเลกุลเริ่มต้นโดยขึ้นอยู่กับวัตถุดิบ

Madad, Chebil, Charbonnel, Ioannou, & Ghoul (2013) ศึกษาปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงเป็นสารโพลิเมอร์ด้วยเอนไซม์ของ sodium lignosulfonates (SLS) ได้แก่ commercial SLS (17800 Da), F1 (4300 Da), F2 (2500 Da) และ F3 (2300 Da) โดยเอนไซม์แลคเคส ในด้านผลของการเร่งปฏิกิริยา น้ำหนักโมเลกุลเริ่มต้นและสารตัวกลาง พบน้ำหนักโมเลกุลเพิ่มขึ้นตามแหล่ง

ของเอนไซม์แลคเคส แหล่งที่มาของเอนไซม์ ความเข้มข้นของซับเตรท และน้ำหนักโมเลกุลของ SLS เริ่มต้น พบน้ำหนักโมเลกุลสูงสุดได้จากแลคเคสที่มีแหล่งที่มาจากเชื้อราโดยเฉพาะ *Trametes versicolor* ในขณะที่ไม่พบการเร่งปฏิกิริยาเกิดขึ้นกับเอนไซม์ที่ได้จากพืชการเพิ่มน้ำหนักโมเลกุลสูงสุด 108600 Da เมื่อใช้ commercial SLS (17800 Da) ที่ความเข้มข้น ของ SLS เท่ากับ 50 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 30 U/ml ซึ่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงเป็นสารโพลิเมอร์ด้วยเอนไซม์แลคเคสจาก *T. versicolor* ของ F1 สามารถพัฒนาได้โดยการใช้สารตัวกลาง 5 ชนิด ได้ แก่ acetosyringone (ASG), violuric acid (VLA), 1-hydroxy- benzotriazole (HBT), acetovanillone (ACV) และ 2-2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline–6-sulfonic acid) (ABTS) พบว่า มีเพียง ASG และ VLA ให้ค่าน้ำหนักโมเลกุล 7500 Da สูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับปฏิกิริยาที่ไม่มีการเติมสารตัวกลาง (6600 Da)

Engel, Hundt, & Schapals (2016) ศึกษาการเพิ่มผลได้ลิกนินของกระบวนการผลิตเยื่อกระดาษในสภาวะด่าง (Alkaline polyol pulping process) โดยการเติมเอนไซม์แลคเคสที่ได้จาก *M. thermophile* ลงในน้ำล้างเยื่อกระดาษ พบมวลโมเลกุลเพิ่มขึ้น 800% การตกตะกอนลิกนินไม่ส่งผลต่อมวลโมเลกุล ที่สภาวะที่เหมาะสมมวลลิกนินที่ตกตะกอน และ มวลโมเลกุลเพิ่มขึ้น 36% และ 385% ตามลำดับ ค่าดูดกลืนแสงยูวีลดลง 62% และการเติมสารตัวกลางช่วยส่งเสริมปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงเป็นสารโพลิเมอร์ลิกนินแต่ลดปริมาณลิกนินตกตะกอน (precipitable lignin)

Sánchez-González, Martín-Martínez, & Dobado (2017) อธิบายกลไกปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงเป็นสารโพลิเมอร์ลิกนิน ซึ่งช่วยพัฒนาวิธีการแตกพันธะลิกนิน (depolymerization) โดยวิธีการคำนวณด้วยคอมพิวเตอร์ได้แก่ 1) การคำนวณค่า density functional theory (DFT) เพื่อศึกษาวิธีการที่เหมาะสมที่สุดและคำนวณโครงสร้างทางเคมีและค่า reaction enthalpies สำหรับการต่อโมโนเมอร์ในแต่ละครั้ง (monollignol dimerization) ซึ่งเป็นกุญแจที่ง่ายที่สุดในการควบคุมปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงเป็นสารโพลิเมอร์ 2) ทฤษฎีควอนตัมของอะตอมในโมเลกุล (Quantum theory of atoms in molecules, QTAIM) ถูกนำมาใช้เพื่อให้เข้าใจกลไกของปฏิกิริยาควบคู่ (coupling reaction mechanisms) สำหรับแต่ละชนิดของอนุมูลอิสระ และค่า transition states (TS_s) 3) ปฏิกิริยาควบคู่ของการสร้างพันธะ β-O-4 ตามทฤษฎีกลไกที่แสดง สำหรับการสร้างพันธะที่ไม่แข็งแรงพบว่ามีความสำคัญในการจัดเรียงสารที่เข้าทำปฏิกิริยา เช่นการสร้างพันธะไฮโดรเจนระหว่างออกซิเจนของอนุมูลอิสระฟีนอลและพันธะอัลลิฟาติกของแอลกอฮอล์ร่วมกับความสัมพันธ์ระหว่างวงแหวนอะโรมาติก ตำแหน่งของสารที่เข้าทำปฏิกิริยาซึ่งเหมาะสมต่อการสร้างพันธะ β-O-4 พบว่า 1) ค่าการหมุนของอิเล็กตรอนของอนุมูลอิสระแต่ละโมโนเมอร์

การสร้างอนุมูลอิสระฟีนอลจากโมโนเมอร์หลักเป็นขั้นตอนแรกของของปฏิกิริยาควบคู่ของอนุมูลอิสระ (radical-coupling reaction) ทำให้เกิดการสังเคราะห์ลิกนินทางชีวภาพ การจัดลักษณะอนุมูลอิสระแต่ละชนิดรายงานจากค่าการหมุนที่ได้จากการวิเคราะห์ค่าคลื่นที่ไม่จำเพาะด้วย HSEH1PBE/6-311++G(d,p) จากทั้งอนุมูลอิสระทั้งสามพบแนวโน้มที่คล้ายกันของทั้งสามโมโนเมอร์แอลกอฮอล์ที่ซึ่งมีอนุมูลอิสระ O อะตอมในการสร้างพันธะ β-O-4 โดยค่าความหนาแน่นการหมุนของออกซิเจนอยู่ที่ 0.274-0.312 เป็นตำแหน่งที่สามารถเข้าทำปฏิกิริยาได้ง่ายที่สุดในอนุมูลอิสระ ตามด้วย C1 ที่ตามด้วย O อะตอมเป็นบริเวณที่สามารถเข้าทำปฏิกิริยาได้ง่าย ซึ่งไม่สัมพันธ์กับค่าความชุกที่ถูกรายงานของพันธะ C1 ในลิกนิน โดยได้ให้ข้อเสนอว่าพันธะ C1 อาจเกิดภายใต้สภาวะแวดล้อมที่จำเพาะเช่นตำแหน่ง α และ β ที่อิ่มตัว ตำแหน่งอื่นๆ เช่น Cβ, C_3และ C_5 สอดคล้องกับค่าการหมุน ซึ่งเข้าทำปฏิกิริยาได้ต่ำกว่าอะตอม O และ C1 แม้ว่าตำแหน่ง C_3-C_5 เหมาะสมในการแบ่งอิเล็กตรอน กลไกปฏิกิริยาควบคู่ระหว่างโมโนเมอร์ของลิกนินและโมโนเมอร์ของอนุมูลอิสระ กลไกแรกของปฏิกิริยาควบคู่ β-O-4 ภายใต้สภาวะที่พิจารณารวมโมโนเมอร์ของอนุมูลอิสระรูปแบบพลังงานในขณะที่ coumaryl alchohol เกิดปฏิกิริยาควบคู่กับอนุมูลอิสระ coniferyl alcohol ทำการคำนวณค่า DFT ของกลไกซึ่งมีโอกาสเป็นไปได้สองรูปแบบเช่นการสร้างพันธะไฮโดรเจนระหว่างอะตอมของอัลลิฟาติกแอลกอฮอล์ของ coumaryl molecule และ O อะตอมของอนุมูลอิสระฟีนอลทำให้ค่า TS_s ลดค่าพลังงานที่ใช้ไป 4Kcal mol^{-1} ซึ่งใช้ศึกษาผลของพันธะไฮโดรเจนในการช่วยให้เกิดความเสถียรของโมเลกุล นอกจากนี้ผลของหมู่ MeO ผลของอนุมูลอิสระที่ไม่เสถียรของค่า TS และการเพิ่มพลังงานกระตุ้นพบว่าจะเกิดแรงผลักของหมู่ MeO ในความเสถียรสัมพัทธ์ของอนุมูลอิสระซึ่งสูญเสียอิเล็กตรอนคู่ ซึ่งค่า O atom ลดลงจะปรากฏหมู่ MeO โดยมีค่า Gibbs free activation energy เท่ากับ 18 Kcal mol^{-1} และ Gibb free reaction energy เท่ากับ 5.0 Kcal mol^{-1}

การจัดเรียงอนุภาค (geometrical arrangement) ที่ใกล้ชิดกับ O atom ของอนุมูลโมโนเมอร์อิสระกับ Cβ ของ coumaryl alcohol ในปฏิกิริยา การจัดเรียงอนุภาคทำให้ทราบการสร้างวงแหวนอะโรเมติก ปฏิกิริยาระหว่าง $\pi - \pi$ อธิบายได้ด้วยการสร้างพันธะไฮโดรเจนความหนาแน่นในการหมุนของอะตอม O และ Cβ ใน transition states ทำให้เกิดการสร้างพันธะ β-O-4 ในกรณีของอะตอม O ของอนุมูลโมโนเมอร์อิสระลิกนิน ค่าความหนาแน่นในการหมุนเท่ากับ 0.264 อย่างไรก็ตามการลดค่า TS เท่ากับ 0.232 ที่ตำแหน่ง C_α ใน Coumaryl alcohol เพิ่มขึ้น 0.343 การเพิ่มค่าการหมุนของตำแหน่ง C_α จะมีขนาดใหญ่กว่าในผลิตภัณฑ์ ซึ่งมีค่า

เท่ากับ 0.583 ซึ่งเป็นตำแหน่งที่เข้าทำปฏิกิริยาได้ง่ายและเหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยาควบคู่ (oxidative coupling)

Ramalingam, Sana, Seayad, Ghadessy, & Sullivan (2017) ศึกษาการเร่งปฏิกิริยาการต่อสายโอลิโกเมอร์ (oligomerisation) ของ dimeric β-O-4 linked lignin model compound ด้วยเอนไซม์แลคเคสพบเอนไซม์แลคเคสมีความจำเพาะต่อสารประกอบฟีนอลที่เป็นซับเตรท ทำให้ได้อนุมูลฟีนอลอิสระที่จำเป็นสำหรับปฏิกิริยาการต่อสายโอลิโกเมอร์อย่างต่อเนื่อง นอกจากนี้การลดความเข้มข้นของเอนไซม์แลคเคสจาก 20 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เป็น 2 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ไม่มีผลต่อค่าการกระจายของน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight distribution, Mw/Mn) ของแต่ละโอลิโกเมอร์ที่ถูกสร้างขึ้น และพบว่าน้ำที่ทำหน้าที่เป็นตัวทำละลายในปฏิกิริยาช่วยให้ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการต่อสายโอลิโกเมอร์มีความเสถียร ดังนั้นเอนไซม์แลคเคสที่ขึ้นชื่อว่าเป็นเอนไซม์ที่มีศักยภาพในการแตกพันธะลิกนินกลับมีความสามารถในปฏิกิริยาการต่อสายโอลิโกเมอร์ด้วยปฏิกิริยา oxidative coupling มากกว่าการตัดพันธะด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชั่นควบคู่ (oxidative cleavages) ถึงแม้ว่าเอนไซม์แลคเคสจะมีความสามารถในการย่อยโพลิเมอร์ลิกนินขนาดใหญ่ในปฏิกิริยาที่มีสารตัวกลางอยู่ในปฏิกิริยาให้ได้เป็นโมโนเมอร์หรือไดเมอร์ (monomeric lignin compounds หรือ dimeric lignin compounds) สารที่เกิดขึ้นเหล่านี้อาจเกิดปฏิกิริยาการต่อสายโพลิเมอร์ซ้ำไปซ้ำมา (re-polymerisation) ในทันทีภายใต้สภาวะเดียวกันกับการย่อยลิกนินของเอนไซม์แลคเคส

Toledano, Serrano, & Labidi (2014) ศึกษาการย่อยลิกนินให้ได้ลิกนินโมโนเมอร์ (monomeric phenolic compound) โดยหลีกเลี่ยงหรือยับยั้งการเกิดปรากฏการณ์การต่อสายโพลิเมอร์ลิกนินของโมโนเมอร์ลิกนิน (repolymerization phenomenon) โดยการเติม boric acid และ phenol ทำหน้าที่เป็น capping agent ในอัตราส่วนที่แตกต่างกันซึ่งจะป้องการการต่อสายโพลิเมอร์ลิกนิน พบว่า capping agent ไม่สามารถหลีกเลี่ยงหรือยับยั้งปฏิกิริยาการต่อสายโพลิเมอร์ลิกนินได้ (lignin repolymerization) มีเพียง boric acid ในอัตราส่วนที่ต่ำสุด (1:0.75) ดังตาราง 7 เมื่อเปรียบเทียบกับ blank (NaOH) ให้ผลมวลโมเลกุลของลิกนินต่ำกว่า blank

ตาราง 7 ผลการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุล (HPSEC) แสดงค่าน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยน้ำหนัก (weight-average, Mw) น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยจำนวน (number-average, Mn) ค่าการกระจายน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight and polydispersity, Mw/Mn) ของลิกนิน

	Mw	Mn	Mw/Mn
Rough lignin	7232	2125	3.40
Blank	19957	4768	4.19
H_3BO_3 1:0.75	15448	5366	2.88
H_3BO_3 1:1	31305	10023	3.12
H_3BO_3 1:2	27515	6711	4.10
Phenol 1:0.75	10296	3637	2.83
Phenol 1:1	10267	3797	2.70
Phenol 1:2	25594	7833	3.27

ที่มา: Toledano et al., 2014

ถ้าความเข้มข้นของกรดบอริก (boric acid) เพิ่มขึ้น ค่าน้ำหนักมวลโมเลกุลของลิกนินจะเพิ่มขึ้นตาม โดยให้เหตุผลว่าปฏิกิริยาการต่อสายโพลิเมอร์ลิกนิน (repolymerization reactions) เกิดขึ้นอย่างสุ่มและชิ้นส่วนของลิกนินที่ไม่เสถียรสามารถทำปฏิกิริยากับลิกนินที่ยังไม่ได้ถูกย่อยอย่างสุ่มได้ ส่วน phenol ที่ทำหน้าที่ capping agent ให้ผลน้ำหนักโมเลกุลต่ำที่อัตราส่วน 1:0.75 และ 1:1 (ตาราง 7) เมื่อเทียบกับ blank อย่างไรก็ตามอัตราส่วน phenol ที่มากเกินไป (1:2) กลับช่วยเพิ่มปฏิกิริยาการต่อสายโพลิเมอร์ลิกนิน ซึ่งน่าจะเกิดจากการทำปฏิกิริยาของฟีนอลร่วมกับชิ้นส่วนของลิกนินที่ไม่เสถียรทำปฏิกิริยาโครงสร้างลิกนินดั้งเดิมหรือลิกนินที่ยังไม่ได้ถูกย่อย ดังนั้นฟีนอลที่มากเกินไปจะช่วยส่งเสริมการต่อสายโพลิเมอร์ลิกนิน

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. Autoclave, Hirayama, HA-300MW
2. Centrifuge, Hettich, EBA 20
3. UV/visible spectrophotometers, Jenway, 7315
4. pH Bench Meter, OHAUS, ST3100-F
5. Hot Air Oven, MEMMERT, UM800
6. Rotary evaporator, Lab Tech, EV311
7. Shaking Incubator, ShelLab, SI6R
8. Fourier Transform Infrared Spectroscopy, Thermo scientific, model Nicolet 6700
9. Gas Chromatograph – Mass Spectrometer, Agilent, model GC7890 A MS5973C
10. Gel Permeation Chromatography (GPC), Water, Alliance e2695

สารเคมี

1. Lignin alkali, Aldrich, analytical grade
2. Glucose ($C_6H_{12}O_6$), Ajax Finechem, analytical grade
3. Peptone, Himedia, Technical grade
4. Sodium nitrate ($NaNO_3$), MERCK, analytical grade
5. Urea (NH_2CONH_2), Ajax Finechem, analytical grade
6. Acetic acid (CH_3COOH), MERCK, analytical grade
7. Furfural ($C_5H_4O_2$), MERCK, analytical grade
8. 5-Hydroxymethylfurfural ($C_6H_6O_3$), MERCK, analytical grade
9. Vanillin ($CH_3OC_6H_3$-2-(OH)CHO), Sigma-Aldrich, analytical grade
10. Ferulic acid($C_{10}H_{10}O_4$), Sigma-Aldrich, analytical grade
11. p-hydroxybenzoic acid ($C_7H_6O_3$), Sigma-Aldrich, analytical grade

12. t-Cinnamic acid (C6H5CH=CHCOOH), Sigma-Aldrich, analytical grade
13. Gallic acid ($(HO)_3C_6H_2CO_2H$), Sigma-Aldrich, analytical grade
14. Guaiacol ($(CH_3O)C_6H_4OH$), Sigma-Aldrich, analytical grade
15. Syringic acid ($HOC_6H_2(OCH_3)_2CO_2H$), Sigma-Aldrich, analytical grade
16. Disodium phosphate (Na_2HPO_4), MERCK, analytical grade
17. Dipotassium phosphate (K_2HPO_4), MERCK, analytical grade
18. Ammonium nitrate (NH_4NO_3), MERCK, analytical grade
19. Magnesium sulfate ($MgSO_4$), MERCK, analytical grade
20. Calcium chloride ($CaCl_2$), MERCK, analytical grade
21. Ethyl acetate ($C_4H_8O_2$), Fisher Chemical, analytical grade
22. Anhydrous Sodium sulfate (Na_2SO_4), MERCK, analytical grade
23. 1,4-Dioxane ($C_4H_8O_2$), Sigma-Aldrich, analytical grade
24. Pyridine (C_5H_5N), MERCK, analytical grade
25. N,O-Bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (CH3C[=NSi(CH3)3]OSi(CH3)3) , Sigma-Aldrich, analytical grade
26. Trimethylcholorsilane ($(CH_3)_3SiCl$), Sigma-Aldrich, analytical grade

วิธีการวิจัย

1. ตัวอย่างที่นำมาทำการคัดแยกจุลินทรีย์

ทำการเก็บตัวอย่างจากโรงงานเยื่อกระดาษจากชานอ้อย บริษัท เอ็นไวรอนเม็นท์ พัลพ์ แอนด์ เปเปอร์ จำกัด (EPPCO) ต.หนองโพ จ.นครสวรรค์ โดยแบ่งตัวอย่างเป็น 3 ประเภท ได้แก่ ดินปนเปื้อน ตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสีย และน้ำในคูน้ำรอบๆ กองชานอ้อยใส่ลงในภาชนะปลอดเชื้อ เก็บรักษาตัวอย่างที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และนำมาคัดแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการภายใน 6 ชั่วโมง

2. การคัดแยกจุลินทรีย์

2.1 การคัดแยกด้วยอาหาร modified MXYP

นำตัวอย่างปริมาณ 10 กรัม ใส่ลงในอาหารเหลว modified Malt extract, Xylose, Yeast extract, and Peptone (mMXYP, ภาคผนวก ก) (Yewale, Panchwagh, Rajagopalan, Dhamole, & Jain, 2016) ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ที่มีการเติมสารพิษจำพวก acetic acid, 5-HMF และ Furfural (Okuda et al., 2008) บ่มที่อุณหภูมิ 40 °C เขย่าด้วยความเร็ว 150 rpm เป็นเวลา

36 ชั่วโมง นำอาหารเลี้ยงเชื้อมาทำการคัดแยกเชื้อโดยวิธีการ spread plate และทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการ streak plate บนอาหาร MXYP agar ไม่มีการเติมสารพิษ (acetic acid, 5-HMF, furfural) นำโคโลนีเดี่ยวที่คัดแยกได้ไประบุชื่อเชื้อในขั้นตอนต่อไป

2.2 การคัดแยกด้วยอาหาร modified PDB

นำตัวอย่างปริมาณ 10 กรัม ใส่ลงในอาหารเหลว modified Potato & Dextrose Broth (mPDB, ภาคผนวก ก) (Zhang et al., 2013) ปริมาตร 90 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 40 °C เขย่าด้วยความเร็ว 150 rpm เป็นเวลา 36 ชั่วโมง นำอาหารเลี้ยงเชื้อมาทำการคัดแยกเชื้อโดยวิธีการ spread plate และทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการ streak plate บนอาหาร PDA ซึ่งไม่มีการเติมสารพิษ (furfural) นำโคโลนีเดี่ยวที่คัดแยกได้ไประบุชื่อเชื้อในขั้นตอนต่อไป

3. การทดสอบคุณสมบัติทางเคมี (Biochemical test) และการระบุชื่อจุลินทรีย์

3.1 การทดสอบคุณสมบัติทางเคมี (Biochemical test)

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อที่คัดแยกได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar จากนั้นเตรียมสารละลายเชื้อให้ได้ความเข้มข้น 0.55 จากนั้นวางแผ่น BCL - Gram-positive spore-forming bacilli ลงในสารละลายเชื้อ นำเข้าเครื่องจำแนกเชื้ออัตโนมัติ (VITEK® 2 Compact) เพื่อจัดจำแนกชนิดจุลินทรีย์โดยวิธีการทดสอบชีวเคมี

3.2 การระบุชื่อจุลินทรีย์โดยใช้ 16S rRNA gene

นำจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ มาระบุชื่อเชื้อโดยวิธีทางชีวโมเลกุล ซึ่งมียีนเป้าหมายเป็น 16s rRNA gene โดยใช้ universal eubacterial primer (Narde, Kapley, & Purohit, 2004) ให้ขนาดผลผลิต 1.5 kb โดยทำการเลี้ยงเชื้อ 1 คืน สกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอที่สกัดได้ปริมาตร 5 µl นำมาใช้สำหรับการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมาย โดยใช้ forward primer (27F) 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' และ reverse primer (1492R) 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3' (Brosius et al., 1978) ส่วนผสมปฏิกิริยาประกอบด้วย 5 µl template, 1X PCR buffer, 200 µM ของแต่ละ dNTP, 3.0 mM $MgCl_2$, primer ความเข้มข้น 25 pmol, และ Amplitaq DNA polymerase ความเข้มข้น 2.5 units ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 50 µl ปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวน 35 รอบ โดย denaturation ที่ 94 °C เป็นเวลา 1 min ตามด้วย annealing 45 °C เป็นเวลา 1 min และ extension ที่ 72 °C เป็นเวลา 2 min ทำ PCR product ให้บริสุทธิ์โดยใช้ QIA gel extraction kit นำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยการทำ sequencing และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ BLAST บนฐานข้อมูลของ NCBI เพื่อระบุชื่อสายพันธุ์ ทำการเก็บรักษาเชื้อที่ได้ทำการระบุชื่อแล้วในรูป lyophilized tube เพื่อนำมาศึกษาคุณสมบัติในการย่อยลิกนินต่อไป

4. การคัดเลือกความสามารถในการเจริญของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้

4.1 การคัดเลือกจุลินทรีย์บน Lignin mineral salts medium (L-MSM agar)

นำจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้มาเลี้ยงในอาหารเหลว L-MSM ที่ประกอบด้วย Na_2HPO_4 2.4 กรัมต่อลิตร K_2HPO_4 2.0 กรัมต่อลิตร NH_4NO_3 0.1 กรัมต่อลิตร $MgSO_4$ 0.01กรัมต่อลิตร, $CaCl_2$ 0.01 กรัมต่อลิตรพีเอช 7.6 ที่เติม lignin, alkali (Aldrich) ความเข้มข้นแตกต่างกัน ได้แก่ 100, 200, 300, 400, 500 และ 600 ppm ทดสอบผลของการเติมและไม่เติมกลูโคส (1%w/v) และเปปโทน (0.5%w/v) เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ตามลำดับ ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติมกล้าเชื้อ 1 ลูป โดยทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในฟลาสก์ที่อุณหภูมิ 30 °C ความเร็วการเขย่า 120 rpm เป็นเวลา 7 วัน เก็บตัวอย่างโดยการ spread plate บน L-MSM agar ความเข้มข้นต่างๆ ที่มีการเติมและไม่เติมกลูโคสและเปปโทน ให้ค่าการเจริญบนอาหารเพาะเลี้ยงด้วยสัญลักษณ์ – แทนไม่มีการเจริญ; + แทนการเจริญอย่างช้า; ++ แทนการเจริญได้ดี; +++ แทนการเจริญได้อย่างรวดเร็ว (Chandra et al., 2007)

4.2 การคัดเลือกจุลินทรีย์โดยใช้สารอะโรมาติกมวลโมเลกุลต่ำ ($LMWAC_s$)

ทำการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้บนอาหาร $LMWAC_s$-MSM broth ที่มีการเติมสารอะโรมาติกมวลโมเลกุลต่ำ ($LMWAC_s$) เป็นแหล่งคาร์บอนความเข้มข้น 50 mg/l (pH 7.6) ได้ แก่ Vanillin, Ferulic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, *t*-Cinnamic acid, Gallic acid, Guaiacol และ Syringic acid โดยถ่ายหัวเชื้อ 1 ลูป บ่มอุณหภูมิ 30 °C เขย่าที่ความเร็ว 120 rpm เป็นเวลา 6 วัน ทำการ spread plate ลงบนอาหารเพาะเลี้ยง $LMWAC_s$-MSM agar ที่มีการเติมสารอะโรมาติกมวลโมเลกุลต่ำต่างๆ กัน เช่นเดียวกับ $LMWAC_s$-MSM broth ตรวจผลการเจริญที่ 72 ชั่วโมง ด้วยสัญลักษณ์ – แทนไม่มีการเจริญ; + แทนการเจริญอย่างช้า; ++ แทนการเจริญได้ดี; +++ แทนการเจริญได้อย่างรวดเร็ว (A. Raj, M. M. K. Reddy, R. Chandra, H. J. Purohit, & A. Kapley, 2007)

4.3 การคัดเลือกจุลินทรีย์โดยใช้น้ำล้างเยื่อกระดาษ

4.3.1 น้ำล้างเยื่อกระดาษความเข้มข้นสูงที่ไม่เติมสารส่งเสริมการเจริญ

นำจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้มาทำการทดสอบการเจริญในน้ำล้างเยื่อกระดาษความเข้มข้นสูง ประกอบด้วย Na_2HPO_4, K_2HPO_4, NH_4NO_3, $MgSO_4$และ $CaCl_2$ ปริมาณ 2.4, 2.0, 0.1, 0.01 และ 0.01 g/l ตามลำดับ โดยความเข้มข้นน้ำล้างเยื่อกระดาษ (BL) 10 %(v/v) ไม่ปรับพีเอช ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที เติมกล้าเชื้อที่เพาะเลี้ยงใน nutrient broth ความเข้มข้น 1% (v/v) อายุหัวเชื้อ 24 ชั่วโมง สภาวะการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์อุณหภูมิ 30°C

ความเร็วการเขย่า 120 rpm เป็นเวลา 6 วัน ทำการเก็บตัวอย่างทุกวันเพื่อนับปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต (CFU/ml) วัดพีเอช และนำน้ำหมักเมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงไปวิเคราะห์ชนิดของสารที่พบในน้ำหมักด้วย Gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) (A. Raj et al., 2007)

4.3.2 น้ำล้างเยื่อกระดาษความเข้มข้นสูงที่เติมสารส่งเสริมการเจริญ

นำจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้มาทำการทดสอบการเจริญในน้ำล้างเยื่อกระดาษความเข้มข้นสูงที่เติมสารส่งเสริมการเจริญ ประกอบด้วย Na_2HPO_4, K_2HPO_4, NH_4NO_3, $MgSO_4$และ $CaCl_2$ ปริมาณ 2.4, 2.0, 0.1, 0.01 และ 0.01 g/l ตามลำดับ โดยความเข้มข้นน้ำล้างเยื่อกระดาษ 10% (v/v) เติมกลูโคส 0.5% (w/v) และเปปโทน 0.25% (w/v) ไม่ปรับพีเอช ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที เติมกล้าเชื้อที่เพาะเลี้ยงใน nutrient broth ความเข้มข้นหัวเชื้อตั้งต้น 1% (v/v) อายุหัวเชื้อ 24 ชั่วโมง สภาวะการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 6 วันทำการเก็บตัวอย่างทุกวันเพื่อนับปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต (CFU/ml) และวัดพีเอช

4.3.3 น้ำล้างเยื่อกระดาษความเข้มข้นต่ำ

นำจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้มาทำการทดสอบการเจริญในน้ำล้างเยื่อกระดาษความเข้มข้นต่ำ ประกอบด้วย Na_2HPO_4, K_2HPO_4, NH_4NO_3, $MgSO_4$และ $CaCl_2$ ปริมาณ 2.4, 2.0, 0.1, 0.01 และ 0.01 g/l ตามลำดับ โดยความเข้มข้นน้ำล้างเยื่อกระดาษ 1 %(v/v) เติม glucose 0.5% (w/v) และ peptone 0.25%(w/v)ไม่ปรับพีเอช ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที เติมกล้าเชื้อที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกันกับอาหารเพาะเลี้ยงความเข้มข้นหัวเชื้อตั้งต้น 5% (v/v) อายุหัวเชื้อ 24 ชั่วโมง สภาวะการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 วัน ทำการเก็บตัวอย่างทุกวันเพื่อนับปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต (CFU/ml) และวัดพีเอช

5. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยลิกนินบริสุทธิ์ (Aldrich)

5.1 การเตรียมหัวเชื้อ (Inoculum preparation)

เตรียมอาหาร Lignin minimal salt medium broth (L-MSM broth) ประกอบด้วย Lignin, Na_2HPO_4, K_2HPO_4, NH_4NO_3, $MgSO_4$, $CaCl_2$, glucose และpeptone ปริมาณ 0.5,2.4, 2.0, 0.1, 0.01, 0.01, 5 และ 5 g/l ตามลำดับ นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 110 °C เป็นเวลา 20 นาที ถ่ายเชื้อรหัส 2B2-1LigB จำนวน 1 ลูป บ่มที่อุณหภูมิ 35°C ความเร็ว 200 rpm อายุหัวเชื้อ 18-24 ชั่วโมง

5.2 ศึกษาอิทธิพลของลิกนิน แหล่งไนโตรเจน และอุณหภูมิ

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยลิกนินของจุลินทรีย์รหัส 2B2-1ligB ดำเนินการในฟลาก์ขนาด 250 ml ที่บรรจุ L-MSM broth ปริมาตร 150 ml ประกอบด้วย Na_2HPO_4, K_2HPO_4, NH_4NO_3, $MgSO_4$ และ $CaCl_2$ปริมาณ 2.4, 2.0, 0.1, 0.01และ 0.01g/l ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 °C เป็นเวลา 20 นาที เติมหัวเชื้อความเข้มข้น 10% (v/v) โดยวางแผนการทดลองแบบ full factorial design 16 การทดลอง (2x2x2x2) จำนวน 2 ซ้ำ ศึกษาปัจจัยด้านสารอาหารและสิ่งแวดล้อม ปัจจัยด้านสารอาหาร ได้แก่ ความเข้มข้นของลิกนิน (lignin) แบ่งออกเป็น 1 และ 2 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ แบ่งออกเป็น Urea และ $NaNO_3$ ที่ความเข้มข้น 0.25% (w/v) และ 5% (w/v) ปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อม ได้แก่ อุณหภูมิ 35 และ 40 °C ทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 6 วัน เก็บตัวอย่างทุกวัน วัดค่าความขุ่นเซลล์ (cell turbidity) ที่ค่าดูดกลืนแสง 620 นาโนเมตร พร้อมทั้งวัดเซลล์ที่มีชีวิตโดยวิธี plate count agar (CFU/ml) ลงบนอาหาร Nutrient agar (Yadav S., & Chandra R, 2015) นำตัวอย่างมาทำการปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสที่ได้มาทำการเจือจาง ถ่ายตัวอย่างปริมาตร 1ml ลงใน phosphate buffer (pH7.6) ปริมาตร 3 ml จึงวัดลิกนินและสีที่ความยาวคลื่น 280 (Chandra et al., 2007) และ 465 nm (Bajpai et al., 1993) ตามลำดับคำนวณค่าสีโดยเทียบกับ Platinum Cobalt Color Reference Solution, Merck, Germany (Hazen 500)

การวัดปริมาณลิกนินที่ไม่ละลายในกรด (acid insoluble lignin) ด้วยวิธีการตกตะกอน ถ่ายส่วนใสที่ได้หลังจากทำการปั่นเหวี่ยงปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ปรับพีเอชสารละลายในช่วง 2.5-3.0 ด้วย HCl เข้มข้น ทิ้งไว้ 1 คืน จากนั้นปั่นเหวี่ยง 5000 rpm เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง ทำละลายตะกอนด้วย 0.5% (w/v) NaOH ทำการเจือจางให้ได้ค่าการเจือจางที่เหมาะสมจึงวัดค่าดูดกลืนแสงยูวีที่ 280 nm (Ulmer et al., 1983) วัดกิจกรรมเอนไซม์แลคเคสประกอบด้วย 1 ml ของส่วนใส (supernatant) และ 1 ml ของ 10 mM ของ guaiacol ใน 1M phosphate buffer pH 7.6 บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 15 นาที วัดค่าดูกลืนแสงที่ 470 nm กิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสแสดงในรูปของ 1 U/ml คำนวณจากปริมาณของเอนไซม์ที่ใช้ในการออกซิไดซ์ 1 µmol substrate ต่อนาที (D. S. Arora, & Sandhu, 1985) และวัดค่าพีเอชของตัวอย่างด้วย pH meter (OHAUS)

6. การศึกษาความเข้มข้นน้ำล้างเยื่อกระดาษที่เหมาะสม

6.1 วิเคราะห์ลิกนินในน้ำล้างเยื่อกระดาษ

สกัดลิกนินโดยใช้กรด เตรียมน้ำย่อยซานอ้อยปริมาตร 500 ml ปรับด้วย H_2SO_4 เข้มข้น ได้ pH 1- 2 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 rpm เป็นเวลา10 min ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นและ HPLC water อบตะกอนให้แห้งที่ 70 °C เป็นเวลา 1 คืน (oven) ทำการชั่งน้ำหนักตะกอนจากนั้น บดให้เป็นผงโดยใช้โกร่ง จึงนำไปทดสอบคุณสมบัติของสารเทียบกับลิกนินทางการค้า (sigma) ด้วยเทคนิค FT-IR Spectroscopy (Minu, K. et al., 2012) บดตัวอย่างผสมกับ Potassium Bromide (KBr) จากนั้นทำการอัดขึ้นรูปเป็นแผ่นบางใส แล้วทำการทดสอบต่อด้วยเครื่องมือ แหล่งกำเนิดแสงช่วง Middle rang infrared (4,000 – 400 cm^{-1}) Resolution: 4 cm^{-1} Detector คือ TGS และวิเคราะห์ลิกนินทั้งหมดในน้ำล้างเยื่อกระดาษตามวิธีของ Pearl – Benson (1940)

6.2 วิเคราะห์องค์ประกอบในน้ำล้างเยื่อกระดาษ

เก็บตัวอย่างน้ำล้างเยื่อกระดาษจากโรงงานเยื่อกระดาษจากซานอ้อยปริมาตร 3,000 ml ทำการวิเคราะห์องค์ประกอบต่างๆ ได้แก่ pH, TDS, TKN, COD, BOD, heavy metals (Cd, Cu, Fe, Ni, Zn, Mn) ตามมาตรฐาน American Public Health Association guildelines (APHA, 2005)

6.3 การศึกษาความเข้มข้นน้ำล้างเยื่อกระดาษที่เหมาะสม

นำสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยลิกนินจากขั้นตอน 5.2 มาประยุกต์ใช้ศึกษาความเข้มข้นของน้ำล้างเยื่อกระดาษที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อรหัส 2B2-1LigB

6.3.1 การเตรียมหัวเชื้อ (Inoculum preparation)

ทำการเตรียมหัวเชื้อเช่นเดียวกับขั้นตอน 5.1 เตรียมอาหาร Lignin mineral salt medium broth (L-MSM broth) ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 110 °C เป็นเวลา 20 นาที ถ่ายเชื้อรหัส 2B2-1LigB จำนวน 1 ลูป บ่มที่อุณหภูมิ 35°C ความเร็ว 200 rpm อายุหัวเชื้อ 18 – 24 ชั่วโมง

6.3.2 ปัจจัยการไม่เติมแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน

นำเชื้อรหัส 2B2-1 LigB เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีองค์ประกอบของน้ำล้างเยื่อกระดาษ เรียกว่า Black liquor mineral salt medium (BL-MSM) ประกอบด้วย (g/l) Na_2HPO_4, K_2HPO_4, NH_4NO_3, $MgSO_4$, $CaCl_2$ปริมาณ 2.4, 2.0, 0.1, 0.01, 0.01 g/l โดยศึกษาความเข้มข้นของน้ำล้างเยื่อกระดาษที่แตกต่างกัน ได้แก่ 1, 2, 3, 4 %(v/v) โดยไม่เติมกลูโคสและแหล่งไนโตรเจน จำนวน 3 ซ้ำ ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในฟลาสก์ขนาด 250 ml ปริมาตรอาหารเพาะเลี้ยง 150 ml ที่อุณหภูมิ 35 °C ความเร็ว 200 rpm เป็นระยะเวลา 6 วันทำการเก็บตัวอย่างทุกวัน วัดค่าความขุ่นเซลล์ (Cell turbidity) วัดเซลล์ที่มีชีวิต (CFU/ml) ทำการปั่นเหวี่ยงตัวอย่างที่

5,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที วัดลิกนินและสีที่ความยาวคลื่น 280 และ 465 nm ตามลำดับวัดปริมาณลิกนินที่ไม่ละลายในกรด (acid insoluble lignin) วัดกิจกรรมเอนไซม์แลคเคส (laccase activity) และวัดพีเอชของตัวอย่าง

6.3.3 ปัจจัยการเติมกลูโคสและยูเรีย

นำจุลินทรีย์รหัส 2B2-1 LigB เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีองค์ประกอบของน้ำล้างเยื่อกระดาษ เรียกว่า Black liquor mineral salt medium (BL-MSM) ประกอบด้วย (g/l) Na_2HPO_4, K_2HPO_4, NH_4NO_3, $MgSO_4$, $CaCl_2$ปริมาณ 2.4, 2.0, 0.1, 0.01, 0.01 g/l โดยศึกษาความเข้มข้นของน้ำล้างเยื่อกระดาษที่แตกต่างกัน ได้แก่ 1, 2, 3, 4 %(v/v) เติมกลูโคสและยูเรียความเข้มข้น 5 และ 5 g/l ตามลำดับ จำนวน 3 ซ้ำ ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในฟลาสก์ขนาด 250 ml ปริมาตรอาหารเพาะเลี้ยง 150 ml ที่อุณหภูมิ 35 °C ความเร็ว 200 rpm เป็นระยะเวลา 6 วัน ทำการเก็บตัวอย่างทุกวัน วัดค่าความขุ่นเซลล์ (Cell turbidity) วัดเซลล์ที่มีชีวิต (CFU/ml) ทำการปั่นเหวี่ยงตัวอย่างที่ 5,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที วัดลิกนินและสีที่ความยาวคลื่น 280 และ 465 nm ตามลำดับวัดปริมาณลิกนินที่ไม่ละลายในกรด (acid insoluble lignin) วัดกิจกรรมเอนไซม์แลคเคส (laccase activity) วัดพีเอชของตัวอย่าง อีกทั้งนำน้ำหมักเมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงไปวิเคราะห์ชนิดของสารที่พบในน้ำหมักด้วย GC-MS (A. Raj et al., 2007) และวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลลิกนินด้วย Gel – permeation chromatography (GPC) (Rittstieg et al., 2002)

7. การวิเคราะห์

7.1 การวิเคราะห์ชนิดของสารที่พบในน้ำหมักด้วย GC-MS

นำน้ำหมักเมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงไปวิเคราะห์ชนิดของสารที่พบในน้ำหมักด้วย GC-MS (A. Raj et al., 2007)โดยมีตัวควบคุมเป็น BL-MSM broth ที่ไม่ได้ทำการเติมเชื้อ นำน้ำตัวอย่างปริมาตร 50 ml มาทำการปั่นเหวี่ยง 5,000 เป็นเวลา 30 นาที ดูดส่วนใสและปรับพีเอชเท่ากับ 1-2 ด้วย HCl เข้มข้นเติม ethyl acetate ปริมาตร 150 ml ทำการผสมให้เข้ากัน 4-6 ครั้ง จากนั้นเติม anhydrous Na_2SO_4 ปริมาณ 1-2 กรัม ทำการเขย่าเล็กน้อย วางแผ่นกรองลงบน Büchner funnel ที่ต่อกับปั๊มสุญญากาศ เทสารละลายลงไป ทิ้งส่วนที่เป็นตะกอน นำส่วนที่เป็นสารละลายเทลงใน evaporating flask และระเหยน้ำออกโดยใช้ rotary evaporator ชั่งตะกอนที่ได้ปริมาณ 3 mg ใส่ลงใน amber chromatography vial ขนาด 2ml ละลายตะกอนด้วยการเติม 1,4-dioxane ปริมาตร 100 µl และpyridine ปริมาตร 10 µl เติม (BSTFA) N,O-Bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide และ (TMCS) trimethylcholorsilane อัตราส่วน 99:1 ปริมาตร 50 µl บ่มที่ 60 °C ด้วย shaking flask เป็นเวลา 15 min เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์โดย

GC-MS ใช้ nonpolar capillary column และ helium เป็น carrier gas ด้วยอัตราการไหล 1 ml/min รอให้oven temperature เสถียรที่ 50 °C ฉีดตัวอย่างปริมาตร 1 µl ที่อัตรา 1/50 split ratio ตั้งค่าอุณหภูมิ column ที่ 50 °C เป็นเวลา 5 นาที และเพิ่มอุณหภูมิขึ้นไปที่ 280 °C ที่อัตรา 5 °C/min รักษาอุณหภูมิสุดท้าย (final temperature) เท่ากับ 280 °C เป็นเวลา 20 min คงอุณหภูมิของ gas chromatograph และ mass spectrometer ที่ 300 °C เลือก solvent delay of 15 min บันทึกelectron ionization mass spectra ในช่วง 10-500 (*m/z*) ที่ electron energy of 70 eV เปรียบเทียบอนุพันธ์สารที่ได้กับสารมาตรฐานระบุชื่อสารประกอบที่ได้โดยการเปรียบเทียบค่า retention times ของ National Institute of Standards and Technology (NIST) mass spectral database (Mathews et al., 2013)

7.2 วิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลลิกนินด้วย GPC

นำน้ำหมักเมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงมาทำการกรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.22 ไมครอนแล้วทำวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลโดยใช้เทคนิค Gel Permeation Chromatography (GPC) ยี่ห้อ Water รุ่น Alliance e2695 โดยใช้สภาวะดังนี้ Column: Ultrahydrogel column (Linear), Detector: 2414 RI Detector, Column temperature: 40 oC, Detector temperature: 40 oC, Mobile phase: DI water, Flow rate: 0.6 ml/min, Injection volume: 10 µl, โดยทำการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน pullulans ที่ความเข้มข้นต่ำๆ ตามลำดับ

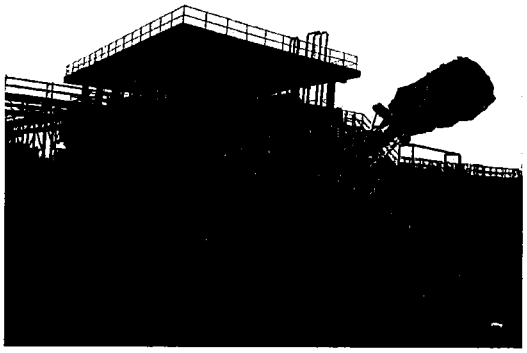
บทที่ 4

ผลการวิจัย

การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการเจริญในอาหารที่มีสารพิษ

การเก็บตัวอย่างดินปนเปื้อนน้ำล้างเยื่อกระดาษ ตะกอนที่ได้จากระบบบำบัดน้ำเสีย และน้ำในคูน้ำรอบ ๆ กองชานอ้อยจากโรงงานเยื่อกระดาษจากชานอ้อย บริษัท EPPCO ตำบลหนองโพ จังหวัดนครสวรรค์ แสดงดังภาพ 27 – 29

ภาพ 27 ตำแหน่งเก็บตัวอย่างดินปนเปื้อนน้ำล้างเยื่อกระดาษ ในทาง**เดินท่อระบาย**



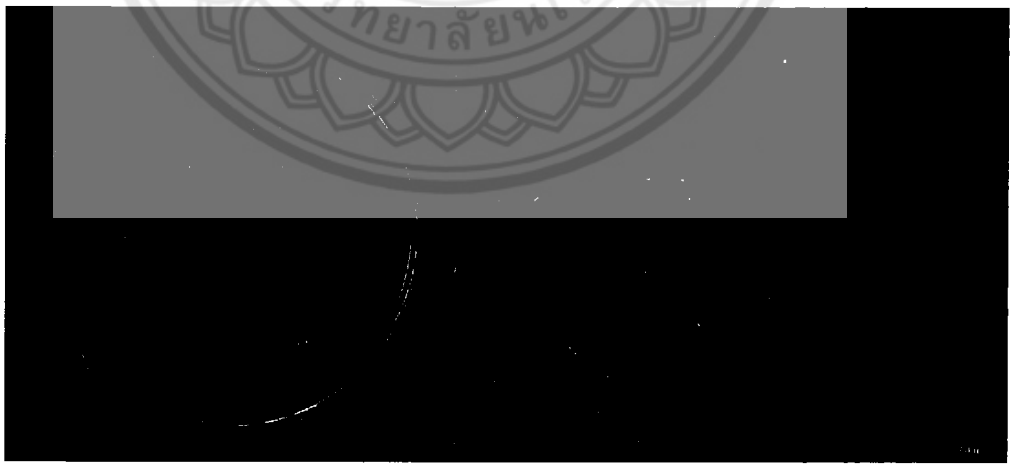
ภาพ 28 ตำแหน่งการเก็บตัวอย่างตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสียแบบใช้อากาศของโรงงาน

ภาพ 29 ตำแหน่งการเก็บตัวอย่างน้ำในคูน้ำรอบ ๆ กองชานอ้อย

นำตัวอย่างบรรจุลงในภาชนะปลอดเชื้อ และทำการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ภายใน 6 ชั่วโมง ในห้องปฏิบัติการ เพื่อคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค toxic tolerance isolation

การคัดแยกจุลินทรีย์

นำตัวอย่างจากโรงงานเยื่อกระดาษปริมาณ 10 กรัมหรือมิลลิลิตร เติมลงในอาหารคัดแยก mMXYP broth และ mPDB บ่มที่อุณหภูมิ 40 °C เขย่าด้วยความเร็ว 150 rpm เป็นเวลา 36 ชั่วโมง นำอาหารเลี้ยงเชื้อมาทำการคัดแยกเชื้อโดยวิธีการ spread plate และทำให้เชื้อบริสุทธิ์ด้วยวิธีการ streak plate แสดงลักษณะโคโลนีดังภาพ 30 – 34

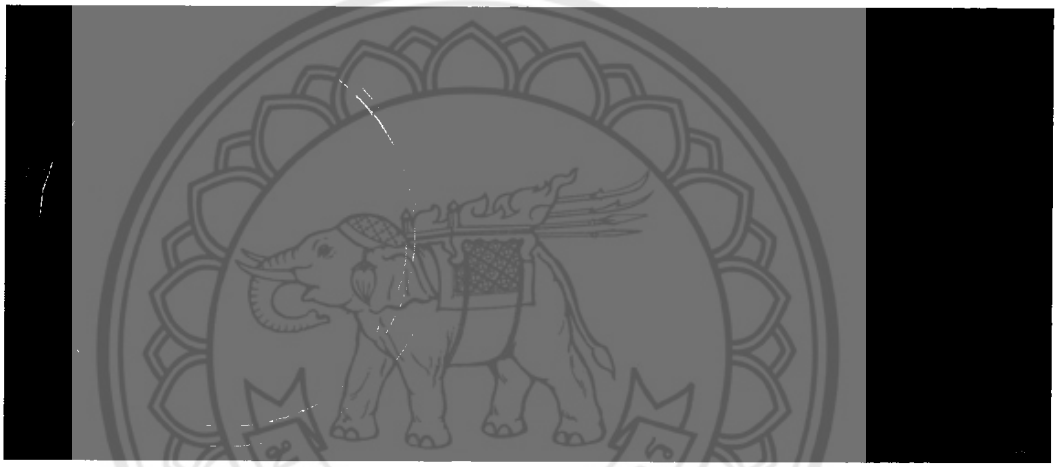


ภาพ 30 แบคทีเรียที่คัดแยกได้รหัส 2B2-1LigB

ตัวอย่างดินปนเปื้อนน้ำล้างเยื่อกระดาษที่เพาะเลี้ยงในอาหาร mMXYP พบว่า สามารถคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ คือ 2B2-1LigB (ภาพ 30) คัดแยกได้จากดินปนเปื้อนน้ำล้างเยื่อกระดาษ

แสดงลักษณะโคโลนีที่ขึ้นบนอาหาร MXYP agar ที่ไม่ได้เติมสารพิษแบบ Rhizoid ขอบของโคโลนีแบบ Curled มีผิวหน้าโคโลนีแห้ง

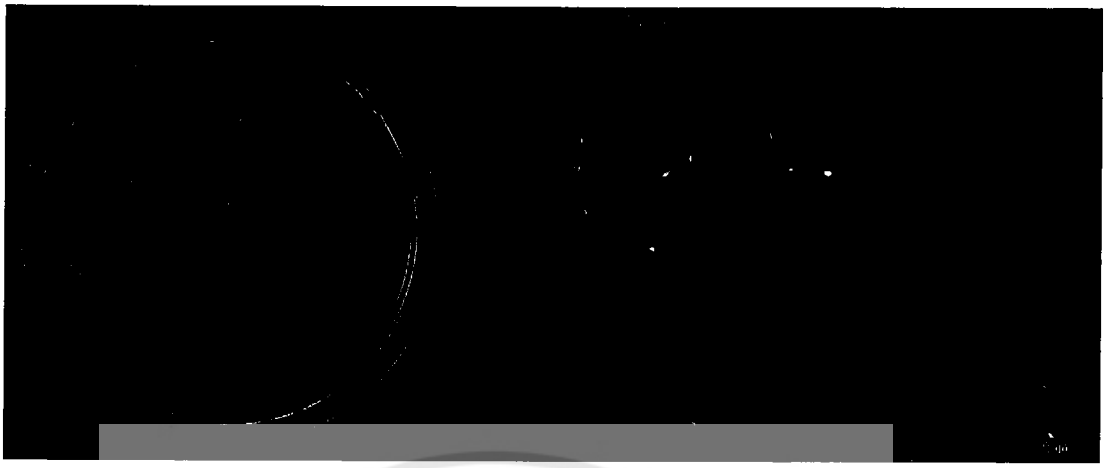
นอกจากนี้เชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้รหัส 2B2-1LigB มีความสามารถในการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่เตรียมจากน้ำล้างเยื่อกระดาษความเข้มข้น 10%(v/v) pH 9.0 แสดงลักษณะโคโลนีที่แตกต่างจากลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหารสมบูรณ์ (MXYP agar) ลักษณะโคโลนีเล็กมาก สีใส แตกต่างจากเชื้อทั้งหมดที่คัดแยกได้ ซึ่งไม่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มีน้ำล้างเยื่อกระดาษเป็นองค์ประกอบแบบไม่เติมการส่งเสริมการเจริญ



ภาพ 31 แบคทีเรียที่คัดแยกได้รหัส 6B2-Al

เชื้อรหัส 6B2-Al คัดแยกได้จากดินปนเปื้อนน้ำล้างเยื่อกระดาษ มีลักษณะแตกต่างจากเชื้อที่คัดแยกได้รหัสอื่นคือ สามารถเจริญได้ในน้ำล้างเยื่อกระดาษที่ได้ทำการตกตะกอนลิกนินด้วย non-toxic aluminum potassium sulfate dodecahydrate ($AlK(SO_4)_2.12H_2O$) ตามงานของ Luong et al. (2012) เพื่อให้ลิกนินตกตะกอนจึงแยกลิกนินออกนำส่วนใสที่ได้ไปฆ่าเชื้อแล้วทำการถ่ายเชื้อที่คัดแยกได้ทุกรหัสลงไป พบว่าเชื้อรหัส 6B2-Al มีความสามารถในการเจริญแตกต่างจากเชื้อรหัสอื่นที่ไม่พบการเจริญ จึงได้ต่อท้ายรหัสด้วยคำว่า "Al"

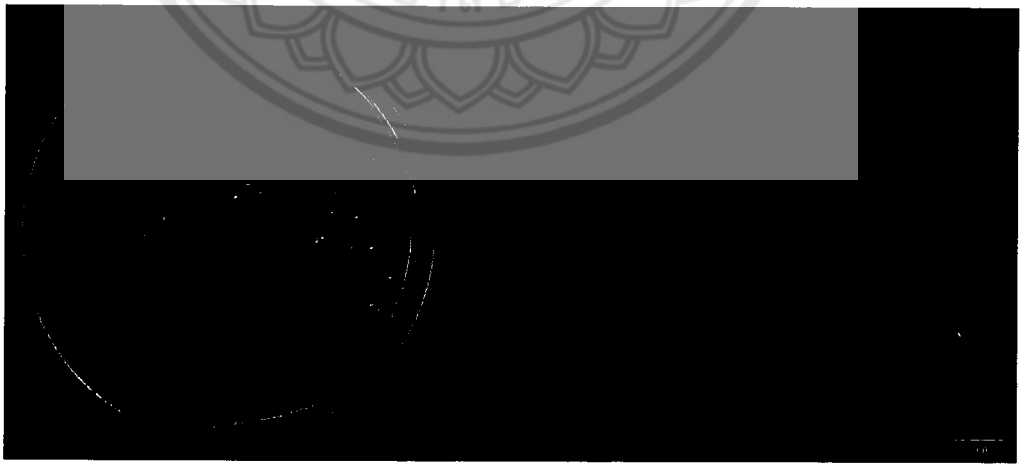
ตัวอย่างดินปนเปื้อนน้ำล้างเยื่อกระดาษที่เพาะเลี้ยงในอาหาร mPDB ปรับพีเอช 5.5 ดัดแปลงอาหารคัดแยกตามงานของ D. Zhang et al. (2013) ได้เชื้อแบคทีเรียที่มีรหัส mPDA7 แสดงดังภาพ 32



ภาพ 32 แบคทีเรียที่คัดแยกได้รหัส mPDA 7

แบคทีเรียที่คัดแยกได้รหัส mPDA 7 คัดแยกได้จากตัวอย่างดินปนเปื้อนน้ำล้างเยื่อกระดาษบนอาหารเลี้ยงเชื้อ mPDA ที่มีการเติม furfural ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร แสดงลักษณะโคโลนีขาวขุ่นขนาดกลาง

ตัวอย่างตะกอนในบ่อบำบัดน้ำเสียที่มีการเติมอากาศ (activated sludge) มาเพาะเลี้ยงในอาหาร modified MXYP พบว่าสามารถคัดแยกเชื้อรหัส MXYP5 แสดงลักษณะโคโลนีสีขาวขุ่นขนาดเล็ก แสดงดังภาพ 33



ภาพ 33 แบคทีเรียที่คัดแยกได้รหัส MXYP 5

ตัวอย่างน้ำในคูน้ำรอบกองชานอ้อย บนอาหารเลี้ยงเชื้อ modified PDA ที่มีการเติม furfural ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร พบเชื้อจุลินทรีย์รหัส MMX3 แสดงลักษณะโคโลนีขาวขุ่น ขนาดเล็ก มีเมือกเยิ้มมันวาว

ภาพ 34 แบคทีเรียที่คัดแยกได้รหัส MMX3

นำเชื้อที่คัดแยกได้ทั้ง 5 รหัส มาทำให้บริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar ด้วยวิธีการ cross streak แล้วส่งสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย (วว.) เพื่อระบุชื่อและเก็บรักษาจุลินทรีย์

การระบุชื่อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้

จุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ถูกระบุชื่อโดยวิธีการทางชีวเคมีและวิธีทางโมเลกุล จากนั้นเก็บรักษาจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้โดยการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (lyophilization) ในหลอดแก้วสุญญากาศ เพื่อการเก็บรักษาในระยะเวลานานและป้องกันการกลายพันธุ์ของจุลินทรีย์ พร้อมระบุรหัสการเก็บรักษาจุลินทรีย์ตามรหัสของศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

1. การระบุชื่อจุลินทรีย์โดยใช้วิธีทางชีวเคมี

จากตาราง 8 พบว่า จุลินทรีย์ทั้ง 5 รหัสให้ผลการระบุชื่อทางชีวเคมีเป็นแบคทีเรียแกรมบวกมีความสามารถในการสร้างเอนโดสปอร์ อยู่ในสกุล *Bacillus* sp. โดยเชื้อรหัส 2B2-1LigB, 6B2-Al, mPDA7 และ MMX3 ถูกระบุชื่อเป็น *B. subtilis/amyloliquefaciens* ร้อยละ 99, 99, 97 และ 86 ตามลำดับ ส่วนเชื้อรหัส MXYP5 ถูกระบุว่าเป็น *B. licheniformis* ร้อยละ 99

จากผลการวิเคราะห์คุณสมบัติทางชีวเคมี พบว่าเชื้อทั้งหมดมีความใกล้ชิดกันในระดับสปีชีร์ ทำให้ต้องใช้ผลการระบุชื่อทางชีวโมเลกุลเพื่อยืนยันสปีชีร์ต่อไป

ตาราง 8 การระบุชื่อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ด้วยวิธีการทางชีวเคมี

Characteristics	2B2-1LigB	6B2-AI	mPDA 7	MXYP 5	MMX3
% similarity	*Bacillus subtilis* /*amyloliquefaciens* 99%	*Bacillus subtilis* /*amyloliquefaciens* 99%	*Bacillus subtilis* /*amyloliquefaciens* 97%	*Bacillus licheniformis* 99%	*Bacillus subtilis* /*amyloliquefaciens* 86%
Gram reaction	+ve	+ve	+ve	+ve	+ve
β-xylosidase	+	+	-	-	+
L-lysine arylamidase	-	-	-	-	-
L-aspartate arylamidase	-	(+)	(-)	-	-
Leucine arylamidase	+	+	+	+	-
Phenylalanine arylamidase	+	+	+	+	+
L-proline arylamidase	-	-	-	-	-
β-galactosidase	+	+	+	+	+
L-pyrrolidonyl arylamidase	+	+	+	+	+
α-galactosidase	+	+	+	-	+
Alanine arylamidase	-	-	-	(-)	-

ตาราง 8 (ต่อ)

Characteristics	2B2-1LigB	6B2-Al	mPDA 7	MXYP 5	MMX3
Tyrosine arylamidase	+	+	+	+	-
β-N-acetyl-glucosaminidase	-	-	(-)	-	-
Ala-Phe-Pro arylamidase	-	-	-	-	+
Cyclodextrine	-	-	+	+	+
D-galactose	-	-	-	-	-
Glycogene	+	+	+	+	+
Myo-inositol	+	+	+	+	+
Methyl-α-D-glucopyranoside acidification	+	+	+	+	+
Ellman	+	+	-	+	+
Methyl-D-xyloside	-	-	-	-	-
α-mannosidase	-	-	-	-	-
Maltotriose	+	+	+	+	+
Glycine arylamidase	+	+	+	(+)	-
D-mannitol	+	+	+	+	+
D-mannose	+	+	+	+	+
D-melezitose	-	-	-	-	-

ตาราง 8 (ต่อ)

Characteristics	2B2-1LigB	6B2-Al	mPDA 7	MXYP 5	MMX3
N-acetyl-D-glucosamine	-	-	-	(-)	-
Palatinose	+	+	+	+	+
L-rhamnose	-	-	-	-	-
β-glucosidase	+	+	+	+	+
β-mannosidase	-	-	-	-	-
Phosphoryl choline	-	-	-	-	-
Pyruvate	+	+	+	+	+
α-glucosidase	+	+	+	+	-
D-tagatose	-	-	-	+	-
D-trehalose	+	+	+	+	+
Inulin	+	+	+	-	+
D-glucose	+	+	+	+	+
D-ribose	+	+	(-)	+	(-)
Putrescine assimilation	-	-	-	-	-
Growth in 6.5% NaCl	+	+	+	+	+
Kanamycin resistance	(+)	(+)	-	+	-

ตาราง 8 (ต่อ)

Characteristics	2B2-1LigB	6B2-Al	mPDA 7	MXYP 5	MMX3
Oleandomycin resistance	-	-	-	+	-
Esculin hydrolyse	+	+	+	+	+
Tetrazolium red	+	+	+	+	+
Polymixin_B resistance	+	+	-	+	+

2. การระบุชื่อเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธีทางชีวโมเลกุล

ผลการระบุชื่อจุลินทรีย์โดยใช้ 16S rRNA gene แสดงดังตาราง 9

ตาราง 9 จุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ในแต่ละรหัสโดยใช้ 16S rRNA gene

รหัส TISTR	รหัสจุลินทรีย์	มีความคล้ายคลึงกับ	ความเหมือน (% similarity)
2580	2B2-1LigB	*Bacillus tequilensis*	99.86
		Bacillus subtilis subsp. *inaquosorum*	99.86
		Bacillus subtilis subsp. *subtilis*	99.80
2581	6B2-Al	*Bacillus subtilis*	100
2582	MXYP5	*Bacillus licheniformis*	100
2583	mPDA7	*Bacillus subtilis*	100
2584	MMX3	*Bacillus subtilis*	100

จากตาราง 9 พบว่า จุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ทั้งหมดถูกระบุชื่ออยู่ในสกุล *Bacillus* sp. สอดคล้องกับวิธีการระบุชื่อทางชีวเคมี (ตาราง 8) โดยสปีชีร์ที่พบมาก ได้แก่ *B. subtilis* จำนวน 4 รหัส ได้แก่ 2B2-1LigB, 6B2-Al, mPDA7 และ MMX3 แบคทีเรียรหัส 2B2-1ligB ถูกระบุชื่อเป็น *B. tequilensis* และ *B. subtilis subsp. inaquosorum* มีค่าความคล้ายคลึงเท่ากับ 99.86% ซึ่งแบคทีเรีย *B. tequilensis* และ *B. subtilis subsp. Inaquosorum* เป็นสปีชีร์ใหม่ที่เพิ่งได้รับการระบุชื่อแยกออกจาก *B. subtilis* เมื่อปี 2009 และ 2006 ตามลำดับ (Rooney et al., 2009; Gatson et al., 2006) ซึ่งเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญในเชิงอุตสาหกรรม Sondhi, S. et al., (2014) รายงานการผลิตเอนไซม์ laccase (SN4LAC) จาก *B. tequilensis* ซึ่งเสถียรที่สภาวะเป็นด่าง อุณหภูมิสูง และทนต่อโลหะหนัก จึงมีความสำคัญต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในทางอุตสาหกรรม ส่วนแบคทีเรียรหัส 6B2-Al, mPDA7 และ MMX3 ระบุชื่อ *B. subtilis* ให้ค่าความคล้ายคลึงเท่ากับ 100% ตามลำดับ

แบคทีเรียรหัส MXYP5 ระบุชื่อเป็น *B. licheniformis* ให้ค่าความคล้ายคลึงเท่ากับ 100% สปีชีส์นี้มียีนสร้างเอนไซม์ laccase (laccase gene, *cotA*) จากรายงานของ K. Koschorreck et al. (2008) ทำการตัดต่อยีนใส่ลงใน *Escherichia coli* โดยเอนไซม์มีมวลโมเลกุลประมาณ

65 kDa มีสารตั้งต้น 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS), syringaldazine (SGZ) และ 2,6-dimethoxyphenol (2,6-DMP) โดยให้กิจกรรมการออกซิไดซ์ต่อ ABTS สูงสุดที่อุณหภูมิ 85 °C แต่ Cot A ไม่สามารถออกซิไดซ์ coumaric acid, cinnamic acid และ vanillic acid ได้ ในขณะที่ syringic acid ถูกออกซิไดซ์เป็น 2,6-dimethoxy-1,4-benzoquinone นอกจากนี้ยังเกิดการสร้างพันธะคู่ (dimerization) ของ sinapic acid, caffeic acid และ ferulic acid ส่วน Damiano, Bocchini, Gomes, & Da Silva (2003) ทำการคัดแยก *B. licheniformis* 77-2 ที่เจริญได้ในสภาวะเป็นด่างจัด โดยนำมาประยุกต์ใช้ในการฟอกเยื่อกระดาษที่ได้จากต้นยูคาลิปตัสพีเอช 9.0 ให้อัตราการย่อยลิกนินสูงสุดที่พีเอช 6 จากงานวิจัยดังกล่าวทำให้เล็งเห็นถึงความสำคัญของการนำจุลินทรีย์ไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่อไป

แบคทีเรียที่คัดแยกได้ถูกจัดอยู่ในสกุล *Bacillus* sp. เป็นเชื้อประจำถิ่นที่อาศัยหรือเจริญได้ในน้ำล้างเยื่อกระดาษหรือของเสียที่ได้จากโรงงานเยื่อกระดาษตามงานวิจัยของ Yang et al. (2008) ศึกษาความหลากหลายและกลไกของจุลินทรีย์ในถังเก็บน้ำล้างเยื่อกระดาษเมื่อปี 2002 ถึงปี 2005 พบการเปลี่ยนแปลงสีของน้ำล้างเยื่อกระดาษจากสีดำเปลี่ยนไปเป็นสีน้ำตาล พีเอชจาก 11.0 เปลี่ยนแปลงเป็น 9.0 โดยทำการคัดแยกเชื้อจำนวน 38 สายพันธุ์ และจัดกลุ่มด้วยเทคนิค random amplified polymorphic DNA-PCR profiles (RAPD) ถูกระบุชื่ออยู่ในสกุล *Halomonas* และ *Bacillus* พร้อมทั้งอธิบายกลไกการอยู่อาศัยร่วมกันโดย *Halomonas* จะสร้างกรดอินทรีย์ในช่วงแรกส่งผลให้พีเอชลดลง จากนั้น *Bacillus* จะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการย่อยของอนุพันธุ์ลิกนินภายใต้สภาวะเป็นกรด โดยสปีชีส์ที่พบ ได้แก่ *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. megaterium*, *B. cereus*

ต่อมาในปี 2010 Yang et al. ศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในน้ำล้างเยื่อกระดาษที่มีพีเอชเป็นด่างจัด โดยการวิเคราะห์ 16S ribosomal DNA (rDNA) clone library และ polymerase chain reaction – denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อ และไม่เพาะเลี้ยงเชื้อ (culture-based and culture-indepentdent techniques) พบความหลากหลายของแบคทีเรียในสกุล *Clostridium*, *Halomonas* และ *Bacillus* โดยมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ xylanase และ CMCase แบคทีเรียสกุล *Bacillus* sp. สามารถพบได้ทุกฤดูกาลที่ทำการเก็บตัวอย่าง ซึ่งเป็นกลุ่มที่เสถียรที่สุด จากผลการเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อศึกษาความหลากหลายของสปีชีส์ในห้องปฏิบัติการ พบว่า *Bacillus* เป็นสกุลเด่นมาก จากเชื้อทั้งหมด 125 สายพันธุ์ ถูกระบุชื่อเป็นเชื้อในสกุล *Bacillus* sp. จำนวน 63 สายพันธุ์ แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายของสปีชีส์ ได้แก่ *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. pumilus*, *B. subtilis*,

B. licheniformis, *B. fusiformis*, *B. firmus*, *B. okhensis*, *B. cellulosilyticus*, *B. halodurans*, *B. cohnii*, *B. pseudofirmus* จากความหลากหลายของสปีชีร์ในสกุล *Bacillus* sp. ของ Yang et al. (2010) แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของเทคนิคคัดแยกเชื้อแบบ toxic tolerance isolation โดยใช้อาหารคัดแยกคือ mMXYP และ mPDB ที่เติมสารยับยั้ง ทำให้สามารถแยกสปีชีส์ที่หลากหลายในสกุล *Bacillus* sp. ออกมาได้ ซึ่งแตกต่างจากรายงานข้างต้นและแน่นอนว่าเชื้อที่คัดแยกได้เหล่านี้เป็นเชื้อประจำถิ่นในน้ำล้างเยื่อกระดาษพีเอซเป็นด่างสูง

จากงานวิจัยเหล่านี้ทำให้ทราบถึงความหลากหลายของสปีชีส์ในสกุล *Bacillus* sp. สามารถพบทั่วไปในสิ่งแวดล้อมของโรงงานเยื่อกระดาษที่มีการปนเปื้อนลิกนิน เนื่องจากความสามารถในการทนต่อสารพิษและการย่อยลิกนินของเชื้อในสกุลนี้ และความสำคัญของเชื้อที่คัดแยกได้ต่ออุตสาหกรรมหลายๆ อุตสาหกรรม เช่น อุตสาหกรรมการฟอกสีเยื่อกระดาษ อุตสาหกรรมเอนไซม์ เป็นต้น เนื่องจากเชื้อมียีนที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยลิกนินแล้ว ยังมีความสามารถในการปรับตัวต่อสิ่งแวดล้อมที่มีสารพิษรุนแรงหรือที่เรียกว่ากลายพันธุ์ได้สูงอีกด้วย

การคัดเลือกจุลินทรีย์

1. การคัดเลือกจุลินทรีย์บน Lignin mineral salts medium (L-MSM agar)

จากตาราง 10 พบว่า เชื้อที่คัดแยกได้ทุกรหัสมีความสามารถในการเจริญได้ดีในอาหาร MSM agar ที่มีการเติมลิกนินทุกความเข้มข้นตั้งแต่ 100 – 600 ppm (L-MSM agar) โดยเจริญได้อย่างรวดเร็วบนอาหารเพาะเลี้ยงที่ได้ทำการเติมกลูโคสและเปปโทนความเข้มข้น 1% และ 0.5% (w/v) ตามลำดับ ภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมงของการบ่ม ให้สัญลักษณ์แทนการเจริญได้อย่างรวดเร็วด้วยเครื่องหมาย +++ เช่นเดียวกับเชื้อรหัส ITRC-S_8 (*Bacillus* sp.) ตามการรายงานของ A. Raj et al. (2008)

ส่วนอาหารเพาะเลี้ยง L-MSM agar ที่ไม่ได้ทำการเติมกลูโคสและเปปโทน แบคทีเรียทุกรหัสยังคงมีความสามารถในการเจริญได้ภายในระยะเวลา 4 วัน โดยให้สัญลักษณ์แทนการเจริญได้ดีด้วยเครื่องหมาย ++ หลังจากการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C และสามารถสังเกตผลการเป็นพิษต่อเซลล์หรือยับยั้งเซลล์ของลิกนินได้ที่ความเข้มข้นของลิกนินสูงสุด 600 ppm พบว่าเชื้อที่คัดแยกได้รหัส mPDA7 และ MMX3 ให้การเจริญอย่างช้า เนื่องจากลิกนินเป็นพิษกับเซลล์แบคทีเรียตามการศึกษาของ J.D. Coral Medina et al. (2016) ศึกษาคุณสมบัติของลิกนินจากทลายปาล์มที่ได้ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดด่าง (sequential acid-alkaline pretreatment) ด้านความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ พบว่า ความเข้มข้นของลิกนิน 2 mg ให้ความสามารถใน

การยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* serovar Thyphimurium, *B. subtilis* และ *Staphylococcus aureus* เป็นผลมาจากโครงสร้าง syringyl aromatic structure และ วงแหวนอะโรมาติกที่พบในลิกนิน แต่เชื้อที่คัดแยกได้รหัส 2B2-1LigB , 6B2-Al และ MXYP5 ให้การเจริญได้ดีคงเดิม

2. การคัดเลือกจุลินทรีย์โดยใช้สารอะโรมาติกมวลโมเลกุลต่ำ ($LMWAC_s$)

จากตาราง 11 พบว่า จุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ทุกรหัสเจริญบนอาหารเพาะเลี้ยง $LMWAC_s$ agar ที่ มี Vanillin acid, Ferulic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, *t*-Cinnamic acid, Gallic acid, Guaiacol และ Syringic acid ที่ไม่เติมกลูโคสและเปปโทน แบคทีเรียทุกรหัสมีความสามารถในการใช้สารประกอบอะโรมาติกมวลโมเลกุลต่ำเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานสำหรับการเจริญหลังจาก 3 วันของการบ่มเชื้อ แสดงว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทุกรหัสมีความารถในการย่อยลิกนิน หรือ lignin degrader เนื่องจากสารประกอบอะโรเมติกมวลโมเลกุลต่ำเหล่านี้เป็นองค์ประกอบพื้นฐานของโครงสร้างลิกนินในธรรมชาติ ดังนั้นการใช้สารประกอบอะโรเมติกมวลโมเลกุลต่ำจึงถูกใช้เป็นสารคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยลิกนิน

ความสามารถของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ในการเจริญบน $LMWAC_s$ agar พบว่าแบคทีเรียมีความสามารถในการใช้สารประกอบอะโรเมติกมวลโมกุลต่ำได้หลากหลายสปีชีส์มากกว่างานของ A. Raj et al. (2007) พบเชื้อเพียงรหัสคัดแยกเดียวที่มีความสามารถในการเจริญบน $LMWAC_s$ agar คือ ITRC-S_8 (*Bacillus* sp.) ที่มีความสามารถในการเจริญได้บน Vanillin acid, Ferulic acid, *p*-Hydroxybenzoic acid, *t*-Cinnamic acid, Guaiacol, Syringic acid ยกเว้น Gallic acid

จากผลการคัดเลือกจุลินทรีย์ในขั้นตอนที่ 1.3.3 และ 1.3.4 ทำให้ทราบถึงความสามารถของอาหารคัดแยก (mMXYP และ mPDB) ที่สามารถคัดแยกเชื้อโดยใช้อิทธิพลของสารพิษ ในการยับยั้งการเจริญ (furfural, 5-HMF และ acetic acid) จุลินทรีย์ทั่วไปที่ไม่มีคุณสมบัติย่อยลิกนินและทนต่อลิกนิน เช่น อาหารเพาะเลี้ยง mMXYP มีอิทธิพลของน้ำตาลไซโลสที่คัดแยกให้ได้เฉพาะเชื้อที่มีความสามารถในการใช้ไซโลส และอิทธิพลของอุณหภูมิสูงที่ 40 องศาเซลเซียสทำให้สามารถคัดแยกจุลินทรีย์ได้เฉพาะแบคทีเรียเท่านั้น แต่อย่างไรก็ตามผลการคัดเลือกผู้วิจัยไม่สามารถเลือกเชื้อใดเชื้อหนึ่งไปศึกษาต่อได้ ทำให้ต้องมีการคัดเลือกเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบของน้ำล้างเยื่อกระดาษเพิ่มเติม

ตาราง 10 การคัดเลือกเชื้อโดยใช้ความสามารถในการใช้และไม่ใช้กลูโคสและเปปโทนบน Kraft lignin mineral medium (L-MSM agar)

รหัสเชื้อ	100 ppm lignin		200 ppm lignin		300 ppm lignin		400 ppm lignin		500 ppm lignin		600 ppm lignin	
	1% glucose and 0.5% peptone[a]	0% glucose and 0% peptone[b]	1% glucose and 0.5% peptone[a]	0% glucose and 0% peptone[b]	1% glucose and 0.5% peptone[a]	0% glucose and 0% peptone[b]	1% glucose and 0.5% peptone[a]	0% glucose and 0% peptone[b]	1% glucose and 0.5% peptone$_a$	0% glucose and 0% peptone[b]	1% glucose and 0.5% peptone[a]	0% glucose and 0% peptone[b]
2B2-1 LigB	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++
6B2-Al	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++
MXYP5	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++
mPDA7	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	+
MMX3	+++	++	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+
Control	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ: a; บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่ 30 องศาเซลเซียส b; บ่มเป็นเวลา 96 ชั่วโมงที่ 30 องศาเซลเซียส

สัญลักษณ์ – แทนไม่มีการเจริญ; + แทนการเจริญอย่างช้า;++ แทนการเจริญได้ดี; +++ แทนการเจริญได้อย่างรวดเร็ว

ตาราง 11 การเจริญบนสารอะโรมาติกมวลโมเลกุลต่ำ (LMWAC$_s$) ของเชื้อแต่ละรหัส

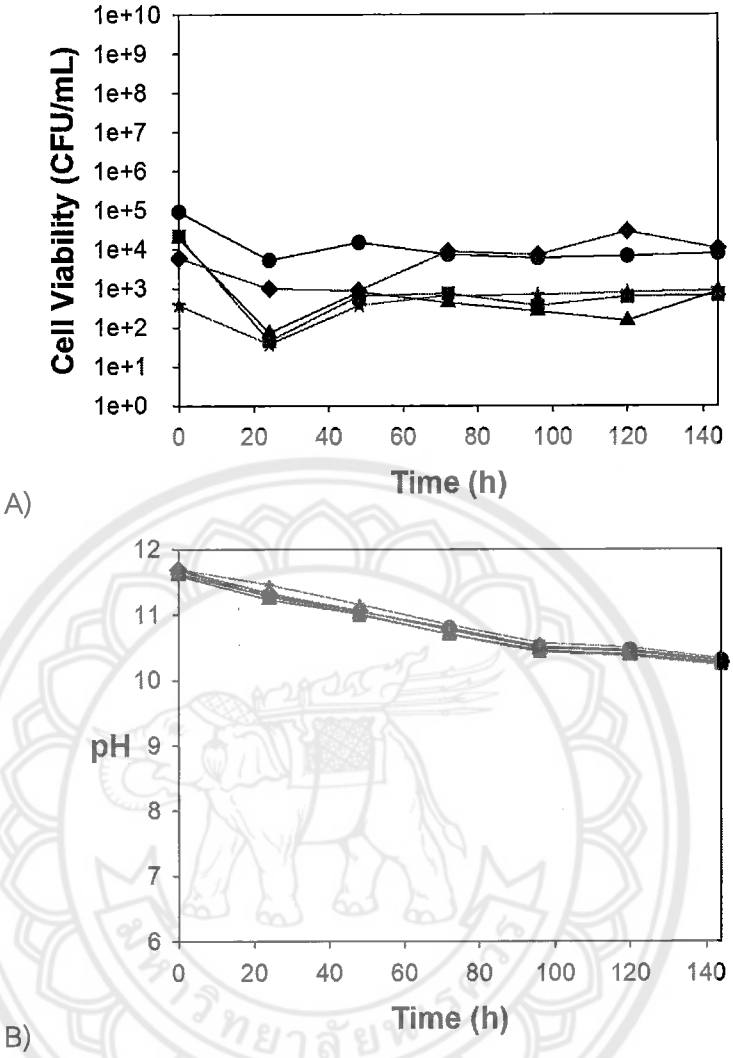
รหัสเชื้อ	การเจริญของเชื้อบนอาหาร lignin-related LMWAC$_s$ agar ที่ความเข้มข้น 50 mg/l โดยไม่เติมกลูโคสและเปปโทน						
	Vanillin	Ferulic acid	*p*-hydroxybenzoic acid	*t*-Cinnamic acid	Gallic acid	Guaiacol	Syringic acid
2B2-1 LigB	+++	+++	++	+	+	+	+++
6B2-AI	+++	+++	+++	+++	+	+	+++
MXYP5	++	+++	+++	+++	+	+++	+++
mPDA7	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
MMX3	++	+++	+++	+++	+	+	+++
Control	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ: สัญลักษณ์ – แทนไม่มีการเจริญ; + แทนการเจริญอย่างช้า;++ แทนการเจริญได้ดี; +++ แทนการเจริญได้อย่างรวดเร็ว ตรวจผลการเจริญที่ 72 ชั่วโมง

3. การคัดเลือกจุลินทรีย์โดยใช้น้ำล้างเยื่อกระดาษ

การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ในขั้นตอน 1.3.3 และ 1.3.4 ไม่สามารถคัดเลือกหรือระบุความสามารถของจุลินทรีย์รหัสใดรหัสหนึ่งได้อย่างชัดเจน ทำให้ต้องใช้การเพาะเลี้ยงเชื้อใน Black liquor – MSM broth (BL-MSM broth) ประกอบด้วยน้ำล้างเยื่อกระดาษที่มีค่า COD ตั้งต้น เท่ากับ 161,680 mg/l มาเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM medium ให้ได้ความเข้มข้นน้ำล้างเยื่อกระดาษร้อยละ 10 (v/v) (COD~16,168 mg/l) ถือเป็นน้ำล้างเยื่อกระดาษความเข้มข้นสูง (Chandra et al., 2011) ไม่ปรับพีเอชและไม่เติมสารส่งเสริมการเจริญ (กลูโคสและเปปโทน) ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และเตรียมหัวเชื้อตั้งต้น (Inoculum) ใน nutrient broth ข้ามคืนที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 120 rpm จากนั้นทำการถ่ายหัวเชื้อปริมาตร 1 ml หรือ ความเข้มข้นหัวเชื้อร้อยละ 1(v/v) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BL-MSM broth ปริมาตร 99 ml บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 120 rpm ทำการติดตามการเจริญทุกวันด้วยอาหาร nutrient agar จนครบ 6 วันของการบ่มเชื้อ แสดงผลดังภาพ 35

จากภาพ 35A น้ำล้างเยื่อกระดาษความเข้มข้นสูงมีผลต่อเชื้อที่คัดแยกได้ทุกรหัส แสดงจากจำนวนแบคทีเรียในช่วง 24 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยงมีปริมาณเซลล์ลดลงอย่างรวดเร็ว เนื่องจากผลการเปลี่ยนแปลงอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกัน ซึ่งขั้นตอนการเตรียมหัวเชื้อใน nutrient broth จากนั้นทำการถ่ายหัวเชื้อเข้าสู่อาหาร MSM broth ที่มีน้ำล้างเยื่อกระดาษความเข้มข้นสูงเป็นองค์ประกอบทำให้เชื้อตายหรือลดจำนวนเซลล์ลง ซึ่งในน้ำล้างเยื่อกระดาษมีองค์ประกอบของลิกนินเป็นหลัก สังเกตได้จากสีดำของอาหารเพาะเลี้ยง (Mishra, & Thakur, 2010) ลิกนินที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อความมีชีวิตของเซลล์เนื่องจากฤทธิ์การต่อต้านจุลินทรีย์ของลิกนิน (antimicrobial) ที่รายงานโดย J.D. Coral Medina et al. (2016) ศึกษาคุณสมบัติของลิกนินความเข้มข้น 2 mg สามารถยับยั้งการเจริญของ *B. subtilis* เนื่องจากคุณสมบัติเหล่านี้เป็นผลมาจากโครงสร้าง syringyl aromatic structure และ วงแหวนอะโรมาติกที่พบในลิกนิน ซึ่งคล้ายคลึงกับยาเพนนิซิลลินกึ่งสังเคราะห์อย่างเช่น methicillin, carbenicilin และ benzyl penicillin ทำให้เชื้อที่คัดแยกได้ใช้ระยะเวลาในการปรับตัวแตกต่างกัน โดยรหัสเชื้อที่ใช้ระยะเวลาในการปรับตัวสั้น ได้แก่ MMX3, mPDA7, 6B2-AI และ MXYP5 แต่ปริมาณเซลล์ที่เพิ่มขึ้นหลังจาก 24 ชั่วโมงมีค่าต่ำ ส่วน 2B2-1LigB ใช้ระยะเวลาในการปรับตัวต่ออาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 2 วัน จากนั้นสามารถเพิ่มปริมาณเซลล์ในวันที่ 3 จนมีปริมาณเซลล์สูงสุดในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อ



ภาพ 35 การเจริญของเชื้อที่คัดแยกได้บนอาหารBL-MSM broth ที่มีองค์ประกอบของน้ำล้างเยื่อกระดาษความเข้มข้นร้อยละ10 สัญลักษณ์ —●— 6B2-AI —■— MMX3 —▲— mPDA7 —◆— 2B2-1LigB —★— MXYP5 และ —+— pH ของตัวแปรควบคุม

จากผลการทดลองแบคทีเรียไม่สามารถเจริญได้ในน้ำล้างเยื่อกระดาษความเข้มข้นสูงที่ไม่เติมสารส่งเสริมการเจริญได้แก่ กลูโคสและเปปโทน เชื้อที่คัดแยกได้รหัส 2B2-1LigB มีความสามารถในการปรับตัวหลังจากชั่วโมงที่ 48 และสามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ให้ได้มากกว่าจำนวนเชื้อตั้งต้น (ภาพ 35A) แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของเชื้อในการทนต่อลิกนินที่ความเข้มข้นสูงและความสามารถในการปรับตัวต่อลิกนินในน้ำล้างเยื่อกระดาษที่ค่าพีเอชเป็นด่างจัด อย่างไรก็ตามเชื้อที่คัดแยกได้ทุกรหัสไม่สามารถเจริญในน้ำล้างเยื่อกระดาษได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจาก

ปัจจัยหลายประการเช่น สารอาหารในน้ำล้างเยื่อกระดาษไม่เพียงพอต่อการเจริญ ความเข้มข้นของน้ำล้างเยื่อกระดาษสูงเกินไป พีเอชที่ไม่เหมาะสม

จากผลการทดลองค่าพีเอชเป็นค่าที่สามารถใช้ในการบ่งบอกกิจกรรมเมทาบอลิซึมของเซลล์ แต่ไม่ได้บอกถึงความสามารถในการย่อยลิกนินและการลดสีของน้ำล้างเยื่อกระดาษ (Abhay Raj, M. M., Krishna Reddy, & Ram Chandra, et al., 2007) จากภาพ 35B ค่าพีเอชในตัวอย่างและตัวควบคุม (control) ลดลงอยู่ในช่วง 11.7 – 10.2 การลดลงของพีเอชนี้ไม่ได้เกิดจากเซลล์จุลินทรีย์แต่เกิดจากปฏิกิริยา oxidation ของลิกนินกับออกซิเจนในการเขย่าขณะทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ จึงมีผลทำให้ค่าพีเอชลดลง เมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงที่ 144 ชั่วโมง จึงทำการสกัดอาหารเพาะเลี้ยงด้วย ethyl acetate และนำไปวิเคราะห์ GC-MS เพื่อวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้หลังจากการเติมเชื้อพบสารประกอบอินทรีย์มวลโมเลกุลต่ำหลากหลายชนิดทั้งชนิดที่สามารถระบุชื่อเทียบกับฐานข้อมูลและไม่สามารถระบุชื่อได้ (unknown) แสดงดังตาราง 12

จากผลการวิเคราะห์ GC-MS (ตาราง 12) พบสารประกอบฟีนอลอิสระ (free phenolic compound) ในตัวอย่างชุดควบคุม ได้แก่ Benzaldehyde (11.44), Hydrocinnamic acid (11.71), Benzoic acid (13.03), *p*-coumaric acid (13.93, 14.78) เป็นต้น เนื่องจากกระบวนการย่อยชิ้นไม้ให้ได้เยื่อกระดาษ หรือ soda pulping process จากวัตถุที่ไม่ใช่ไม้ (nonwood-based biomass sources) เช่น ชานอ้อย ย่อยในสารละลายด่าง (sodium hydroxide) ที่อุณหภูมิสูง 160 °C ทำให้ลิกนินถูกตัดพันธะอีเทอร์ที่ตำแหน่ง α และ β เป็นผลให้ได้เป็นสารประกอบฟีนอลอิสระ และลิกนินมวลโมเลกุลต่ำขนาดเล็กซึ่งละลายน้ำได้ (Upton, & Kasko, 2016)

นอกจากนี้ยังพบกรดอินทรีย์ (Organic acids) ละลายในน้ำล้างเยื่อกระดาษจำนวนหลากหลายชนิด ได้แก่ Butanoic acid (5.97), Pentanoic acid (7.55), Propanoic acid (8.75), Hexanoic acid (8.82), Acetic acid (8.88) เป็นต้น เนื่องจากชานอ้อยถูกย่อยที่อุณหภูมิสูงเพื่อแตกพันธะหรือปลดปล่อยเยื่อกระดาษมีผลทำให้เซลลูโลสถูกย่อยในสารละลายด่างเปลี่ยนเป็นกรดอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ (Yan, & Qi, 2014) นอกจากนี้สารประกอบที่สกัดได้ยังสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ สารประกอบที่ถูกย่อยกับสารประกอบที่ถูกสร้างขึ้นตามแต่ละรหัสของเชื้อดังนี้

เชื้อรหัส 2B2-1LigB มีความสามารถในการย่อยสารประกอบในน้ำล้างเยื่อกระดาษ ได้แก่ Silane (8.53), Propanoic acid (10.00), Octanoic acid (10.56), Malic acid (12.19), Hydrocinnamic acid (13.77), Benzoic acid (13.80), *p*-Coumaric acid (13.93), 9,12-octadecadienoic acid (16.02) และสารประกอบที่ถูกสร้างขึ้น ได้แก่ ethanedioic acid (9.99), Butanedioic acid (10.47), Fumaric acid (11.21), Butanedioic acid (12.18), Vanillic acid (13.80)

ตาราง 12 สารประกอบที่สกัดได้โดยใช้ ethyl acetate ในตัวอย่างควบคุม และตัวอย่างน้ำล้างเยื่อกระดาษความเข้มข้นร้อยละ 10 หลังจากการย่อยของแบคทีเรียที่คัดแยกได้รหัสต่าง ๆ โดยไม่มีการแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน

ลำดับ	ชื่อสาร	Control	2B2-1ligB	6B2-Al	MMX3	MXYP5	mPDA7
1	Trisiloxane , octamethyl (5.87)	√	√	√	√	√	√
2	Butanoic acid, trimethylsilyl ester (5.97)	√	√	√	√	√	√
3	Butanoic acid,3-methyl-, trimethylsilyl ester (6.82)	√	–	–	–	–	–
4	Trifluoromethyl-bis-(trimethylsilyl) methyl ketone (7.04)	√	√	√	√	√	√
5	Pentanoic acid , trimethylsilyl ester (7.55)	√	√	√	√	√	√
6	Silane, trimethylphenoxy (8.53)	√	–	√	–	–	–
7	Propanoic acid, 2-[(trimethylsilyl)oxy]-trimethylsilyl ester (8.75)	√	√	√	√	√	√
8	Hexanoic acid, trimethylsilyl ester (8.82)	√	√	√	√	√	√
9	Acetic acid,[(trimethylsilyl)oxy]-trimethylsilyl ester (8.88)	√	√	√	√	√	√
10	Butanoic acid, 2-[(trimethylsilyl)oxy-],trimethylsilyl ester (8.75)	√	√	√	√	√	√
11	Propanoic acid, 3-[(trimethylsilyl)oxy]-trimethylsilyl ester (9.56)	√	√	√	√	√	√

ตาราง 12 (ต่อ)

ลำดับ	ชื่อสาร	Control	2B2-1ligB	6B2-AI	MMX3	MXYP5	mPDA7
12	Heptanoic acid TMS (9.77)	√	√	√	√	√	√
13	Pentenoic acid,4-[(trimethylsilyl)oxy]-,trimethylsilyl ester (9.99)	-	-	√	-	-	-
14	ethanedioic acid, bis(trimethylsilyl) ester (9.99)	-	√	-	-	-	-
15	Propanoic acid, 3-[(trimethylsilyl)oxy]-,trimethylsilyl ester (10.00)	√	-	-	√	√	√
16	Pentanoic acid,2-[(trimethylsilyl)oxy]-,trimethylsilyl ester (10.07)	-	-	√	-	√	√
17	Propanedioic acid,bis(trimethylsilyl) ester(10.12)	-	-	√	-	√	√
18	2-Methoxyphenol (10.29)	-	-	√	-	-	-
19	Butanoic acid, 4-[(trimethylsilyl)oxy]-,trimethylsilyl ester (10.37)	√	√	√	√	√	√
20	Butanedioic acid, bis(trimethylsilyl) ester (10.47)	-	√	-	-	-	√
21	Octanoic acid, trimethylsilyl ester (10.56)	√	-	√	-	√	-
22	Butanedioic acid, bis[trimethylsilylester] (10.97)	-	-	√	√	√	-

ตาราง 12 (ต่อ)

ลำดับ	ชื่อสาร	Control	2B2-1ligB	6B2-AI	MMX3	MXYP5	mPDA7
23	Succinic acid-DI TMS (10.97)	√	–	–	–	–	–
24	Pyrotartaric acid - DI TMS (11.06)	√	√	–	√	√	√
25	2-Butendioic acid(E), bis(trimethylsilyl) ester (11.21)	–	–	√	√	√	√
26	Fumaric acid , bis(trimethyl silyl) ester (11.21)	–	√	–	–	–	–
27	2-Butenedioic acid. (E)-,bis(trimethylsilyl) ester (11.22)	√	–	–	–	–	–
28	Tris(trimethylsilyl) malic acid (11.38)	–	–	√	–	–	–
29	Benzaldehyde,4-[(trimethylsilyl)oxy](11.44)	√	√	√	√	√	√
30	2-methylacetoacetic acid TMS Ether TMS Ester (11.58)	–	–	√	–	–	–
31	unknown (11.58)	√	√	–	√	√	√
32	Benzenepropanoic acid , trimethylsilyl ester (11.71)	–	–	–	√	√	√
33	Hydrocinnamic acid, trimethylsilyl ester (11.71)	√	√	√	–	–	–
34	unknown (12.10)	√	√	√	√	√	√
35	Butanedioic acid, [((trimethylsilyl)oxy]-,bis(trimethylsilyl) ester (12.18)	–	√	–	–	–	–
36	Malic acid, Tris (trimethylsilyl) ester (12.19)	√	–	–	√	√	√

ตาราง 12 (ต่อ)

ลำดับ	ชื่อสาร	Control	2B2-1ligB	6B2-Al	MMX3	MXYP5	mPDA7
37	unknown (12.31)	√	√	√	√	√	√
38	Benzaldehyde,3-methoxy-4-[(trimethylsilyl)oxy] (12.52)	–	–	–	–	√	√
39	Trimethylsilyl vanillin (12.52)	√	√	√	√	–	–
40	Alpha-hydroxyglutaric acid (TMS)(12.71)	–	–	√	–	–	–
41	Pentanedioic acid , 2-(trimethylsilyl)oxy-bis(trimethylsilyl) ester (12.71)	√	√	–	√	√	√
42	Benzoic acid , 4-[(trimethylsilyl)oxy]-trimethylsilyl ester (13.03)	√	√	√	√	√	√
43	3,5-dimethoxy-4-trimethylsilyloxybenzaldehyde (13.50)	√	√	√	√	√	√
44	Hydrocinnamic acid, p-(trimethylsiloxy)-,trimethylsilyl ester (13.77)	√	–	√	–	–	–
45	Vanillic acid,trimethylsilyloxytrimethylsilyl ester (13.80)	–	√	–	–	√	–
47	Benzoic acid ,3-methoxy-4-[(trimethylsilyl)oxy]-trimethylsilyl ester (13.80)	√	–	–	√	–	√
48	unknown (13.90)	√	√	–	√	√	√

ตาราง 12 (ต่อ)

ลำดับ	ชื่อสาร	Control	2B2-1ligB	6B2-Al	MMX3	MXYP5	mPDA7
49	p-Coumaric acid (TMS) (13.93)	√	–	√	–	–	–
50	Trimethylsilyl 3,5-dimethoxy-4-(trimethylsilyloxy) benzoate (14.51)	√	√	√	√	√	√
51	p-Coumaric acid (TMS) (14.78)	√	√	√	√	√	√
52	vanillyl lactic acid-TRITMS (15.11)	–	–	–	–	√	√
53	Hexadecanoic acid, trimethylsilyl ester (15.16)	–	√	√	√	√	√
54	Ferulic acid, trimethylsiloxy, trimethylsilyl ester (15.48)	√	√	√	√	√	√
55	9,12 - octadecadienoic acid, trimethylsilyl ester (16.02)	√	–	√	√	√	√
56	Octadecanoic acid, trimethylsilyl ester (16.17)	√	–	–	–	–	–

หมายเหตุ: สภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM media

เชื้อรหัส 6B2-AI มีความสามารถในการย่อยสารประกอบในน้ำล้างเยื่อกระดาษ ได้แก่ Propanoic acid (10.00), Pyrotartaric acid (11.06), Malic acid (12.19), Pentanedioic acid (12.71), Benzoic acid (13.80) และสารประกอบที่ถูกสร้างขึ้น ได้แก่ Pentanoic acid (10.07), Propanedioic acid (10.12), 2-Methoxyphenol (10.29), Butanedioic acid (10.97), Malic acid (11.38), 2-methylacetoacetic acid (11.58), Alpha-hydroxyglutaric acid (12.71)

เชื้อรหัส MMX3 มีความสามารถในการย่อยสารประกอบในน้ำล้างเยื่อกระดาษ ได้แก่ Silane (8.53), Octanoic acid (10.56), Hydrocinnamic acid (11.71), Hydrocinnamic acid (13.77), *p*-Coumaric acid (13.93) และสารประกอบที่ถูกสร้างขึ้น ได้แก่ Butanedioic acid (10.97), Benzenepropanoic acid (11.71)

เชื้อรหัส MXYP5 มีความสามารถในการย่อยสารประกอบในน้ำล้างเยื่อกระดาษ ได้แก่ Silane (8.53), Hydrocinnamic acid (11.71), Vanillin (12.52), Hydrocinnamic acid (13.77), Benzoic acid (13.80), *p*-Coumaric acid (13.93) และสารประกอบที่ถูกสร้างขึ้น ได้แก่ Pentanoic acid (10.07), Propanedioic acid (10.12), Butanedioic acid (10.97), Benzenepropanoic acid (11.71), Benzaldehyde (12.52), Vanillic acid (13.80), Vanillyl lactic acid (15.11)

เชื้อรหัส mPDA7 มีความสามารถในการย่อยสารประกอบในน้ำล้างเยื่อกระดาษ ได้แก่ Silane (8.53), Octanoic acid (10.56), Hydrocinnamic acid (11.71), Vanillin (12.52), Hydrocinnamic acid (13.77), p-Coumaric acid (13.93) และสารประกอบที่ถูกสร้างขึ้น ได้แก่ Pentanoic acid (10.07), Propanedioic acid (10.12), Benzenepropanoic acid (11.71), Benzaldehyde (12.52), Vanillyl lactic acid (15.11)

นอกจากนี้สารประกอบที่สกัดได้หลายชนิดยังคงพบในตัวอย่างที่ได้ทำการลงเชื้อและตัวอย่างควบคุม ทำให้ไม่สามารถอธิบายความแตกต่างของสารประกอบในตัวอย่างแต่ละชนิดได้ ผู้วิจัยจึงนำค่าพื้นที่ใต้กราฟของสารแต่ละชนิดมาทำการเทียบกับพื้นที่ใต้กราฟของตัวอย่างควบคุม เพื่อคำนวณค่าร้อยละการย่อยแสดงดังตาราง 13

ตาราง 13 การระบุชื่อสารประกอบในสารสกัด ethyl acetate และร้อยละการย่อยสารประกอบต่างๆ ในน้ำล้างเยื่อกระดาษโดยเทคนิค TMS derivatives ของตัวอย่างน้ำล้างเยื่อกระดาษความเข้มข้น 10 %(v/v) ซึ่งไม่เติมสารส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ตามกราฟการเจริญในภาพ 35A

RT	Identified compound	Untreated 10%BL	2B2-1-treated 10%BL	6B2-AL-treated 10%BL	MMX3-treated 10%BL	MXYP5-treated 10%BL	mPDA7-treated 10%BL
5.97	Butanoic acid	√	41.60	53.11	35.61	23.55	33.03
7.04	Trifluoromethyl-bis-(trimethylsilyl) methyl ketone	√	13.89	30.81	1.34	0.95	5.04
7.55	Pentanoic acid	√	43.11	47.83	36.07	25.89	32.59
8.75	Propanoic acid	√	46.57	46.64	41.56	29.72	37.79
8.82	Hexanoic acid	√	49.65	50.62	42.80	31.89	38.61
8.88	Acetic acid	√	38.86	37.37	32.06	19.73	30.37
9.56	Propanoic acid	√	60.63	43.93	57.17	40.40	56.34
9.77	Heptanoic acid	√	54.97	48.80	44.89	30.84	42.32
10.37	Butanoic acid	√	49.31	47.17	46.16	41.76	39.39
10.97	Butanedioic acid	√	45.91	49.47	42.67	28.34	33.43
11.44	Benzaldehyde	√	50.70	48.61	46.71	28.88	38.21

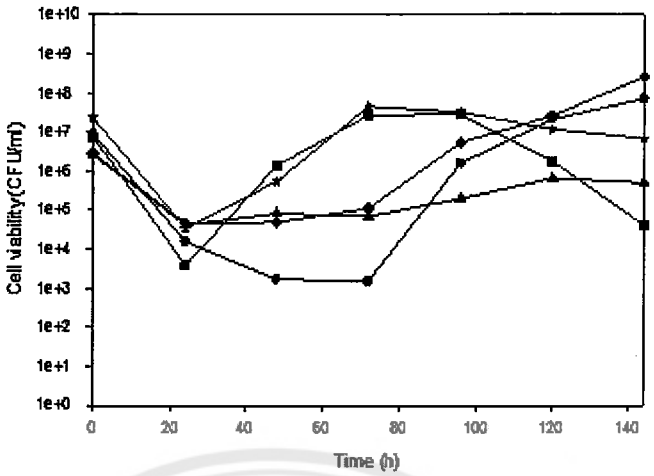
ตาราง 13 (ต่อ)

RT	Identified compound	Untreated 10%BL	2B2-1-treated 10%BL	6B2-AL-treated 10%BL	MMX3-treated 10%BL	MXYP5-treated 10%BL	mPDA7-treated 10%BL
13.03	Benzoic acid	√	47.08	53.19	41.36	20.45	33.36
13.50	3,5-dimethoxy-4-trimethylsilyloxybenzaldehyde	√	63.17	66.28	62.29	59.78	35.62
14.51	Trimethylsilyl 3,5-dimethoxy-4-(trimethylsilyloxy) benzoate	√	61.72	55.02	47.54	39.80	50.14
14.78	p-Coumaric acid	√	46.77	44.43	40.56	26.00	35.34
15.16	Hexadecanoic acid	√	67.72	60.70	61.72	39.74	52.19
15.48	Ferulic acid	√	57.79	50.59	60.56	49.16	68.10
16.02	9,12 - octadecadienoic acid	√	79.16	76.22	73.76	35.55	65.14

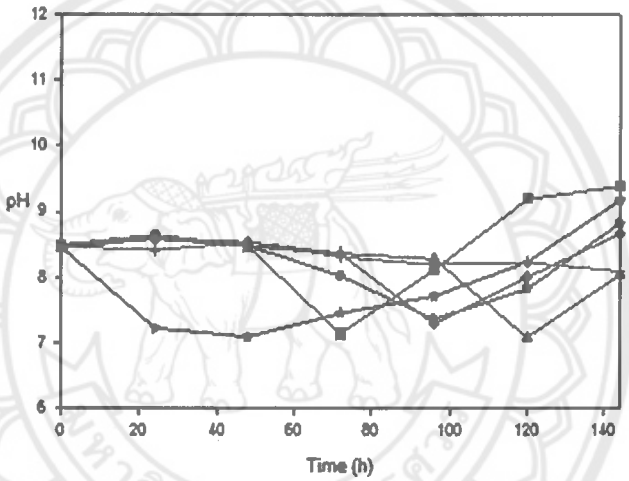
ตาราง 13 บ่งบอกถึงศักยภาพในการกำจัดสารประกอบอินทรีย์ของจุลินทรีย์แต่ละรหัสที่คัดแยกได้ โดยนำค่าพื้นที่ใต้กราฟของสารแต่ละชนิดมาคำนวณร้อยละการย่อยสารประกอบต่างๆ ในน้ำล้างเยื่อกระดาษ ซึ่งใช้พื้นที่ใต้กราฟน้ำล้างเยื่อกระดาษที่ไม่ได้เติมเชื้อเป็นค่าตั้งต้น พบเชื้อทุกรหัสมีความสามารถในการลดพื้นที่ใต้กราฟของสารประกอบที่มีในน้ำล้างเยื่อกระดาษ เช่น 2B2-1LigB ให้ค่าการลดลงของสารประกอบ Acetic acid (38.86%), Propanoic acid (60.63%), Heptanoic acid (54.97%), Benzaldehyde (50.70%), 3, 5-dimethoxy-4-trimethylsilyloxybenzaldehyde (63. 17%), Trimethylsilyl 3,5-dimethoxy-4-(trimethylsilyloxy) benzoate (61.72%), *p*-Coumaric acid (46.77%), Hexadecanoic acid (67.72%) และ 9,12 - octadecadienoic acid (79.16%) สอดคล้องตามการรายงาน Casa et al. (2003) ทำการกำจัดน้ำเสียของโรงงานน้ำมันมะกอก (Olive-mill wastewater, OMW) ด้วยเอนไซม์แลคเคส พบการลดลงของสารประกอบฟีนอลทั้งหมด และ otho-diphenols เท่ากับ 65 % และ 86 % ตามลำดับ

จากผลดังกล่าวเป็นการยืนยันว่า เชื้อที่คัดแยกได้ทุกรหัสสามารถทนต่อน้ำล้างเยื่อกระดาษความเข้มข้นสูงที่มีองค์ประกอบของอนุพันธ์ฟีนอลและกรดอินทรีย์หลากหลายชนิด ซึ่งมีความสามารถในการปรับตัวในอาหารเลี้ยงเชื้อ ในปัจจุบันน้ำล้างเยื่อกระดาษยังไม่ถูกนำไปใช้ประโยชน์ มีเพียงวิธีการกำจัดด้วยวิธีทางเคมีกายภาพ โดยการตกตะกอนลิกนินด้วยกรด จากนั้นเผาเพื่อนำด่างกลับมาใช้ใหม่ ในช่วงการเผามีการปล่อยสารพิษอินทรีย์ที่ระเหยได้ออกมา เช่น dioxins ทำให้วิธีเผานี้เป็นวิธีที่ไม่มีประสิทธิภาพก่อให้เกิดปัญหาอื่นตามมา (Mishra, & Thakur, 2010) ดังนั้นการกำจัดมลพิษของน้ำล้างเยื่อกระดาษโดยวิธีทางชีวภาพ จึงมีความท้าทาย

อย่างไรก็ตามปริมาณเซลล์ยังคงต่ำ เนื่องจากไม่มีการเติมสารส่งเสริมการเจริญ ผู้วิจัยจึงทำการทดลองเติมสารส่งเสริมการเจริญ ได้แก่ กลูโคสและเปปโทน เพื่อเร่งให้เซลล์มีปริมาณมากในช่วงตั้งต้นและกระตุ้นให้เกิดการย่อยลิกนิน บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ใช้ในการคัดแยกเชื้อ แสดงผลการทดลองตามภาพ 36



A)



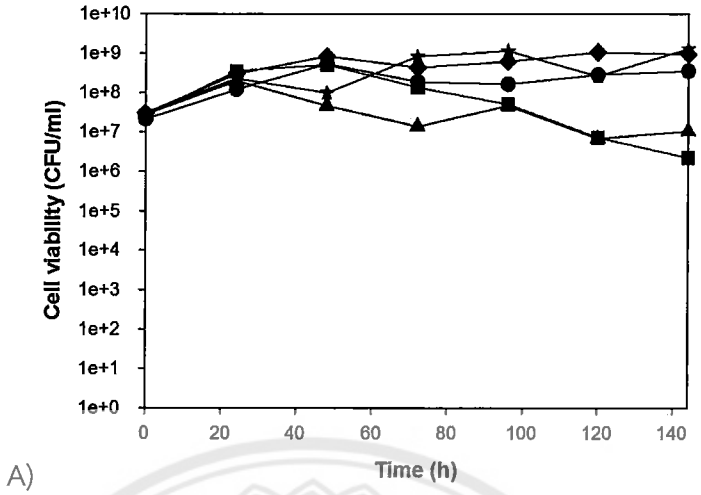
B)

ภาพ 36 การเจริญของเชื้อที่คัดแยกได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีองค์ประกอบของน้ำล้างเยื่อกระดาษความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตรที่มีการเติมสารส่งเสริมการเจริญ (กลูโคส0.5%(w/v)และเปปโทน 0.25%(w/v)) อุณหภูมิ 40 °C ความเร็ว 200 รอบต่อนาที สัญลักษณ์แทน —●— 6B2-Al, —■— MMX3, —▲— mPDA7 , —◆— 2B2-1LigB, —★— MXYP5และ —+— pH ของตัวแปรควบคุม

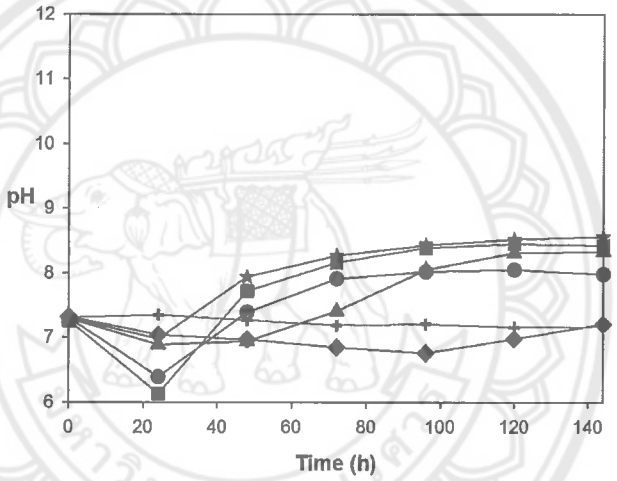
จากภาพ 36A พบว่า การเติมกลูโคสและเปปโทนความเข้มข้น 5 และ 2.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ลงในน้ำล้างเยื่อกระดาษความเข้มข้นสูงช่วยเพิ่มปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตได้ โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อในน้ำล้างเยื่อกระดาษความเข้มข้นสูง แสดงผลการยับยั้งเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อทุกรหัสสังเกตได้จากจำนวนเซลล์ลดลงที่ 24 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง จากนั้นเชื้อแต่ละรหัสใช้เวลาในการปรับตัวต่ออาหารเพาะเลี้ยงแตกต่างกัน เนื่องจากผลของกลูโคสและเปปโทน

โดยเชื้อที่ใช้ระยะเวลาในการปรับตัวสั้น คือ MMX3 และ MXYP5 ใช้เวลาในการปรับตัวต่ออาหารเลี้ยงเชื้อภายใน 24 ชั่วโมง รองลงมา 2B2-1ligB, mPDA7 และ 6B2-Al ใช้ระยะในการปรับตัว 72 ชั่วโมง จากนั้นเชื้อ 2B2-1ligB และ 6B2-Al สามารถเจริญเพิ่มขึ้นได้อย่างต่อเนื่อง แสดงว่าเชื้อทั้งสองรหัสมีความสามารถในการใช้ลิกนินที่เป็นองค์ประกอบหลักในน้ำล้างเยื่อกระดาษเพื่อการเจริญ

จากผลของค่าพีเอชภาพ 36B พบการลดลงของพีเอชในทุกรหัสมีรูปแบบที่แตกต่างกัน การที่พีเอชลดลง เนื่องมาจากจุลินทรีย์เกิดกระบวนการหมักทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นกรด การเจริญของเซลล์ยังทำให้เกิดการปลดปล่อยโปรตอน (H^+) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากการใช้โลหะโดยกิจกรรมของเซลล์ (Malik, 2004) เชื้อรหัส 2B2-1 LigB มีกิจกรรมเมทาบอลิซึมอย่างมากในชั่วโมงที่ 96 อย่างไรก็ตามไม่มีเชื้อรหัสใดที่จะคงสภาวะพีเอชให้ต่ำกว่าปัจจัยควบคุมได้ ผู้วิจัยจึงศึกษาความเข้มข้นของน้ำล้างเยื่อกระดาษต่ำ เท่ากับ 1% (v/v)(COD~1,616 mg/l) และช่วยลดระยะในการปรับตัวของเชื้อโดยการเปลี่ยนอาหารที่ใช้ในการเตรียมหัวเชื้อตั้งต้น (Inoculum) จากเดิมเพาะเลี้ยงบน nutrient broth จึงเปลี่ยนมาใช้อาหารเลี้ยงเชื้อตัวเดียวกับอาหารเพาะเลี้ยง (การเลี้ยงเชื้อใน 1% Black liqour(v/v), 0.5%glucose, 0.25% Peptone) และเพิ่มปริมาณหัวเชื้อตั้งต้นเท่ากับ 5 % (v/v) (Inoculum size) นอกจากนี้ได้ทำการบันทึกค่าพีเอชก่อนการฆ่าเชื้อ 8.29 และค่าพีเอชหลังการฆ่าเชื้อ 7.44 (ไม่ปรับค่าพีเอช) ให้ผลการเจริญดังภาพ 37



A)



B)

ภาพ 37 การเจริญของเชื้อที่คัดแยกได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีองค์ประกอบของน้ำล้างเยื่อกระดาษความเข้มข้นร้อยละ 1โดยปริมาตร ที่มีการเติมสารส่งเสริมการเจริญ (กลูโคส 0.5%(w/v)และเปปโทน 0.25%(w/v)) อุณหภูมิ 40 °C ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ปริมาณหัวเชื้อตั้งต้น 5 %(v/v) ในอาหารเดียวกัน สัญลักษณ์แทน —●— 6B2-Al, —■— MMX3, —▲— mPDA7 , —◆— 2B2-1LigB, —★— MXYP5และ —✚— pH ของตัวแปรควบคุม

จากภาพ 37A พบว่าการลดความเข้มข้นน้ำล้างเยื่อกระดาษ การเปลี่ยนอาหารที่ใช้สำหรับเตรียมหัวเชื้อตั้งต้น และการเพิ่มปริมาณหัวเชื้อส่งผลต่อการเจริญของเชื้อที่คัดแยกได้ โดยเชื้อที่คัดแยกได้ทุกรหัสมีความสามารถในการเจริญในน้ำล้างเยื่อกระดาษได้ทันทีหลังจาก 24 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง จากนั้นเชื้อรหัส mPDA7 ให้ปริมาณเซลล์ลดลง เชื้อรหัส 2B2-1LigB, 6B2-Al และ MMX3 ให้ค่าการเจริญสูงสุดในชั่วโมงที่ 48 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่ง 2B2-1LigB

และ 6B2-Al มีการเจริญลดลงเล็กน้อยในชั่วโมงที่ 72 แล้วเข้าสู่การเจริญคงที่ (stationary phase) แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของเชื้อที่สามารถนำไปหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยลิกนินต่อไป ส่วน MMX3 หลังจาก 72 ชั่วโมง ปริมาณเซลล์ลดลงอย่างต่อเนื่อง ส่วน MXYP5 เป็นเชื้อที่มีความน่าสนใจ แต่ไม่ได้ถูกเลือก เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของค่าพีเอชเข้าสู่สภาวะด่างอย่างรวดเร็วหลังจาก 24 ชั่วโมง

จากภาพ 37B พบว่า เชื้อทุกรหัสสามารถลดค่าพีเอชลงภายใน 24 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับค่าพีเอชของชุดควบคุม เนื่องจากเชื้อใช้น้ำตาลกลูโคส จากนั้นค่าพีเอชของเชื้อทุกรหัสกลับสูงขึ้นโดยให้ค่าพีเอชมากกว่าปัจจัยควบคุม สอดคล้องตามงานของ R. Chandra et al. (2011) ศึกษารูปแบบการเปลี่ยนแปลงพีเอชในอาหารเพาะเลี้ยงที่เติม black liquor ความเข้มข้น 10% (COD 18,700 mg/l) และเติมสารส่งเสริมการเจริญกลูโคสและเปปโทน เท่ากับ 1% และ 0.5% (w/v) ตามลำดับ พบค่าพีเอชในช่วง 24 ชั่วโมงแรกมีการลดลงเท่ากับ 9.0 จากพีเอชตั้งต้น 12 จากนั้นค่าพีเอชสูงขึ้นจนถึง 11.5 ในวันที่ 8 ของการบ่ม ทำให้ทราบว่าการลดลงของพีเอชเกิดจากเชื้อใช้กลูโคสและเปปโทนในการเจริญช่วงแรกของการบ่ม เมื่อสารอาหารหมดลงค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อจะสูงขึ้น ยกเว้นเชื้อรหัส 2B2-1LigB ยังคงมีกิจกรรมเมทาบอลิซึมของเซลล์ได้อย่างต่อเนื่อง จนถึงชั่วโมงที่ 96 เท่ากับ 6.76 หลังจากชั่วโมงที่ 96 ค่าพีเอชจึงเพิ่มขึ้น เมื่อวิเคราะห์น้ำเพาะเลี้ยงในวันสุดท้ายโดยวัดค่าดูดกลืนแสงลิกนินและค่าสีแสดงดังตาราง 14

ตาราง 14 ค่าวัดลิกนินและสีของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำล้างเยื่อกระดาษร้อยละ 1

รหัสเชื้อ	ปริมาณลิกนินค่าเจือจางที่10^{-1} (A_{280})	ปริมาณลิกนินที่ไม่เจืองจางA_{280}	ค่าสีการเจือจางที่ 10^{-1} (A_{465})	ค่าสี Co-Pt= $500(A_2/A_1)$
6B2-Al	0.231	1.081	0.127	5,039
MMX3	0.24	1.138	0.151	5,992
mPDA7	0.214	0.859	0.119	4,722
2B2-1LigB	0.202	0.758	0.111	4,404
MXYP5	0.241	1.205	0.134	5,317
Control	0.232	0.901	0.107	4,246
Hazen500 (A_1)			0.126	500

จากตาราง 14 พบว่าแบคทีเรียรหัส 2B2-1LigB สามารถลดค่าลิกนินเท่ากับ 15.87% (0.901-0.758=0.143*100/0.901) และให้ผลของค่าสีต่ำกว่าเชื้อทุกรหัสที่คัดแยกได้ ดังนั้นจึงนำแบคทีเรียรหัส 2B2-1LigB ไปศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญในขั้นตอนต่อไป

จากผลการเปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงที่ใช้ในการเตรียมหัวเชื้อตั้งต้น (Inoculum) และการเพิ่มปริมาณหัวเชื้อ (Inoculum size) ทำให้การศึกษาในหัวข้อที่ 2 หรือการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยลิกนินโดยใช้ลิกนินบริสุทธิ์ทางการค้า (Aldrich) ซึ่งเลือกเฉพาะจุลินทรีย์รหัส 2B2-1LigB มาศึกษาสภาวะที่เหมาะสม ซึ่งช่วยกระตุ้นให้เชื้อสร้างเอนไซม์ย่อยลิกนินได้อย่างมีประสิทธิภาพ (F. N. U. Asina, Brzonova, Kozliak, Kubátová, & Ji, 2017)

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยลิกนินบริสุทธิ์

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยลิกนินใช้ลิกนินทางการค้า (lignin alkali, Aldrich) แทนการใช้น้ำล้างเยื่อกระดาษ เนื่องจากสามารถควบคุมปัจจัยอื่น ๆ ที่ไม่เกี่ยวข้องกับการย่อยลิกนินได้ดีกว่า โดยธรรมชาติของน้ำล้างเยื่อกระดาษมีลิกนินและสารประกอบฟีนอลอิสระอื่นๆ เป็นองค์ประกอบ โดยมวลโมเลกุลลิกนินในน้ำล้างเยื่อกระดาษจะมีขนาดเล็ก เนื่องจากกระบวนการย่อยเยื่อกระดาษด้วยด่าง (Upton, & Kasko, 2016)

การหาสภาวะที่เหมาะสมดำเนินการในฟลาส์กขนาด 250 ml บรรจุอาหารเพาะเลี้ยง Lignin Mineral Salt Medium (L-MSM) ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ศึกษาปัจจัยทั้งหมด 4 ปัจจัย ได้แก่ ความเข้มข้นลิกนินที่ 1 และ 2 กรัมต่อลิตร แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม (Urea, $NaNO_3$) ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ 0.25% และ 0.5% (w/v) และอุณหภูมิ 35 และ 40 องศาเซลเซียส รวมทั้งหมด 16 การทดลอง การทดลองละ 2 ซ้ำ

ทำการทดลองเพิ่มเติม โดยลดความเข้มข้นของของ $NaNO_3$ เท่ากับ 0.1% (w/v) และเพิ่มความเข้มข้นของยูเรีย 0.75% (w/v) เพื่อยืนยันความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม (ตาราง 15) นอกจากนี้ทำการศึกษาผลของอุณหภูมิที่ 45 องศาเซลเซียส เพื่อยืนยันผลของอุณหภูมิสูงที่มีต่อความสามารถในการเจริญในทุกการทดลอง

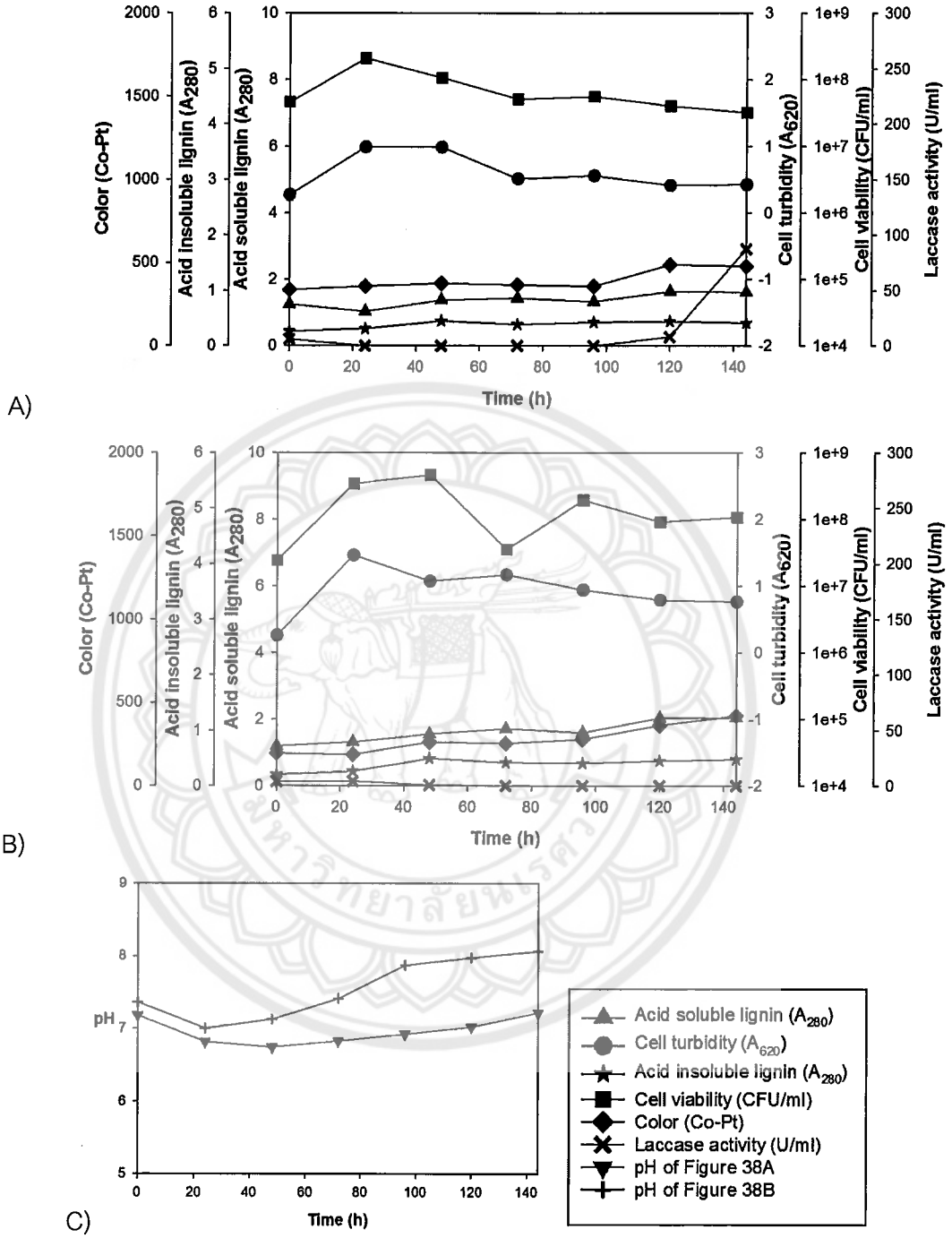
ตาราง 15 แบบแผนการหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยลิกนินบริสุทธิ์

ภาพที่	ปัจจัยที่ศึกษา				เหตุผลที่ศึกษา
	ความเข้มข้นลิกนิน (g/l)	อุณหภูมิ (°C)	แหล่งไนโตรเจน	ความเข้มข้นแหล่งไนโตรเจน(g/l)	
38A	-	35	$NaNO_3$	5	ศึกษาผลของการไม่เติมลิกนินที่อุณหภูมิ 35 °C
38B	-	35	Peptone	5	
39A	-	40	$NaNO_3$	5	ศึกษาผลของการไม่เติมลิกนินที่อุณหภูมิ 40 °C
39B	-	40	Peptone	5	
40A	1	35	-	-	ศึกษาผลของการไม่เติมแหล่งไนโตรเจนที่อุณหภูมิ 35 °C
40B	2	35	-	-	
41A	1	35	Peptone	5	ศึกษาผลของการเติมแหล่งไนโตรเจนที่อุณหภูมิ 35 °C
41B	2	35	Peptone	5	
42A	1	40	-	-	ศึกษาผลของการไม่เติมแหล่งไนโตรเจนที่อุณหภูมิ 40 °C
42B	2	40	-	-	
43A	1	40	Peptone	5	ศึกษาผลของการเติมแหล่งไนโตรเจนที่อุณหภูมิ 40 °C
43B	2	40	peptone	5	
44A	1	35	$NaNO_3$	2.5	ศึกษาผลของการเติมNaNO3 ความเข้มข้นต่างกันที่อุณหภูมิ
44B	1	35	$NaNO_3$	5	35 °C ลิกนิน 1 g/l
45A	1	35	Urea	2.5	ศึกษาผลของการเติม Urea ความเข้มข้นต่างกันที่อุณหภูมิ
45B	1	35	Urea	5	35 °Cลิกนิน 1 g/l
46A	1	40	$NaNO_3$	2.5	ศึกษาผลของการเติมNaNO3 ความเข้มข้นต่างกันที่อุณหภูมิ
46B	1	40	$NaNO_3$	5	40 °Cลิกนิน 1 g/l
47A	1	40	Urea	2.5	ศึกษาผลของการเติม Urea ความเข้มข้นต่างกันที่อุณหภูมิ
47B	1	40	Urea	5	40 °Cลิกนิน 1 g/l
48A	2	35	$NaNO_3$	2.5	ศึกษาผลของการเติมNaNO3 ความเข้มข้นต่างกันที่อุณหภูมิ
48B	2	35	$NaNO_3$	5	35 °C ลิกนิน 2 g/l
49A	2	35	Urea	2.5	ศึกษาผลของการเติม Urea ความเข้มข้นต่างกันที่อุณหภูมิ
49B	2	35	Urea	5	35 °Cลิกนิน 2 g/l
50A	2	40	$NaNO_3$	2.5	ศึกษาผลของการเติมNaNO3 ความเข้มข้นต่างกันที่อุณหภูมิ
50B	2	40	$NaNO_3$	5	40 °Cลิกนิน 2 g/l
51A	2	40	Urea	2.5	ศึกษาผลของการเติม Urea ความเข้มข้นต่างกันที่อุณหภูมิ
51B	2	40	Urea	5	40 °Cลิกนิน 2 g/l
52A	-	45	$NaNO_3$	5	ศึกษาผลของการไม่เติมลิกนินที่อุณหภูมิ 45 °C
52B	-	45	Peptone	5	
53A	1	45	-	-	ศึกษาผลของการไม่เติมแหล่งไนโตรเจนที่อุณหภูมิ 45 °C
53B	2	45	-	-	

ตาราง 15 (ต่อ)

ภาพที่	ปัจจัยที่ศึกษา				เหตุผลที่ศึกษา
	ความเข้มข้นลิกนิน (g/l)	อุณหภูมิ (°C)	แหล่งไนโตรเจน	ความเข้มข้นแหล่งไนโตรเจน (g/l)	
54A	1	45	Peptone	5	ศึกษาผลของการเติมแหล่งไนโตรเจนที่อุณหภูมิ 45 °C
54B	2	45	Peptone	5	
55A	1	45	$NaNO_3$	2.5	ศึกษาผลของการเติมNaNO3 ความเข้มข้นต่างกันที่อุณหภูมิ
55B	1	45	$NaNO_3$	5	45 °C ลิกนิน 1 g/l
56A	1	45	Urea	2.5	ศึกษาผลของการเติม Urea ความเข้มข้นต่างกันที่อุณหภูมิ
56B	1	45	Urea	5	45 °C ลิกนิน 1 g/l
57A	2	45	$NaNO_3$	2.5	ศึกษาผลของการเติมNaNO3 ความเข้มข้นต่างกันที่อุณหภูมิ
57B	2	45	$NaNO_3$	5	45 °C ลิกนิน 2 g/l
58A	2	45	Urea	2.5	ศึกษาผลของการเติม Urea ความเข้มข้นต่างกันที่อุณหภูมิ
58B	2	45	Urea	5	45 °C ลิกนิน 2 g/l
59A	1	35	$NaNO_3$	1	เพื่อยืนยันความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม
59B	2	35	$NaNO_3$	1	
60A	1	40	$NaNO_3$	1	เพื่อยืนยันความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม
60B	2	40	$NaNO_3$	1	
61A	1	45	$NaNO_3$	1	เพื่อยืนยันความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนและอุณหภูมิที่
61B	2	45	$NaNO_3$	1	เหมาะสม
62A	1	35	Urea	7.5	เพื่อยืนยันความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม
62B	2	35	Urea	7.5	
63A	1	40	Urea	7.5	เพื่อยืนยันความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม
63B	2	40	Urea	7.5	
64A	1	45	Urea	7.5	เพื่อยืนยันความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนและอุณหภูมิที่
64B	2	45	Urea	7.5	เหมาะสม

การศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนชนิดอินทรีย์และอนินทรีย์ โดยดำเนินการศึกษาที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 rpm แสดงผลการทดลองดังภาพ 38

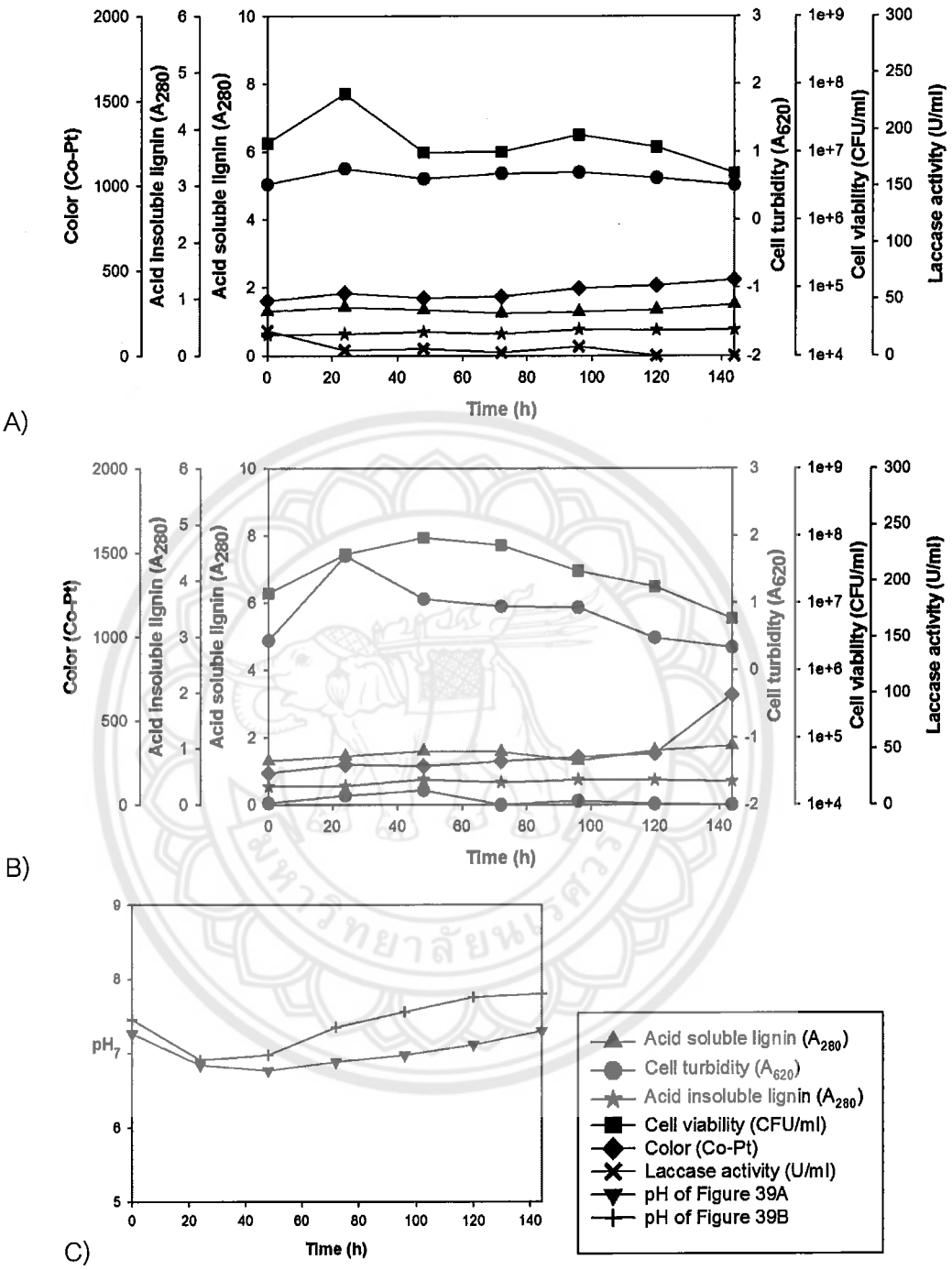


ภาพ 38 ปฏิกิริยาของ 2B2-1 LigB ที่เกิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ไม่เติมลิกนิน กลูโคส 5 กรัมต่อลิตร และแหล่งไนโตรเจนความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร A) $NaNO_3$ B) Peptone

จากภาพ 38 เชื้อรหัส 2B2-1LigB มีความสามารถในการเจริญได้ทันทีในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ MSM broth ที่มีแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์และอินทรีย์ ซึ่งมีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและไม่เติมลิกนินที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส แสดงจากค่าเซลล์ที่มีชีวิตและค่าความขุ่น ส่วนค่าสีและค่าลิกนินที่ละลายในสารละลายกรด (acid soluble lignin) มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงที่มีการเติม $NaNO_3$ ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร ค่าสีเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนสอดคล้องกับค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสที่เพิ่มขึ้นในชั่วโมงที่ 144 เนื่องจากเอนไซม์แลคเคสที่แบคทีเรียสร้างขึ้นเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงเป็นสารโพลิเมอร์ (polymerization) ทำให้ค่าสีในระบบเพิ่มขึ้น (Jönsson, Palmqvist, Nilvebrant, & Hahn-Hägerdal, 1998) ส่วนการเพาะเลี้ยงที่มีการเติมเปปโทนเป็นแหล่งไนโตรเจน พบการเจริญของเซลล์ที่มีชีวิต (cell viability) สูงกว่าการใช้ $NaNO_3$ หรือแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ ทำให้ทราบถึงศักยภาพของเปปโทนในการส่งเสริมการเจริญของเซลล์ที่มีชีวิตได้ดีกว่า $NaNO_3$ หลังจาก 48 ชั่วโมง ปริมาณเซลล์ลดลงในชั่วโมงที่ 72 บ่งชี้ถึงปริมาณแหล่งคาร์บอนที่หมดไป เนื่องจากการเจริญของแบคทีเรีย จากนั้นเซลล์จะทำการปรับตัวจึงสามารถเพิ่มปริมาณเซลล์ขึ้นได้ อิทธิพลจากการไม่เติมลิกนินมีผลต่อการสร้างเอนไซม์แลคเคส พบค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสต่ำมากในช่วง 24 ชั่วโมงแรกของการเจริญ ซึ่งมีการเพิ่มขึ้นของค่าสีและค่าลิกนินที่ละลายได้ในสารละลายกรด (acid soluble lignin) มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ส่วนค่าลิกนินที่ไม่ละลายในสารละลายกรด (acid insoluble lignin) มีร้อยละเพิ่มขึ้นภายใน 48 ชั่วโมง เท่ากับ 0.49 จากค่าลิกนินเริ่มต้น 0.20

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของแบคทีเรียที่คัดแยกได้รหัส 2B2-1ligB เลือกศึกษาเฉพาะแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ โดยหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมระหว่าง $NaNO_3$ กับ ยูเรีย เนื่องจากเชื้อมีความสามารถในการเจริญได้โดยใช้แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์เป็นสารส่งเสริมการเจริญ (ภาพ 38A) แสดงประโยชน์ในด้านการลดค่าต้นทุนในการใช้จ่ายของโรงงานอุตสาหกรรม และสามารถนำผลที่ได้จากการทดลองนี้ไปประยุกต์ใช้ได้อีกด้วย

การศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนชนิดอินทรีย์และอนินทรีย์ โดยดำเนินการศึกษาที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสความเร็ว 200 rpm แสดงผลการทดลองดังภาพ 39

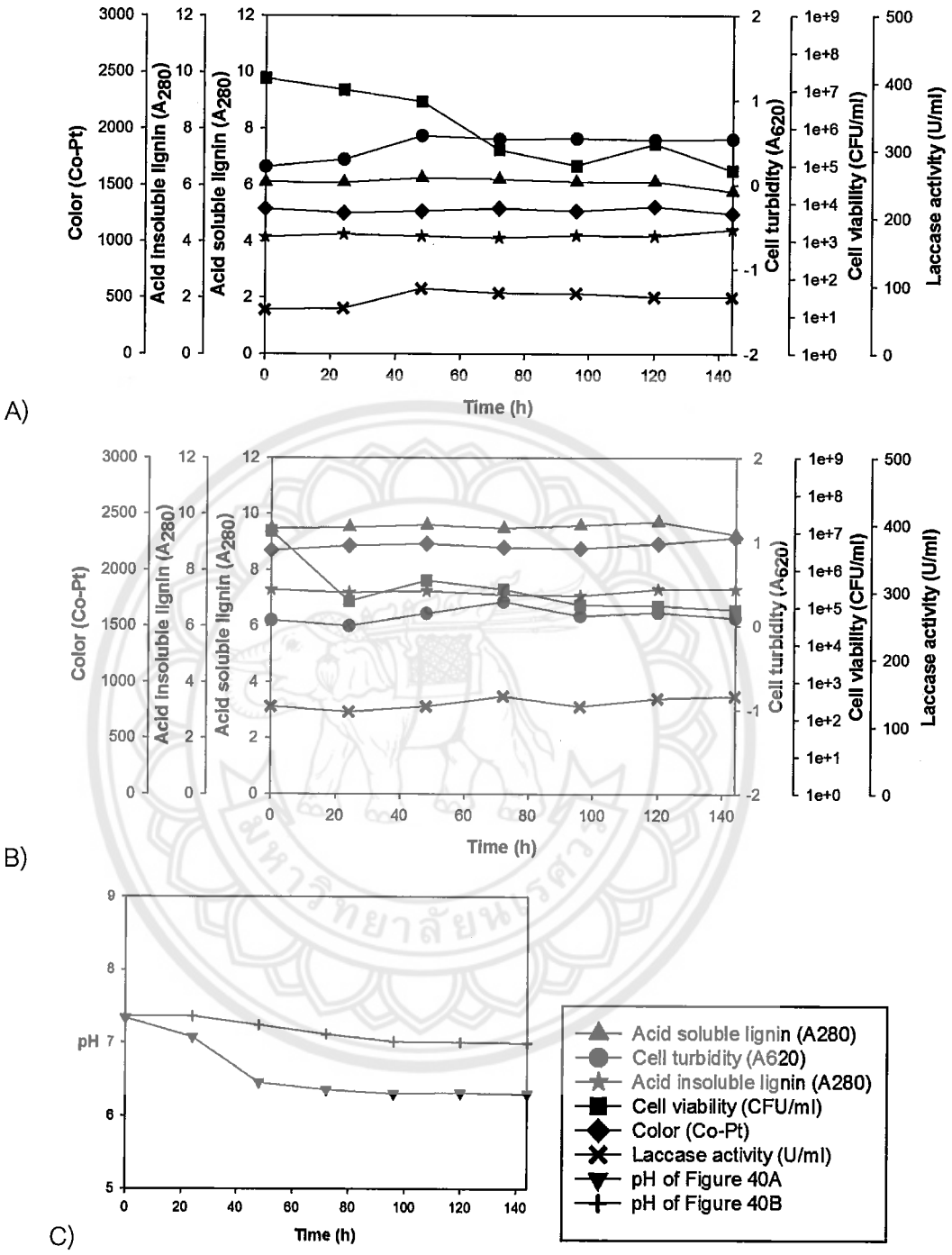


ภาพ 39 ปฏิกิริยาของ 2B2-1 LigB ที่เกิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ไม่เติมลิกนิน กลูโคส 5 กรัมต่อลิตร และแหล่งไนโตรเจนความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร A) $NaNO_3$ B) Peptone

จากภาพ 39 เชื้อรหัส 2B2-1LigB เจริญได้ทันทีในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM broth ที่มีแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์และอินทรีย์ พร้อมทั้งกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงแหล่งเดียวที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ ($NaNO_3$) มีการเจริญสูงสุดเท่ากับ $7.16x10^7$ CFU/ml ที่ 24 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง ในขณะที่แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ (เปปโทน) เชื้อเจริญสูงสุดใน 48 ชั่วโมง เท่ากับ $9.41x10^7$ CFU/ml แสดงว่าแบคทีเรียสามารถใช้ $NaNO_3$ เป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งมีศักยภาพใกล้เคียงกับเปปโทน จากนั้นปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตลดลงอย่างต่อเนื่อง และค่ากิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสในระบบมีค่าต่ำตลอดช่วงระยะเวลาของการเพาะเลี้ยง เนื่องจากไม่มีการเติมตัวเหนี่ยวนำ (ลิกนิน) ทำให้ไม่เกิดการสร้างเอนไซม์แลคเคสในปฏิกิริยา จากผลค่าสีและค่าลิกนินละลายในกรด (acid soluble lignin) มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น แม้ในระบบไม่มีการเติมลิกนินลงไป โดยค่าสีและลิกนินนั้นมาจากหัวเชื้อตั้งต้น (inoculum) ที่ได้ทำการถ่ายลงในอาหารเพาะเลี้ยงในชั่วโมงที่ 0

เมื่อเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อภาพ 39 กับภาพ 38 พบว่า เชื้อมีการเจริญที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสหรืออุณหภูมิต่ำได้ดีกว่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แสดงให้ทราบถึงอุณหภูมิมีผลต่อการเจริญของเซลล์แบคทีเรีย

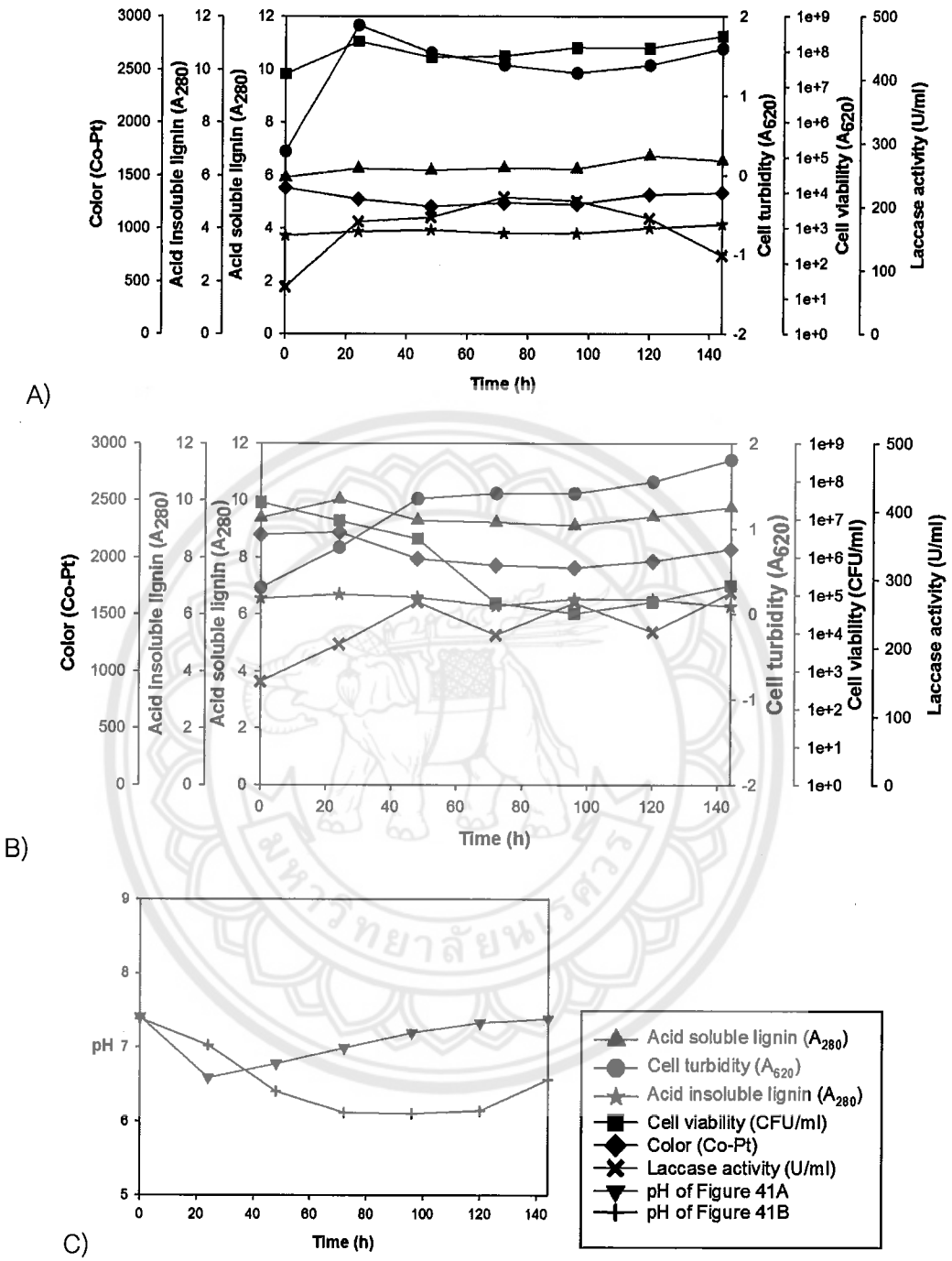
การศึกษาผลของลิกนินและผลของการไม่เติมแหล่งไนโตรเจนที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส แสดงดังภาพ 40



ภาพ 40 ปฏิกิริยาของ 2B2-1LigB ที่เกิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เติมลิกนิน A) 1 กรัมต่อลิตร B) 2 กรัมต่อลิตร กลูโคส 5 กรัมต่อลิตร และไม่เติมแหล่งไนโตรเจน

จากภาพ 40 พบการเติมลิกนินลงในอาหารเพาะเลี้ยงที่ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจนมีผลต่อเซลล์ที่มีชีวิต โดยมีการตายของเซลล์เกิดขึ้นหลังจาก 24 ชั่วโมง ในการเติมลิกนินความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร เชื้อตายหรือลดปริมาณเซลล์จากวันที่ 1 ถึงวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง จากนั้นเซลล์จะปรับตัวต่ออาหารเลี้ยงเชื้อและรักษาปริมาณเซลล์ให้คงที่ ส่วนความเข้มข้นของลิกนินที่สูงขึ้น 2 กรัมต่อลิตร (ภาพ 40B) ส่งผลต่อการตายของเชื้อมากขึ้นภายใน 24 ชั่วโมงหลังจากนั้นเชื้อจะพยายามรักษาความมีชีวิตของเซลล์ให้คงที่ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง ดังนั้นการเติมแหล่งไนโตรเจนจึงมีความจำเป็นเพื่อช่วยรักษาปริมาณเซลล์และส่งเสริมการเจริญในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารที่มีลิกนินเป็นองค์ประกอบ แสดงดังภาพ 41 ที่มีการเติมเปปโทนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีลิกนินความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร ไม่พบการตายของเซลล์เกิดขึ้นและเชื้อยังสามารถรักษาความมีชีวิตของเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อให้คงที่ นอกจากนี้ค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสตลอดช่วงการเจริญให้ค่ากิจกรรมเพิ่มขึ้นสอดคล้องกับการเจริญ ดังนั้นการเติมแหล่งไนโตรเจนช่วยส่งเสริมการเจริญของเซลล์และกิจกรรมเอนไซม์แลคเคส

ศึกษาอิทธิพลของลิกนินและเปปโทนที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อรหัส 2B2-1ligB ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส แสดงผลดังภาพ 41



ภาพ 41 ปฏิกิริยาของ 2B2-1LigB ที่เกิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เติมลิกนิน A) 1 กรัมต่อลิตร B) 2 กรัมต่อลิตร กลูโคส 5 กรัมต่อลิตร และเติม Peptone เป็นแหล่งไนโตรเจนความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร

จากภาพ 41 การเติมเปปโทนเป็นแหล่งไนโตรเจนช่วยส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้นลิกนิน 1 กรัมต่อลิตร ได้ทันที โดยเชื้อจะยังคงรักษาความมีชีวิต

ของเซลล์ให้คงที่ได้ ค่าสีมีแนวโน้มลดลงต่ำสุดที่ 96 ชั่วโมง เท่ากับ 1908 CU จากค่าสีเริ่มต้น 2200 CU จากนั้นค่าสีเพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่าในช่วงแรกของการเจริญของแบคทีเรียในอาหารเพาะเลี้ยงมีค่าสีลดลงโดยผู้วิจัยสันนิษฐานว่า ในช่วงการเพาะเลี้ยงที่มีค่าสีลดลง เนื่องจากเชื้อย่อยลิกนินที่มีอยู่ในอาหารเพาะเลี้ยงโดยการสร้างเอนไซม์แลคเคสออกมาย่อยลิกนิน (lignin degradation) ซึ่งหลังจาก 96 ชั่วโมง ค่าสีเพิ่มขึ้นเกิดจากการเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงเป็นโพลิเมอร์ลิกนิน (polymerization) ด้วยเอนไซม์แลคเคส ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่เกิดแบบสุ่มของอนุมูลฟีนอลอิสระ เพื่อรักษาความเสถียรของอนุมูลฟีนอลอิสระ จึงไปต่อกับโมเลกุลของลิกนินดังเดิมหรือลิกนินที่ยังไม่ผ่านการย่อย ทำให้ค่าสีเข้มขึ้นโดยค่าสีเป็นค่าที่แสดงถึงความเข้มข้นของลิกนินที่ละลายอยู่ในสารละลาย (Abhay Raj, M. M., Krishna Reddy, & Ram Chandra, 2007b) สอดคล้องกับค่าลิกนินที่ละลายได้ในสารละลายกรดมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในวันที่ 5 แสดงว่าลิกนินในสารละลายมีปริมาณเพิ่มขึ้น

ส่วนการเจริญของเชื้อที่มีการเติมลิกนิน 2 กรัมต่อลิตร พบเชื้อตายหลังจาก 24 ชั่วโมง และตายอย่างต่อเนื่อง จากนั้นสามารถรักษาปริมาณเซลล์ให้คงที่หลังจากวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง สอดคล้องกับค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสที่ให้ค่ากิจกรรมคงที่ตามลักษณะการเจริญแบบคงที่ Giroux, Vidal, Bouchard, & Lamy (1988) อธิบายผลของการเติมแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้เกิดการสะสมของลิกนินที่ถูกย่อยแทนที่จะใช้ลิกนินที่ถูกย่อยแล้วนั้นเพื่อการเจริญ

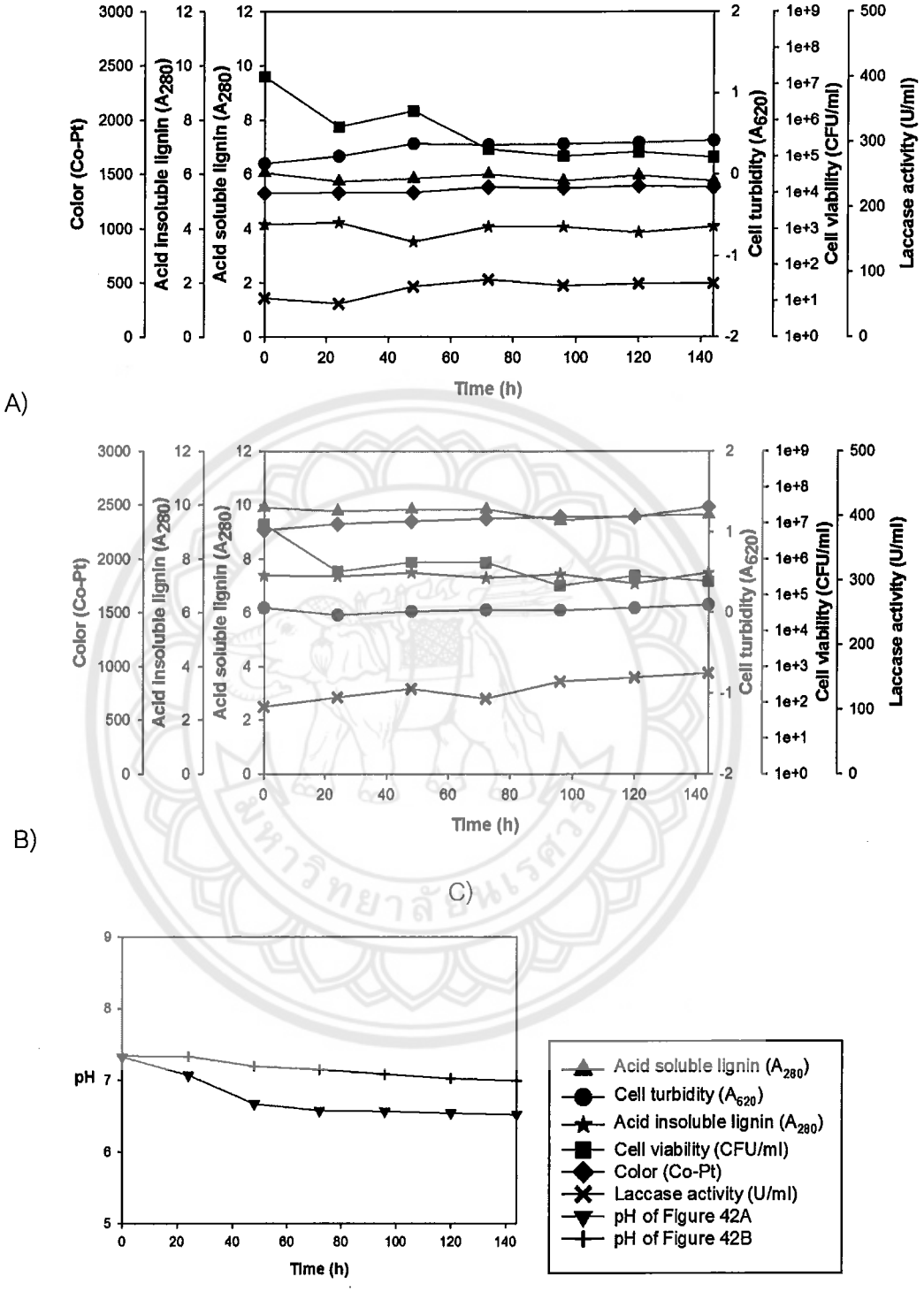
เมื่อสังเกตผลการเจริญที่แสดงด้วยค่าความขุ่น A_{620} กับปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต (CFU/ml) แสดงรายละเอียดของผลการทดลองที่แตกต่างกัน ทำให้ผู้วิจัยเล็งเห็นถึงความสำคัญของการแสดงผลด้วยปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตสามารถแสดงผลการทดลองที่ละเอียดกว่าการแสดงผลด้วยค่าความขุ่น (A_{620}) ในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีลิกนินเป็นองค์ประกอบ ส่วนค่าสีและค่าลิกนิน (acid soluble lignin) ลดลงในวันที่ 2 ของการบ่ม ซึ่งมีค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสสูงสุด จากนั้นค่าสีและค่าลิกนินมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น แสดงผลของปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงเป็นสารโพลิเมอร์ลิกนิน (polymerization) ซึ่งเกิดควบคู่กับปฏิกิริยาการย่อยลิกนิน

จากภาพ 41C แสดงผลอัตราเมทาบอลิซึมของจุลินทรีย์ผ่านค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีการเติมลิกนิน 2 กรัมต่อลิตร ช่วยให้แบคทีเรียมีค่าอัตราเมทาบอลิซึมสูงได้อย่างคงที่จนถึงวันที่ 5 หลังจากนั้นเซลล์ไม่สามารถควบคุมอัตราเมทาบอลิซึมได้ เนื่องจากความรุนแรงในการเกิดปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงเป็นสารโพลิเมอร์ลิกนินทำให้ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มสูงขึ้น ส่วนการเติมลิกนินความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร

เชื้อมีอัตราเมทาบอลิซึมสูงในช่วง 24 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง จากนั้นอัตราเมทาบอลิซึมของเซลล์ลดลง ทำให้ค่าพีเอชสูงขึ้นเรื่อย ๆ จากค่าพีเอชทำให้สามารถคาดการณ์ได้ว่าการเติมลิกนินลงในอาหารเพาะเลี้ยงช่วยเพิ่มแหล่งคาร์บอนให้แก่แบคทีเรีย ทำให้แบคทีเรียยังคงมีชีวิตอยู่ในระบบ แต่อย่างไรก็ตามด้วยคุณสมบัติความเป็นพิษของลิกนิน ทำให้การย่อยลิกนินของแบคทีเรียที่เกิดขึ้นนี้ส่งผลเสียต่อเซลล์จนเซลล์ไม่สามารถที่จะรักษาสมดุลของอัตราการเมทาบอลิซึมของเซลล์ได้

เมื่อเปรียบเทียบผลของการเติมแหล่งไนโตรเจน (เปปโทน) กับภาพ 40 พบว่าการเติมแหล่งไนโตรเจนให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสสูงกว่าการไม่เติมแหล่งไนโตรเจน โดยค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสจากภาพ 41B แม้เซลล์ที่มีชีวิตเกิดการตายแต่ค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสกลับเพิ่มขึ้นโดยสูงสุดที่ 48 ชั่วโมง จากนั้นจะมีแนวโน้มคงที่

การศึกษาผลของลิกนินและผลของการไม่เติมแหล่งไนโตรเจนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แสดงดังภาพ 42

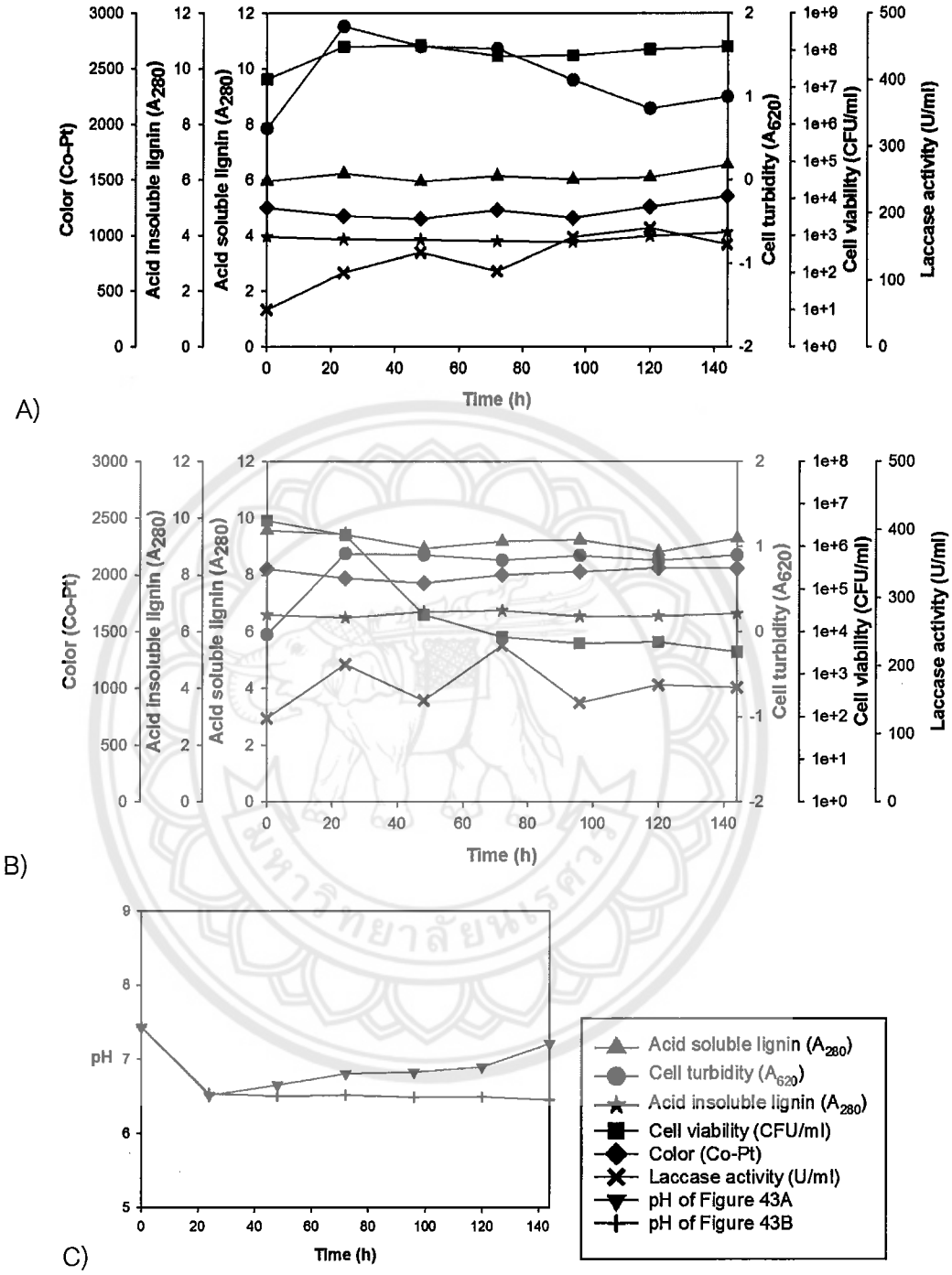


ภาพ 42 ปฏิกิริยาของ 2B2-1 LigB ที่เกิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เติมลิกนิน A) 1 กรัมต่อลิตร B) 2 กรัมต่อลิตร กลูโคส 5 กรัมต่อลิตร และไม่เติมแหล่งไนโตรเจน

จากภาพ 42 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยไม่เติมแหล่งไนโตรเจน พบเชื้อรหัส 2B2-1LigB ตายหลังจากการเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นลิกนิน 1 และ 2 กรัมต่อลิตร จากนั้นเชื้อจะพยายามรักษาปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตให้คงที่ตลอดช่วงการเพาะเลี้ยง การเติมลิกนินความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร เชื้อมีการเจริญในชั่วโมงที่ 48 ทำให้เกิดการย่อยลิกนินที่ไม่ละลายในสารละลายกรด (acid insoluble lignin) สอดคล้องกับค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสสูงขึ้น ส่วนการเพาะเลี้ยงที่มีการเติมลิกนินความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร เชื้อไม่สามารถเพิ่มปริมาณได้ แสดงให้ทราบถึงอิทธิพลความเข้มข้นของลิกนินที่เหมาะสมเป็นปัจจัยสำคัญต่อการย่อยลิกนิน

เมื่อเปรียบเทียบกับการเติมแหล่งไนโตรเจน (เปปโทน) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (ภาพ 43) พบว่าการเติมแหล่งไนโตรเจนช่วยให้เชื้อมีความสามารถในการเจริญได้ทันทีในชั่วโมงที่ 24 และเชื้อสามารถรักษาปริมาณเซลล์ให้คงที่ได้จนถึงวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยง ในขณะที่การเพาะเลี้ยงที่มีลิกนินความเข้มข้นสูง การเติมแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์กลับส่งผลเสียต่อเซลล์มากกว่าการไม่เติมแหล่งไนโตรเจน Giroux et al. (1988) อธิบายว่าเกิดจากการสะสมของลิกนินที่ถูกย่อยแล้ว (depolymerized lignin) ซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์ทำให้เกิดการตายของเซลล์เพิ่มขึ้น

ศึกษาอิทธิพลของลิกนินและเปปโทนที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อรหัส 2B2-1ligB ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แสดงผลดังภาพ 43



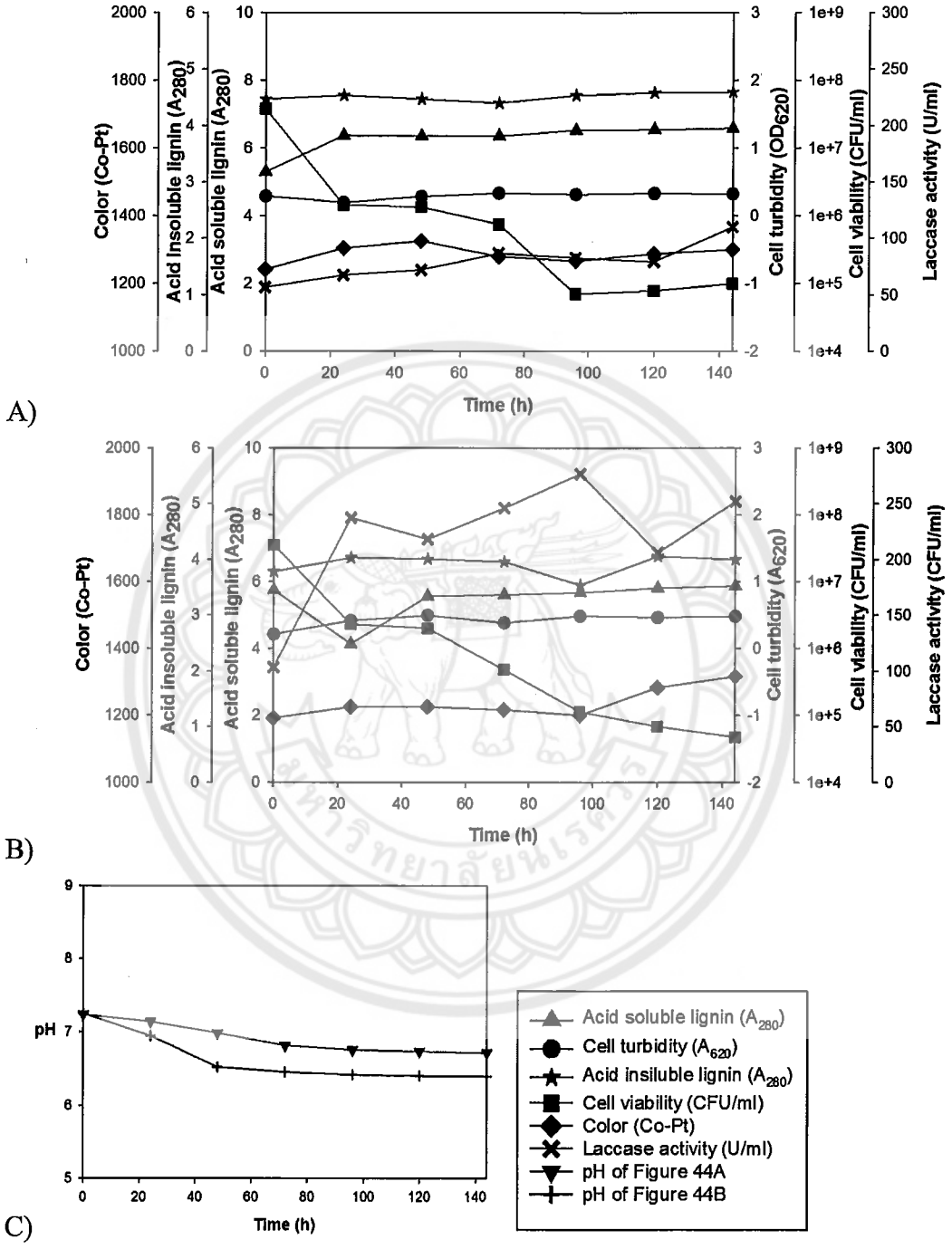
ภาพ 43 ปฏิกิริยาของ 2B2-1LigB ที่เกิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เติมลิกนิน A) 1 กรัมต่อลิตร B) 2 กรัมต่อลิตร กลูโคส 5 กรัมต่อลิตร และเติมPeptone เป็นแหล่งไนโตรเจนความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร

จากภาพ 43 การเติมเปปโทนช่วยส่งเสริมการเจริญของเชื้อรหัส 2B2-1ligB ในการเพาะเลี้ยงที่มีการเติมลิกนินความเข้มข้นต่ำ (1 กรัมต่อลิตร) โดยเซลล์เจริญได้อย่างคงที่สอดคล้องกับค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสที่สูงขึ้นตามระยะเวลาการเพาะเลี้ยง ค่าสีมีแนวโน้มลดลงในช่วงที่ลิกนินถูกย่อย แต่กลับสูงขึ้นจนถึงค่าสีเริ่มต้นในวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยง เนื่องจากปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงเป็นสารโพลิเมอร์ลิกนิน (polymerization) โดยเอนไซม์แลคเคสที่แบคทีเรียสร้างขึ้น ในขณะที่ค่าลิกนินที่ละลายในสารละลายกรด (acid soluble lignin) และค่าลิกนินที่ไม่ละลายในสารละลายกรด (acid insoluble lignin) ไม่มีแนวโน้มลดลง

ส่วนการเติมลิกนินที่ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร ให้ผลการเจริญตรงกันข้ามกับความเข้มข้นลิกนินต่ำ (1 กรัมต่อลิตร) เชื้อตายอย่างต่อเนื่องจนถึงวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง เชื้อจึงสามารถรักษาปริมาณเซลล์ให้คงที่ได้ เนื่องจากผลของลิกนินความเข้มข้นสูงเป็นพิษต่อเซลล์ ค่าลิกนินที่ละลายได้ในสารละลายกรดมีค่าลดลงต่ำกว่าค่าเริ่มต้นในชั่วโมงที่ 48 และค่าสีลดลงในช่วง 48 ชั่วโมงเช่นกัน แสดงเชื้อมีการใช้สารประกอบอะโรมาติกขนาดเล็ก เพื่อช่วยให้เชื้อมีการเจริญคงที่แต่ไม่มีผลต่อโพลิเมอร์ลิกนินขนาดใหญ่ หลังจาก 48 ชั่วโมง ค่าทั้งสองเพิ่มขึ้นด้วยปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงเป็นสารโพลิเมอร์ (polymerization) ที่เร่งโดยเอนไซม์แลคเคส

จากค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พบว่าอุณหภูมิมีผลต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคส โดยการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิที่ 35 องศาเซลเซียส เชื้อให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสสูงกว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสตามผลการเจริญ (ภาพ 41 และ 43)

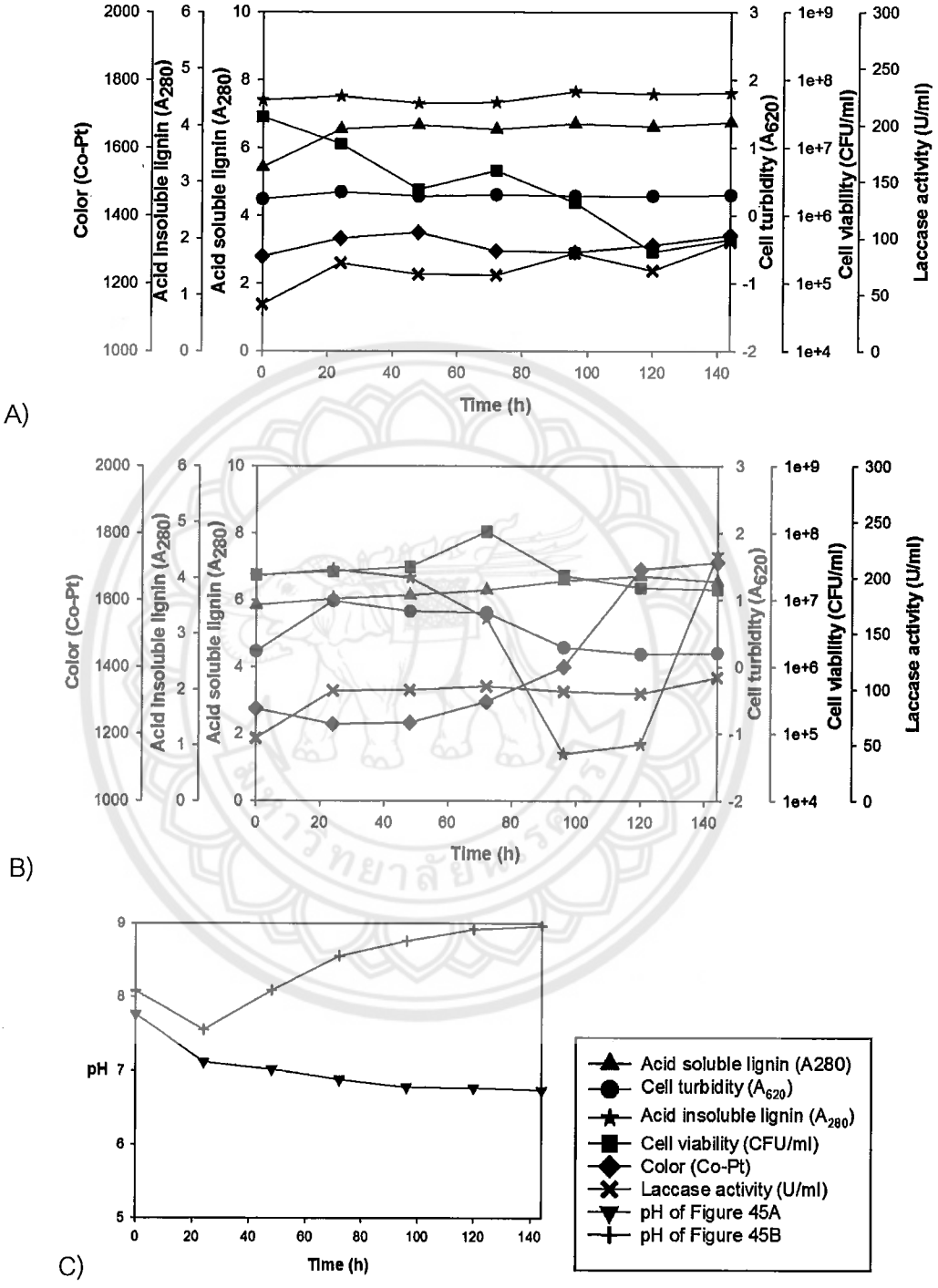
การศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อการย่อยลิกนิน โดยศึกษาผลของ $NaNO_3$ ที่ความเข้มข้น 0.25% และ 0.5% (w/v) ในการเพาะเลี้ยงเชื้อรหัส 2B2-1ligB ที่ความเข้มข้นลิกนิน 1 กรัมต่อลิตร แสดงผลดังภาพ 44



ภาพ 44 ปฏิกิริยาของ 2B2-1 ligB ที่เกิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ทำการเติมลิกนิน 1 กรัมต่อลิตร กลูโคส 5 กรัมต่อลิตร และมี $NaNO_3$ เป็นแหล่งไนโตรเจน A) 2.5 กรัมต่อลิตร B) 5 กรัมต่อลิตร

ภาพ 44 การเติม $NaNO_3$ มีผลต่อความมีชีวิตของเซลล์แสดงจากค่าเซลล์ที่มีชีวิต (cell viability, CFU/ml) การเติม $NaNO_3$ ความเข้มข้น 2.5 กรัมต่อลิตรมีผลต่อความมีชีวิตของเซลล์ โดยมีการลดลงอย่างมากหลังจาก 24 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง จากนั้นจะรักษาปริมาณเซลล์คงที่เป็นระยะเวลา 2 วันจึงลดลงอีกครั้ง ในขณะที่ค่าสี ค่าลิกนินและค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสเพิ่มขึ้น ส่วนการเติม $NaNO_3$ที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตรส่งผลให้ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตลดลงอย่างต่อเนื่อง โดยสังเกตได้ว่าในช่วง 48 ชั่วโมง เชื้อพยายามรักษาปริมาณเซลล์ให้คงที่ โดยการใช้ลิกนินแสดงจากค่าลิกนินที่ละลายในสารละลายกรด (acid soluble lignin) ที่ลดลงในช่วง 24 ชั่วโมงแรก ส่วนค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสสูงกว่าการเติม $NaNO_3$ ความเข้มข้น 2.5 กรัมต่อลิตร จากผลการทดลองเมื่อเซลล์มีการตายกลับส่งเสริมกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสให้สูงขึ้น (ภาพ 44B) โดยวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสสูงสุดเท่ากับ 276 U/ml ส่งผลต่อโครงสร้างลิกนินโดยเพิ่มค่าการละลายในกรดของลิกนิน แสดงให้เห็นว่าลิกนินเกิดการย่อยสูงสุด (acid insoluble lignin) ในวันที่ 4 เท่ากับ 6.42% สอดคล้องกับค่าสีที่ลดลง จากนั้นค่าสีจะเพิ่มสูงขึ้นในวันที่ 5 และ 6 ของการเพาะเลี้ยงแสดงให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับโครงสร้างลิกนินโดยการเกิดปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงเป็นสายโพลิเมอร์ของลิกนินหรือ ปฏิกิริยา polymerization เร่งโดยเอนไซม์แลคเคส อย่างไรก็ตามการเพิ่มปริมาณ $NaNO_3$ ในอาหารเพาะเลี้ยงไม่ส่งเสริมการเจริญของเชื้อทำให้ปริมาณเซลล์ลดลงอย่างต่อเนื่อง โดยความเข้มข้นของ $NaNO_3$ที่สูงขึ้นมีผลต่อการลดลงของเซลล์ที่มีชีวิตสูงกว่าความเข้มข้นของ $NaNO_3$ ต่ำ

การศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนยูเรียที่ความเข้มข้น 0.25% และ 0.5% (w/v) ในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีการเติมลิกนิน 1 กรัมต่อลิตร แสดงดังภาพ 45



ภาพ 45 ปฏิกิริยาของ 2B2-1 LigB ที่เกิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ทำการเติมลิกนิน 1 กรัมต่อลิตร กลูโคส 5 กรัมต่อลิตร และมี Urea เป็นแหล่งไนโตรเจน A) 2.5 กรัมต่อลิตร B) 5 กรัมต่อลิตร

จากภาพ 45 การเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมยูเรีย 2.5 กรัมต่อลิตร (ภาพ 45A) ไม่ส่งเสริมการเจริญของเซลล์ ในขณะเดียวกันค่าลิกนิน ค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคส และค่าสี มีค่าสูงขึ้นที่ 24 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง แสดงว่าลิกนินถูกย่อยและเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นสารโพลิเมอร์ลิกนิน (polymerization) โดยกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสที่เชื้อผลิตขึ้น (Guan, Guo, Lin, Li, & Liu, 2015) ในขณะเดียวกันการเพิ่มความเข้มข้นของยูเรีย 5 กรัมต่อลิตร (ภาพ 46B) มีผลส่งเสริมการเจริญของเซลล์ที่มีชีวิต โดยเซลล์ใช้ระยะในการปรับตัว (lag phase) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเชื้อสามารถเพิ่มปริมาณเซลล์สูงสุดเท่ากับ $1.05x10^8$ CFU/ml ซึ่งมีผลให้เกิดการย่อยลิกนิน (acid insoluble lignin) ที่ 96 ชั่วโมง โดยเพิ่มค่าการละลายในสารละลายกรดของลิกนินให้สูงขึ้น หรือเรียกว่า ลิกนินถูกย่อย (degradation) ซึ่งลิกนินสูญเสียคุณสมบัติการไม่ละลายในสารละลายกรด (Ulmer et al., 1983) การย่อยลิกนินจะเกิดได้ดีเท่ากับ 79.23% จากนั้นในชั่วโมงที่ 144 ของการเพาะเลี้ยงโมเลกุลลิกนินกลับมามีคุณสมบัติที่ไม่ละลายในสารละลายกรดเช่นเดิม แสดงให้เห็นถึงการเกิดปฏิกิริยา polymerization ที่เร่งโดยเอนไซม์แลคเคสที่มีอยู่ในอาหารเพาะเลี้ยง

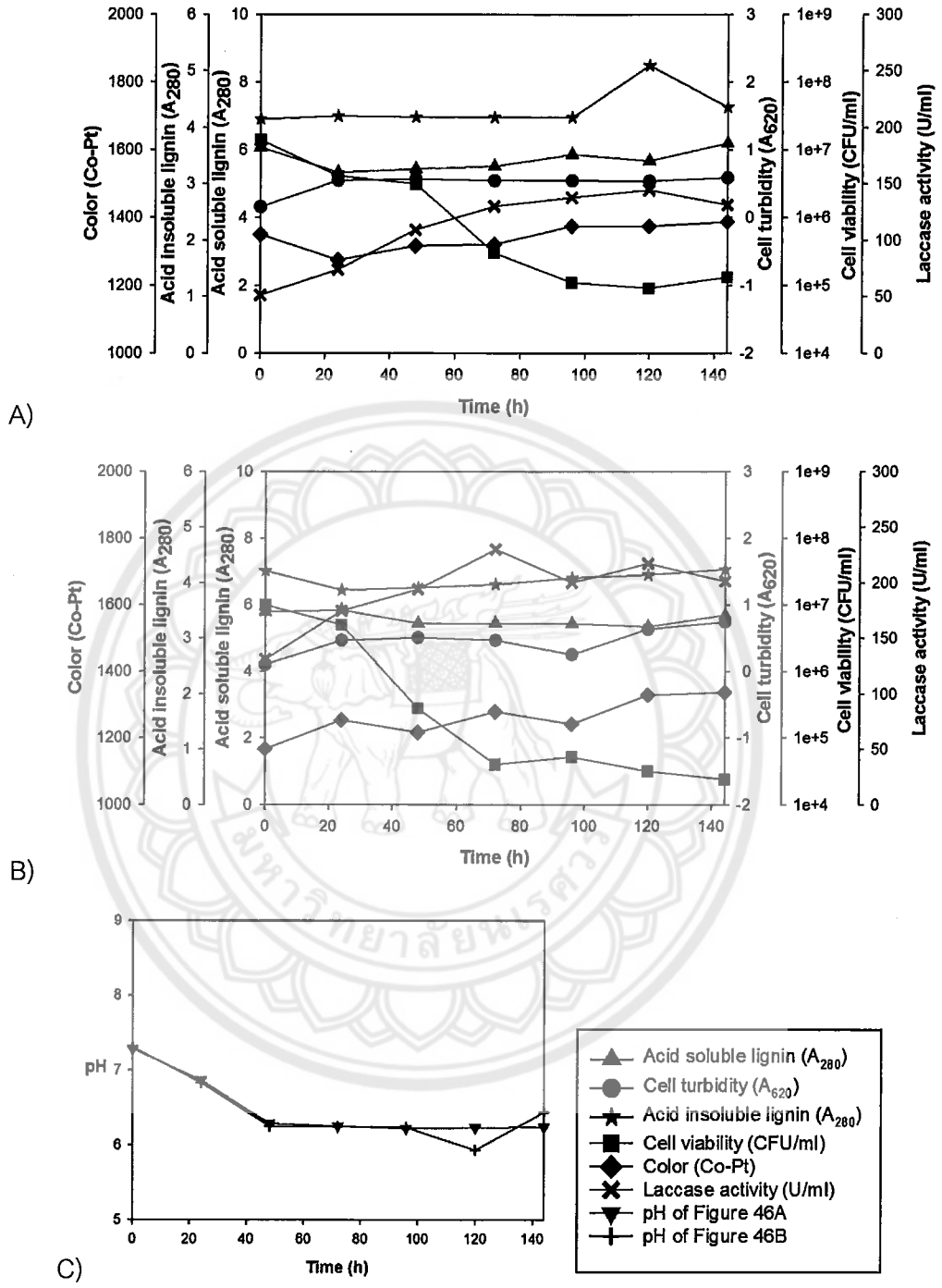
โดยทั่วไปเอนไซม์แลคเคสขึ้นชื่อว่าเป็นเอนไซม์ที่มีศักยภาพในการย่อยลิกนิน แต่การศึกษาล่าสุดบ่งชี้ว่าเอนไซม์แลคเคสมีแนวโน้มในการเปลี่ยนแปลงเป็นสารโอลิโกเมอร์ลิกนินหรือเกิด polymerization ผ่านทางปฏิกิริยา oxidative coupling มากกว่าเกิดปฏิกิริยา oxidative cleavages โดยในช่วงแรกเอนไซม์แลคเคสจะทำการย่อยลิกนิน เพื่อให้ได้สารประกอบฟีนอลโมเลกุลเดี่ยว โมเลกุลคู่ จากนั้นสารประกอบฟีนอลเหล่านี้จะเกิดปฏิกิริยา re-polymerization อย่างรวดเร็วภายใต้สภาวะเดียวกัน (Ramalingam et al., 2017)

ส่วนค่ากิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสมีค่าไม่สูงมากเมื่อเปรียบเทียบการเติม $NaNO_3$ เป็นแหล่งไนโตรเจนซึ่งค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสสูงไม่ช่วยเร่งปฏิกิริยาการย่อยลิกนินได้ดีเสมอไป จากการศึกษาของ Ramalingam et al. (2017) ศึกษาปฏิกิริยา polymerization ของซับเตรท 1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2(2-methoxyphenoxy)-propane-1,3-diol ที่เร่งโดยเอนไซม์แลคเคส โดยลดความเข้มข้นของเอนไซม์แลคเคสจาก 20 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เป็น 2 ยูนิตต่อมิลลิลิตร พบว่าไม่ส่งผลต่อน้ำหนักมวลโมเลกุลของโอลิโกเมอร์ที่ได้ และ Kolb, Sieber, Amann, Faulstich, and Schieder (2012) ศึกษาการย่อยผลิตภัณฑ์ลิกนินโมโนเมอร์โดยเอนไซม์แลคเคสจาก *Trametes versicolor* ในน้ำย่อยฟางข้าวสาลี (liquid hot water pretreated wheat straw supernatants) พบการลดลงของฟีนอลสูงสุดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์แลคเคส 0.2 และ 0.5 U/ml พบว่า การใช้เอนไซม์แลคเคสความเข้มข้นสูงกว่านี้ไม่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการลดลงของผลิตภัณฑ์ลิกนินโมโนเมอร์ และการลดลงของสารประกอบฟีนอลพบภายใน 24 ชั่วโมง ทำให้จัดแบ่งผลิตภัณฑ์

โมโนเมอร์ฟีนอลที่เร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์แลคเคส (Laccase reaction groups, LRG) เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ย่อยได้ทันที (LRG-A) กลุ่มที่ย่อยได้หลังจาก 1 วัน (LRG-B) และกลุ่มที่ไม่ย่อยด้วยเอนไซม์ (LRG-C) เช่น ปริมาณของ acetophenone และ 4-hydroxybenzaldehyde (HBA) ไม่ลดลงโดยการเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์แลคเคส

ส่วนค่าสีในช่วง 2 วันแรกของการเพาะเลี้ยงค่าสีลดลง (ภาพ 45B) เนื่องจากเกิดการย่อยลิกนินในอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นค่าสีเพิ่มขึ้นตามการเจริญของเซลล์ ซึ่งในระหว่างเกิดการย่อยลิกนินในช่วงชั่วโมงที่ 96 และ 120 ค่าสีไม่ลดลง ในทางตรงกันข้ามค่าสีเพิ่มขึ้นและคงที่ในวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยงแสดงให้เห็นถึงปฏิกิริยาการย่อยลิกนิน (degradation) เกิดขึ้นควบคู่กับปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงเป็นสารโพลิเมอร์ (polymerization) โดยจะต้องเกิดการย่อยโมเลกุลลิกนินให้ได้ฟีนอลเดี่ยวๆ ที่ไม่เสถียรหรืออยู่ในสภาวะประจุ ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นในการเกิดปฏิกิริยาการต่อสายโพลิเมอร์เพื่อทำให้โมเลกุลเสถียรได้ผลผลิตเป็นน้ำและสารโพลิเมอร์ลิกนินที่มีขนาดใหญ่ขึ้น (Areskogh et al., 2010) ดังนั้นการย่อยและการเปลี่ยนแปลงเป็นโพลิเมอร์ลิกนินสามารถแสดงได้จากค่า Acid insoluble lignin (A_{280}) และค่าสีอย่างคร่าว ๆ เพื่อบอกปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น อย่างไรก็ตาม Hatfield and Fukushima (2005) บอกถึงข้อเสียของการวัดลิกนินที่ละลายน้ำได้ที่ค่าดูดกลืนแสง A_{280} ว่าผลผลิตที่ได้จากการย่อยคาร์โบไฮเดรตที่ยังคงอยู่ในตัวอย่างลิกนิน ซึ่งมีความสามารถในการดูดกลืนแสงยูวี ทำให้ผลการวัดที่ได้ไม่ถูกต้อง จากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงการรบกวนจากปฏิกิริยา polymerization ในขณะเกิดการย่อยโพลิเมอร์ลิกนินที่ค่าดูดกลืนแสงยูวีที่ 280 นาโนเมตร ทำให้การย่อยลิกนินไม่สามารถวัดได้จากวัดค่า Acid soluble lignin เพียงอย่างเดียวทราบได้จากผลการทดลองที่พบว่า A_{280}ไม่ลดลง แต่กลับเพิ่มขึ้นสอดคล้องกับค่าสี ในขณะที่คุณสมบัติการละลายของลิกนิน (acid insoluble lignin) เปลี่ยนแปลงไปแสดงให้เห็นถึงเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโพลิเมอร์ลิกนินซึ่งมีขนาดใหญ่ตามการศึกษาของ Ulmer et al. (1983) ที่ได้รายงานร้อยละการย่อย acid insoluble kraft lignin, alkali straw และ dioxane straw lignins เท่ากับ 90-100% จากค่า acid insoluble lignin ความเข้มข้นลิกนิน 1 กรัมต่อลิตร ภายในระยะเวลา 2-3 วัน โดยเชื้อรา *Phanerochaete chrysosporium*

การศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจน $NaNO_3$ ที่ความเข้มข้น 0.25% และ 0.5% (w/v) ในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีการเติมลิกนิน 1 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสแสดงดังภาพ 46

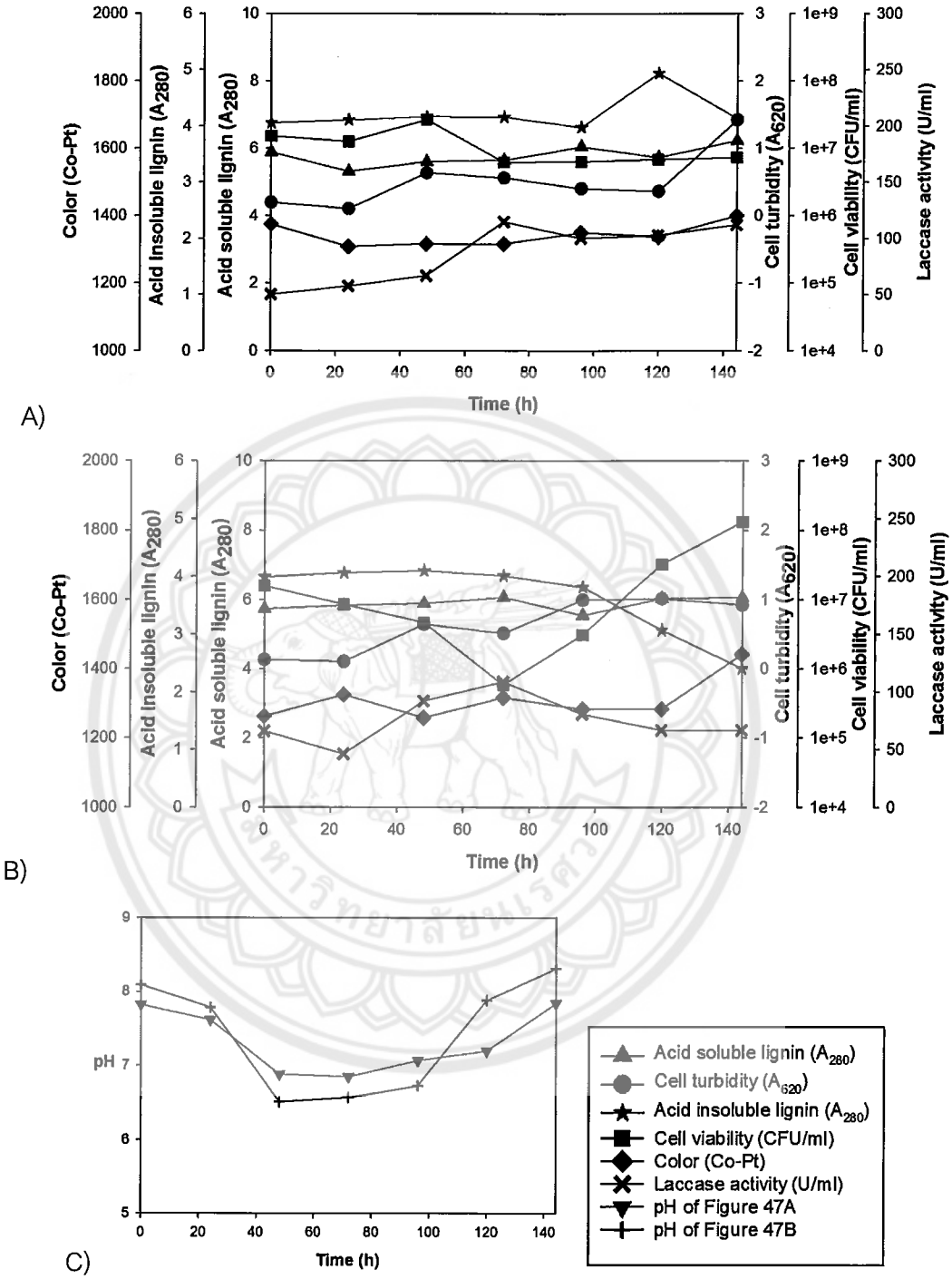


ภาพ 46 ปฏิกิริยาของ 2B2-1LigB ที่เกิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ทำการเติมลิกนิน 1 กรัมต่อลิตร กลูโคส 5 กรัมต่อลิตร และมี $NaNO_3$ เป็นแหล่งไนโตรเจน A) 2.5 กรัมต่อลิตร B) 5 กรัมต่อลิตร

จากภาพ 46 การเติม $NaNO_3$ ความเข้มข้น 2.5 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ไม่ส่งเสริมการเจริญของเซลล์ที่มีชีวิต โดยให้ค่าเซลล์ที่มีชีวิตลดลง ซึ่งค่าสีและค่าลิกนิน (acid soluble lignin) มีค่าลดลงหลังจาก 24 ชั่วโมง จากนั้นค่าสีและลิกนินมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะค่าสีในวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยงให้ค่าสีสูงกว่าค่าสีเริ่มต้นในขณะที่ค่าลิกนินที่ไม่ละลายในสารละลายกรด (acid insoluble lignin) มีค่าสูงขึ้นในช่วง 120 ชั่วโมง สอดคล้องกับค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคส จากปฏิกิริยาดังกล่าวสรุปได้ว่า การเติม $NaNO_3$ ไม่ส่งเสริมการเจริญของเซลล์ที่มีชีวิต แต่ส่งเสริมกิจกรรมการเปลี่ยนแปลงเป็นสารโพลิเมอร์ (polymerization) โดยในช่วงท้ายของการเพาะเลี้ยงแสดงค่าลิกนินที่ไม่ละลายในสารละลายกรดเพิ่มขึ้น

การเติม $NaNO_3$ ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร เกิดการตายของเซลล์อย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 3 วัน จากนั้นเชื้อสามารถรักษาระดับเซลล์ให้คงที่ได้จนถึงวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยง ซึ่งในวันที่ 3 ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสสูงสุด ค่าสีและค่าลิกนิน (acid soluble lignin และ acid insoluble lignin) มีแนวโน้มสูงขึ้น ดังนั้นการเติม $NaNO_3$ เป็นแหล่งไนโตรเจนไม่ช่วยส่งเสริมความมีชีวิตของเซลล์ โดยเซลล์มีปริมาณลดลงอย่างต่อเนื่องโดยเฉพาะที่ค่าความเข้มข้น $NaNO_3$ สูง (ภาพ 46B) และไม่ส่งเสริมการย่อยลิกนินแต่ส่งเสริมปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงเป็นโพลิเมอร์ลิกนิน (polymerization) เร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์แลคเคส ทั้งนี้ลิกนินขนาดเล็กที่เข้าทำปฏิกิริยา polymerization อาจเป็นลิกนินที่ได้จากการย่อยลิกนินด้วยความร้อนในขั้นตอนการฆ่าเชื้อในอาหารเพาะเลี้ยงด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)

การศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนยูเรียที่ความเข้มข้น 0.25% และ 0.5% (w/v) ในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีการเติมลิกนิน 1 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 rpm แสดงผลดังภาพ 47



ภาพ 47 ปฏิกิริยาของ 2B2-1LigB ที่เกิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ทำการเติมลิกนิน 1 กรัมต่อลิตร กลูโคส 5 กรัมต่อลิตร และมี Urea เป็นแหล่งไนโตรเจน A) 2.5 กรัมต่อลิตร B) 5 กรัมต่อลิตร

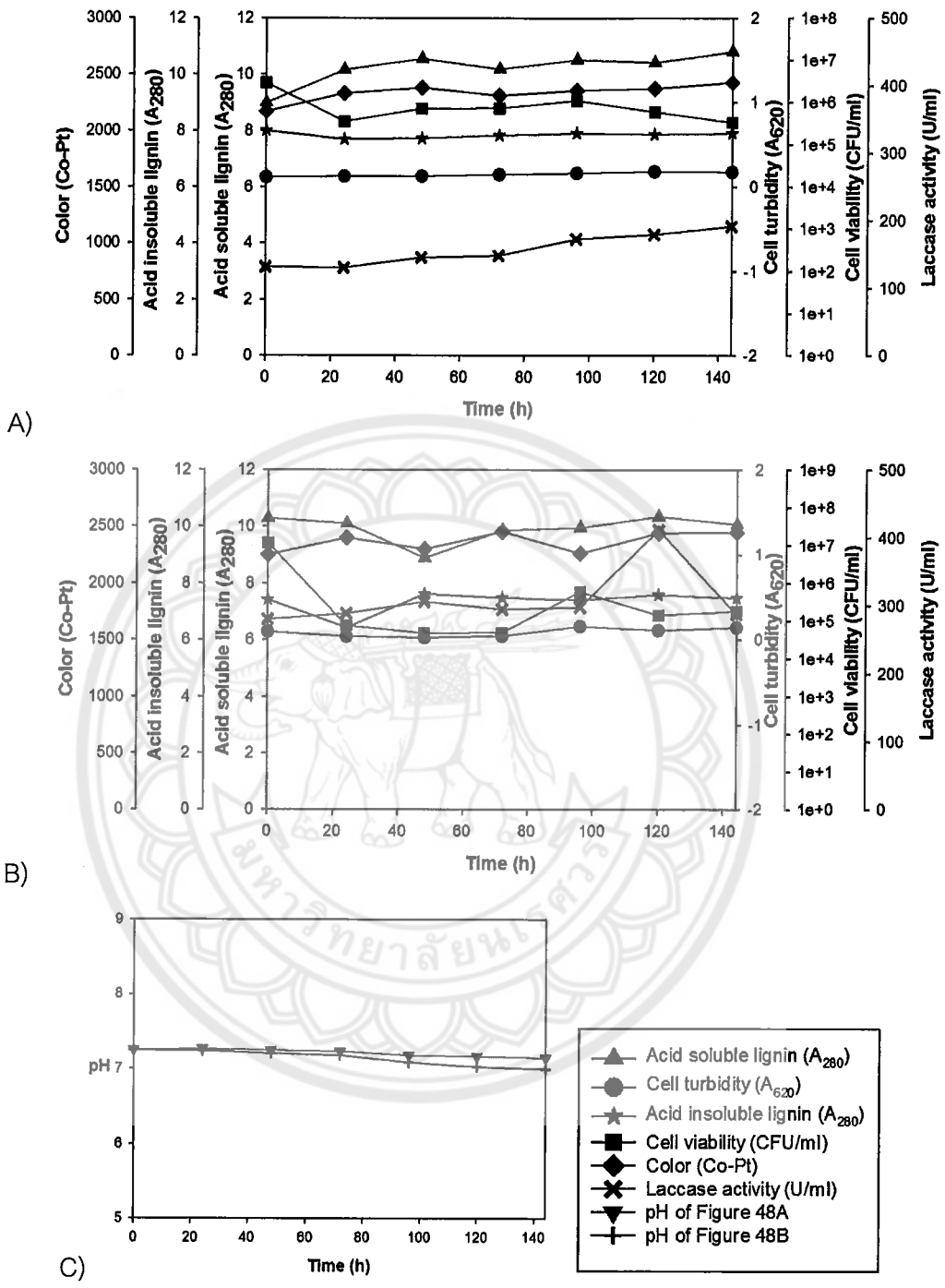
จากภาพ 47 การเติมยูเรียที่ความเข้มข้น 2.5 กรัมต่อลิตร (ภาพ 47A) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เชื้อใช้ระยะเวลาในการปรับตัวเป็นระยะเวลา 1 วัน โดยเชื้อจะสามารถเพิ่มปริมาณเซลล์ในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยงเท่ากับ $2.6x10^7$ CFU/ml จากนั้นปริมาณเซลล์จะลดลงในชั่วโมงที่ 72 และเข้าสู่สภาวะคงที่ ค่าสี (Co-Pt) และค่าลิกนิน (acid soluble lignin) ในช่วง 24 ชั่วโมงมีค่าลดลง แสดงเกิดการย่อยลิกนิน จากนั้นจะมีแนวโน้มสูงขึ้นสอดคล้องกับค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสที่สูงขึ้นโดยในชั่วโมงที่ 120 เกิดปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงเป็นสารโพลิเมอร์ของลิกนิน (polymerisation) สังเกตจากค่าของลิกนิน (acid insoluble lignin) ที่สูงขึ้น ซึ่งเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์แลคเคส

การเติมยูเรียความเข้มข้นสูง 5 กรัมต่อลิตร (ภาพ 47B) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส มีผลต่อความมีชีวิตของเซลล์ โดยปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตมีค่าต่ำสุดในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงเท่ากับ $5.83x10^5$ CFU/ml จากนั้นเชื้อสามารถปรับตัวและเพิ่มค่าการเจริญ สังเกตจากค่าความมีชีวิตของเซลล์ที่เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ และค่าความขุ่น (A_{620}) ที่สูงขึ้น นอกจากนี้ยังช่วยเพิ่มค่าการละลายในสารละลายกรดของลิกนินให้สูงขึ้นหรือลิกนินถูกย่อยในช่วงวันที่ 5 และ 6 ให้ค่าการย่อยลิกนินในชั่วโมงที่ 144 เท่ากับ 39.79% ในขณะเดียวกันค่าสีเพิ่มขึ้น (คล้ายผลการทดลองภาพ 46B) ยืนยันว่าลิกนินถูกย่อยเมื่อเซลล์สามารถเพิ่มจำนวนในอาหารเพาะเลี้ยงโดยเปลี่ยนแปลงโพลิเมอร์ลิกนิน ขนาดใหญ่ให้มีค่าการละลายในสารละลายกรดหรือค่า acid insoluble lignin ลดต่ำลงขณะที่ค่าสีเพิ่มขึ้น

เมื่อเปรียบเทียบอิทธิพลของอุณหภูมิพบว่าอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการย่อยลิกนินมากกว่าอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส โดยเกิดการย่อยลิกนินสูงสุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง (79.23%) ส่วนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ให้การย่อยลิกนินสูงสุดในวันที่ 6 (39.79%) (ภาพ 45B กับ 47B)

จากค่าพีเอชพบว่า ในช่วงปรับตัวของเซลล์ต่อสภาวะแวดล้อม (ชั่วโมงที่ 48-96) ค่าพีเอชจะลดลงอยู่ในช่วงเป็นกรด แสดงว่าเซลล์เกิดเมตาบอลิซึมในอาหารเพาะเลี้ยง ซึ่งเมื่อเกิดการย่อยลิกนินค่าพีเอชจะสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องเป็นผลมาจากปฏิกิริยา polymerization ที่เร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์แลคเคส

การศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจน $NaNO_3$ ที่ความเข้มข้น 0.25% และ 0.5% (w/v) ในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีการเติมลิกนิน 2 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส แสดงผลดังภาพ 48

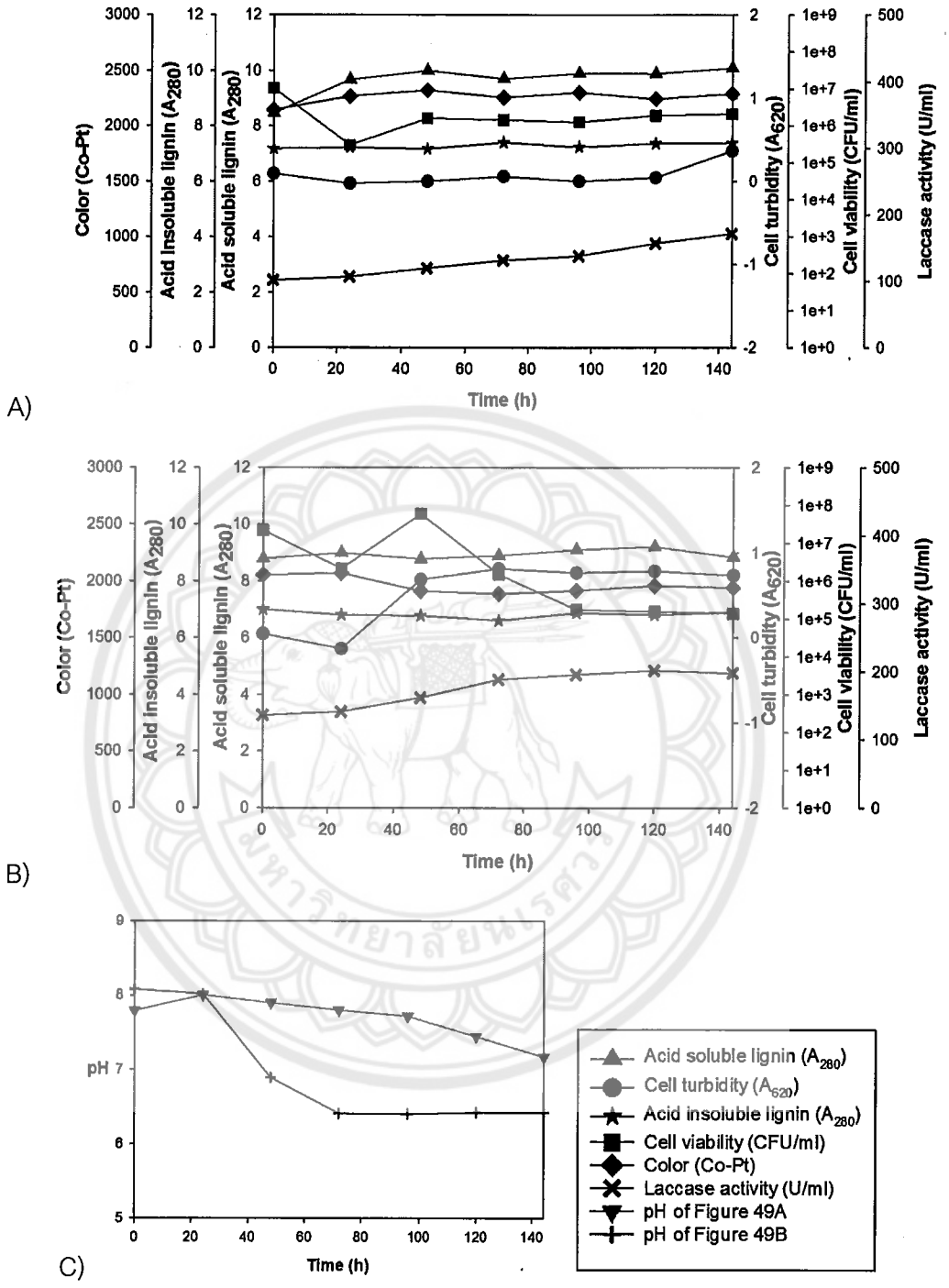


ภาพ 48 ปฏิกิริยาของ 2B2-1 LigB ที่เกิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ทำการเติมลิกนิน 2 กรัมต่อลิตร กลูโคส 5 กรัมต่อลิตร และมี $NaNO_3$ เป็นแหล่งไนโตรเจน A) 2.5 กรัมต่อลิตร B) 5 กรัมต่อลิตร

จากภาพ 48 การเติม $NaNO_3$ ที่ความเข้มข้นลิกนิน 2 กรัมต่อลิตร มีผลต่อความมีชีวิตของเซลล์โดยจะลดปริมาณเซลล์ลงหลังจาก 24 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง จากนั้นเชื้อจะพยายามรักษาปริมาณเซลล์ให้คงที่ พร้อมกับการเพิ่มขึ้นของค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคส การเติม $NaNO_3$ ความเข้มข้น 2.5 กรัมต่อลิตร(ภาพ48A) ช่วยเพิ่มค่าลิกนินและค่าสีตลอดระยะการเพาะเลี้ยง แต่ไม่เกิดการย่อยลิกนินโมเลกุลใหญ่ สังเกตจากค่าลิกนินที่ไม่ละลายในสารละลายกรด (acid insoluble lignin)

ส่วนการเติม $NaNO_3$ ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร (ภาพ 48B) ให้ค่าเซลล์ที่มีชีวิตลดลงที่ 24 ชั่วโมงเช่นเดียวกัน จากนั้นปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตจะคงที่ แต่ในวันที่ 4 เซลล์สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ได้เท่ากับ 5.93×10^5 CFU/ml ส่งผลให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสสูงขึ้นในวันที่ 5 สอดคล้องกับค่าลิกนิน (acid soluble lignin) สูงสุดเช่นกัน ดังนั้นการเพิ่มความเข้มข้นของ $NaNO_3$ ไม่ส่งเสริมการเจริญของเซลล์ที่มีชีวิตทำให้เอนไซม์แลคเคสถูกผลิตออกมาต่ำเช่นกัน จากผลการทดลองนี้แตกต่างจากงานของ Chandra et al. (2011) ที่ศึกษาผลของ $NaNO_3$ ว่าสามารถเร่งการย่อยลิกนินได้ดีกว่าแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนอื่น เช่น ammonium nitrate และแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน เช่น Beef extract เนื่องจากจุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษาแตกต่างกัน

การศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนยูเรียที่ความเข้มข้น 0.25% และ 0.5% (w/v) ในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีการเติมลิกนิน 2 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส แสดงดังภาพ 49



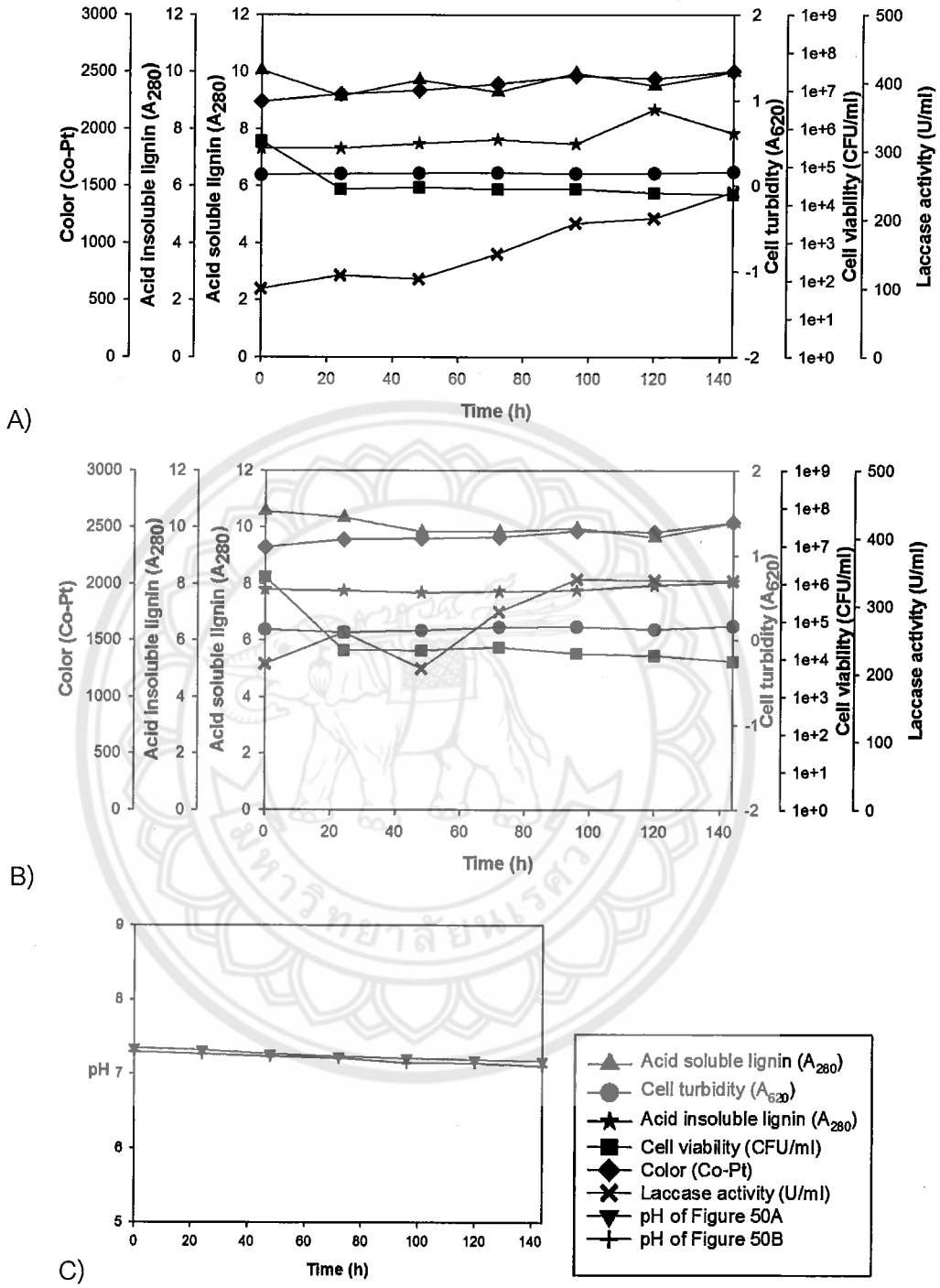
ภาพ 49 ปฏิกิริยาของ 2B2-1 ligB ที่เกิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ทำการเติมลิกนิน 2 กรัมต่อลิตร กลูโคส 5 กรัมต่อลิตร และมี Urea เป็นแหล่งไนโตรเจน A) 2.5 กรัมต่อลิตร B) 5 กรัมต่อลิตร

จากภาพ 49 การเติมยูเรียความเข้มข้น 2.5 กรัมต่อลิตร (ภาพ 49A) ในความเข้มข้นลิกนิน 2 กรัมต่อลิตร พบปริมาณเซลล์ลดลงภายใน 24 ชั่วโมง จากนั้นปริมาณเซลล์จะเพิ่มขึ้นและคงที่ ส่วนค่าลิกนินและค่าสีมีค่าเพิ่มขึ้นที่ 24 ชั่วโมง จากนั้นมีแนวโน้มคงที่ ในขณะที่ค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นกลับไม่ส่งผลต่อคุณสมบัติของลิกนินสังเกตจากค่าลิกนินที่ไม่ละลายในสารละลายกรด (acid insoluble lignin) เนื่องจากอิทธิพลของลิกนินความเข้มข้นสูง

ส่วนการเพิ่มความเข้มข้นยูเรีย 5 กรัมต่อลิตร (ภาพ 49B) ช่วยส่งเสริมการเจริญของเชื้อโดยเชื้อเพิ่มปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตในชั่วโมงที่ 48 ให้สูงขึ้นเท่ากับ 6.03×10^7 CFU/ml สอดคล้องกับค่าความขุ่นที่เพิ่มขึ้น จากนั้นไม่สามารถต้านอิทธิพลของความเข้มข้นลิกนินสูงได้ เซลล์ที่มีชีวิตจึงลดลงเรื่อย ๆ จนถึงวันที่ 4 และจะคงที่ ในขณะที่ค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นสอดคล้องกับการเจริญ และเมื่อการเจริญต่ำลงทำให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสคงที่เช่นกัน ซึ่งไม่ส่งผลต่อโครงสร้างของลิกนิน เนื่องจากลิกนินความเข้มข้นสูงเกินไป

ค่าพีเอชในปฏิกิริยาการเติมยูเรียความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร (ภาพ 49C) มีอัตราเมทาบอลิซึมของเซลล์มากกว่าการเติมยูเรีย 2.5 กรัมต่อลิตร สอดคล้องกับผลการเจริญ ซึ่งไม่พบค่าพีเอชที่สูงขึ้น เนื่องจากเอนไซม์แลคเคสไม่มีอิทธิพลต่อการเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงเป็นสารโพลิเมอร์ลิกนิน (polymerization)

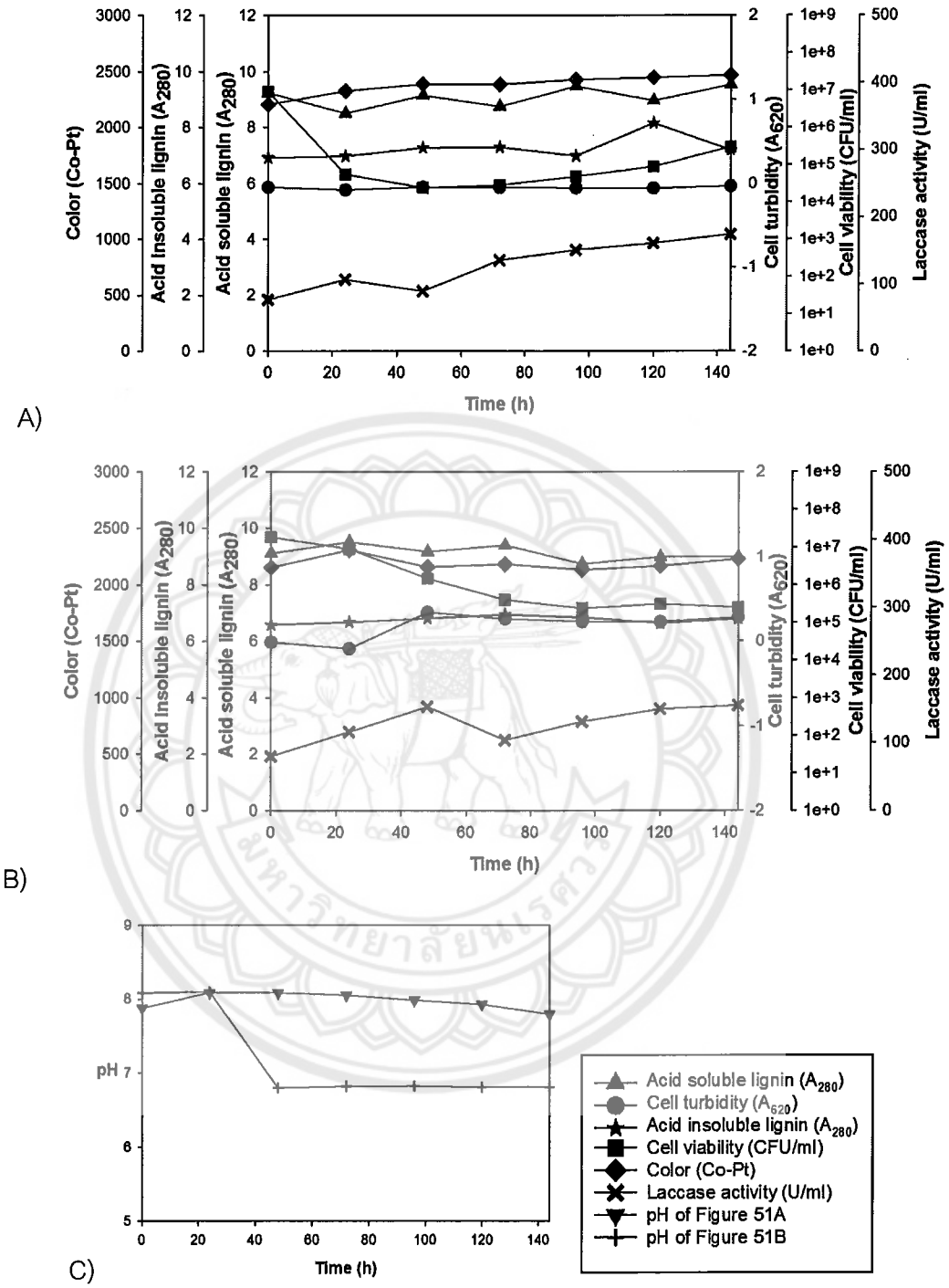
การศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจน $NaNO_3$ ที่ความเข้มข้น 0.25% และ 0.5% (w/v) ในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีการเติมลิกนิน 2 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แสดงดังภาพ 50



ภาพ 50 ปฏิกิริยาของ 2B2-1 LigB ที่เกิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ทำการเติมลิกนิน 2 กรัมต่อลิตร กลูโคส 5 กรัมต่อลิตร และมี $NaNO_3$ เป็นแหล่งไนโตรเจน A) 2.5 กรัมต่อลิตร B) 5 กรัมต่อลิตร

จากภาพ 50 พบว่า การเติม $NaNO_3$ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ลิกนินความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร มีผลต่อความมีชีวิตของเซลล์ โดยความเข้มของ $NaNO_3$ ที่สูงขึ้น ทำให้ความมีชีวิตของเซลล์ลดลง โดยหลังจาก 24 ชั่วโมงแรกปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตลดลง เนื่องมาจากลิกนินความเข้มข้นสูง โดยเชื้อพยายามรักษาปริมาณเซลล์ให้คงที่สังเกตได้จากค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสที่เพิ่มสูงขึ้น การเติม $NaNO_3$ ความเข้มข้น 2.5 กรัมต่อลิตร ค่าสีมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ส่วนค่าลิกนิน (acid soluble lignin) มีแนวโน้มคงที่ อย่างไรก็ตามวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงกลับมีค่าลิกนินที่ไม่ละลายในสารละลายกรด (acid insoluble lignin) มีค่าสูงขึ้น เนื่องจากการเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงเป็นสารโพลิเมอร์ลิกนิน (polymerization) โดยเอนไซม์แลคเคสในระบบ เนื่องจากสารประกอบฟีนอลโมเลกุลต่ำถูกนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในปฏิกิริยาการสร้างโพลิเมอร์ลิกนิน (polymerization) ทำให้ปริมาณลิกนินเพิ่มขึ้น ส่วนการเติม $NaNO_3$ ที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร มีปฏิกิริยาใกล้เคียงกับการเติม $NaNO_3$ ความเข้มข้น 2.5 กรัมต่อลิตร แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับลิกนิน และให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสสูงกว่า แสดงว่าการเพิ่มความเข้มข้น $NaNO_3$ ส่งผลเสียต่อเซลล์ที่มีชีวิตในช่วง 24 ชั่วโมงแรก ค่าพีเอชจากทั้ง 2 ปฏิกิริยามีค่าไม่แตกต่างกัน แสดงว่าการเพิ่มความเข้มข้น $NaNO_3$ ที่สูงขึ้นในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีลิกนินความเข้มข้นสูงไม่ช่วยส่งเสริมอัตราเมทาบอลิซึมของเซลล์

การศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจน Urea ที่ความเข้มข้น 0.25% และ 0.5% (w/v) ในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีการเติมลิกนิน 2 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แสดงดังภาพ 51



ภาพ 51 ปฏิกิริยาของ 2B2-1LigB ที่เกิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ทำการเติมลิกนิน 2 กรัมต่อลิตร กลูโคส 5 กรัมต่อลิตร และมี Urea เป็นแหล่งไนโตรเจน A) 2.5 กรัมต่อลิตร B) 5 กรัมต่อลิตร

จากภาพ 51 การเติมยูเรียความเข้มข้น 2.5 กรัมต่อลิตร ที่ความเข้มข้นของลิกนิน 2 กรัมต่อลิตร (ภาพ 51A) พบปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตลดลงหลังจาก 24 ชั่วโมง เนื่องจากลิกนินความเข้มข้นสูงมีผลต่อความมีชีวิตของเซลล์ ค่าลิกนินที่ละลายในสารละลายกรด (acid soluble lignin) และค่าลิกนินที่ไม่ละลายในสารละลายกรด (acid insoluble lignin) มีค่าสูงขึ้นในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง แสดงผลการเกิดปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงเป็นสารโพลิเมอร์ลิกนิน (polymerization) สอดคล้องกับค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสที่เพิ่มขึ้น

การเติมยูเรียความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร ที่ความเข้มข้นลิกนิน 2 กรัมต่อลิตร (ภาพ 51B) พบปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตลดลงในช่วง 24 ชั่วโมงแรก ซึ่งต่ำกว่าการเพาะเลี้ยงที่มีการเติมยูเรียความเข้มข้น 2.5 กรัมต่อลิตร เนื่องมาจากความเข้มข้นยูเรียที่สูงขึ้นมีผลต่อความมีชีวิตรอดของเซลล์ในปฏิกิริยา หลังจากวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงปริมาณเซลล์จะคงที่ จากค่าพีเอชพบว่าอัตราเมทาบอลิซึมสูงสุดที่ 48 ชั่วโมง ทำให้ค่าสีและค่าลิกนิน (acid soluble lignin) ลดลงในชั่วโมงที่ 48 และเชื้อสามารถรักษาอัตราเมตาบอลิซึมให้คงที่ (ภาพ 51C) แสดงว่าภายในระบบไม่เกิดปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงเป็นสารโพลิเมอร์ลิกนินด้วยเอนไซม์แลคเคส ดังนั้นสามารถสรุปลักษณะการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในระบบได้ดังนี้ ถ้าค่าพีเอชลดลงอย่างมากในช่วงเริ่มต้นของการเพาะเลี้ยงเนื่องจากการเจริญของเซลล์โดยเชื้อสามารถใช้น้ำตาลกลูโคสหรือใช้สารประกอบอะโรเมติกมวลโมเลกุลต่ำ จากนั้นค่าพีเอชสูงขึ้น (ด่าง) เป็นผลจากปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงเป็นโพลิเมอร์ลิกนิน (polymerization) โดยเอนไซม์แลคเคสที่เชื้อสร้างขึ้น

เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองนี้ (ภาพ 51) กับภาพ 47 ที่มีความเข้มข้นของลิกนิน 1 กรัมต่อลิตร บ่งบอกถึงอิทธิพลของลิกนินความเข้มข้นสูงมีผลต่อค่าความมีชีวิตของเซลล์และค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคส โดยยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แลคเคส ส่วนความเข้มข้นของยูเรียต่ำ (2.5 กรัมต่อลิตร) ไม่ช่วยส่งเสริมอัตราเมทาบอลิซึมของเซลล์ ดังนั้นความเข้มข้นของยูเรียและลิกนินส่งผลต่อความมีชีวิตของเซลล์โดยความเข้มข้นของลิกนินที่เพิ่มขึ้นมีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์ แตกต่างจากภาพ 47B ยูเรียความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตรสามารถส่งเสริมการเจริญของเซลล์ให้สูงขึ้นได้หลังจากวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งไม่พบการเจริญในการเพาะเลี้ยงที่มีการเติมลิกนินความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร

จากตาราง 16 สรุปร้อยละการย่อยลิกนินจากค่าลิกนินที่ไม่ละลายในสารละลายกรด (acid insoluble lignin) ตามวิธีของ Ulmer et al. (1983) ทั้งหมด 16 การทดลอง พบว่าเชื้อรหัส 2B2-1LigB มีความจำเพาะต่อสารอาหารและสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงอย่างมาก โดยการทดลองที่ให้การย่อยลิกนินสูงสุด คือ การทดลองที่ 13 ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ 2B2-1LigB ที่ความเข้มข้น

ลิกนิน 1 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิที่ 35 องศาเซลเซียส โดยมียูเรียความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน ให้ค่าการย่อยลิกนินเท่ากับ 79.23 % รองลงมาคือ การทดลองที่ 15 ให้ค่าร้อยละการย่อยเท่ากับ 39.79 % ซึ่งแตกต่างจากสภาวะที่เหมาะสมที่สุด คือ การใช้อุณหภูมิที่ 40 °C จากทั้งสองการทดลอง ยืนยันได้ว่ายูเรียช่วยส่งเสริมการย่อยลิกนินมากกว่าโซเดียมไนเตรทที่ความเข้มข้นของยูเรีย 5 กรัมต่อลิตร จากการศึกษาของ Rivera-Hoyos et al. ความเข้มข้นของไนโตรเจนสูงช่วยกระตุ้นการสร้างเอนไซม์แลคเคส ของ *Trametes gallica* ในขณะที่ให้ผลตรงกันข้ามเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ *T. versicolor* (Rivera-Hoyos et al., 2013)

ตาราง 16 ร้อยละการย่อยลิกนินในแต่ละการทดลอง

Run	Lignin (g/l)	Temperature (°C)	Nitrogen source	Nitrogen source Concentration (%w/v)	Acid insoluble lignin Degradation (%)
1	1	35	$NaNO_3$	0.25	1.56
2	2	35	$NaNO_3$	0.25	3.85
3	1	40	$NaNO_3$	0.25	-0.71
4	2	40	$NaNO_3$	0.25	0.07
5	1	35	Urea	0.25	1.19
6	2	35	Urea	0.25	0.14
7	1	40	Urea	0.25	1.91
8	2	40	Urea	0.25	-0.80
9	1	35	$NaNO_3$	0.5	6.42
10	2	35	$NaNO_3$	0.5	13.37
11	1	40	$NaNO_3$	0.5	8.30
12	2	40	$NaNO_3$	0.5	1.49
13	1	35	Urea	0.5	79.23
14	2	35	Urea	0.5	5.58
15	1	40	Urea	0.5	39.79
16	2	40	Urea	0.5	-0.91

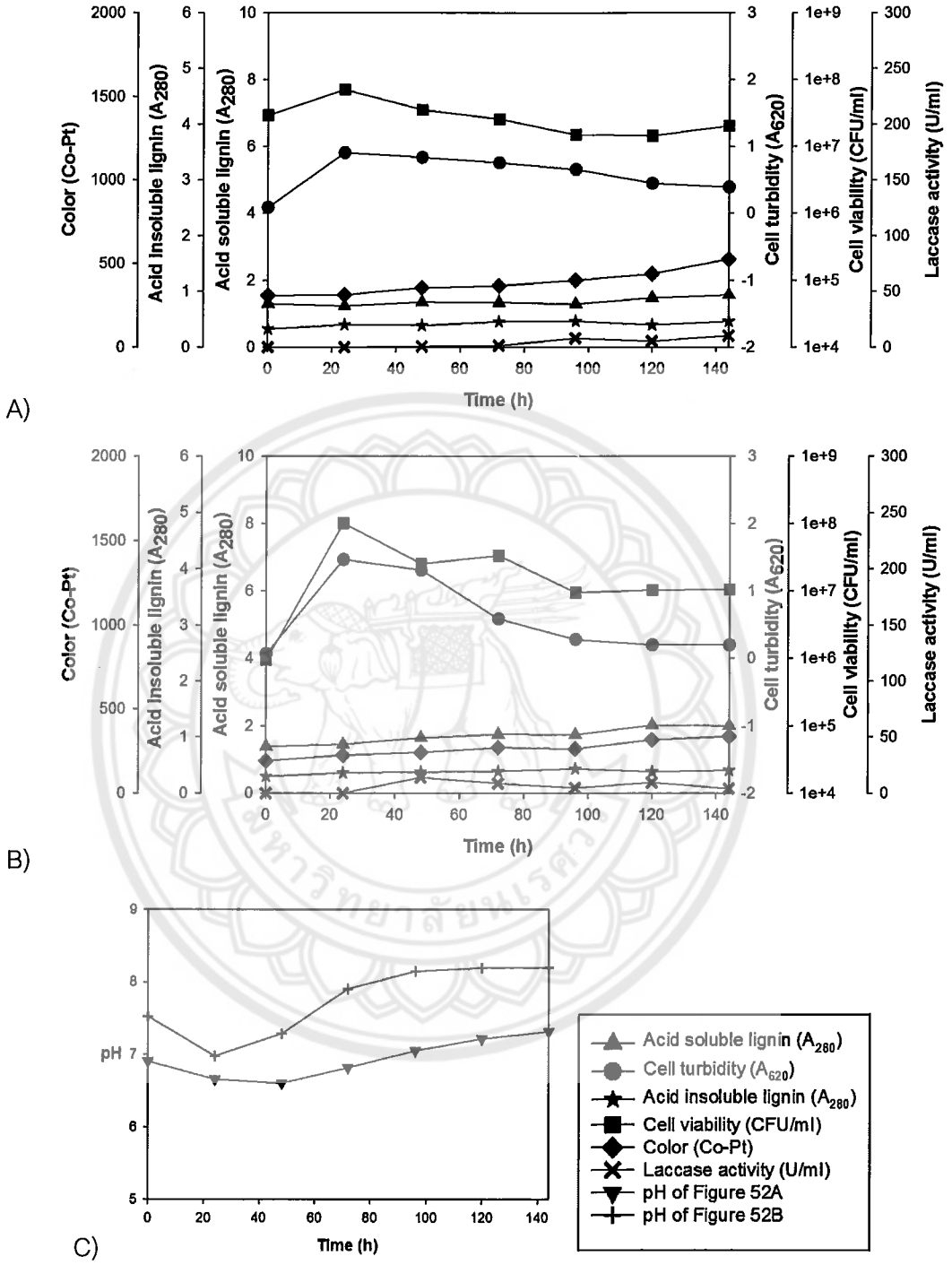
จากตาราง 16 จากการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อรหัส 2B2-1LigB พบสภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยลิกนิน ได้แก่ ความเข้มข้นลิกนิน 1 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยมียูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร ให้ค่าการย่อยลิกนิน

เท่ากับ 79.23% รองลงมา คือ สภาวะที่ใช้ความเข้มข้นลิกนิน 1 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยมียูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร ให้ค่าการย่อยลิกนินเท่ากับ 39.79% จากผลการทดลองยืนยันสภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยลิกนินของเชื้อรหัส 2B2-1LigB เป็นสภาวะที่มีความจำเพาะส่งเสริมให้จุลินทรีย์เจริญและย่อยลิกนิน ซึ่งเป็นโพลิเมอร์ที่ยากต่อการย่อยสลาย โดยผู้วิจัยจะนำสภาวะที่เหมาะสมนี้ไปประยุกต์ใช้กับน้ำล้างเยื่อกระดาษ ซึ่งมีลิกนินเป็นองค์ประกอบหลัก

นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ทำการทดลองเพิ่มเติมที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เพื่อให้แน่ใจว่าเชื้อไม่มีความสามารถในการย่อยลิกนินที่อุณหภูมิสูงตามการรายงานของ Zhu et al. (2017) ที่ได้ทำการคัดแยกเชื้อ *B. ligniniphilus* L1 จากตะกอนทะเลจีนตอนใต้ พบว่าอุณหภูมิ 50 °C เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการย่อยลิกนิน โดยวัดค่าดูดกลืนแสงทุก ๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน ซึ่งมีลิกนินเป็นแหล่งคาร์บอน ให้ค่าดูดกลืนแสงที่ 280 nm ลดลงจาก 0.36 เป็น 0.22 คิดเป็น 38.9% เนื่องจากเชื้อสร้างเอนไซม์ manganese peroxidase (MnP) และแลคเคสเพื่อช่วยในการย่อยลิกนิน จากงานวิจัยนี้บ่งบอกถึงศักยภาพของสปีชีส์ที่แตกต่างกันของสกุล *Bacillus* ที่มีรูปแบบในการย่อยลิกนินที่แตกต่างกัน

เชื้อ 2B2-1ligB ให้การย่อยลิกนินในลักษณะที่เพิ่มค่าดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร และเพิ่มค่าสีอาหารเลี้ยงเชื้อ ด้วยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์แลคเคสที่แบคทีเรียสร้างขึ้นตามการเจริญของเซลล์โดยมีลิกนินเป็นตัวเหนี่ยวนำ ส่งผลให้เกิดปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงเป็นสายโพลิเมอร์ลิกนิน (polymerization) จากรูปแบบการย่อยนี้ทำให้ผู้วิจัยเล็งเห็นประโยชน์ในด้านการดัดแปลงมวลโมเลกุลลิกนินในน้ำล้างเยื่อกระดาษจากปฏิกิริยา polymerization เพื่อใช้ลิกนินเป็นวัตถุดิบตั้งต้นของอุตสาหกรรมอื่น ๆ ต่อไป

ศึกษาแหล่งไนโตรเจนชนิดอินทรีย์และอนินทรีย์ โดยดำเนินการศึกษาที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ไม่เติมลิกนิน แสดงดังภาพ 52



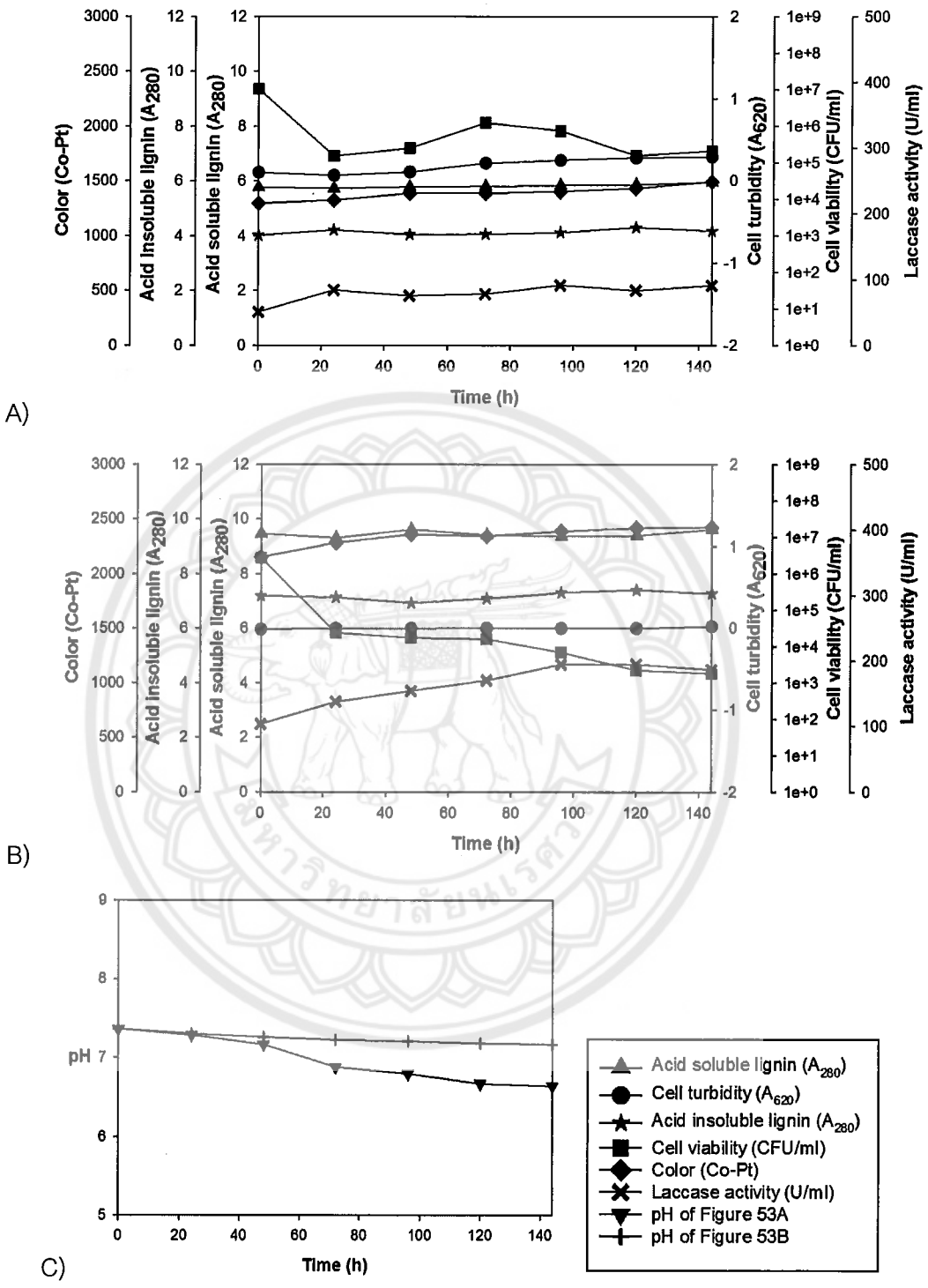
ภาพ 52 ปฏิกิริยาของ 2B2-1 LigB ที่เกิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ไม่เติมลิกนิน กลูโคส 5 กรัมต่อลิตร และแหล่งไนโตรเจนความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตรA) $NaNO_3$ B) Peptone

จากภาพ 52 พบว่า เชื้อสามารถเจริญได้ทันทีหลังจาก 24 ชั่วโมง ในการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส โดยเปปโทนทำหน้าที่เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ดีกว่า $NaNO_3$ ซึ่งหลังจาก 24 ชั่วโมงปริมาณเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงอย่างต่อเนื่อง (ภาพ 52A) ในขณะที่การเติมเปปโทนเป็นแหล่งไนโตรเจนให้ปริมาณเซลล์ลดลงหลังจาก 24 ชั่วโมงเช่นเดียวกัน

อิทธิพลการไม่เติมลิกนินพบค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสมีค่าต่ำมาก แสดงให้เห็นถึงลิกนินเป็นตัวเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างเอนไซม์แลคเคส สอดคล้องกับ Mongkolthanaruk (2012) กล่าวว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมซับเตรทหรือสารประกอบอะโรเมติก (aromatic compounds) ได้แก่ guaiacol, phenol red และ น้ำล้างเยื่อกระดาษ (black liqour) ลงไปจะช่วยเหนี่ยวนำให้จุลินทรีย์สร้างเอนไซม์แลคเคส

จากการทดสอบการเจริญทั้ง 3 อุณหภูมิ ได้แก่ 35, 40 และ 45 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อรหัส 2B2-1ligB มีความสามารถในการเจริญได้ที่อุณหภูมิสูง ซึ่งในปฏิกิริยาต้องไม่มีสารยับยั้งการเจริญ เช่น ลิกนิน โดยเชื้อจะมีอัตราการเมทาบอลิซึมสูงสุดในช่วง 24 ชั่วโมงแรกของการเจริญ (ภาพ 38, 39 และ 52)

การศึกษาผลของการไม่เติมแหล่งไนโตรเจนและความเข้มข้นลิกนินที่เพิ่มขึ้น โดยดำเนินการศึกษาที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสความเร็ว 200 rpm แสดงผลการทดลองดังภาพ 53



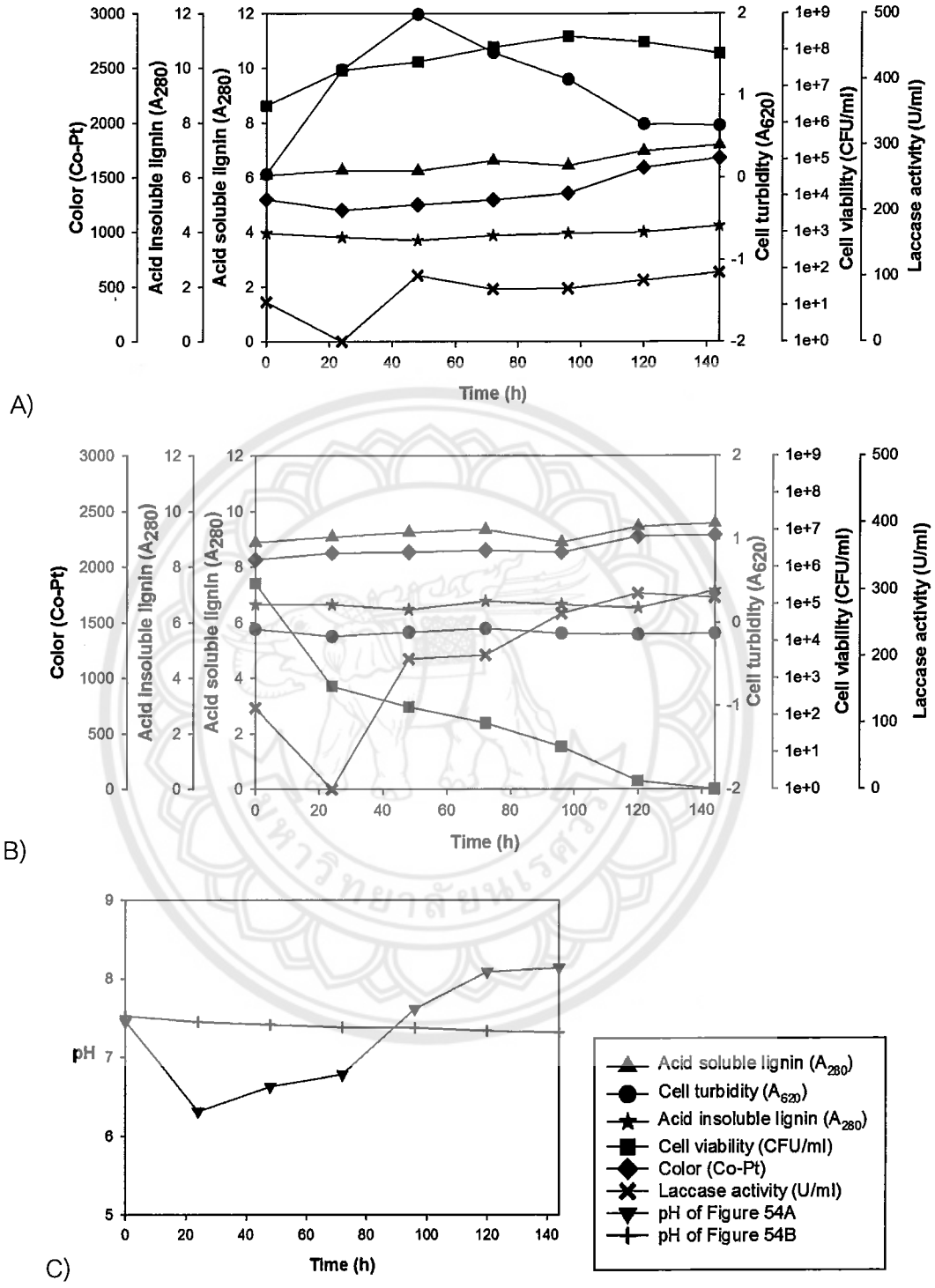
ภาพ 53 ปฏิกิริยาของ 2B2-1LigB ที่เกิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เติมลิกนิน A) 1 กรัมต่อลิตร B) 2 กรัมต่อลิตร เติมกลูโคส 5 กรัมต่อลิตร และไม่เติมแหล่งไนโตรเจน

จากภาพ 53 การเติมลิกนินและการไม่เติมแหล่งไนโตรเจนมีผลให้เซลล์ที่มีชีวิตลดลง หลังจาก 24 ชั่วโมงของการบ่ม โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อในสารละลายที่มีความเข้มข้นของลิกนินต่ำ (1 กรัมต่อลิตร) เซลล์จะยังสามารถเพิ่มจำนวนใน 72 ชั่วโมง (ภาพ 53A) ส่วนการเพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้นลิกนินสูงเซลล์ที่มีชีวิตจะมีปริมาณลดลงอย่างต่อเนื่อง (ภาพ 53B) แสดงให้เห็นถึงอิทธิพลความเข้มข้นของลิกนินที่มีผลต่อความมีชีวิตของเซลล์

จากค่าพีเอชพบว่าความเข้มข้นลิกนินในการเพาะเลี้ยงเชื้อที่ 1 กรัมต่อลิตร มีค่าอัตราเมทาบอลิซึมสูงกว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีความเข้มข้นลิกนิน 2 กรัมต่อลิตร โดยค่าสีจากทั้ง 2 ปฏิกิริยามีค่าเพิ่มขึ้น ซึ่งค่าสีที่ความเข้มข้นลิกนิน 2 กรัมต่อลิตร มีค่าเพิ่มขึ้นมากกว่าปฏิกิริยาที่มีการเติมลิกนิน 1 กรัมต่อลิตร เป็นผลมาจากอุณหภูมิสูงมีผลส่งเสริมการเกิดปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงเป็นสารโพลิเมอร์ลิกนิน (polymerization)

เมื่อเปรียบเทียบอิทธิพลของอุณหภูมิในปฏิกิริยาที่มีลิกนินเป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจน พบว่าอุณหภูมิมีผลต่อความเข้มสีของน้ำเลี้ยงเชื้อ โดยอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงสูงมีผลทำให้ค่าสีอาหารเพาะเลี้ยงสูงขึ้น (ภาพ 40, 42 และ 53)

การศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนเปปโทนและความเข้มข้นลิกนินที่เพิ่มขึ้น โดยดำเนินการศึกษาที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 rpm แสดงผลการทดลองดังภาพ 54



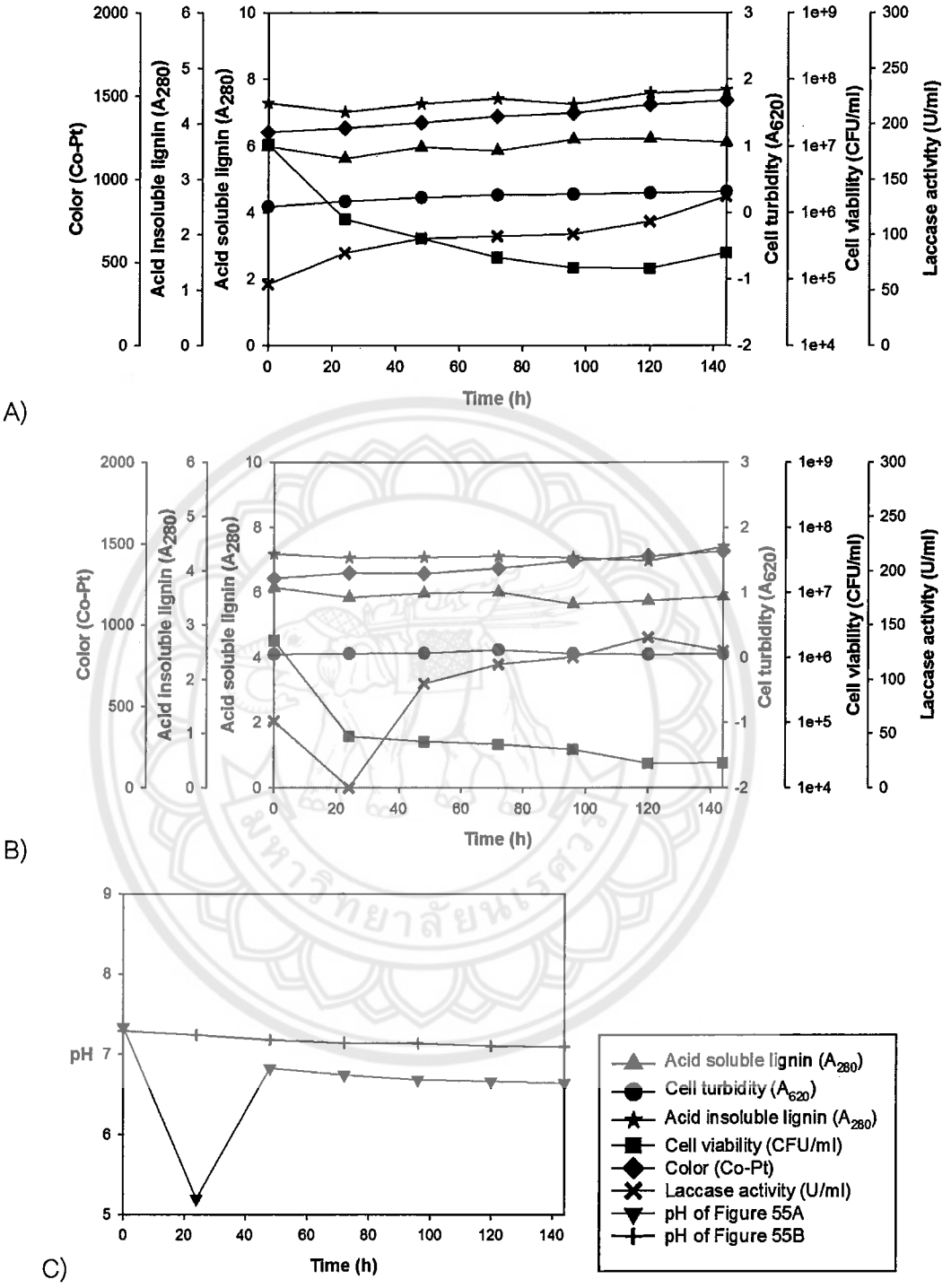
ภาพ 54 ปฏิกิริยาของ 2B2-1 LigB ที่เกิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เติมลิกนิน A) 1 กรัมต่อลิตร B) 2 กรัมต่อลิตร กลูโคส 5 กรัมต่อลิตร และเติมเปปโทนเป็นแหล่งไนโตรเจนความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร

จากภาพ 54 การเพาะเลี้ยงเชื้อรหัส 2B2-1LigB ที่มีเปปโทนเป็นแหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้นของลิกนิน 1 กรัมต่อลิตร ช่วยส่งเสริมการเจริญของเซลล์ที่มีชีวิต (ภาพ 54A) ซึ่งมีการเจริญเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องสอดคล้องกับค่าความขุ่นที่เพิ่มสูงสุดที่ 48 ชั่วโมง Chandra et al. (2011) ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนที่ส่งเสริมการย่อยลิกนินและลดค่าสีของน้ำล้างเยื่อกระดาษ พบว่าเปปโทนเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุด ในทางตรงกันข้ามที่ความเข้มข้นลิกนิน 2 กรัมต่อลิตร (งานวิจัยนี้) การเติมเปปโทนกลับไม่ช่วยเพิ่มปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต โดยเซลล์ไม่สามารถปรับตัวต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นผลให้เซล์ตายจนไม่มีเชื้อปรากฏ (sterilization)

Giroux et al. (1988) อธิบายปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นนี้ว่า การเติมแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ทำให้เกิดการสะสมของลิกนินที่ถูกย่อยสลายแล้วได้มากกว่าการที่จุลินทรีย์จะนำลิกนินไปใช้เพื่อสร้างเซลล์ ซึ่งการสะสมของลิกนินที่เกิดขึ้นนี้ไปมีผลต่อปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต สังเกตจากค่าสีและค่าลิกนิน (acid soluble lignin) มีค่าสูงขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับค่าตั้งต้น แตกต่างจากผลการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่อุณหภูมิต่ำ (35 และ 40 องศาเซลเซียส) เซลล์ที่มีชีวิตสามารถปรับตัวต่ออาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อที่จะรักษาปริมาณเซลล์ให้คงที่หลังจาก 72 ชั่วโมงได้ อย่างไรก็ตามการเจริญที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาที่มีการเติมลิกนินความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร ไม่มีผลต่อโครงสร้างลิกนิน (acid insoluble lignin) ค่าสีในน้ำเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้น ดังนั้นอุณหภูมิ ความเข้มข้นของลิกนิน และแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ จึงมีบทบาทสำคัญต่อการมีชีวิตรอดของเชื้อในปฏิกิริยา กิจกรรมของจุลินทรีย์ในระบบการเพาะเลี้ยง และการย่อยหรือการเปลี่ยนแปลงเป็นโพลิเมอร์ลิกนิน

ค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสมีค่าเฉพาะแตกต่างจากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 35 และ 40 องศาเซลเซียส พบว่าในช่วง 24 ชั่วโมงแรก ไม่พบค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสในปฏิกิริยา อุณหภูมิสูงมีผลยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แลคเคสของเซลล์ (54A) จากนั้นเชื้อจึงมีการสร้างเอนไซม์แลคเคสขึ้นมาในระบบ โดยในปฏิกิริยาที่มีการเติมลิกนินความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสสูงกว่าการเติมลิกนินที่ 1 กรัมต่อลิตร เนื่องจากลิกนินทำหน้าที่เป็นตัวเหนี่ยวนำให้เชื้อผลิตเอนไซม์ เมื่อเปรียบเทียบผลของอุณหภูมิต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคส พบว่าอุณหภูมิที่ 45 องศาเซลเซียส ส่งเสริมค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสภายในปฏิกิริยาได้สูงสุด (ภาพ 41B, 43B และ 54B)

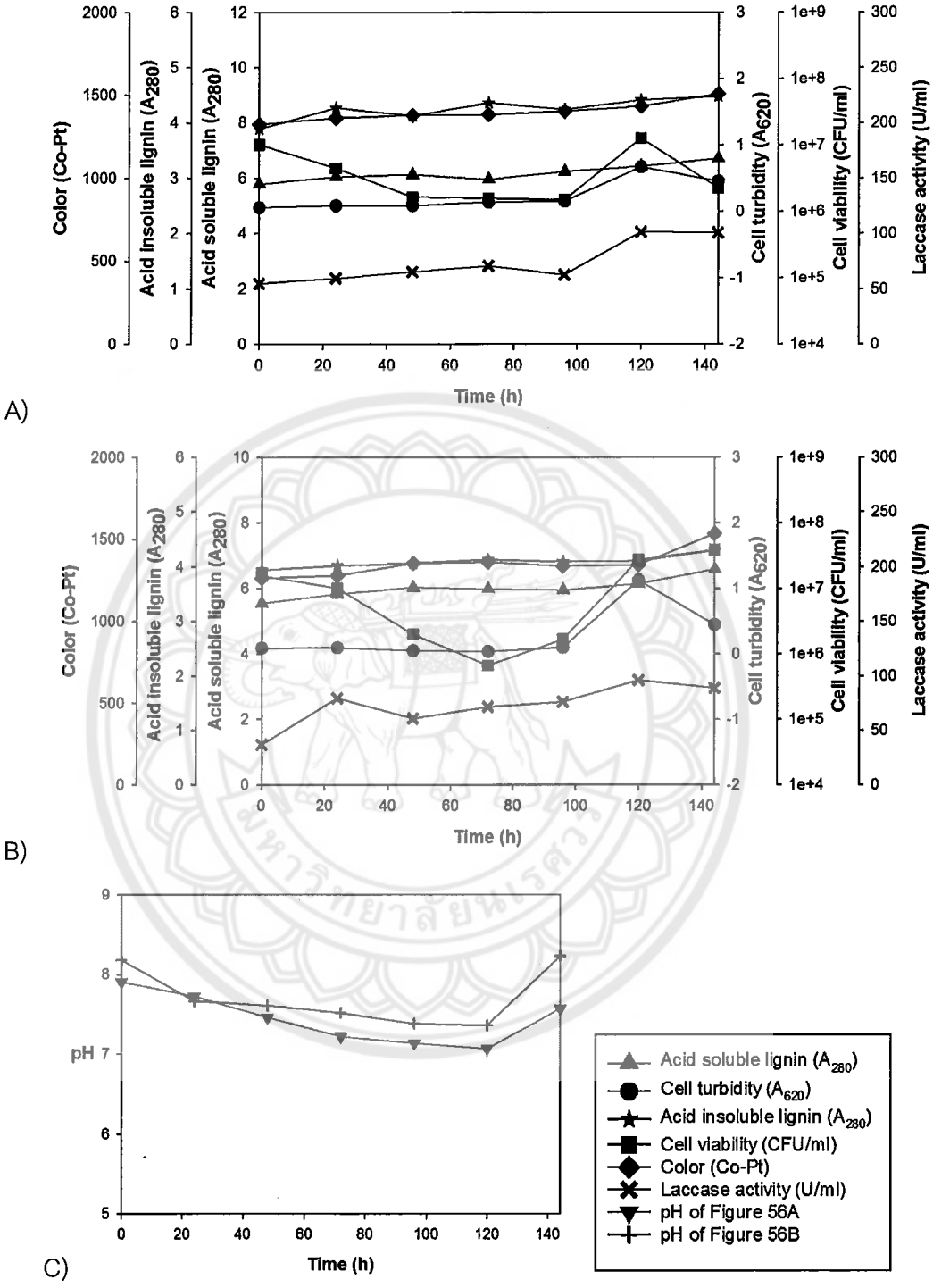
การศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจน $NaNO_3$ ที่ความเข้มข้น 0.25% และ 0.5% (w/v) ในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีการเติมลิกนิน 1 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส แสดงผลดังภาพ 55



ภาพ 55 ปฏิกิริยาของ 2B2-1LigB ที่เกิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ทำการเติมลิกนิน 1 กรัมต่อลิตร กลูโคส 5 กรัมต่อลิตร และมี $NaNO_3$ เป็นแหล่งไนโตรเจน A) 2.5 กรัมต่อลิตร B) 5 กรัมต่อลิตร

จากภาพ 55 การเติม $NaNO_3$ มีผลต่อค่าเซลล์ที่มีชีวิตในช่วง 24 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยงและปริมาณเซลล์ลดลงอย่างต่อเนื่อง ซึ่งความเข้มข้นของ $NaNO_3$ สูง มีผลต่อความมีชีวิตของเซลล์เป็นอย่างมากแสดงจากค่าเซลล์ที่มีชีวิต (Cell viability, CFU/ml) โดยการเติม $NaNO_3$ ที่ความเข้มข้น 2.5 กรัมต่อลิตร ค่าสีและค่าลิกนิน (acid soluble lignin) และค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตลอดการเพาะเลี้ยง แต่ไม่ส่งผลต่อโพลิเมอร์ลิกนินสังเกตจากค่าลิกนินที่ไม่ละลายในกรด (acid insoluble lignin) การเติม $NaNO_3$ ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร มีผลต่อค่าเซลล์ที่มีชีวิตให้ค่าการเจริญลดลงอย่างต่อเนื่องหลังจาก 24 ชั่วโมง โดยให้ค่าปริมาณเซลล์สุดท้ายต่ำกว่าการเติม $NaNO_3$ ความเข้มข้นต่ำ (2.5 กรัมต่อลิตร) เท่ากับ $2.4x10^4$ และ $2.48x10^5$ CFU/ml ตามลำดับ ดังนั้นการเพิ่มความเข้มข้นของ $NaNO_3$ มีผลต่อการลดลงของปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต ซึ่งเห็นได้ชัดเจนเมื่ออุณหภูมิมีค่าสูงขึ้น (ภาพ 46 และ 55) นอกจากนี้อุณหภูมิสูงมีผลในการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แลคเคสในช่วง 24 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง (ภาพ 55B) ซึ่งไม่พบผลการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แลคเคสที่ความเข้มข้นของ $NaNO_3$ 2.5 กรัมต่อลิตร (ภาพ 55A) และที่อุณหภูมิต่ำ (ภาพ 44 และ 46)

การศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนยูเรียที่ความเข้มข้น 0.25% และ 0.5% (w/v) ในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีการเติมลิกนิน 1 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส แสดงผลดังภาพ 56

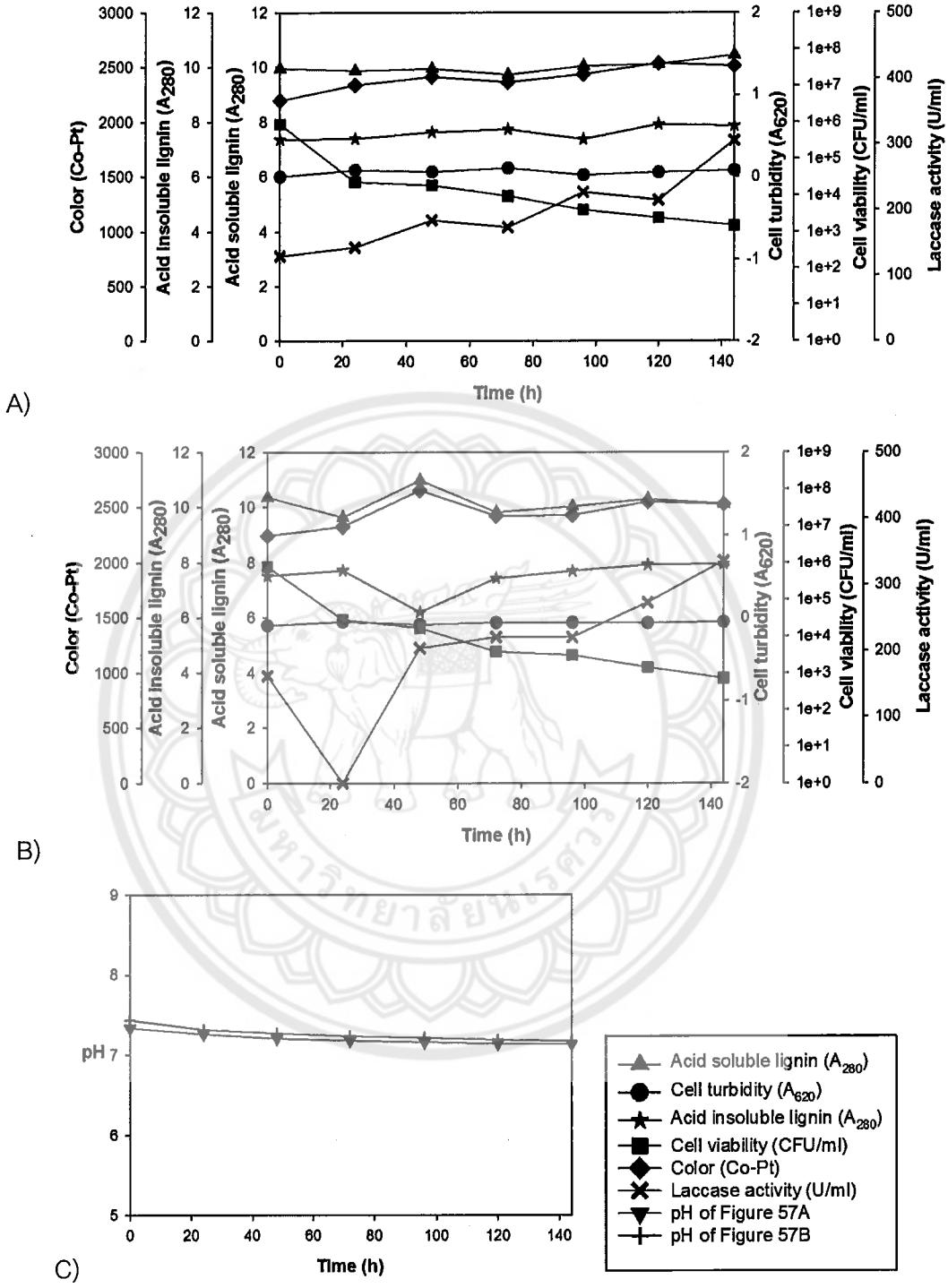


ภาพ 56 ปฏิกิริยาของ 2B2-1LigB ที่เกิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ทำการเติมลิกนิน 1 กรัมต่อลิตร กลูโคส 5 กรัมต่อลิตร และมี Urea เป็นแหล่งไนโตรเจน A) 2.5 กรัมต่อลิตร B) 5 กรัมต่อลิตร

ภาพ 56 การเติมยูเรียความเข้มข้น 2.5 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีความเข้มข้นลิกนิน 1 กรัมต่อลิตร มีผลในการยับยั้งการเจริญของเซลล์เป็นระยะเวลา 4 วัน โดยเชื้อสามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตได้ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง ทำให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสเพิ่มสูงขึ้นตามการเจริญ โดยค่าสีและค่าลิกนินมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตลอดการเพาะเลี้ยง ส่วนการเติมยูเรียความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร เชื้อใช้ระยะเวลาในการปรับตัวเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นเชื้อจึงเพิ่มปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต

เมื่อสังเกตค่าพีเอชที่บ่งบอกถึงค่าอัตราเมทาบอลิซึม การเพาะเลี้ยงมีค่าพีเอชต่ำสุดในวันที่ 5 (ภาพ 56C) แสดงผลของอุณหภูมิสูงในการยับยั้งอัตราเมทาบอลิซึมของเชื้อ รูปแบบการเจริญคล้ายกับการเพาะเลี้ยงที่ 40 องศาเซลเซียส โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ไม่ส่งผลต่อลิกนินและสี ซึ่งแตกต่างจากการเพาะเลี้ยงที่ 40 องศาเซลเซียส (ภาพ 47B) โดยลิกนินถูกย่อยในวันที่ 5 และ 6 ของการเพาะเลี้ยง ดังนั้นอิทธิพลของอุณหภูมิจึงมีความสำคัญต่อการย่อยลิกนินของเชื้อ ซึ่งไม่พบปฏิกิริยาการย่อยลิกนินเกิดขึ้นที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส แตกต่างจากงานของ Zhu et al. (2017) ได้ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Bacillus ligniphilus* L1 ในอาหารที่มีองค์ประกอบของกลูโคสและลิกนินที่ 30 และ 50 องศาเซลเซียส พบการย่อยลิกนินของเชื้อที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสมากกว่าอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

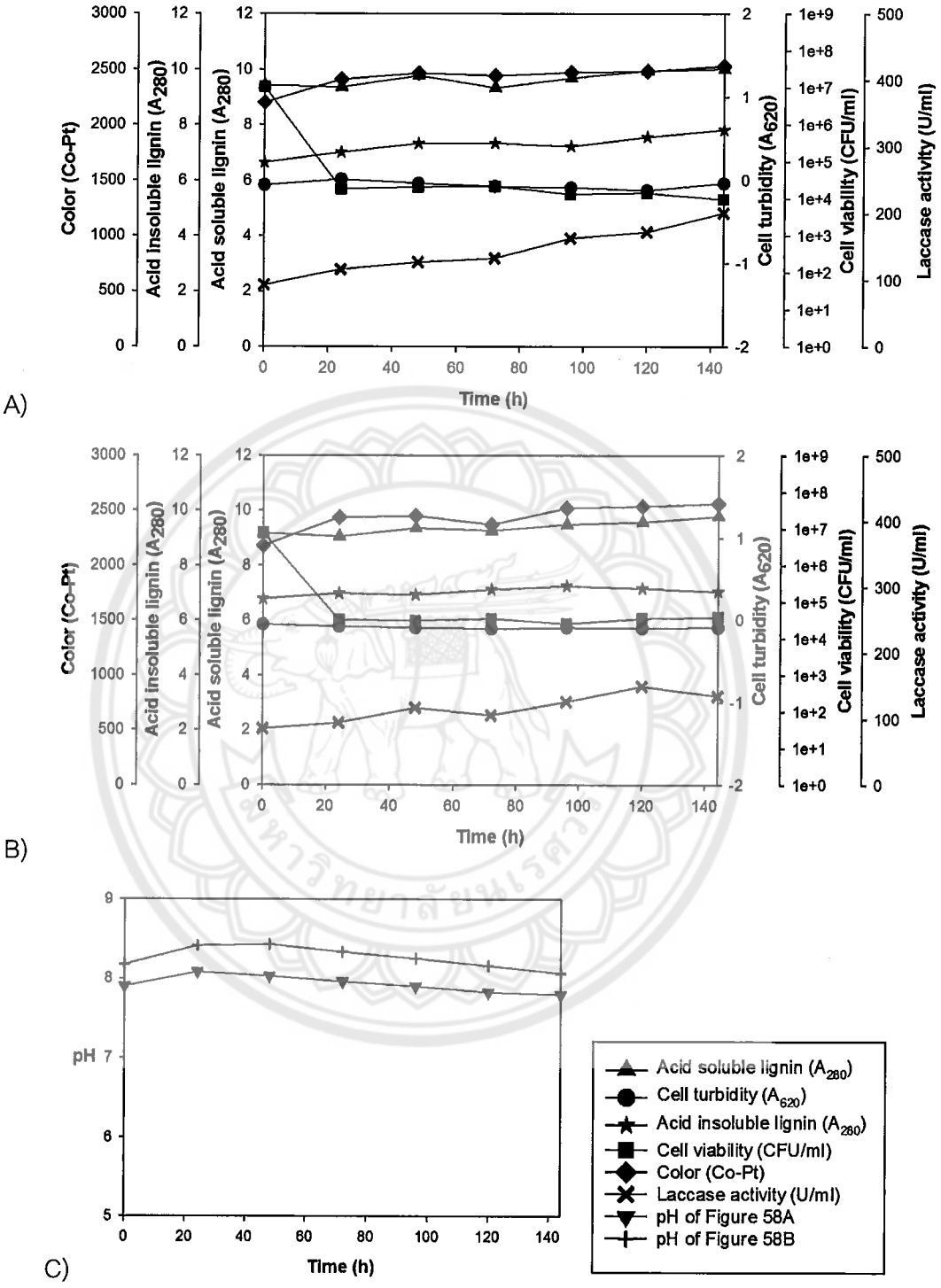
การศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจน $NaNO_3$ ที่ความเข้มข้น 0.25% และ 0.5% (w/v) ในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีการเติมลิกนิน 2 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส แสดงผลดังภาพ 57



ภาพ 57 ปฏิกิริยาของ 2B2-1LigB ที่เกิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ทำการเติมลิกนิน 2 กรัมต่อลิตร กลูโคส 5 กรัมต่อลิตร และมี $NaNO_3$ เป็นแหล่งไนโตรเจน A) 2.5 กรัมต่อลิตร B) 5 กรัมต่อลิตร

จากภาพ 57 การเพาะเลี้ยงที่เติม $NaNO_3$ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีลิกนินความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร ส่งผลต่อปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตทำให้ปริมาณเซลล์ลดลงโดยลดลงอย่างมากที่ 24 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยงและลดลงอย่างต่อเนื่อง ซึ่งการเติม $NaNO_3$ ความเข้มข้นต่ำที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ไม่พบการย่อยลิกนินในขณะที่การเพาะเลี้ยงที่เติม $NaNO_3$ ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร พบการย่อยลิกนินเกิดขึ้นที่ 48 ชั่วโมง สังเกตจากค่าลิกนินที่ไม่ละลายในสารละลายกรด (acid insoluble lignin) ลดลง จากนั้นค่าลิกนินที่ไม่ละลายในสารละลายกรด (acid insoluble lignin) กลับเพิ่มขึ้น เนื่องจากเกิดปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงเป็นสารโพลิเมอร์ลิกนิน (polymerization) โดยเพิ่มค่าลิกนินที่ไม่ละลายได้ในสารละลายกรด (acid insoluble lignin) เมื่อเปรียบเทียบกับค่าเริ่มต้น ปรากฏการณ์นี้เกิดจากกิจกรรมเอนไซม์แลคเคสในปฏิกิริยาที่ให้ค่ากิจกรรมเพิ่มขึ้นอย่ารวดเร็วส่งผลต่อโพลิเมอร์ลิกนินขนาดใหญ่ ทำให้ค่าสีและค่าลิกนินที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าสูงขึ้น ค่าสีที่เพิ่มขึ้นนี้สามารถอธิบายได้จากงานของ Gonzalez, K. et al. (2005) ศึกษาการใช้เอนไซม์แลคเคสในปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงเป็นโพลิเมอร์ลิกนิน พบว่าสารละลายให้ค่าสีเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง ซึ่งค่าพีเอชยืนยันว่าปฏิกริยาที่เกิดขึ้นในระหว่างการเพาะเลี้ยงไม่ได้เกิดจากเชื้อ เนื่องจากค่าพีเอชไม่เปลี่ยนแปลง (ภาพ 57C) และจุดที่น่าสังเกตในปฏิกิริยาอีกประเด็น คือ ค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสที่ 24 ชั่วโมง ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ลดลงหรือแทบไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคส (ภาพ 57B) เป็นผลมาจากความเข้มข้นสูงของ $NaNO_3$ และอุณหภูมิสูงที่ 45 องศาเซลเซียส ซึ่งไม่พบปรากฏการณ์นี้จากการใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน เมื่อเปรียบเทียบผลของการเติมแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์และอนินทรีย์ ภาพ 57B และ 54B พบว่าการเติมแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ให้ปริมาณเซลล์สุดท้ายมากกว่าการใช้เปปโทนเป็นแหล่งไนโตรเจน เท่ากับ $7.0x10^2$ และ $1x10^0$CFU/ml ตามลำดับ

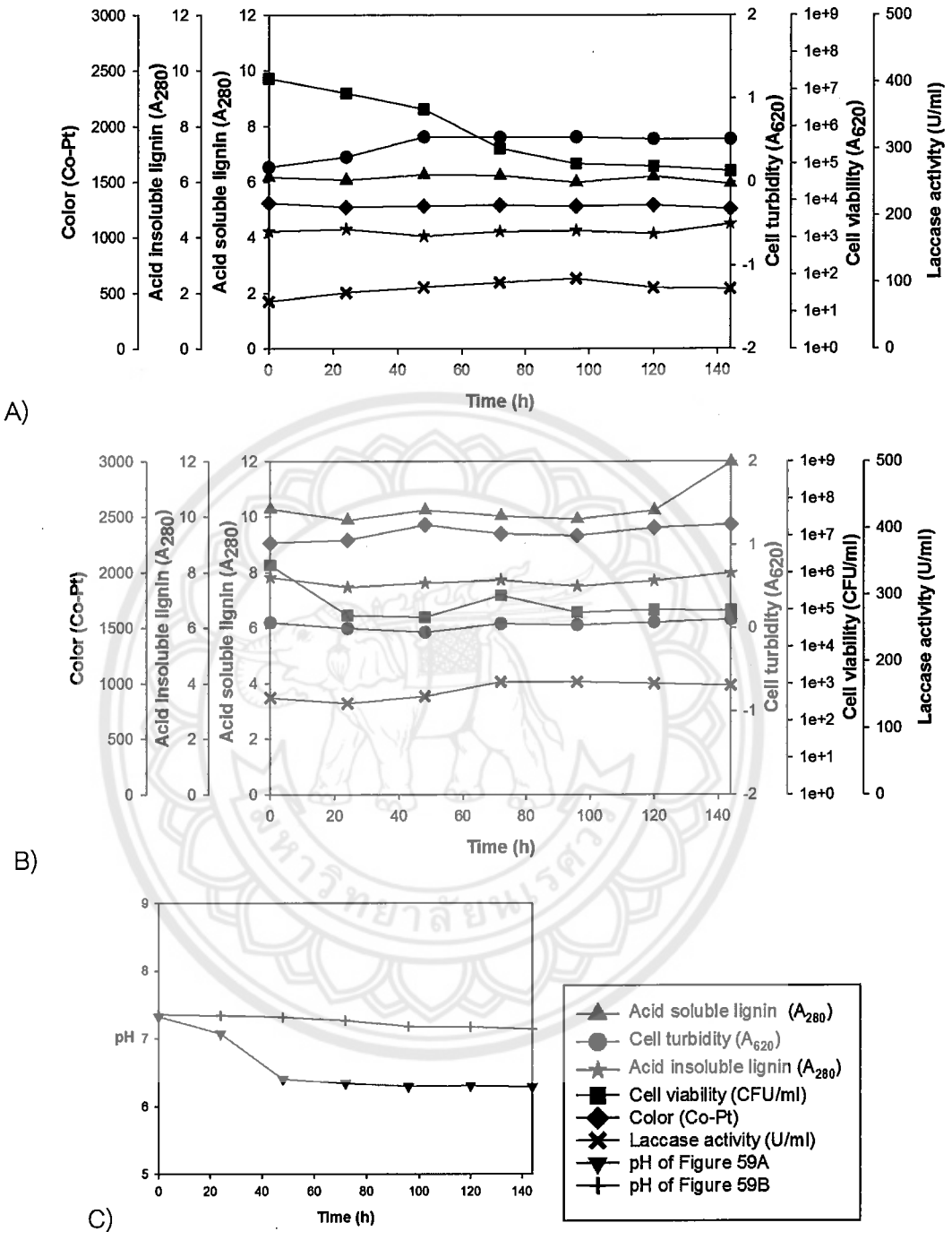
การศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนยูเรียที่ความเข้มข้น 0.25% และ 0.5% (w/v) ในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีการเติมลิกนิน 2 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส แสดงผลดังภาพ 58



ภาพ 58 ปฏิกิริยาของ 2B2-1 LigB ที่เกิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ทำการเติมลิกนิน 2 กรัมต่อลิตร กลูโคส 5 กรัมต่อลิตร และมี Urea เป็นแหล่งไนโตรเจน A) 2.5 กรัมต่อลิตร B) 5 กรัมต่อลิตร

จากภาพ 58 การเติมยูเรียที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส มีผลต่อค่าความมีชีวิตของเซลล์ โดยปริมาณเซลล์ลดลงอย่างมากหลังจาก 24 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง จากนั้นเชื้อจะพยายามรักษาปริมาณเซลล์ให้คงที่ แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของยูเรียที่ช่วยส่งเสริมให้เซลล์คงความมีชีวิตอยู่ได้ ซึ่งความเข้มข้นยูเรีย 2.5 กรัมต่อลิตร ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสสูงกว่าการเติมยูเรีย 5 กรัมต่อลิตร โดยค่าสีและค่าลิกนินมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น เนื่องจากในระบบการเพาะเลี้ยงเชื้อเกิดปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงเป็นสารโพลิเมอร์ (polymerization) การเพาะเลี้ยงที่มีการเติมยูเรีย 5 กรัมต่อลิตร เกิดการลดลงของปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตเช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงที่เติมลิกนิน 2.5 กรัมต่อลิตร แต่ค่าลิกนินที่ไม่ละลายในสารละลายกรด (acid insoluble lignin) เพิ่มขึ้นต่ำกว่าเนื่องจากค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสต่ำกว่านั้นเอง ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเชื้อที่เติมยูเรียความเข้มข้นสูงขึ้นไม่ส่งเสริมการย่อยลิกนินที่อุณหภูมิสูง (45 องศาเซลเซียส) จากค่าพีเอชของอาหารเพาะเลี้ยงมีค่าเป็นด่างมากกว่าพีเอชตั้งต้นแสดงผลของอุณหภูมิสูงที่ส่งเสริมปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงเป็นโพลิเมอร์ลิกนิน (polymerization) โดยเอนไซม์แลคเคสที่เชื้อสร้างขึ้นเพียงปฏิกิริยาเดียวไม่ส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียและการย่อยลิกนิน สังเกตจากค่าสีสุดท้ายที่เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบค่าสีตั้งต้น

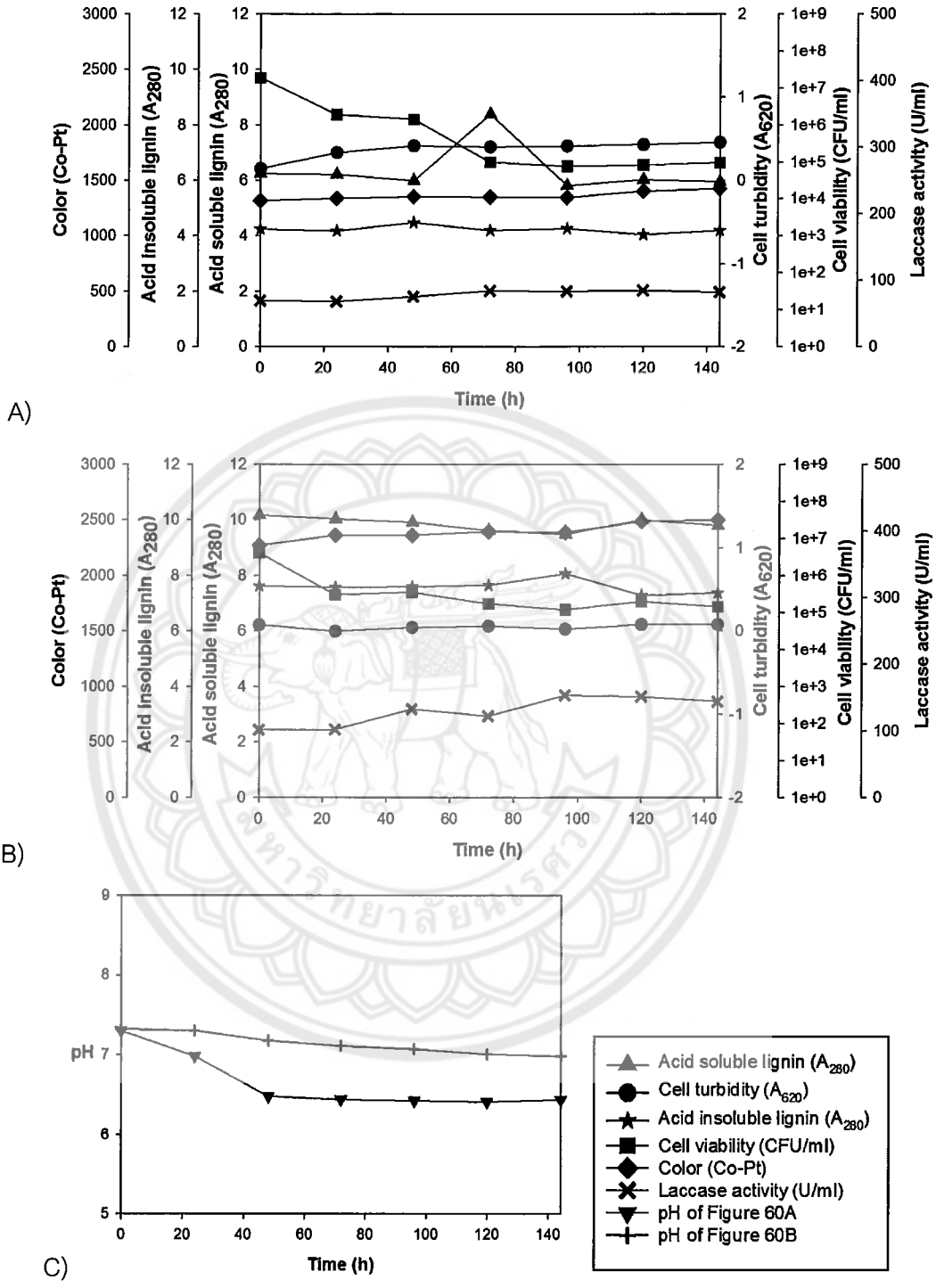
การทดลองเพิ่มเติมเพื่อยืนยันความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการเจริญและการย่อยลิกนินของ 2B2-1ligB โดยความเข้มข้นของ $NaNO_3$ ที่ต่ำกว่า 2.5 กรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อMSM ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส แสดงผลดังภาพ 59



ภาพ 59 ปฏิกิริยาของ 2B2-1LigB ที่เกิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ทำการเติมลิกนิน A) 1 กรัมต่อลิตร B) 2 กรัมต่อลิตร กลูโคส 5 กรัมต่อลิตร และมี $NaNO_3$ เป็นแหล่งไนโตรเจน 1 กรัมต่อลิตร

จากภาพ 59 แสดงการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่มีความเข้มข้นลิกนิน 1 กรัมต่อลิตร และมี $NaNO_3$ ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร พบการเพิ่มขึ้นของค่าความขุ่นที่ 48 ชั่วโมง แต่ค่าเซลล์ที่มีชีวิตกลับให้ค่าลดลงอย่างต่อเนื่อง แต่จากค่าพีเอชบ่งชี้ว่าเชื้อสามารถมีกิจกรรมในปฏิกิริยาในช่วง 48 ชั่วโมง เนื่องจากพบการลดลงของค่าพีเอชในปฏิกิริยา ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบปฏิกิริยาการไม่เติมแหล่งไนโตรเจน ภาพที่ 40A พบว่ามีรูปแบบของปฏิกิริยาคล้ายคลึงกัน ในเรื่องรูปแบบการเจริญของเซลล์และปริมาณเอนไซม์แลคเคส ส่วนในปฏิกิยาที่มีการเพิ่มความเข้มข้นลิกนิน 2 กรัมต่อลิตร แต่ยังคงความเข้มข้นของ $NaNO_3$ ที่ 1 กรัมต่อลิตร พบรูปแบบของปฏิกิริยาคล้ายกับการไม่เติมแหล่งไนโตรเจน (ภาพ 41B) แตกต่างที่ค่าลิกนินที่ละลายในสารละลายกรด (acid soluble lignin) เพิ่มขึ้น ณ ชั่วโมงสุดท้าย อาจเนื่องจากเกิดการย่อยลิกนิน ซึ่งมีการปลดปล่อยสารประกอบฟีนอลขนาดเล็กออกจากโพลิเมอร์ลิกนินขนาดใหญ่ ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของค่าการดูดกลืนแสงยูวีที่ 280 นาโนเมตร ซึ่งไม่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาการสร้างสายโพลิเมอร์ลิกนิน (polymerization) โดยเอนไซม์แลคเคส เนื่องจากไม่ถูกส่งเสริมปฏิกิริยาด้วยอุณหภูมิสูง

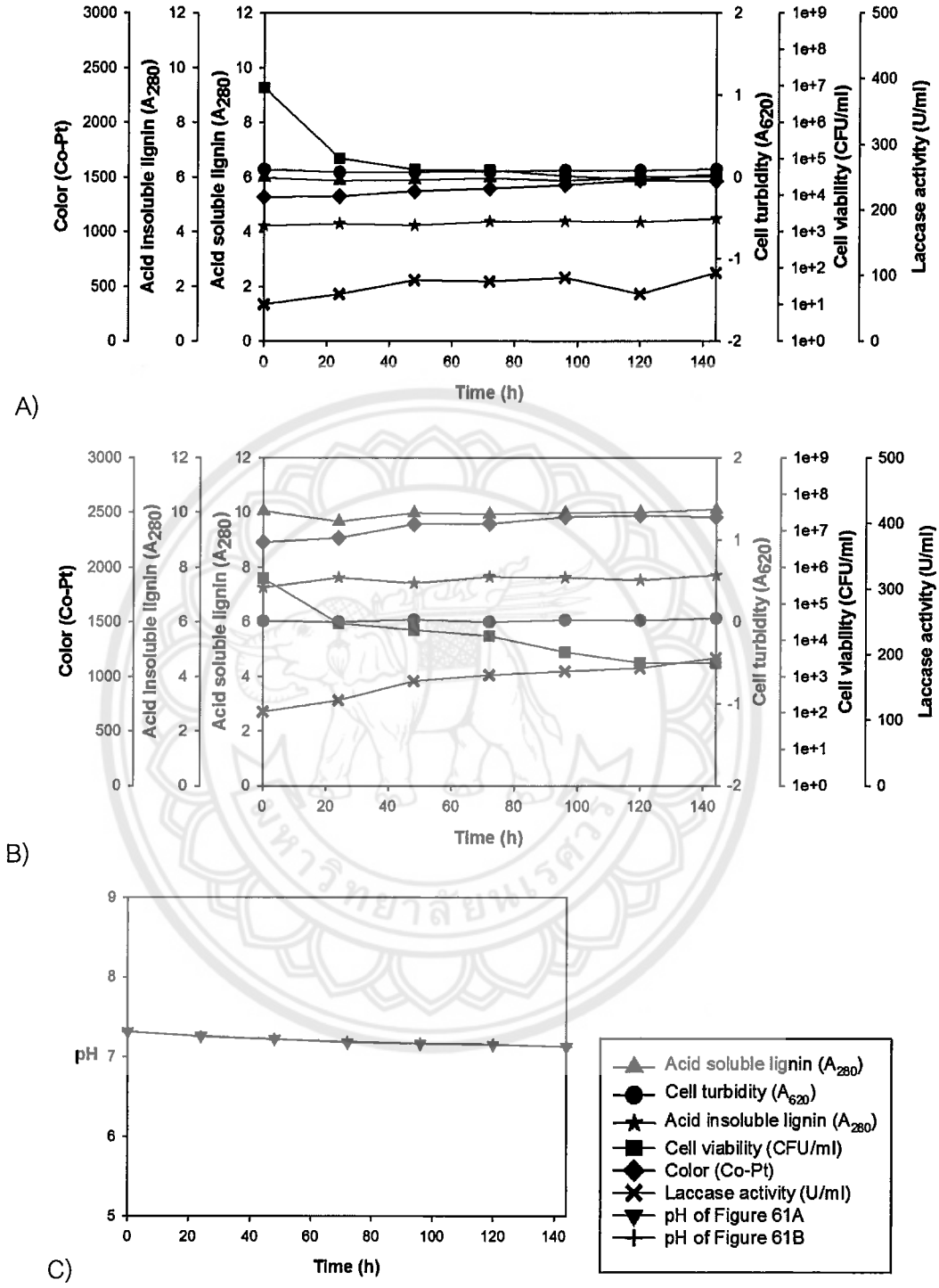
การศึกษาอิทธิพลของ $NaNO_3$ ความเข้มข้นต่ำ (1 กรัมต่อลิตร) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แสดงดังภาพ 60



ภาพ 60 ปฏิกิริยาของ 2B2-1LigB ที่เกิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ทำการเติมลิกนิน A) 1 กรัมต่อลิตร B) 2 กรัมต่อลิตร กลูโคส 5 กรัมต่อลิตร และมี $NaNO_3$ เป็นแหล่งไนโตรเจน 1 กรัมต่อลิตร

จากภาพ 60 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่มีความเข้มข้นลิกนิน 1 กรัมต่อลิตร และมี $NaNO_3$ ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร พบการเพิ่มขึ้นของค่าความขุ่นเซลล์ที่ 48 ชั่วโมง แต่ค่าเซลล์ที่มีชีวิตกลับให้ค่าลดลงอย่างต่อเนื่อง แต่จากค่าพีเอชบ่งชี้ว่า เชื้อสามารถมีกิจกรรมในปฏิกิริยาในช่วง 48 ชั่วโมง เนื่องจากพบการลดลงของค่าพีเอชในปฏิกิริยา และพบการเพิ่มขึ้นของค่าดูดกลืนแสงยูวีชั่วโมงที่ 72 จากนั้นค่าดูดกลืนแสงลดลง เนื่องจากการเจริญของเซลล์มีผลต่อการย่อยลิกนินทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของค่าลิกนินที่ละลายในสารละลายกรดที่ชั่วโมง 72 หลังจากนั้นค่าดูดกลืนแสงลดลงเป็นผลมาจากเซลล์ที่มีชีวิตนำสารประกอบขนาดเล็กที่ได้จากการย่อยลิกนินไปใช้สำหรับการคงปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบปฏิกิริยาการไม่เติมแหล่งไนโตรเจน (ภาพ 42A) พบว่า มีรูปแบบของปฏิกิริยาคล้ายคลึงกัน ในเรื่องรูปแบบการเจริญของเซลล์และปริมาณเอนไซม์แลคเคส ส่วนในปฏิกิริยาที่มีการเพิ่มความเข้มข้นลิกนิน 2 กรัมต่อลิตร (ภาพ 60B) แต่ยังคงความเข้มข้นของ $NaNO_3$ ที่ 1 กรัมต่อลิตร พบรูปแบบของปฏิกิริยาคล้ายกับการไม่เติมแหล่งไนโตรเจน (ภาพ 42B) แตกต่างที่ค่าลิกนินที่ไม่ละลายในสารละลายกรด (acid insoluble lignin) เพิ่มขึ้น ณ ชั่วโมงที่ 96 เนื่องจากเกิดปฏิกิริยาการสร้างสายโพลิเมอร์ลิกนิน (polymerization) โดยเอนไซม์แลคเคสทั้งนี้เนื่องจากถูกส่งเสริมปฏิกิริยาด้วยอุณหภูมิสูง (40 องศาเซลเซียส)

การศึกษาอิทธิพลของ $NaNO_3$ ความเข้มข้นต่ำ (1 กรัมต่อลิตร) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส แสดงดังภาพ 61

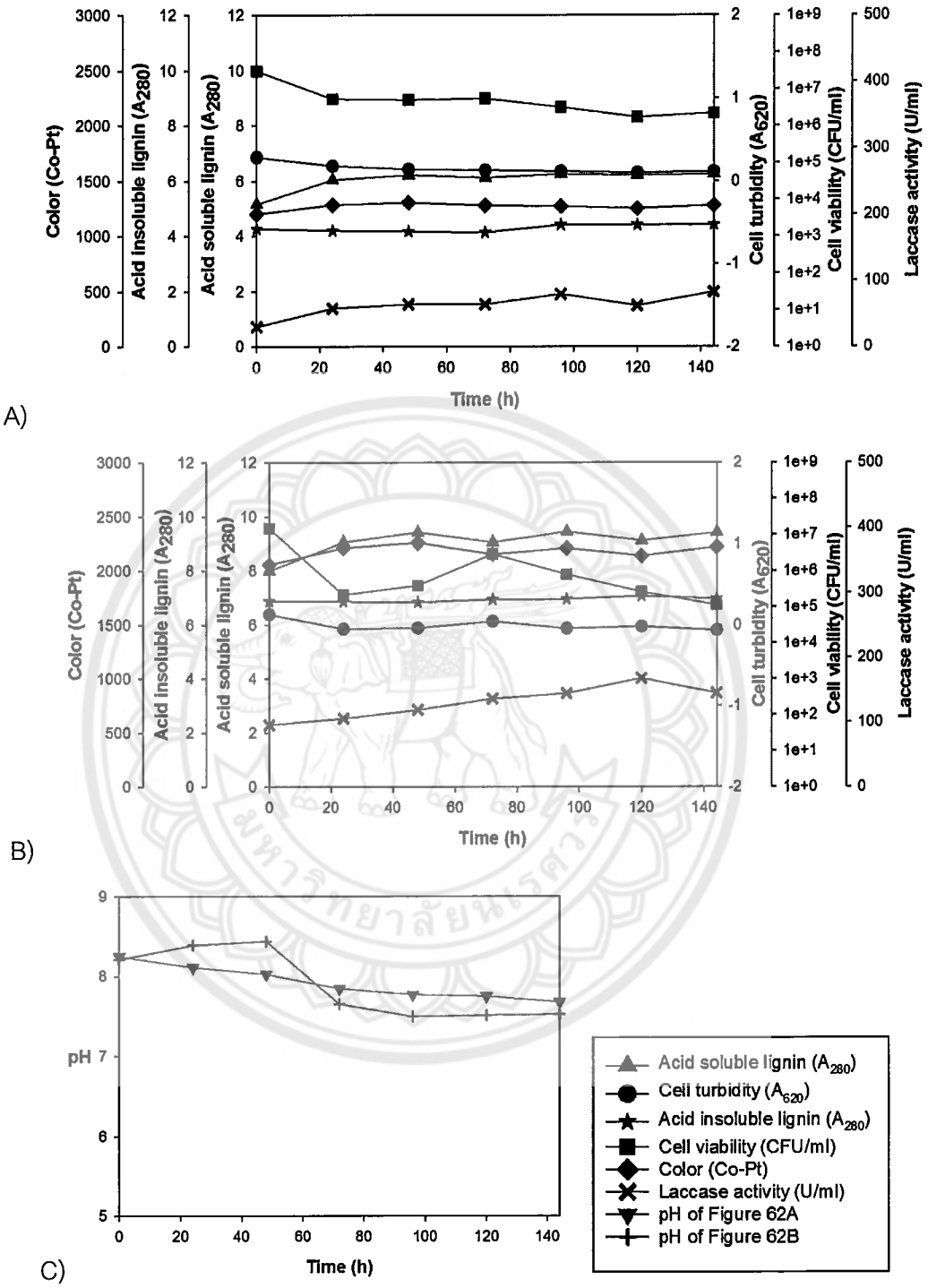


ภาพ 61 ปฏิกิริยาของ 2B2-1LigB ที่เกิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ทำการเติมลิกนิน A) 1 กรัมต่อลิตร B) 2 กรัมต่อลิตร กลูโคส 5 กรัมต่อลิตร และมี $NaNO_3$ เป็นแหล่งไนโตรเจน 1 กรัมต่อลิตร

จากภาพ 61 แสดงการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่มีความเข้มข้นลิกนิน 1 กรัมต่อลิตร และมี $NaNO_3$ ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พบการลดลงของเซลล์หลังจาก 24 ชั่วโมง จานั้นเซลล์พยายามรักษาปริมาณเซลล์ให้คงที่ ซึ่งไม่พบการเพิ่มขึ้นของเซลล์ แสดงถึงผลของอุณหภูมิในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบปฏิกิริยาการไม่เติมแหล่งไนโตรเจน ภาพ 53A พบว่าเซลล์ยังสามารถเพิ่มปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตได้ในชั่วโมงที่ 72 แสดงผลของ $NaNO_3$ ที่มีผลในการยับยั้งเซลล์ที่มีชีวิต

ส่วนในปฏิกิริยาที่มีการเพิ่มความเข้มข้นลิกนิน 2 กรัมต่อลิตร แต่ยังคงความเข้มข้นของ $NaNO_3$ ที่ 1 กรัมต่อลิตร พบรูปแบบของปฏิกิริยาคล้ายกับการไม่เติมแหล่งไนโตรเจน (ภาพ 53B) โดยปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตลดลงอย่างต่อเนื่อง ค่าสีและลิกนินในชั่วโมงสุดท้ายมีค่าสูงมากกว่าค่าเริ่มต้น อย่างไรก็ตามเมื่อสังเกตค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้น แสดงให้เห็นถึงอิทธิพลของอุณหภูมิสูง (45 °C) ในการยับยั้งเซลล์

การศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนยูเรียความเข้มข้นสูง เท่ากับ 0.75% (w/v) ในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีการเติมลิกนินแตกต่างกัน อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส แสดงผลดังภาพ 62

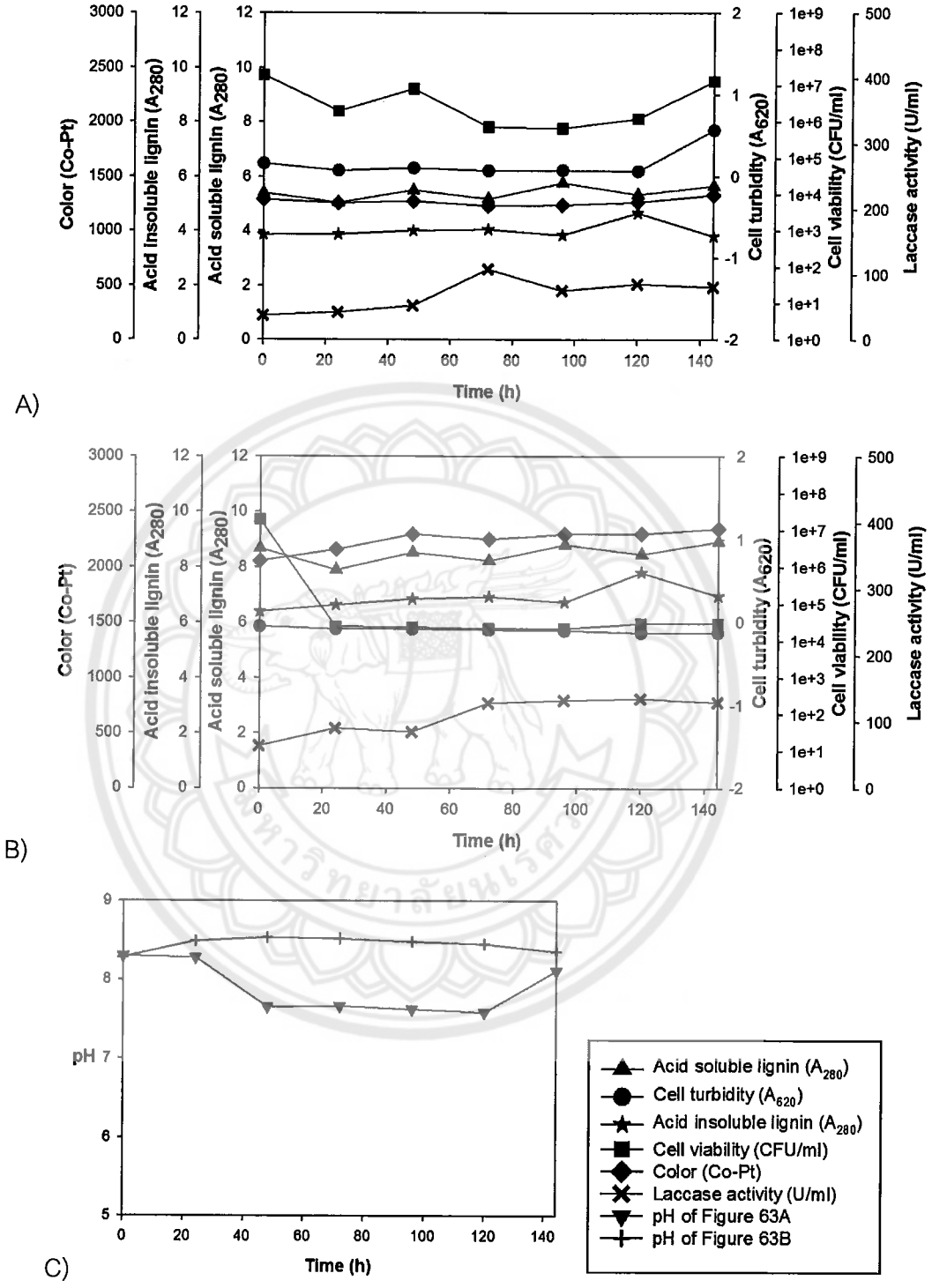


ภาพ 62 ปฏิกิริยาของ 2B2-1 LigB ที่เกิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ทำการเติมลิกนิน A) 1 กรัมต่อลิตร B) 2 กรัมต่อลิตร กลูโคส 5 กรัมต่อลิตร และมี Urea เป็นแหล่งไนโตรเจน 7.5 กรัมต่อลิตร

จากภาพ 62 การเติมยูเรียที่ความเข้มข้นสูง 7.5 กรัมต่อลิตร ส่งผลเสียต่อปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตที่ความเข้มข้นลิกนิน 1 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ซึ่งคล้ายกับการเติมยูเรียความเข้มข้น 2.5 กรัมต่อลิตร (ภาพ 45A) ในขณะที่การเติมยูเรียความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร เชื้อสามารถเพิ่มปริมาณเซลล์ในชั่วโมงที่ 72 ซึ่งเป็นสภาวะที่ให้การย่อยลิกนินสูงสุด แสดงให้เห็นถึงความจำเพาะของจุลินทรีย์ที่มีต่อความเข้มข้นสารอาหาร

ส่วนการเติมยูเรียความเข้มข้นสูงและความเข้มข้นลิกนิน 2 กรัมต่อลิตร พบว่าเซลล์สามารถเพิ่มปริมาณได้ในชั่วโมงที่ 72 สอดคล้องกับค่าพีเอชที่ลดลงในชั่วโมงที่ 72 เช่นเดียวกัน แต่อย่างไรก็ตามไม่ส่งผลต่อลิกนินที่อยู่ในระบบ เมื่อเปรียบเทียบผลของความเข้มข้นยูเรียทั้ง 3 ความเข้มข้น ได้แก่ 2.5 (ภาพ 49A), 5 (ภาพ 49B) และ 7.5 (ภาพ 62B) ที่ความเข้มข้นลิกนิน 2 กรัมต่อลิตร พบว่าความเข้มข้นยูเรียที่ 5 กรัมต่อลิตร (ภาพ 49B) ช่วยส่งเสริมให้เซลล์เพิ่มปริมาณเซลล์ ณ ชั่วโมงที่ 48 ซึ่งรวดเร็วกว่าการเติมยูเรียความเข้มข้นสูง (7.5 กรัมต่อลิตร)

การศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนยูเรียความเข้มข้นสูง เท่ากับ 0.75% (w/v) ในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีการเติมลิกนินแตกต่างกัน อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แสดงผลดังภาพ 63

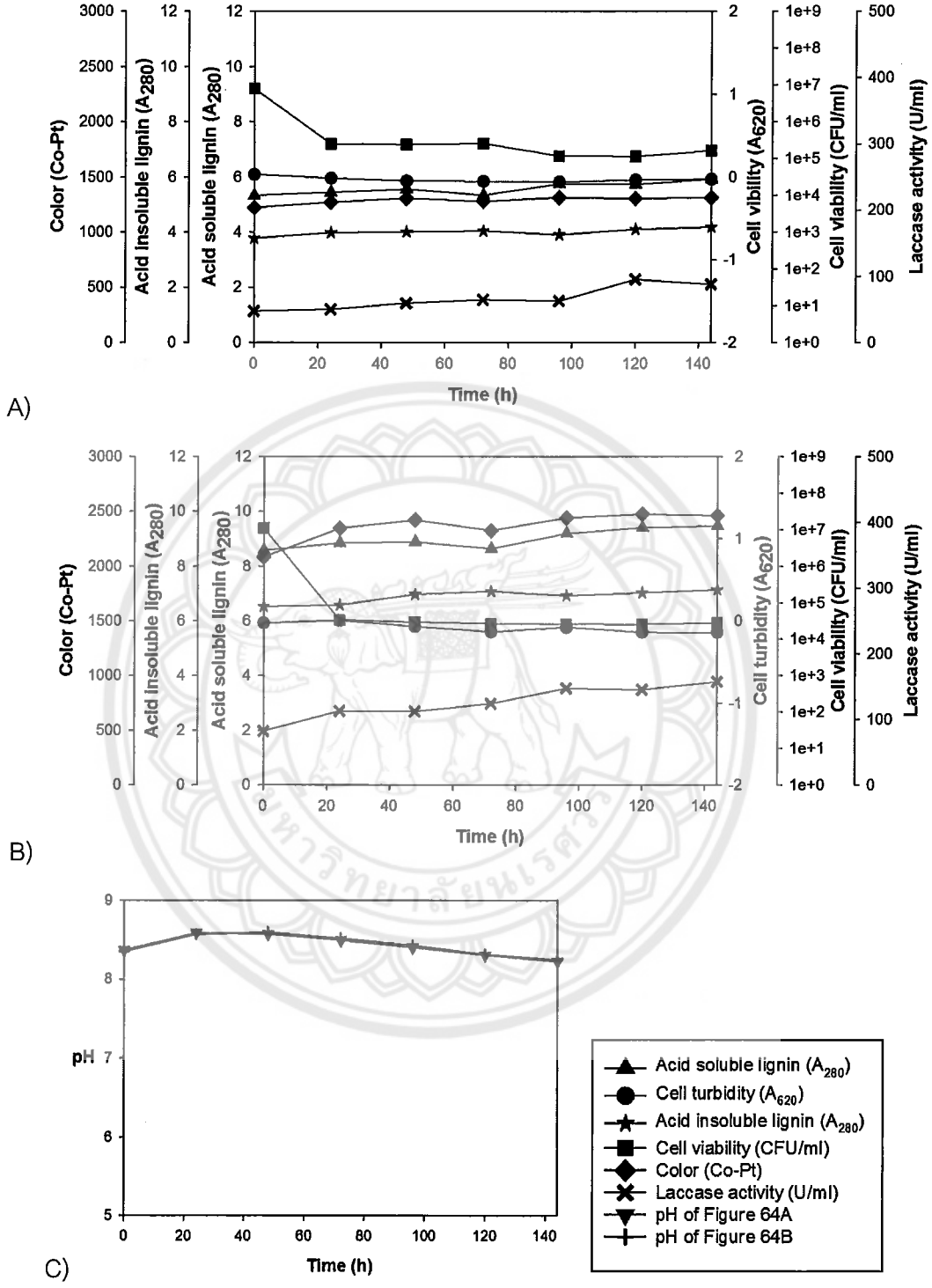


ภาพ 63 ปฏิกิริยาของ 2B2-1LigB ที่เกิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ทำการเติมลิกนิน A) 1 กรัมต่อลิตร B) 2 กรัมต่อลิตร กลูโคส 5 กรัมต่อลิตร และมี Urea เป็นแหล่งไนโตรเจน 7.5 กรัมต่อลิตร

จากภาพ 63 การเติมยูเรียความเข้มข้นสูง 7.5 กรัมต่อลิตร ลงในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีลิกนินความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ให้ผลการเจริญของเซลล์คล้ายกับการเติมยูเรียความเข้มข้น 2.5 กรัมต่อลิตร (ภาพ 47A) ซึ่งเซลล์สามารถเจริญได้ในชั่วโมงที่ 48 สอดคล้องกับค่าพีเอชที่ลดลงที่ 48 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามไม่พบการย่อยลิกนินในปฏิกิริยา แต่พบปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงเป็นสายโพลิเมอร์ลิกนินที่ 120 ชั่วโมง

ส่วนการเติมยูเรียความเข้มข้นสูง (7.5 กรัมต่อลิตร) ในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีลิกนินความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร พบเซลล์ลดลงอย่างรวดเร็วที่ 24 ชั่วโมง จากนั้นเซลล์จะคงปริมาณเซลล์ให้คงที่ ซึ่งคล้ายกับปฏิกิริยาที่มีการเติมยูเรียความเข้มข้น 2.5 กรัมต่อลิตร (ภาพ 51A) ที่สภาวะเดียวกันจากค่าพีเอชยืนยันว่า ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในระบบไม่ได้เกิดจากกิจกรรมหรือเมทาบอลิซึมของแบคทีเรีย เนื่องจากค่าพีเอชเข้าสู่สภาวะด่างตลอดช่วงการเพาะเลี้ยง

การศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนยูเรียความเข้มข้นสูง เท่ากับ 0.75% (w/v) ในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีการเติมลิกนินแตกต่างกัน อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส แสดงผลดังภาพ 64



ภาพ 64 ปฏิกิริยาของ 2B2-1LigB ที่เกิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ทำการเติมลิกนิน A) 1 กรัมต่อลิตร B) 2 กรัมต่อลิตร กลูโคส 5 กรัมต่อลิตร และมี Urea เป็นแหล่งไนโตรเจน 7.5 กรัมต่อลิตร

จากภาพ 64 ผลของยูเรียความเข้มข้นสูงในการเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิสูง (45 องศาเซลเซียส) พบการเติมยูเรียความเข้มข้นสูงไม่สามารถกระตุ้นการเจริญของเชื้อได้ โดยเชื้อมีปริมาณลดลงหลังจาก 24 ชั่วโมง และพยายามรักษาปริมาณเซลล์ให้คงที่แม้การเพาะเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้นที่ลิกนินต่ำ (1 กรัมต่อลิตร) เซลล์ไม่สามารถปรับตัวและเพิ่มการเจริญขึ้นมาได้ ส่วนค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสที่ความเข้มข้นลิกนินสูง (2 กรัมต่อลิตร) ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสมากกว่าในการเพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้นลิกนินต่ำ

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดแยกได้รหัส 2B2-1LigB ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงแตกต่างกันมีผลต่อการเจริญของเชื้อ การย่อยลิกนินและการเปลี่ยนแปลงเป็นสารโพลิเมอร์ลิกนิน สรุปสภาวะที่เหมาะสมได้ดังนี้ ความเข้มข้นของลิกนินมีผลต่อการเจริญของเชื้อโดยเชื้อมีความสามารถในการเจริญได้ที่ความเข้มข้นลิกนินต่ำ (1 กรัมต่อลิตร) ได้ดีกว่าลิกนินที่ความเข้มข้นสูง (2 กรัมต่อลิตร) เช่นเดียวกับผลของอุณหภูมิ โดยอุณหภูมิต่ำ (35 องศาเซลเซียส) ช่วยส่งเสริมการเจริญในอาหารที่มีองค์ประกอบของลิกนินได้ดีกว่าอุณหภูมิสูง แหล่งไนโตรเจนและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนมีผลส่งเสริมการเจริญ พบว่ายูเรียมีผลในการส่งเสริมการเจริญของเชื้อได้ดีกว่าโซเดียมไนเตรทที่ความเข้มข้น 0.5 %(w/v) หรือ 5 กรัมต่อลิตร เมื่อเชื้อมีความสามารถในการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ เชื้อจะย่อยลิกนินโพลิเมอร์ขนาดใหญ่โดยการสร้างเอนไซม์แลคเคสควบคู่กับการเจริญให้ได้เป็นอนุมูลอิสระฟีนอลมวลโมเลกุลต่ำ ซึ่งไม่เสถียร ลักษณะการย่อยลิกนินแสดงได้จากค่าลิกนินที่ไม่ละลายในสารละลายกรด (acid insoluble lignin) ลดลง (Ulmer et al., 1983) ส่วนค่าลิกนินที่ละลายในสารละลายกรด (acid soluble lignin) และค่าสีที่ลดลงในช่วงเริ่มต้นการเพาะเลี้ยงนั้นเกิดจากเชื้อใช้อนุพันธุ์ลิกนินเป็นแหล่งคาร์บอน (Abhay Raj, M. M., Krishna Reddy, & Ram Chandra, et al., 2007) จากนั้นค่าลิกนินและค่าสีจะเพิ่มขึ้นเนื่องจากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์แลคเคสที่อยู่ในปฏิกิริยา ทำให้เกิดปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงเป็นสารโพลิเมอร์ลิกนิน (polymerization) (Jönsson et al., 1998) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในขณะเดียวกับการย่อยลิกนิน (lignin degradation)โดยมีเซลล์จุลินทรีย์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

ปัจจุบันนิยมใช้เอนไซม์แลคเคสบริสุทธิ์ที่ได้จากเชื้อราเร่งปฏิกิริยาการต่อสายโพลิเมอร์ลิกนิน เพื่อต้องการให้ได้มวลโมเลกุลลิกนินที่มีขนาดใหญ่ขึ้น เพื่อเพิ่มคุณสมบัติการดูดซับและการแพร่กระจายของโมเลกุลลิกนิน (Madad et al., 2013) ในขณะเดียวกันการใช้เอนไซม์จากแบคทีเรียได้มีการศึกษาการเร่งปฏิกิริยาต่อสารโพลิเมอร์ลิกนินเช่นกัน Gouveia et al. (2012) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงเป็นสารโพลิเมอร์ลิกนินของลิกนินในน้ำล้างเยื่อกระดาษจากไม้ยูคาลิปตัส

(*Eucalyptus globulus*) โดยเอนไซม์แลคเคสจาก *Myceliopthora thermophile* โดยแบ่งเป็น 2 ปัจจัย คือการเติมและไม่เติมสารประกอบมวลโมเลกุลต่ำ พบมวลโมเลกุลเพิ่มขึ้นอยู่ในช่วง 4 –21 เท่า และปัจจัยการเติมสารประกอบมวลโมเลกุลต่ำไม่ช่วยส่งเสริมระดับการเปลี่ยนแปลงเป็นสารโพลิเมอร์ลิกนิน (polymerization degree) ต่อมา Gouveia et al. (2013) ศึกษาสภาวะในด้านปัจจัยของพีเอช อุณหภูมิ ความเข้มข้นเอนไซม์และระยะเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงเป็นสารโพลิเมอร์ ลิกนินของน้ำล้างเยื่อกระดาษจากไม้ยูคาลิปตัส (*E. globulus*) และส่วนผสมของน้ำล้างเยื่อกระดาษจากสนและไม้ยูคาลิปตัส (*Pinus pinaster*/*E. globulus*) พบสภาวะที่เหมาะสมพีเอช 7.3 อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นเอนไซม์ 2 U/ml เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง ให้โพลิเมอร์มวลโมเลกุลเพิ่มขึ้น 69 เท่า เมื่อเทียบกับมวลโมเลกุลเริ่มต้นโดยขึ้นอยู่กับวัตถุดิบ

การใช้เอนไซม์บริสุทธิ์ถูกเปลี่ยนรูปแบบมาเป็นการใช้ตัวเซลล์โดยตรง จากการรายงานของ Brzonova et al. (2017) ใช้เชื้อรา *Coriolus versicolor* เพื่อดัดแปลงโมเลกุลลิกนินที่มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำให้อยู่ในรูปของโพลิเมอร์ที่ละลายน้ำได้ ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิต anionic hydrogels ดำเนินการเตรียมหัวเชื้อ (inoculum) บนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อรา ประกอบด้วย Kraft lignin 3 กรัมต่อลิตร กับหญ้าปอแก้วแห้ง (dry kenaf grass) ปริมาณ 3 กรัมต่อลิตร และวุ้น 4.5 กรัม ในปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ 300 มิลลิลิตร ทำการฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จึงเทใส่จานเพาะเลี้ยง ทำการถ่ายเชื้อราและเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน

ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ใช้ในการดัดแปลงลิกนินทางชีวภาพในปริมาตร 100 มิลลิลิตร ประกอบด้วย Kraft lignin ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร และ DMSO ความเข้มข้น 2% (v/v) จากนั้นทำการถ่ายเชื้อราโดยการตัดอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเส้นใยเชื้อราขนาด 5x5 มิลลิเมตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เขย่าที่อุณหภูมิ 29 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6 วัน พบปฏิกิริยา oxidative cross linking เกิดขึ้น ซึ่งเพิ่มค่ามวลโมเลกุลของลิกนิน ค่าน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยจำนวน (MW_n) จาก 1,750 Da เป็น 4,780 Da และค่าน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยน้ำหนัก (MW_w) จาก 4,690 ถึง 28,760 Da โดยการเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์แลคเคสที่สร้างจากเชื้อรา ทำหน้าที่ย่อยลิกนิน ขณะเดียวกันเกิดปฏิกิริยาการต่อสายโพลิเมอร์ สมดุลของปฏิกิริยาระหว่างการย่อยลิกนินและการต่อสายโพลิเมอร์ลิกนินขึ้นอยู่กับอุณหภูมิของปฏิกิริยา การเติมสารละลาย แหล่งกำเนิดเอนไซม์และโครงสร้างของลิกนิน (Brzonova et al., 2017)

การใช้จุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์แลคเคสโดยตรงมีประโยชน์ในด้านลดขั้นตอนการผลิตเอนไซม์หรือลดค่าใช้จ่ายที่จะต้องทำการซื้อหาเอนไซม์ ซึ่งอาศัยสภาวะที่เหมาะสมหรือเฉพาะไม่ว่าจะเป็นสารอาหารหรือสภาวะแวดล้อมช่วยส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์ เมื่อจุลินทรีย์เจริญในอาหารที่มีลิกนิน เชื้อจะสร้างเอนไซม์แลคเคสออกมาย่อยลิกนิน หรือลิกนินในอาหารเลี้ยงเชื้อทำหน้าที่เป็นตัวเหนี่ยวนำให้เชื้อสร้างเอนไซม์ ถ้าเชื้อมีความสามารถในการเจริญในระบบได้จะมีโอกาสช่วยให้ลิกนินที่ขึ้นชื่อว่าย่อยได้ยาก สามารถถูกย่อยได้โดยเชื้อและเอนไซม์ ถ้าเชื้อไม่สามารถเจริญได้ แต่ในระบบมีเอนไซม์อยู่ปฏิกิริยาการสร้างสายโพลิเมอร์ลิกนินจะเกิดขึ้นทันที ซึ่งปฏิกิริยานี้ถูกส่งเสริมโดยอุณหภูมิสูงในระบบ

จากงานวิจัยเหล่านี้ทำให้ผู้วิจัยเล็งเห็นถึงความสำคัญในการดัดแปลงโพลิเมอร์ลิกนินโดยเอนไซม์แลคเคส ซึ่งเป็นปฏิกิริยาคู่กับการย่อยลิกนิน และการประยุกต์ใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยลิกนินลงในปฏิกิริยา โดยจะนำสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยลิกนินบริสุทธิ์ทางการค้า (Aldrich) ของเชื้อที่คัดแยกได้รหัส 2B2-1LigB นี้ (แผนการดำเนินการวิจัยตอนที่ 2) ไปประยุกต์ใช้กับน้ำล้างเยื่อกระดาษ (แผนการดำเนินการวิจัยตอนที่ 3) ซึ่งน้ำล้างเยื่อกระดาษมีคุณสมบัติแตกต่างจากลิกนินทางการค้าหลายประการ โดยประเด็นหลัก คือ ลิกนินในน้ำล้างเยื่อกระดาษมีขนาดเล็กหรือน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ทำให้ไม่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ทางการค้าได้ เนื่องจากสภาวะการย่อยด้วยด่างเข้มข้นมีผลต่อการตัดพันธะลิกนินในขั้นตอนการเตรียมเยื่อกระดาษ (soda pulp process) (Upton, & Kasko, 2016)

ดังนั้นการนำลิกนินในน้ำล้างเยื่อกระดาษไปใช้ประโยชน์จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการดัดแปลงโครงสร้างลิกนินโดยปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงเป็นสารโพลิเมอร์ลิกนิน ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่สามารถเพิ่มน้ำหนักโมเลกุลลิกนินได้ นอกจากนี้น้ำล้างเยื่อกระดาษเป็นแหล่งของสารประกอบฟีนอลอิสระจำนวนมาก ซึ่งมีผลต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ ทำให้มีจุลินทรีย์ไม่กี่สปีชีร์ที่จะสามารถทนต่อน้ำล้างเยื่อกระดาษ หรือปรับตัวเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ได้

การศึกษาความเข้มข้นน้ำล้างเยื่อกระดาษที่เหมาะสม

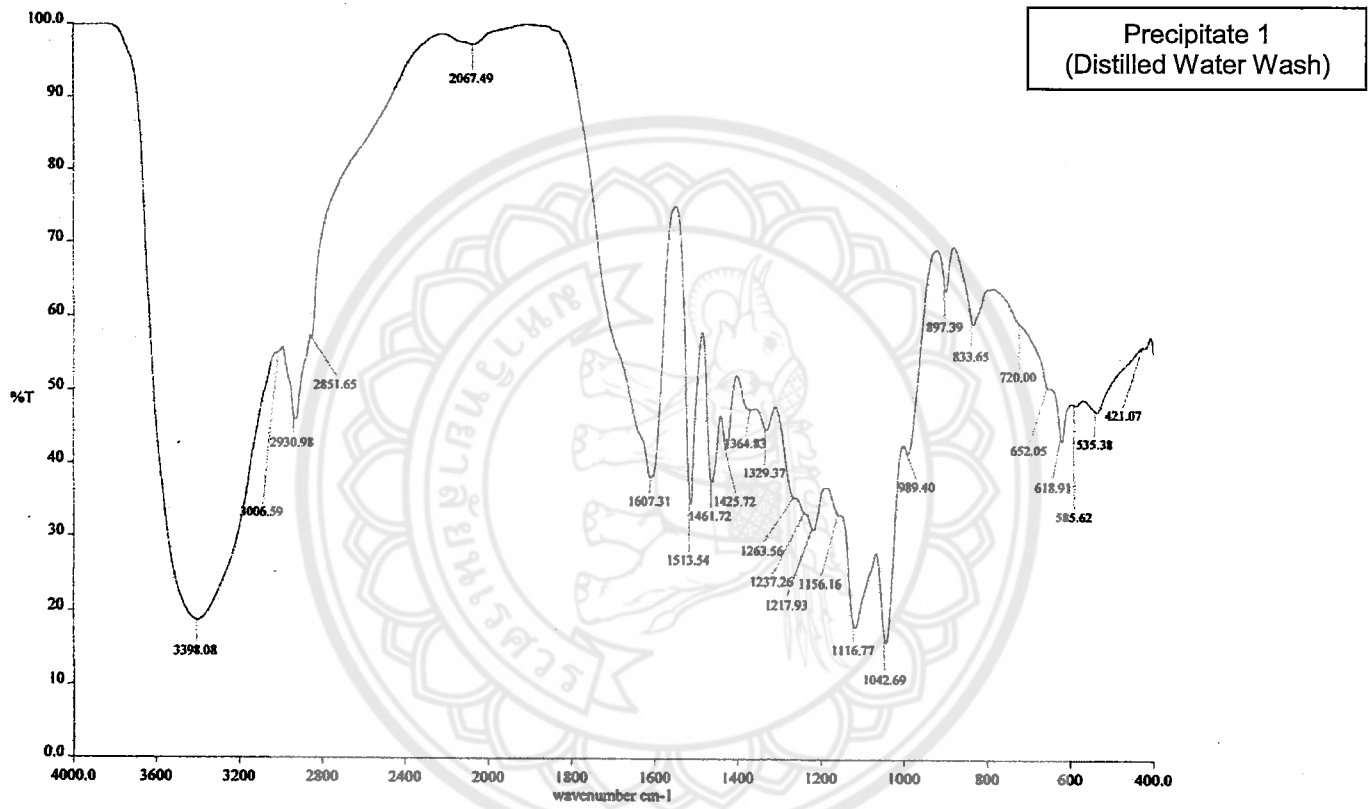
การนำน้ำล้างเยื่อกระดาษมาประยุกต์ใช้ร่วมกับแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ (แบคทีเรียรหัส 2B2-1LigB หรือ TISTR no. 2580) โดยนำสภาวะที่เหมาะสมซึ่งได้จากขั้นตอนที่ 2 มาใช้ในการศึกษาการย่อยและการเปลี่ยนแปลงเป็นโพลิเมอร์ลิกนินมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องทราบความเข้มข้นของลิกนินในน้ำล้างเยื่อกระดาษ และพารามิเตอร์ทางสิ่งแวดล้อมอื่นๆ ของน้ำล้างเยื่อกระดาษ

1. **วิเคราะห์ปริมาณลิกนินในน้ำล้างเยื่อกระดาษ**

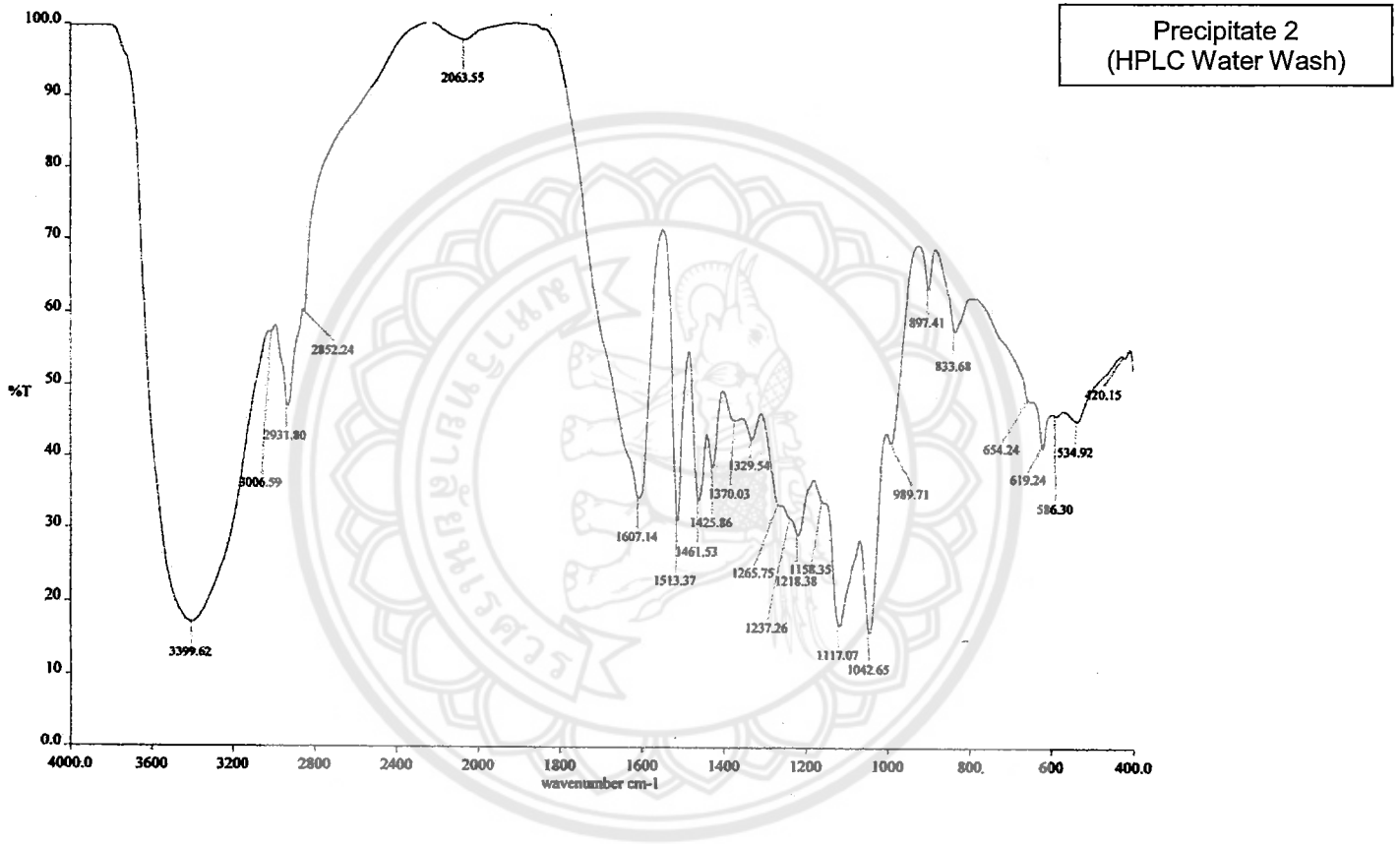
การวิเคราะห์ปริมาณลิกนินโดยวิธีการตกตะกอนลิกนินด้วยกรด ดัดแปลงจากวิธีของ Minu et al. (2012) แยกลิกนินออกจากน้ำล้างเยื่อกระดาษด้วย H_2SO_4 เข้มข้น ด้วยการปรับพีเอช 7.0 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที พบว่าเกิดการแยกชั้นของตะกอนกับส่วนของเหลวซึ่งยังไม่ใส (ขุ่น) ดังนั้นผู้วิจัยจึงทำการปรับพีเอชต่ำ เท่ากับ 1.54 (น้ำล้างเยื่อกระดาษปริมาตร 500 มิลลิลิตรผสมกับ H_2SO_4 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง พบว่าเกิดการแยกชั้นระหว่างตะกอนกับของเหลวได้ชัดเจน ซึ่งส่วนของของเหลว (supernatant) มีลักษณะเป็นสีเหลืองเข้มใส จึงทำการเทของเหลวทิ้ง แล้วล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น และ HPLC water จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นเทส่วนตะกอนลงในถ้วยชั่งน้ำหนัก อบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ได้ตะกอนแห้ง แสดงดังภาพ 65

ภาพ 65 ตะกอนแห้งที่ได้จากการตกตะกอนน้ำล้างเยื่อกระดาษด้วยกรด

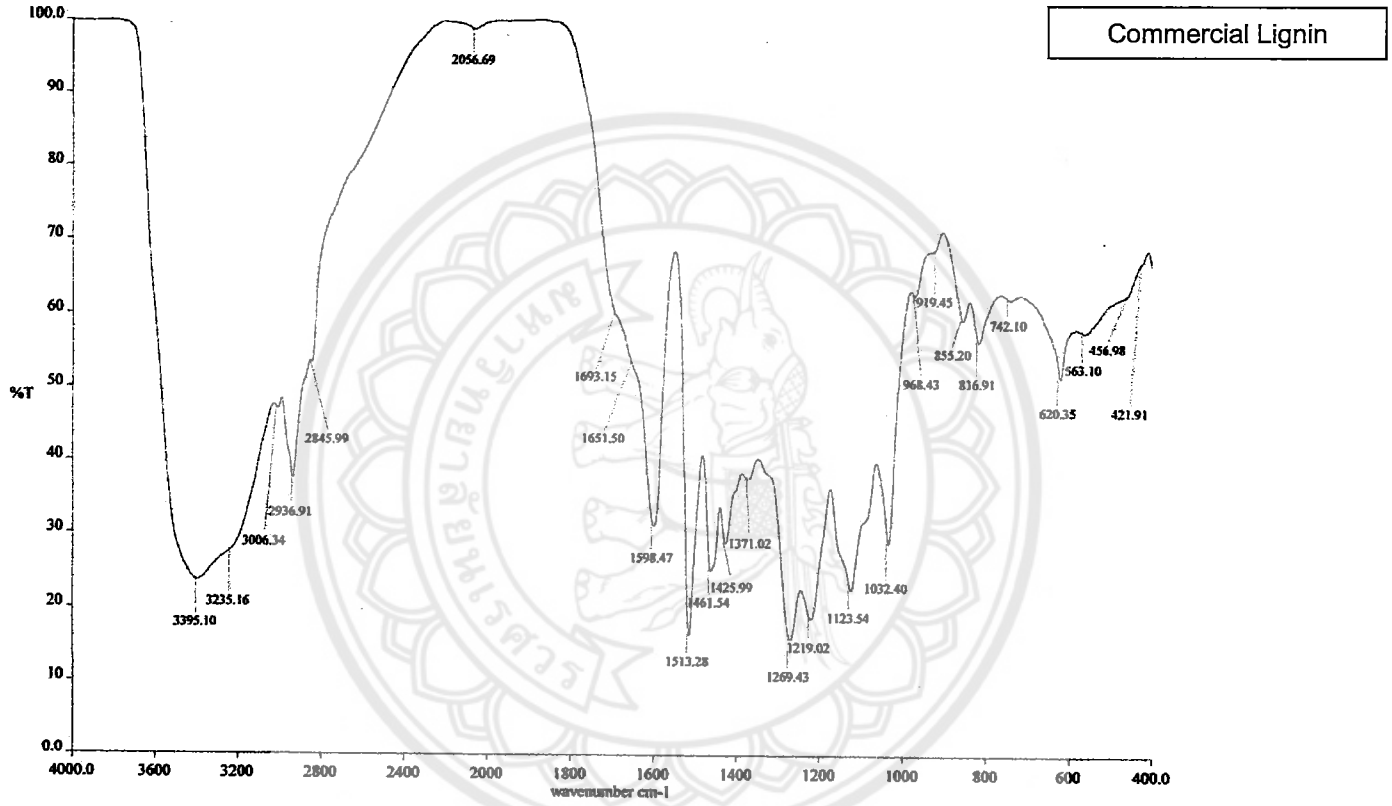
นำตะกอนที่ได้ชั่งน้ำหนักแห้ง แล้วบดตะกอนด้วยโกร่ง แล้วนำผงที่ได้มาตรวจสอบคุณสมบัติของสารด้วยการเปรียบเทียบกับลิกนินทางการค้า Lignin, alkali (Aldrich) ด้วยเทคนิค FTIR (Fourier Transform Infra-Red Spectroscopy) (Minu et al., 2012; Luong et al., 2012) แสดงดังภาพ 66



ภาพ 66 การเปรียบเทียบค่าความยาวคลื่น (FT-IR) ระหว่างลิกนินที่สกัดได้จากน้ำล้างเยื่อกระดาษและลิกนินทางการค้า


Precipitate 2
(HPLC Water Wash)
%T
wavenumber cm-1
100.0
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0.0
4000.0
3600
3200
2800
2400
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400.0
3399.62
3006.59
2931.80
2852.24
2063.55
1607.14
1513.37
1461.53
1425.86
1370.03
1329.54
1265.75
1218.38
1158.35
1237.26
1117.07
1042.65
989.71
897.41
833.68
720.15
654.24
619.24
586.30
534.92

ภาพ 66 (ต่อ)


Commercial Lignin
100.0
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0.0
%T
4000.0
3600
3200
2800
2400
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400.0
wavenumber cm-1
3395.10
3235.16
3006.34
2936.91
2845.99
2056.69
1693.15
1651.50
1598.47
1513.28
1461.54
1425.99
1371.02
1269.43
1219.02
1123.54
1032.40
968.43
919.45
855.20
816.91
742.10
620.35
563.10
456.98
421.91

ภาพ 66 (ต่อ)

พบว่าหมู่ฟังก์ชั่นของลิกนินทางการค้า ลิกนินจากน้ำล้างเยื่อกระดาษที่ล้างด้วยน้ำกลั่นและ HPLC water มีความใกล้เคียงกัน โดยการเปรียบเทียบค่าดูดกลืนแสงของหมู่ฟังก์ชั่นที่สำคัญตามวิธี Minu et al., (2012) ได้แก่ OH/Phenolic compound ให้ค่าความยาวคลื่นเท่ากับ 3395.10, 3398.08 และ 3399.62 cm^{-1} ตามลำดับ หมู่ฟังก์ชั่น CH-methyl/methyl group เท่ากับ 2936.91, 2930.98 และ 2931.80 cm^{-1} ตามลำดับ หมู่ฟังก์ชั่น C-H เท่ากับ 2845.99, 2851.65 และ 2852.24 cm^{-1} ตามลำดับ หมู่ ester เท่ากับ 1693.15 cm^{-1} ไม่พบในตัวอย่างลิกนินที่ได้จากน้ำล้างเยื่อกระดาษ หมู่ Benzene มี 2 ตำแหน่ง โดยตำแหน่งที่ 1 เท่ากับ 1598.47, 1607.31 และ 1607.14 cm^{-1} ตามลำดับ หมู่ Benzene ตำแหน่งที่ 2 เท่ากับ 1513.28, 1513.54 และ 1513.37 cm^{-1} ตามลำดับ หมู่ฟังก์ชั่น C-O bond/ether stretching เท่ากับ 1123.54, 1116.77 และ 1117.07 cm^{-1} ตามลำดับ หมู่ฟังก์ชั่น CS group เท่ากับ 620.35, 618.91 และ 619.24 cm^{-1} ตามลำดับ จากผลการทดลองทำให้ผู้วิจัยทราบว่าองค์ประกอบหลักของน้ำล้างเยื่อกระดาษ (Black liquor) คือ ลิกนิน ซึ่งได้ทำการวัดน้ำหนักแห้งหลังอบที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เท่ากับ 5.90 กรัมต่อน้ำย่อยซานอ้อยปริมาตร 500 ml คิดเป็น 12 กรัมลิกนินต่อลิตรน้ำล้างเยื่อกระดาษ (g_{lignin}/l) โดยประมาณสอดคล้องตาม Upton, & Kasko (2016) ที่กล่าวว่าการแยกลิกนินออกจากน้ำล้างเยื่อกระดาษที่ได้จากกระบวนการ soda process สามารถกระทำได้อย่างง่ายด้วยการตกตะกอนลิกนินด้วยกรด โดยลิกนินที่ได้จะมีความบริสุทธิ์

2. **วิเคราะห์องค์ประกอบในน้ำล้างเยื่อกระดาษ**

ทำการเก็บตัวอย่างน้ำล้างเยื่อกระดาษ (black liquor) จากโรงงานเยื่อกระดาษจากซานอ้อยที่โรงงาน เอ็นไวรอนเม้นท์พัลพ์ แอนด์ เปเปอร์ จำกัด (EPPCO) จังหวัดนครสวรรค์ ลักษณะทั่วไปเป็นของเหลวข้น ไม่หนืด สีดำ มีฟอง อุณหภูมิของน้ำล้างเยื่อกระดาษในขณะเก็บประมาณ 80 องศาเซลเซียส เมื่อตั้งทิ้งไว้ฟองจะแตกทำให้ทราบปริมาตรที่แท้จริง จากนั้นนำน้ำล้างเยื่อกระดาษส่งตรวจพารามิเตอร์ทางสิ่งแวดล้อมภายใน 3 ชั่วโมง หลังจากทำการเก็บตัวอย่าง แสดงผลตาราง 17

ตาราง 17 องค์ประกอบในน้ำล้างเยื่อกระดาษที่โรงงานเยื่อกระดาษ (EPPCO)

Parameter		Black liquor	USEPA (2000)
pH		12.8	ไม่ผ่าน
Lignin (Gindl et al.,2000)	(mg/l)	36,620	-
Lignin (Pearl and Benson)	(mg/l)	58,840	-
Lignin (Precipitation by H_2SO_4)	(mg/l)	11,814	-
Colour	CU	361,702	-
BOD	(mg/l)	25,800	ไม่ผ่าน
COD	(mg/l)	161,680	ไม่ผ่าน
TDS	(mg/l)	93,176	-
TKN	(mg/l)	350	-
Cd	(mg/l)	0.09	ไม่ผ่าน
Cu	(mg/l)	0.2	ผ่าน
Fe	(mg/l)	35.2	ไม่ผ่าน
Mn	(mg/l)	2.8	ไม่ผ่าน
Ni	(mg/l)	0.6	ไม่ผ่าน
Zn	(mg/l)	0.8	ผ่าน

หมายเหตุ: TSS Part 2540 D at 103-105 °C , TDS Part 2540 C at 103-105 °C Standard methods for Examination of Water and Wastewater, APHA, AWWA, WEF, 22^{ed} edition, 2012

จากตาราง 17 พบว่า องค์ประกอบในน้ำล้างเยื่อกระดาษมีค่า TDS COD และ BOD สูงมาก เท่ากับ 93,176 , 161,680 และ 25,800 mg/l ตามลำดับ จึงให้ค่าการย่อยสลายทางชีวภาพต่ำมาก เท่ากับ 0.159 (25,800/161,680=0.159) คำนวณตาม Zheng et al. (2013) กล่าวว่า น้ำล้างเยื่อกระดาษที่ใช้ในการศึกษาต่อการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ สามารถคำนวณได้จากค่าการย่อยสลายทางชีวภาพ (biodegradability) BOD/COD ถ้าน้อยกว่า 0.5 แสดงถึงความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพที่ต่ำ โดยลักษณะของน้ำล้างเยื่อกระดาษที่ Zheng et al. (2013) ใช้ใน

การศึกษามีดังนี้ พีเอชอยู่ในช่วง 13.1 - 13.6 ค่าสีอยู่ในช่วง 524,300 – 675,000 CU ค่า COD อยู่ในช่วง 180,000 – 230,000 mg/l ค่า BOD อยู่ในช่วง 12,000 – 16,000 mg/l

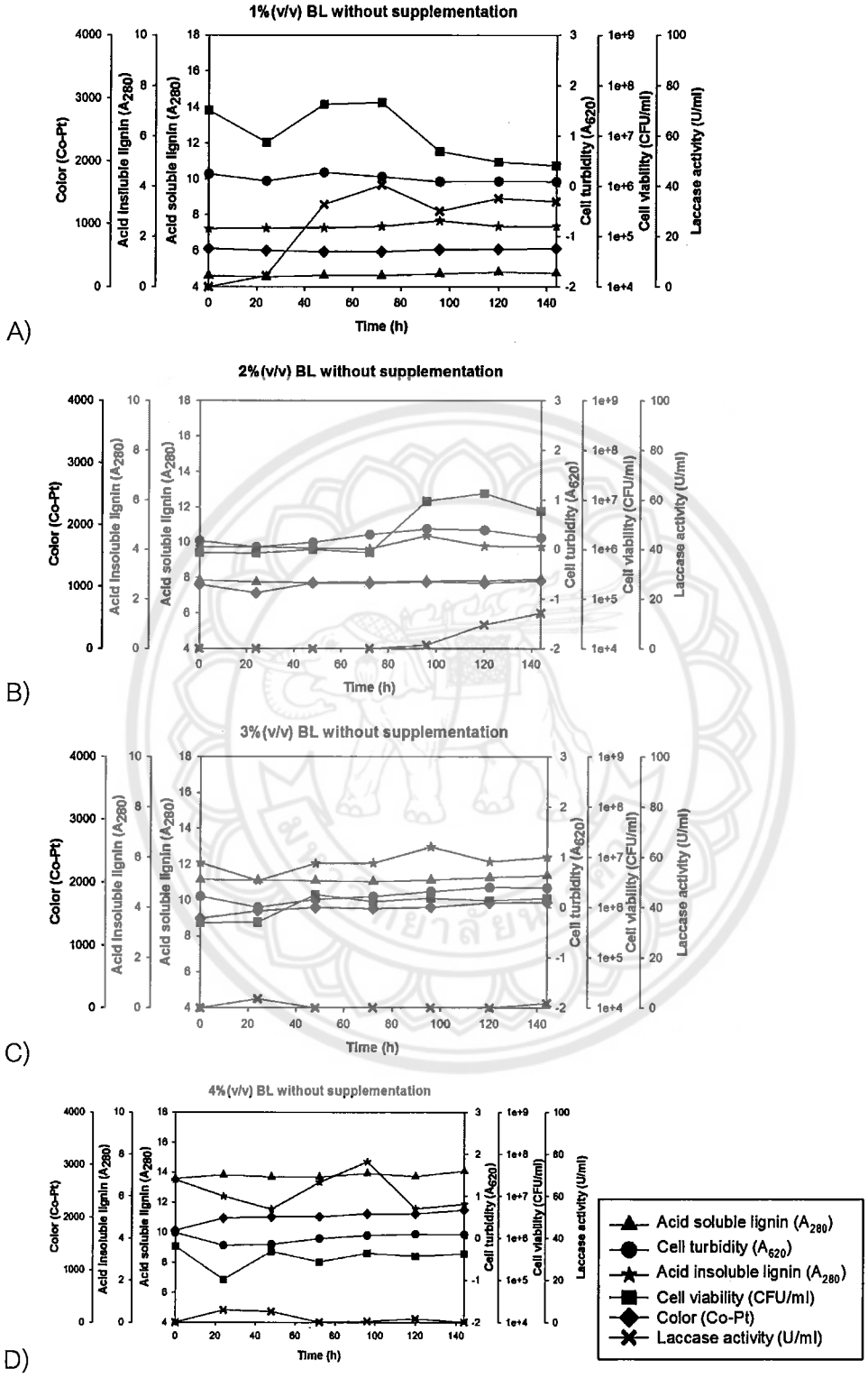
ลักษณะของน้ำล้างเยื่อกระดาษที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้มีลักษณะใกล้เคียงกับคุณสมบัติของน้ำล้างเยื่อกระดาษที่อธิบายโดย Pokhrel, & Viraraghavan (2004) ว่าน้ำทิ้งที่ได้จากโรงงานเยื่อกระดาษหรือ Black liquor มีลักษณะสีน้ำตาลดำ อุณหภูมิสูง กลิ่นแรง พีเอชเป็นด่างจัด มีค่า COD สูง (COD; 200,000 mg/l) และค่า BOD สูง (BOD; 40,000 – 50,000 mg/l) โดยกระดาษ 1 ตันจะปล่อยน้ำเสีย 150 m^3 ซึ่งมีสารพิษในปริมาณมากและอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม ดังนั้นงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับการใช้จุลินทรีย์ย่อยลิกนินในน้ำทิ้งหรือน้ำล้างเยื่อกระดาษจะใช้ค่า COD เป็นตัวบ่งบอกคุณสมบัติของน้ำล้างเยื่อกระดาษที่ศึกษา ซึ่งโดยทั่วไปน้ำล้างเยื่อกระดาษที่จะใช้ในการย่อยโดยจุลินทรีย์นั้นมีค่า COD (10,140.79 mg/l) BOD (4092.40 mg/l) TDS (1261.91 mg/l) (Paliwal et al., 2015) ต่ำกว่าคุณสมบัติของน้ำล้างเยื่อกระดาษในงานวิจัยนี้มาก และจากผลการศึกษาการเจริญในน้ำล้างเยื่อกระดาษในแผนการดำเนินงานวิจัยตอนที่ 1 พบเชื้อมีการเจริญต่ำมากในน้ำล้างเยื่อกระดาษที่ทำการเจือจางร้อยละ 10 ทำให้การศึกษาต่อไปต้องทำการเจือจางน้ำล้างเยื่อกระดาษมากกว่าร้อยละ 10 โดยเลือกช่วงค่าการเจือจางที่จะศึกษาความเข้มข้นของน้ำล้างเยื่อกระดาษที่เหมาะสมในการย่อยและการเปลี่ยนแปลงเป็นสารโพลิเมอร์ลิกนินโดยเชื้อที่คัดแยกได้รหัส 2B2-1ligB เท่ากับ 1 – 4% (v/v) เพื่อส่งเสริมการเจริญของเชื้อในน้ำล้างเยื่อกระดาษ

3. การศึกษาความเข้มข้นน้ำล้างเยื่อกระดาษที่เหมาะสม

นำเชื้อรหัส 2B2-1LigB เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีองค์ประกอบของน้ำล้างเยื่อกระดาษเรียกว่า Black liquor mineral salt medium (BL-MSM) โดยศึกษาทั้งปัจจัยการไม่เติมแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนในน้ำล้างเยื่อกระดาษความเข้มข้นแตกต่างกัน ได้แก่ 1, 2, 3, 4 %(v/v) จำนวน 3 ซ้ำ ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในฟลาสก์ขนาด 250 ml ปริมาตรอาหารเพาะเลี้ยง 150 มิลลิลิตร อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 rpm เป็นระยะเวลา 6 วัน ส่วนขั้นตอนการเตรียมหัวเชื้อตั้งต้น (Inoculum) จะทำการเตรียมเช่นเดียวกับขั้นตอนที่ 2 (การหาสภาวะที่เหมาะสม) โดยใช้อาหาร MSM medium ที่มีการเติมลิกนิน (alkali, Aldrich) กลูโคสและเปปโทนเท่ากับ 0.5, 5 และ 5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ความเข้มข้นหัวเชื้อร้อยละ 10% (v/v) ทำการเก็บตัวอย่างทุกวัน นำตัวอย่างที่ได้วัดการเจริญของเซลล์ที่มีชีวิตบน NA agar และวัดค่าความขุ่นที่ 620 นาโนเมตร และปั่นเหวี่ยงตัวอย่างที่ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา

15 นาที นำส่วนใสวัดค่าลิกนิน ค่าสี และค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคส ผลการทดลองแสดงดังภาพ 67 และ 68

ภาพ 67 แสดงปฏิกิริยาการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียรหัส 2B2-1LigB ในน้ำล้างเยื่อกระดาษที่ช่วงความเข้มข้น 1 – 4% (v/v) โดยไม่เติมสารส่งเสริมการเจริญ เพื่อศึกษาศักยภาพในการเจริญของเชื้อในน้ำล้างเยื่อกระดาษ



ภาพ 67 ปฏิกิริยาของ 2B2-1LigB ที่เกิดในน้ำล้างเยื่อกระดาษความเข้มข้นต่าง ๆ A) 1%(v/v) B) 2%(v/v) C) 3%(v/v) D) 4%(v/v) ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ไม่เติมกลูโคสและยูเรีย

จากภาพ 67 การเพาะเลี้ยงเชื้อรหัส 2B2-1ligB ในน้ำล้างเยื่อกระดาษที่มีลิกนินเป็นองค์ประกอบหลักโดยไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน พบว่า น้ำล้างเยื่อกระดาษความเข้มข้นต่ำที่ 1%(v/v) (ภาพ 67A) เชื้อมีความสามารถในการเจริญในน้ำล้างเยื่อกระดาษได้ โดยใช้ระยะเวลาในการปรับตัวต่ออาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเซลล์จะสามารถเพิ่มจำนวนและคงที่เป็นระยะเวลา 1 วัน จากนั้นปริมาณเซลล์ลดลงในชั่วโมงที่ 96 ของการเพาะเลี้ยง ขณะเดียวกันค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสให้ผลสอดคล้องกับการเจริญ ในขณะที่เชื้อมีการเจริญค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสสูงขึ้น

ส่วนน้ำล้างเยื่อกระดาษความเข้มข้นร้อยละ 2% (v/v) (ภาพ 67B) เชื้อใช้ระยะเวลาในการปรับตัวต่ออาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 วัน จึงจะสามารถเพิ่มปริมาณเซลล์ขึ้นมาในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงสอดคล้องกับค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคส แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์แลคเคสเป็นเอนไซม์ที่จะถูกสร้างขึ้นตามอัตราการเจริญ เชื้อสร้างขึ้นมาเพื่อย่อยโมเลกุลลิกนินในอาหารเลี้ยงเชื้อ แม้ว่าในระบบจะไม่มีแหล่งคาร์บอนอื่นแต่เชื้อสามารถใช้ลิกนินเป็นแหล่งคาร์บอนได้

ความเข้มข้นของน้ำล้างเยื่อกระดาษ 3% (v/v) (ภาพ 67C) เชื้อมีความสามารถในการเจริญได้ในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง โดยให้การเจริญต่ำสอดคล้องกับค่ากิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสที่ต่ำในช่วง 24 ชั่วโมงแรกของการเจริญ อย่างไรก็ตามกลับส่งผลต่อโครงสร้างลิกนินโดยลดคุณสมบัติการละลายในสารละลายกรดของลิกนิน (acid insoluble lignin) ในชั่วโมงที่ 96 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อ แสดงถึงการเกิดปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงเป็นโพลิเมอร์เกิดขึ้นกับโมเลกุลลิกนินที่เร่งปฏิกิยาโดยเอนไซม์แลคเคสในระบบ

ความเข้มข้นของน้ำล้างเยื่อกระดาษ 4% (v/v) (ภาพ 67D) เชื้อใช้ระยะเวลาในการปรับตัวต่ออาหารที่มีลิกนินความเข้มข้นสูงในช่วง 24 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยงเชื้อ จากนั้นเชื้อเพิ่มจำนวนเซลล์และรักษาปริมาณเซลล์ให้คงที่ ในช่วงการเจริญนี้ลิกนินในระบบถูกย่อยสังเกตจากค่าลิกนินที่ไม่ละลายในกรด (acid insoluble lignin) ลดลงในชั่วโมงที่ 48 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งมีเอนไซม์แลคเคสในระบบ จากนั้นในชั่วโมงที่ 96 ค่าลิกนินที่ไม่ละลายในสารละลายกรดกลับมีค่าสูงขึ้น แสดงให้เห็นถึงการเกิดปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงโพลิเมอร์ลิกนินที่สามารถเร่งโดยเอนไซม์แลคเคสที่อยู่ในระบบเช่นเดียวกัน

จากผลการทดลองยืนยันได้ว่าเชื้อรหัส 2B2-1LigB (*Bacillus* sp.) มีความสามารถในการเจริญได้ในน้ำล้างเยื่อกระดาษที่ไม่เติมสารส่งเสริมการเจริญ เนื่องจากลิกนินทำหน้าที่เป็นแหล่งคาร์บอนหลักในการเจริญของแบคทีเรีย (primary metabolism) สังเกตจากการเจริญ

อย่างมากในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบของลิกนิน แต่ไม่มีการเติมแหล่งคาร์โบไฮเดรท (F. N. U. Asina et al., 2017)

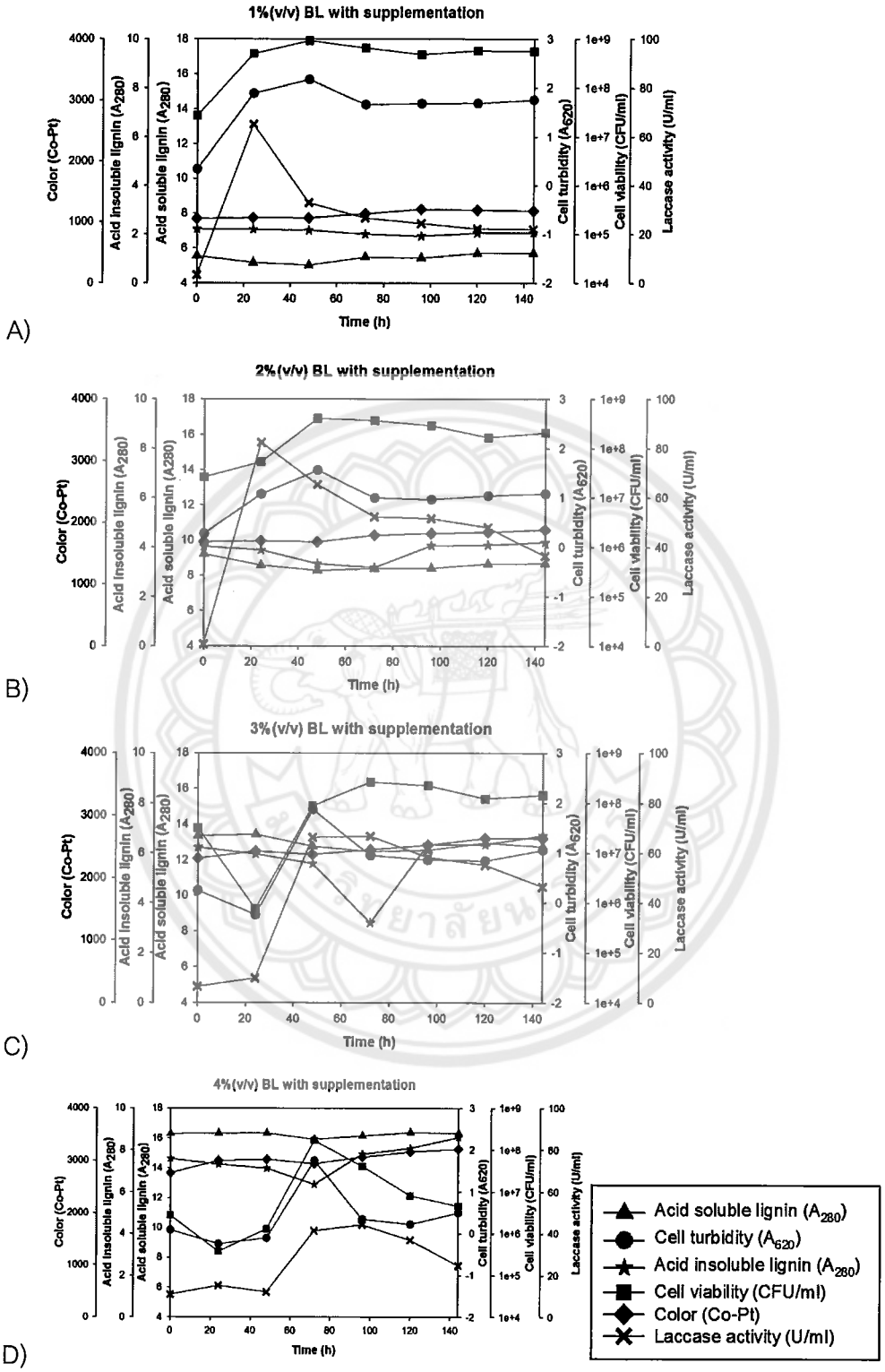
จากรูปแบบการเจริญในน้ำล้างเยื่อกระดาษสอดคล้องกับผลการทดลองตาราง 11 การเจริญบนสารอะโรมาติกมวลโมเลกุลต่ำ (LMWAC$_s$) ของเชื้อแต่ละรหัส บ่งบอกถึงศักยภาพของเชื้อในการใช้สารอะโรเมติกมวลโมเลกุลต่ำหลากหลายชนิดในการเจริญโดยใช้สารอะโรเมติกมวลโมเลกุลต่ำเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญโดยเชื้อจะมีรูปแบบการเจริญในแบบเดียวกัน คือ การปรากฏโคโลนีบนอาหารแข็งในวันที่ 4 ของการบ่ม จากการเจริญในน้ำล้างเยื่อกระดาษโดยไม่เติมสารส่งเสริมการเจริญ แสดงให้เห็นถึงการปรับตัวของเชื้อได้อย่างชัดเจน ทำให้สามารถยืนยันผลการคัดเลือกเชื้อในตาราง 11 ได้ว่าเชื้อมีความสามารถในการใช้สารอะโรเมติกมวลโมเลกุลต่ำได้ ซึ่งสารประกอบอะโรเมติก พบเป็นองค์ประกอบในน้ำล้างเยื่อกระดาษ โดยจุลินทรีย์มีการปรับตัวต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ การปรับตัวของจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นคุณสมบัติพิเศษของจุลินทรีย์ที่จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมได้ (F. N. U. Asina et al., 2017)

ค่าความเข้มข้นของน้ำล้างเยื่อกระดาษมีผลโดยตรงต่อการเจริญของเชื้อ ส่งผลยับยั้งการเจริญของเชื้อ ซึ่งค่าการเจือจางน้ำล้างเยื่อกระดาษต่ำช่วยเพิ่มค่าการเจริญของเชื้อได้ แต่ความเข้มข้นน้ำล้างเยื่อกระดาษสูงมีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อ Chandra et al. (2011) กล่าวถึงน้ำทิ้งของโรงงานเยื่อกระดาษที่ใช้ในการศึกษาการย่อยน้ำทิ้งโดยจุลินทรีย์จะทำการเจือจางให้ค่าของสารพิษต่ำ เพื่อให้แน่ใจว่าเชื้อมีการเจริญและการย่อยลิกนินได้อย่างเต็มประสิทธิภาพ ส่วนค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสให้ผลสอดคล้องกับค่าการเจริญ เอนไซม์ถูกสร้างขึ้นเมื่อเชื้อมีการเจริญ

เอนไซม์แลคเคสถูกพิจารณาว่าเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่สะอาด (ideal green catalyst) เนื่องจากใช้ออกซิเจนเป็นสารตั้งต้นควบคู่ (co-substrate) กับสารประกอบฟีนอลได้ผลผลิตเป็นน้ำ กิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสพบได้ทั้งในเชื้อราและแบคทีเรีย ซึ่งใช้เพื่อย่อยลิกนินโดยเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชั่นสารประกอบฟีนอล โดยการย้ายอิเล็กตรอนจากหมู่ไฮดรอกซิลของสารประกอบฟีนอล ทำให้ได้อนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอล ตำแหน่งที่เอนไซม์เข้าเร่งปฏิกิริยา C_α และตัดพันธะ aryl-alkyl C-C และ C_α-C_β (Kunamneniet al., 2007) ส่วนลิกนินซับเตรทที่ไม่ใช่สารประกอบฟีนอล (non-phenolic substrates) จะต้องมีการใช้ตัวกลาง หรือ mediators ทำหน้าที่เป็นตัวช่วยที่จำเป็นของเอนไซม์แลคเคสในปฏิกิริยา การย่อยลิกนินโดยจุลินทรีย์ทั่วไปพบสารตัวกลางเป็นตัวช่วยในปฏิกิริยา ซึ่งถูกออกซิไดส์โดยเอนไซม์ย่อยลิกนิน จากนั้นจะสามารถแทรกเข้าสู่โมเลกุลลิกนิน เพื่อทำหน้าที่เป็นตัวออกซิไดซ์แทนที่จะเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่นี้ เนื่องจากสารตัวกลางมีขนาดเล็ก จึงทำให้สามารถแทรกเข้าไปยังโมเลกุลของลิกนินได้ (Wong D.W.S., 2009)

ค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสไม่ได้บ่งบอกถึงประสิทธิภาพในการย่อยลิกนิน จากค่าการเจือจางน้ำล้างเยื่อกระดาษที่ 1% (v/v) ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสสูงแต่ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงกับโมเลกุลโพลิเมอร์ลิกนินขนาดใหญ่ สังเกตจากค่าลิกนินที่ไม่ละลายในสารละลายกรด (acid insoluble lignin) เนื่องจากเชื้อมีการใช้สารประกอบฟีนอลในการเจริญในทางตรงกันข้ามที่ค่าการเจือจางน้ำล้างเยื่อกระดาษสูง เช่น น้ำล้างเยื่อกระดาษร้อยละ 4 โดยปริมาตร พบค่าลิกนินที่ไม่ละลายในสารละลายกรดลดลงในช่วง 48 ชั่วโมง จากนั้นกลับเพิ่มสูงขึ้นในชั่วโมงที่ 96 แสดงให้เห็นถึงการเกิดปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงเป็นสายโพลิเมอร์ลิกนิน ซึ่งเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์แลคเคสที่เชื้อสร้างขึ้นในช่วงแรกของการเจริญ เนื่องจากค่าความเข้มข้นน้ำล้างเยื่อกระดาษสูง ทำให้ในระบบมีสารประกอบฟีนอลอิสระอยู่มากจึงเกิดปฏิกิริยาควบคู่พร้อมกับในกระบวนการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อมีการให้ความร้อนเพื่อฆ่าเชื้อปนเปื้อนก่อนทำการถ่ายหัวเชื้อตั้งต้น โดยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ด้วยอุณหภูมิสูงมีโอกาสทำให้โมเลกุลลิกนินขนาดใหญ่ถูกย่อยด้วยความร้อน (Thermal degradation) ได้เป็นโมเลกุลลิกนินขนาดเล็กจำนวนมาก

จากภาพ 67 แสดงให้เห็นถึงความจำเป็นในการเติมสารส่งเสริมการเจริญ เนื่องจากค่าความเข้มข้นน้ำล้างเยื่อกระดาษมีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์และการผลิตเอนไซม์แลคเคส โดยใช้ผลการทดลองที่ได้จากตอนที่ 2 หรือการหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยลิกนิน ได้แก่ อุณหภูมิการเพาะเลี้ยง 35 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นยูเรีย 5 กรัมต่อลิตร ใช้ในการศึกษาหาความเข้มข้นของน้ำล้างเยื่อกระดาษที่เหมาะสมต่อการย่อยลิกนินและการเปลี่ยนแปลงเป็นโพลิเมอร์ลิกนิน แสดงผลดังภาพ 68



ภาพ 68 ปฏิกิริยาของ 2B2-1LigB ที่เกิดในน้ำล้างเยื่อกระดาษความเข้มข้นต่าง ๆ A) 1%(v/v) B) 2%(v/v) C) 3%(v/v) D) 4%(v/v) ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เติมกลูโคส 5 กรัมต่อลิตร และยูเรีย 5 กรัมต่อลิตร

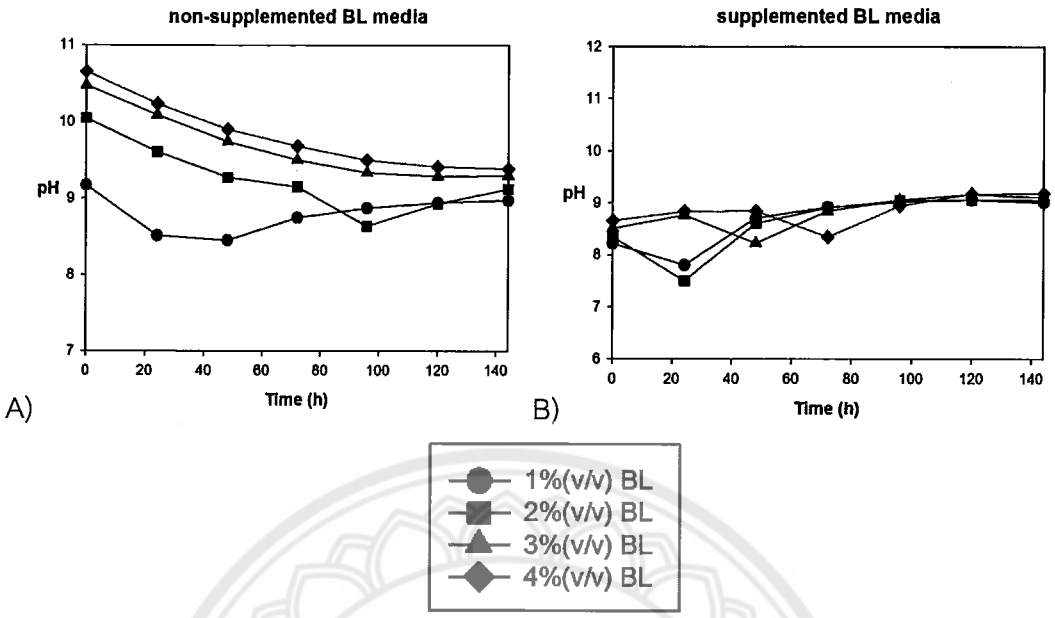
จากภาพ 68 การเติมสารส่งเสริมการเจริญ (กลูโคสและยูเรีย) ช่วยเพิ่มความมีชีวิตของเซลล์ในน้ำล้างเยื่อกระดาษทุกค่าความเข้มข้น โดยเฉพาะที่ค่าความเข้มข้นน้ำล้างเยื่อกระดาษร้อยละ 1% (v/v) (ภาพ 68A) เชื้อสามารถเจริญได้ทันทีภายใน 24 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง และเพิ่มจำนวนสูงสุดที่ 48 ชั่วโมง มีค่าปริมาณเซลล์เท่ากับ 9.25×10^8 CFU/ml เมื่อเวลาผ่านไปจะลดลงเล็กน้อย จากนั้นจะคงที่จนถึงวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยง ค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสเพิ่มขึ้นตามการเจริญ ค่าลิกนินที่ละลายในสารละลายกรด (acid soluble lignin) ลดลงที่ 48 ชั่วโมง บ่งบอกว่าในชั่วโมงที่ 48 เชื้อมีการย่อยลิกนิน แต่อย่างไรก็ตามค่าลิกนินดังกล่าวกลับสูงขึ้นในชั่วโมงถัดมา แสดงผลของปฏิกิริยาการต่อสายโพลิเมอร์ลิกนินที่เร่งโดยเอนไซม์แลคเคส ซึ่งส่งผลให้ค่าสีของน้ำล้างเยื่อกระดาษมีค่าเพิ่มขึ้น

ส่วนน้ำล้างเยื่อกระดาษความเข้มข้นที่ 2% (v/v) (ภาพ 68B) เซลล์ที่มีชีวิตสามารถเจริญได้ทันทีจนถึงชั่วโมงที่ 48 เท่ากับ 4.08×10^8 CFU/ml และเข้าสู่การเจริญคงที่ ซึ่งค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสเพิ่มขึ้นสูงสุดหลังจาก 24 ชั่วโมงแรก เท่ากับ 82 U/ml และพบการย่อยลิกนินสูงสุดในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง สังเกตจากค่าลิกนินที่ไม่ละลายในสารละลายกรด (acid insoluble lignin) และค่าสีมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น จากนั้นปริมาณลิกนินจะเท่าเดิมแสดงให้เห็นถึงศักยภาพในการเปลี่ยนแปลงเป็นโพลิเมอร์ลิกนิน (polymerization) โดยในช่วงที่เกิดการย่อยลิกนินทำให้ปริมาณอนุมูลฟีนอลอิสระเกิดขึ้นอย่างมาก ซึ่งส่งเสริมปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงเป็นสารโพลิเมอร์ลิกนินที่เร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์แลคเคสเกิดขึ้นได้อย่างทันที สังเกตได้จากค่าสีที่เพิ่มขึ้นในวันที่ 3 อนุมูลอิสระที่ได้จากการย่อยของเอนไซม์แลคเคสไปต่อสายกับลิกนินที่ยังไม่ผ่านการย่อยทำให้ได้ขนาดโพลิเมอร์ลิกนินที่มีขนาดใหญ่ สังเกตจากค่าลิกนินที่ไม่ละลายในสารละลายกรดเพิ่มขึ้นในชั่วโมงที่ 96 โดยปรากฏการณ์นี้เกิดขึ้นกับน้ำล้างเยื่อกระดาษที่มีความเข้มข้นสูงขึ้น เนื่องจากน้ำล้างเยื่อกระดาษที่มีความเข้มข้นสูงขึ้น มีปริมาณของสารประกอบฟีนอลอิสระขนาดเล็กอยู่มากเมื่อภายในระบบมีเอนไซม์แลคเคสอยู่ค่ากิจกรรมสูงหรือต่ำก็ตามสามารถเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงเป็นสารโพลิเมอร์ลิกนิน ทำให้ได้โพลิเมอร์ลิกนินขนาดใหญ่ตามค่าสีที่เพิ่มขึ้น (Toledano et al., 2014)

น้ำล้างเยื่อกระดาษความเข้มข้นที่ 3% (v/v) (ภาพ 68C) แสดงผลการยับยั้งของลิกนินในน้ำล้างเยื่อกระดาษที่มีความเข้มข้นสูง ทำให้เชื้อต้องใช้ระยะเวลาในการพักตัวเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง โดยเชื้อมีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตสูงสุดในวันที่ 3 เท่ากับ 2.6×10^8 CFU/ml ของการเพาะเลี้ยงสอดคล้องกับค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสสูงสุดเช่นกัน และพบการย่อยลิกนินเกิดขึ้น (acid insoluble lignin) ส่วนค่าสีมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น

น้ำล้างเยื่อกระดาษความเข้มข้นที่ 4% (v/v) (ภาพ 68D) แสดงผลการยับยั้งของลิกนินในน้ำล้างเยื่อกระดาษที่ความเข้มข้นสูง ทำให้เชื้อต้องใช้ระยะเวลาในการปรับตัวเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งใช้ระยะเวลามากกว่าน้ำล้างเยื่อกระดาษความเข้มข้นที่ 3% (v/v) เชื้อจึงสามารถเจริญได้ในชั่วโมงที่ 72 โดยให้ปริมาณเซลล์สูงสุดเท่ากับ $1.68x10^8$ CFU/ml ค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสให้ค่ากิจกรรมสอดคล้องกับค่าการเจริญโดยการย่อยลิกนินของเชื้อจะสูงสุดในชั่วโมงที่ 72 โดยให้ค่าการย่อย ลิกนินต่ำกว่าน้ำล้างเยื่อกระดาษความเข้มข้นที่ 3% (v/v) เนื่องมาจากการเจริญของเซลล์ในระบบมีค่าต่ำกว่า นอกจากนี้ค่าลิกนินที่ไม่ละลายในสารละลายกรด (acid insoluble lignin) ที่ชั่วโมงสุดท้ายสูงกว่าค่าลิกนินที่เวลาเริ่มต้นแสดงการเกิดปฏิกิริยาเปลี่ยนแปลงเป็นสารโพลิเมอร์ลิกนิน (polymerization)

จากผลการทดลองข้างต้นเชื้อสามารถใช้น้ำล้างเยื่อกระดาษในการเจริญของเซลล์พร้อมกับการผลิตเอนไซม์แลคเคส เพื่อเร่งปฏิกิริยาการย่อยลิกนินที่เป็นองค์ประกอบหลักในน้ำล้างเยื่อกระดาษเพื่อให้เซลล์สามารถรักษาความมีชีวิตของเซลล์ให้คงที่ แต่อย่างไรก็ตามค่าความเข้มข้นน้ำล้างเยื่อกระดาษสูงสุดมีผลยับยั้งความมีชีวิตของเซลล์ เมื่อเซลล์ตายปฏิกิริยาการย่อยลิกนินจะถูกยับยั้ง ทำให้ปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงเป็นโพลิเมอร์ลิกนินเกิดขึ้นแทนที่ สังเกตค่าสีของน้ำล้างเยื่อกระดาษในระบบจะเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนกว่าการเพาะเลี้ยงในน้ำล้างเยื่อกระดาษความเข้มข้นอื่น F. Asina et al. (2016) กล่าวถึงรูปแบบการย่อยลิกนินของเชื้อราและแบคทีเรียว่ามีรูปแบบการใช้ลิกนิน (lignin utilization) แตกต่างกัน โดยเชื้อราจะสามารถย่อยสารประกอบฟีนอลและโพลีเมอร์ลิกนินที่ย่อยได้ยากโดยกระบวนการเปลี่ยนคาร์บอนไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ ในทางตรงกันข้ามแบคทีเรียจะสะสมสารประกอบฟีนอลที่ระเหยได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบสมดุลมวลคาร์บอนจากเชื้อราและแบคทีเรีย พบว่า ไม่แตกต่างกัน ดังนั้นผลการทดลองนี้จึงแสดงรูปแบบการย่อยลิกนินของ *Bacillus* sp. ที่มีการย่อยลิกนินและเกิดปฏิกิริยาการต่อสายลิกนินไปพร้อมกัน โดยผลที่ได้จากการย่อยลิกนิน คือ เซลล์ ส่วนผลที่ได้จากการเปลี่ยนแปลงเป็นโพลิเมอร์ลิกนิน คือ โพลิเมอร์ลิกนินที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่าลิกนินตั้งต้น แสดงผลดังตาราง 20 ซึ่งสามารถเก็บเกี่ยววัตถุดิบได้ง่าย โดยการตกตะกอนลิกนินด้วยกรด และมีศักยภาพในการเป็นผลิตภัณฑ์พ่วง (by-product) ของโรงงานเยื่อกระดาษจากชานอ้อยได้ สอดคล้องกับ Brzonova et al. (2017) ศึกษาการใช้เชื้อรา *Coriolus versicolor* ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์แลคเคสดัดแปลงโมเลกุลลิกนินทางชีวภาพความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตรและ DMSO ความเข้มข้น 2%(v/v) ที่อุณหภูมิ 29 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 วัน น้ำหนักมวลโมเลกุลเพิ่มขึ้น ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการทำ anionic hydrogels



ภาพ 69 การเปรียบเทียบค่าพีเอชในการศึกษาผลการเลี้ยงเชื้อในน้ำล้างเยื่อกระดาษ A) ที่ไม่เติมสารส่งเสริมการเจริญ และ B) เติมสารส่งเสริมการเจริญได้แก่กลูโคสและยูเรีย

จากภาพ 69 การเปรียบเทียบค่ากรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการเติมสารส่งเสริมการเจริญ (ภาพ 69A) พบว่า ค่าพีเอชลดลงสอดคล้องตามการเจริญสูงสุด โดยค่าการเจือจางน้ำล้างเยื่อกระดาษที่ 1%(v/v) ส่งเสริมการเจริญของเชื้อได้รวดเร็วที่สุด โดยเชื้อจะสามารถเจริญได้ในช่วง 24-48 ชั่วโมง จากนั้นค่าพีเอชสูงขึ้นเนื่องจากผลของปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงเป็นโพลิเมอร์ลิกนิน (polymerization) ที่เร่งโดยเอนไซม์แลคเคส มีผลทำให้ค่าพีเอชเข้าสู่สภาวะด่าง ส่วนค่าการเจือจางที่ 2% (v/v) ให้ค่าพีเอชลดลงต่ำสุดในชั่วโมงที่ 96 ของการเลี้ยงเชื้อ สอดคล้องกับการเจริญสูงสุดในชั่วโมงที่ 96 เช่นกัน ในทางตรงกันข้ามน้ำล้างเยื่อกระดาษร้อยละ 3 และ 4 (v/v) มีลักษณะการลดลงของค่าพีเอชที่ไม่แตกต่างกัน ซึ่งไม่แสดงค่าการลดลงของพีเอชต่ำสุด เนื่องจากทั้งสองความเข้มข้นไม่ส่งเสริมการเจริญของเชื้อ หรือการลดลงของพีเอชที่เกิดขึ้นไม่ได้เกิดจากการทำของเชื้อ แต่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชั่น (oxidation) ของออกซิเจนในขณะเขย่าอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากการเปรียบเทียบค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมสารส่งเสริมการเจริญ (ภาพ 69B) ได้แก่ กลูโคสและยูเรีย พบว่าการเติมสารส่งเสริมการเจริญทำให้แบคทีเรียสามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ในทันทีที่ค่าการเจือจางน้ำล้างเยื่อกระดาษที่ 1 และ 2%(v/v) ซึ่งค่าการเจือจางน้ำล้างเยื่อกระดาษที่ 2% (v/v) มีค่าการลดลงของพีเอชมากกว่าน้ำล้างเยื่อกระดาษ

ที่ความเข้มข้น 1% (v/v) แสดงถึงอัตราเมทาบอลิซึมของแบคทีเรียมีค่ามากกว่า เนื่องจากแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อหรือลิกนินมีปริมาณมากกว่า ส่วนค่าการเจือจางน้ำล้างเยื่อกระดาษร้อยละ 3 และ 4 (v/v) แสดงให้เห็นถึงความเข้มข้นของลิกนินมีผลในการยับยั้งอัตราเมทาบอลิซึมของเชื้อ ซึ่งเชื้อจะต้องใช้ระยะเวลาในการปรับตัวนานขึ้นตามความเข้มข้นของน้ำล้างเยื่อกระดาษที่สูงขึ้น

จากผลการเจริญของเชื้อในน้ำล้างเยื่อกระดาษที่มีการเติมสารส่งเสริมการเจริญดังภาพ 68 ผู้วิจัยได้ทำการสกัดอาหารเพาะเลี้ยงที่ชั่วโมงสุดท้ายปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในแต่ละความเข้มข้นของน้ำล้างเยื่อกระดาษ และน้ำล้างเยื่อกระดาษที่ยังไม่ผ่านการฆ่าเชื้อความเข้มข้น 1%(v/v) ด้วยเอทิล แอซิเตรท จึงนำไประบุชื่อสารประกอบด้วยการวิเคราะห์ GC-MS แสดงผลการทดลองดังตาราง 18

ตาราง 18 สารประกอบที่สกัดได้โดยใช้ ethyl acetate ในตัวอย่างควบคุมน้ำล้างเยื่อกระดาษร้อยละ 1 ที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ และตัวอย่างน้ำล้างเยื่อกระดาษความเข้มข้นร้อยละ 1-4 ก่อนและหลังการบ่มเป็นเวลา 144 ชั่วโมง

NO.	RT (min)	Identified conpounds	Black liquor before autoclaved	Autoclaved at 110 °C, 20 min							
				0h_ 1%	144H _1%	0h_ 2%	144H _2%	0h_ 3%	144h _3%	0h_ 4%	144H _4%
1	6.08	N,N'-methanetrtraylbis(1,1,1-trimethyl-silanamine)	√	√	√	√	√	√	√	√	√
2	6.33	Pentanoic acid, trimethylsilyl ester	√	√	–	√	–	√	–	√	√
3	6.5	1,2-Bis-(trimethylsiloxy)ethane	√	–	–	–	–	–	–	–	–
4	7.29	2,3-Butanediol di TMS	–	–	–	–	–	–	–	–	√
5	7.34	unknown	√	√	√	√	√	√	√	√	√
6	7.44	Tetrasiloxane, decamethyl	–	√	√	–	√	–	–	–	–
7	7.55	unknown	√	√	√	√	√	√	√	√	√
8	7.66	unknown	–	–	√	–	√	–	√	–	–
9	7.68	Propanoic acid, 2-[(trimethylsilyl)oxy]-,trimethylsilyl ester	√	√	–	√	–	√	–	√	√
10	7.76	Hexanoic acid trimethylsilyl ester	√	√	–	√	–	√	–	√	√
11	7.77	unknown	–	–	√	√	–	–	–	–	–
12	7.78	Octamethyl trisiloxane	–	–	–	–	√	–	√	–	–

ตาราง 18 (ต่อ)

NO.	RT (min)	Identified conpounds	Black liquor before autoclaved	Autoclaved at 110 °C, 20 min							
				0h_ 1%	144H _1%	0h_ 2%	144H _2%	0h_ 3%	144h _3%	0h_ 4%	144H _4%
13	7.86	Acetic acid,[(trimethylsilyl)oxy]-,trimethyl silyl ester	√	√	√	√	√	√	√	√	√
14	8.03	unknown	–	–	√	–	√	–	–	–	–
15	8.34	unknown	–	–	√	–	√	–	–	–	–
16	8.44	Propanoic acid, 2-methyl-2-[(trimethylsilyl)oxy]-trimethylsilyl ester	√	√	√	√	√	√	√	√	√
17	8.48	Laevulic acid, trimethylsilyl ester	–	√	√	√	√	√	√	√	√
18	8.52	Ethanedioic acid, bis(trimethylsilyl)ester	–	–	–	–	–	√	–	√	–
19	8.58	unknown	√	√	√	–	√	–	√	–	–
20	8.6	Propanoic acid,3-[(trimethylsilyl)oxy]-,trimethylsilyl ester	–	√	–	√	√	√	√	–	√
21	8.66	unknown	–	√	√	–	√	–	–	–	–
22	8.8	Heptanoic acid TMS	√	√	–	–	–	√	–	√	√
23	8.82	unknown	–	√	√	√	√	√	√	√	√
24	9.04	unknown	√	√	√	√	√	√	√	√	√

ตาราง 18 (ต่อ)

NO.	RT (min)	Identified conpounds	Black liquor before autoclaved	Autoclaved at 110 °C, 20 min							
				0h_ 1%	144H _1%	0h_ 2%	144H _2%	0h_ 3%	144h _3%	0h_ 4%	144H _4%
25	9.13	Pentanoic acid, 2-[(trimethylsilyl)oxy]-,trimethylsilyl ester	√	–	–	–	–	√	–	√	–
26	9.17	Malonic acid (TMS)	–	–	–	–	–	√	–	√	–
27	9.25	unknown	√	√	√	√	√	√	√	√	√
28	9.34	2-methoxyphenol tms	√	–	–	–	–	√	√	√	–
29	9.37	unknown	–	√	√	–	√	√	√	√	–
30	9.5	Benzoic acid trimethylsilyl ester	√	–	–	–	–	–	–	–	–
31	9.63	Octanoic acid , trimethylsilyl ester	√	–	–	–	–	–	–	–	–
32	9.65	N,N'-bis(trimethylsilyl)-urea	–	√	√	√	√	√	√	√	√
33	9.8	Tristrimethylsilyl phosphoric acid	–	√	√	√	√	√	√	√	√
34	9.9	Benzeneacetic acid, trimethylsilyl ester	–	–	–	–	–	–	√	–	–
35	10.04	Butanedioic acid, bis(trimethylsilyl)ester	√	√	√	√	–	√	√	√	√
36	10.13	Pyrotartaric acid , Di-TMS	√	√	√	√	√	√	√	√	√

ตาราง 18 (ต่อ)

NO.	RT (min)	Identified conpounds	Black liquor	Autoclaved at 110 °C, 20 min							
			before autoclaved	0h_ 1%	144H _1%	0h_ 2%	144H _2%	0h_ 3%	144h _3%	0h_ 4%	144H _4%
37	10.21	Propanoic acid, 2,3-bis[(trimethyl silyl)oxy]- ,trimethyl silyl ester	–	√	–	√	–	√	–	√	√
38	10.32	unknown	√	√	√	√	√	√	√	√	√
39	10.5	4-trimethylsiloxybenzaldehyde	√	–	–	–	–	–	–	–	–
40	10.68	silane,[1,4-phenylenebis(oxy)]bis[trimethyl]	√	–	–	–	–	–	–	–	–
41	10.7	unknown	–	√	√	√	√	√	√	√	√
42	10.77	Hydrocinnamic acid, trimethylsilyl ester	√	–	–	–	–	–	–	–	–
43	10.97	unknown	–	–	–	–	–	√	–	√	–
44	11.16	3-Hydroxy glutaric acid triTMS	–	√	√	√	√	√	√	√	√
45	11.18	malic acid-TMS	–	–	–	–	–	–	–	√	–
46	11.32	unknown	–	√	√	√	√	√	–	–	√
47	11.39	unknown	–	√	√	√	√	√	√	–	√
48	11.5	unknown	–	√	√	√	√	√	√	√	–
49	11.54	unknown	–	–	√	–	–	–	–	–	–

ตาราง 18 (ต่อ)

NO.	RT (min)	Identified conpounds	Black liquor before autoclaved	Autoclaved at 110 °C, 20 min							
				0h_ 1%	144H _1%	0h_ 2%	144H _2%	0h_ 3%	144h _3%	0h_ 4%	144H _4%
50	11.59	unknown	–	√	–	√	√	√	√	√	√
51	11.8	Pentanedioic acid, 2-[(trimethylsilyl)oxy]- ,bis(trimethylsilyl) ester	–	√	√	√	–	√	√	√	√
52	11.85	1-Hexadecene	√	√	√	√	–	√	√	–	–
53	12.1	unknown	√	–	–	–	–	–	–	–	√
54	12.1	Benzoic acid, 3-[(trimethylsilyl)oxy]-trimethylsilyl ester	–	√	√	√	√	√	√	√	–
55	12.2	unknown	–	√	–	√	–	√	√	√	√
56	12.33	unknown	–	√	√	√	√	√	√	√	–
57	12.46	unknown	–	√	√	√	√	–	–	–	–
58	12.57	3,5-dimethoxy-4-trimethylsilyoxybenzaldehyde	√	–	–	–	–	–	–	–	–
59	12.84	Hydrocinnamic acid, p-(trimethylsiloxy)- ,trimethylsilyl ester	√	–	–	–	–	–	√	–	–
60	12.88	Bistrimethylsilyl vanillic acid	√	–	–	–	–	–	–	–	–

ตาราง 18 (ต่อ)

NO.	RT (min)	Identified conpounds	Black liquor before autoclaved	Autoclaved at 110 °C, 20 min							
				0h_ 1%	144H _1%	0h_ 2%	144H _2%	0h_ 3%	144h _3%	0h_ 4%	144H _4%
61	12.87	Benzoic acid,3-methoxy-4-[(trimethylsilyl)oxy]-, trimethyl silyl ester	–	√	–	√	√	√	√	√	√
62	12.94	unknown	√	√	–	√	√	√	√	√	√
63	13	Cinnamic acid, p-(trimethylsiloxy)-,trimethylsilyl ester	–	√	–	√	–	√	–	√	√
64	13.01	p-Coumaric acid tms	√	–	–	–	√	–	√	–	–
65	13.06	unknown	–	–	√	–	√	–	√	–	–
66	13.26	Tetradecanoic acid, trimethylsilyl ester	√	–	–	–	–	–	–	–	–
67	13.31	unknown	–	–	√	–	√	–	–	–	–
68	13.56	unknown	–	√	–	√	√	√	√	√	–
69	13.58	Benzoic acid, 3,5-dimethoxy-4-[(trimethylsilyl)oxy]-trimethylsilyl ester	–	–	–	–	–	–	–	–	√
70	13.59	Trimethylsilyl 3,5-dimethoxy-4-(trimethylsilyloxy)benzoate	√	–	√	–	–	–	–	–	–

ตาราง 18 (ต่อ)

NO.	RT (min)	Identified conpounds	Black liquor before autoclaved	Autoclaved at 110 °C, 20 min							
				0h_ 1%	144H _1%	0h_ 2%	144H _2%	0h_ 3%	144h _3%	0h_ 4%	144H _4%
71	13.76	Cinnamic acid,p-(trimethylsiloxy)-, trimethylsilyl ester	–	√	√	√	√	√	√	√	√
72	13.79	p-Coumaric acid -TMS ether	√	–	–	–	–	–	–	–	–
73	13.87	unknown	–	–	√	–	√	–	–	–	–
74	13.99	1-Octadecene	√	–	–	–	–	–	–	–	–
75	14.18	Vanillyl lactic acid-Tri TMS	√	–	√	√	√	√	√	√	√
76	14.18	Benzenepropanoic acid,3-methoxy-alpha,4-bis[(trimethylsilyl)oxy]-, trimethylsilyl ester	–	√	–	–	–	–	–	–	–
77	14.24	Hexadecanoic acid, Trimethylsilyl ester	√	√	√	√	√	√	√	√	√
78	14.52	Cinnamic acid, 4-methoxy-3-(trimethylsiloxy)-,trimethylsilyl ester	√	√	√	√	–	√	√	√	√
79	15	9,12-Octadecadienoic acid (z,z)-trimethylsilyl ester	√	√	–	√	–	√	–	√	√
80	15.02	Oleic acid, trimethylsilyl ester	√	√	√	√	√	√	–	√	√

ตาราง 18 (ต่อ)

NO.	RT (min)	Identified conpounds	Black liquor	Autoclaved at 110 °C, 20 min							
			before autoclaved	0h_ 1%	144H _1%	0h_ 2%	144H _2%	0h_ 3%	144h _3%	0h_ 4%	144H _4%
81	15.13	Octadecanoic acid, trimethylsilyl ester	√	√	√	√	√	√	√	√	√
82	15.82	9-octadecanamide	–	√	√	√	√	√	√	–	–
83	16.01	unknown	–	–	√	√	√	√	–	–	√
84	16.64	unknown	√	√	–	√	–	√	–	√	√
85	16.86	9,12-Octadecadienoic acid (z,z)-trimethylsilyl ester	–	√	–	–	–	–	–	–	–
86	16.87	unknown	√	–	–	√	–	√	–	√	√
87	17.53	unknown	–	√	–	√	–	√	–	√	√

หมายเหตุ: แบคทีเรียรหัส 2B2-1LigB อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM media ที่ทำการเติมกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

จากตาราง 18 สามารถจัดจำแนกสารประกอบที่ระบุชื่อแล้วได้ 5 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 สารประกอบที่เกิดการย่อยด้วยอุณหภูมิสูง (Thermal degradation) สังเกตจากคอลัมน์ของน้ำล้างเยื่อกระดาษที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อเทียบกับน้ำล้างเยื่อกระดาษความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ 0 ชั่วโมง ได้แก่ 1,2-Bis-(trimethylsiloxy)ethane (6.5), 4-trimethylsiloxybenzaldehyde (10.5), silane,[1,4-phenylenebis(oxy)]bis[trimethyl] (10.68), Hydrocinnamic acid, trimethylsilyl ester (10.77), 3,5-dimethoxy-4-trimethylsilyoxybenzaldehyde(12.57), Bistrimethylsilyl vanillic acid (12.88), *p*-Coumaric acid tms (13.01), Tetradecanoic acid, trimethylsilyl ester (13.26), *p*-Coumaric acid -TMS ether (13.79) และ 1-Octadecene (13.99) ซึ่งการไม่พบสารประกอบเหล่านี้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แสดงถึงอุณหภูมิสูงสามารถกำจัดสารประกอบออกจากตัวอย่างได้ (Thermal degradation) หรือเปลี่ยนสารประกอบรูปหนึ่งไปสู่อีกรูปแบบหนึ่ง เช่น การเปลี่ยน *p*-Coumaric acid -TMS ether (13.79) ไป เป็น Cinnamic acid, *p*-(trimethylsiloxy)-, trimethylsilyl ester (13.76) แสดงถึงการย่อยน้ำล้างเยื่อกระดาษด้วยความร้อนไม่สามารถแตกวงแหวนเบนซีนได้

กลุ่มที่ 2 กลุ่มสารประกอบที่ไม่พบเมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 144 ชั่วโมง โดยการเปรียบเทียบค่า retention time ระหว่างสารประกอบในชั่วโมงที่ 0 และ 144 ได้แก่ Pentanoic acid, trimethylsilyl ester (6.33), Propanoic acid, 2-[(trimethylsilyl)oxy]-,trimethylsilyl ester (7.68), Hexanoic acid trimethylsilyl ester (7.76), Ethanedioic acid, bis(trimethylsilyl) ester (8.52), Heptanoic acid TMS (8.80), Pentanoic acid, 2-[(trimethylsilyl)oxy]-,trimethylsilyl ester (9.13), Malonic acid (TMS) (9.17), Propanoic acid, 2,3-bis[(trimethyl silyl)oxy]-,trimethyl silyl ester (10.21), Malic acid-TMS (11.18), 1-Hexadecene (11.85), Benzoic acid, 3-[(trimethylsilyl)oxy]-trimethylsilyl ester (12.10), Benzoic acid,3-methoxy-4-[(trimethylsilyl)oxy]-, trimethyl silyl ester (12.87), Cinnamic acid, p-(trimethylsiloxy)-,trimethylsilyl ester (13.00), 9,12-Octadecadienoic acid (z,z)-trimethylsilyl ester (15.00), Oleic acid, trimethylsilyl ester (15.02) จากการไม่พบสารประกอบเหล่านี้หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 144 ชั่วโมง แสดงให้เห็นศักยภาพของเชื้อในการกำจัดสารพิษ (detoxification) ไม่ว่าจะเป็นสารประกอบฟีนอลหรือกรดอินทรีย์ต่าง ๆ ซึ่งปนเปื้อนอยู่ในน้ำล้างเยื่อกระดาษจากกระบวนการต้มเยื่อกระดาษในการเตรียมเยื่อกระดาษ โดยสารประกอบฟีนอลอิสระได้มาจากการย่อยลิกนินในขณะต้มเยื่อกระดาษด้วยสารละลายด่าง ส่วนกรดอินทรีย์ได้จากการย่อยสารประกอบจำพวกเฮมิเซลลูโลส เป็นต้น

กลุ่มที่ 3 กลุ่มสารประกอบที่ถูกสร้างขึ้นเมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 144 ชั่วโมง ซึ่งไม่ปรากฏในน้ำล้างเยื่อกระดาษตั้งต้น ได้แก่ 2,3-Butanediol di TMS (7.29), unknown (7.66), Octamethyl trisiloxane (7.78), unknown (8.03, 8.34, 8.58, 8.66), Benzeneacetic acid, trimethylsilyl ester (9.90), Hydrocinnamic acid, *p*-(trimethylsiloxy)-,trimethylsilyl ester (12.84), unknown (13.06, 13.31), Benzoic acid, 3,5-dimethoxy-4-[(trimethylsilyl)oxy]-trimethylsilyl ester (13.58), Trimethylsilyl 3,5-dimethoxy-4-(trimethylsilyloxy)benzoate (13.59), unknown (13.87) จากสารประกอบเหล่านี้ทำให้ทราบถึงศักยภาพของเชื้อในการเปลี่ยนลิกนินให้เป็นสารตัวกลาง (key intermediates) เพื่อนำสารประกอบตัวกลางที่เปลี่ยนแปลงได้นี้ไปย่อยต่อหรือเป็นวัตถุดิบในการสร้างเซลล์ต่อไป ซึ่งจะประกอบด้วยสารประกอบที่ไม่สามารถระบุชื่อได้ (unknown) อยู่อย่างหลากหลาย

กลุ่มที่ 4 กลุ่มของสารประกอบที่ยังคงพบแต่ให้ค่าพื้นที่ใต้กราฟน้อยกว่าชั่วโมงที่ 0 สุดท้ายโดยสารประกอบกลุ่มนี้จะต้องดูเทียบกันระหว่างตารางที่ 18 และ 19 ได้แก่ Acetic acid, [(trimethylsilyl)oxy]-,trimethyl silyl ester (7.86), Propanoic acid, 2-methyl-2-[(trimethylsilyl)oxy]-trimethylsilyl ester (8.44), Laevulic acid, trimethylsilyl ester (8.48), Propanoic acid,3-[(trimethylsilyl)oxy]-,trimethylsilyl ester (8.60), N,N'-bis(trimethylsilyl)-urea (9.65), Tristrimethylsilyl phosphoric acid (9.80), Butanedioic acid, bis(trimethylsilyl)ester (10.04), Pyrotartaric acid , Di-TMS (10.13), 3-Hydroxy glutaric acid triTMS (11.16), Pentanedioic acid, 2-[(trimethylsilyl)oxy]-,bis(trimethylsilyl) ester (11.80), 1-Hexadecene (11.85), Benzoic acid,3-methoxy-4-[(trimethylsilyl)oxy]-, trimethyl silyl ester (12.87), Cinnamic acid, p-(trimethylsiloxy)-,trimethylsilyl ester (13.00), Cinnamic acid,p-(trimethylsiloxy)-, trimethylsilyl ester (13.76), Hexadecanoic acid, Trimethylsilyl ester (14.24), Cinnamic acid, 4-methoxy-3-(trimethylsiloxy)-,trimethylsilyl ester (14.52), Oleic acid, trimethylsilyl ester (15.02), Octadecanoic acid, trimethylsilyl ester (15.13), 9-octadecanamide (15.82) จากสารประกอบเหล่านี้พบว่าจุลินทรีย์มีความสามารถในการย่อยสารพิษได้ แต่ไม่สามารถกำจัดสารพิษเหล่านี้ออกจากน้ำล้างเยื่อกระดาษได้ทั้งหมด ทำให้ยังสามารถพบกราฟปรากฏอยู่ แต่เมื่อนำค่าพื้นที่ใต้กราฟของแต่ละเวลามาเปรียบเทียบกันพบว่าพื้นที่ใต้กราฟมีค่าต่ำกว่าเวลาตั้งต้น โดยสารประกอบที่เชื้อสามารถย่อยได้มีอยู่หลากหลายเช่นเดียวกับสารประกอบกลุ่มที่ 2 ที่กล่าวไปแล้วข้างต้น

ตาราง 19 การระบุชื่อสารประกอบในสารสกัด ethyl acetate และร้อยละการย่อยสารประกอบต่างๆ ในน้ำล้างเยื่อกระดาษโดยเทคนิค TMS derivatives ของตัวอย่างน้ำล้างเยื่อกระดาษความเข้มข้น 1 – 4 %(v/v) ซึ่งเติมสารส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ แสดงกราฟการเจริญของเชื้อภาพ 68

NO.	RT(min)	Indentified conpounds	1%BL	2%BL	3%BL	4%BL
1	6.08	N,N'-methanetrtraylbis(1,1,1-trimethyl-silanamine)	8	0	-12	-5
2	6.33	Pentanoic acid, trimethylsilyl ester	100	100	100	66
9	7.68	Propanoic acid, 2-[(trimethylsilyl)oxy]-,trimethylsilyl ester	100	100	100	12
10	7.76	Hexanoic acid trimethylsilyl ester	100	100	100	73
13	7.86	Acetic acid,[(trimethylsilyl)oxy]-,trimethyl silyl ester	35	44	39	26
16	8.44	Propanoic acid, 2-methyl-2-[(trimethylsilyl)oxy]-trimethylsilyl ester	84	83	64	34
17	8.48	Laevulic acid, trimethylsilyl ester	53	43	35	37
18	8.52	Ethanedioic acid, bis(trimethylsilyl)ester	-	-	100	100
20	8.6	Propanoic acid,3-[(trimethylsilyl)oxy]-,trimethylsilyl ester	100	73	58	0
22	8.8	Heptanoic acid TMS	100	0	100	57
25	9.13	Pentanoic acid, 2-[(trimethylsilyl)oxy]-,trimethylsilyl ester	-	-	100	100
26	9.17	Malonic acid (TMS)	-	-	100	100
32	9.65	N,N'-bis(trimethylsilyl)-urea	39	62	63	41
33	9.8	Tristrimethylsilyl phosphoric acid	2	55	59	35

ตาราง 19 (ต่อ)

NO.	RT(min)	Indentified conpounds	1%BL	2%BL	3%BL	4%BL
35	10.04	Butanedioic acid, bis(trimethylsilyl)ester	72	100	92	21
36	10.13	Pyrotartaric acid , Di-TMS	32	40	35	39
37	10.21	Propanoic acid, 2,3-bis[(trimethyl silyl)oxy]-,trimethyl silyl ester	100	100	100	0
44	11.16	3-Hydroxy glutaric acid triTMS	54	58	53	39
51	11.8	Pentanedioic acid, 2-[(trimethylsilyl)oxy]-,bis(trimethylsilyl) ester	1	100	62	63
52	11.85	1-Hexadecene	23	100	53	-
54	12.1	Benzoic acid, 3-[(trimethylsilyl)oxy]-trimethylsilyl ester	-159	-208	-197	0
61	12.87	Benzoic acid,3-methoxy-4-[(trimethylsilyl)oxy]-, trimethyl silyl ester	100	32	-14	57
63	13	Cinnamic acid, p-(trimethylsiloxy)-,trimethylsilyl ester	100	100	100	35
71	13.76	Cinnamic acid,p-(trimethylsiloxy)-, trimethylsilyl ester	98	89	46	44
75	14.18	Vanillyl lactic acid-Tri TMS	-	37	39	33
77	14.24	Hexadecanoic acid, Trimethylsilyl ester	42	44	48	47
78	14.52	Cinnamic acid, 4-methoxy-3-(trimethylsiloxy)-,trimethylsilyl ester	96	100	77	51
79	15	9,12-Octadecadienoic acid (z,z)-trimethylsilyl ester	100	100	100	44
80	15.02	Oleic acid, trimethylsilyl ester	38	36	100	41
81	15.13	Octadecanoic acid, trimethylsilyl ester	31	19	21	40

กลุ่มที่ 5 กลุ่มสารประกอบที่พบเมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 144 ชั่วโมง ซึ่งให้ค่าพื้นที่ใต้กราฟเพิ่มขึ้นมากกว่าชั่วโมงที่ 0 โดยสารประกอบกลุ่มนี้จะต้องดูเทียบกันระหว่างตาราง 18 และ 19 ได้แก่ Benzoic acid, 3-[(trimethylsilyl)oxy]-trimethylsilyl ester (12.10), Benzoic acid, 3-methoxy-4-[(trimethylsilyl)oxy]-, trimethyl silyl ester (12.87) และจากค่าติดลบของพื้นที่ใต้กราฟในตาราง 19 แสดงว่าแบคทีเรียสร้างกรดเบนโซอิก โดยการเปลี่ยนสารประกอบอื่นๆ เป็นสารตัวกลาง (key intermediates) เพื่อนำเข้าสู่เซลล์และทำการย่อยเพื่อสร้างเซลล์สอดคล้องกับงานวิจัยของ Mougin, Boyer, Caminade, and Rama (2000) ใช้เชื้อรา *P. chrysosporium* ย่อยยากำจัดวัชพืช diketone ในอาหารเพาะเลี้ยงเหลว ให้ผลการย่อยเป็นกรดเบนโซอิก ซึ่งพบทั่วไปในพืชที่ดื้อต่อยา กระบวนการย่อยยากำจัดวัชพืชจะเกิดขึ้นในช่วงท้ายของการเจริญร่วมกับการผลิตเอนไซม์แลคเคส ซึ่งถือเป็นการค้นพบใหม่ที่สามารถย่อยยากำจัดวัชพืชโดยใช้เอนไซม์แลคเคส

ผลการวัดน้ำหนักโมเลกุลลิกนินในน้ำล้างเยื่อกระดาษด้วยเทคนิค Gel permeation chromatography (GPC) ที่ชั่วโมงเริ่มต้นและชั่วโมงสุดท้ายของการเพาะเลี้ยงเชื้อที่คัดแยกได้รหัส 2B2-1LigB ในสภาวะที่เหมาะสมโดยมีน้ำล้างเยื่อกระดาษเป็นส่วนประกอบตามภาพ 68 แสดงดังตาราง 20

ตาราง 20 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของอาหารเพาะเลี้ยงที่มีองค์ประกอบของน้ำล้างเยื่อกระดาษความเข้มข้นต่าง ๆ ด้วยเทคนิค GPC

Samples	Peak no.	RT(min)	Mw (Dalton)
1% 0h	1	15.388	20,385.19
	2	15.648	15,130.76
	3	18.757	428.44
1% 144h	1	15.387	20,408.58
	2	18.983	330.65
2% 0h	1	15.564	16,660.36
	2	15.909	11,217.83
	3	18.750	431.89

ตาราง 20 (ต่อ)

Samples	Peak no.	RT(min)	Mw (Dalton)
2% 144h	1	15.452	18,943.02
	2	18.977	332.93
	3	20.080	94.01
3% 0h	1	15.393	20268.67
	2	15.706	14157.37
	3	16.125	8757.14
	4	18.778	4,142.23
3% 144h	1	15.559	16,756.14
	2	18.981	331.41
4% 0h	1	15.485	18,239.73
	2	15.812	12,537.33
	3	16.286	7281.16
	4	18.780	417.29
	5	19.830	125.21
4% 144h	1	15.539	17,144.78
	2	15.873	11,690.51
	3	16.361	6681.26
	4	18.806	405.04

จากตารางแสดงมวลโมเลกุลลิกนินในชั่วโมงเริ่มต้น (0h) มีขนาดเล็กกว่ามวลโมเลกุลที่ชั่วโมงสุดท้าย (144 h) โดยค่าการเจือจางน้ำล้างเยื่อกระดาษร้อยละ 2 โดยปริมาตร ให้ความแตกต่างของน้ำหนักมวลโมเลกุลลิกนินมากที่สุดเท่ากับ 2,282.66 Da (18,943.02 Da-16,660.36 Da) ค่าการเจือจางน้ำล้างเยื่อกระดาษที่ให้ค่าน้ำหนักมวลโมเลกุลลิกนินที่เพิ่มขึ้นรองลงมา คือ ร้อยละ 1 โดยปริมาตรให้ค่าความแตกต่างน้ำหนักมวลโมเลกุลลิกนินเท่ากับ 23.39 Da (20,408.58 Da -20,385.19 Da) ยกเว้นที่ความเข้มข้นของน้ำล้างเยื่อกระดาษร้อยละ 3 และ 4 โดยปริมาตร ให้ค่าความแตกต่างน้ำหนักมวลโมเลกุลต่ำกว่ามวลโมเลกุลลิกนินเริ่มต้น เท่ากับ

-3,512.53 Da (16,756.14 Da -20,268.67 Da) และ -1,094.95 Da (17,144.78 Da -18,239.73 Da) แสดงให้เห็นถึงอิทธิพลความเข้มข้นของน้ำล้างเยื่อกระดาษที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของมวลโมเลกุลลิกนิน ดังนั้นความเข้มข้นของน้ำล้างเยื่อกระดาษที่เหมาะสมต่อการนำน้ำล้างเยื่อกระดาษไปประยุกต์ใช้เพื่อเพิ่มมวลโมเลกุลลิกนิน คือ ค่าน้ำล้างเยื่อกระดาษร้อยละ 2 โดยปริมาตร นอกจากนี้ค่าความเข้มข้นน้ำล้างเยื่อกระดาษนี้ยังช่วยส่งเสริมการเจริญของเซลล์และการย่อยลิกนิน โดยทั้ง 3 ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในระบบการเพาะเลี้ยงจะต้องอาศัยจุดสมดุลเพื่อให้ปฏิกิริยาทั้งสามเกิดขึ้นพร้อมกัน

จากผลการทดลองทั้งหมด แสดงให้เห็นว่าเชื้อที่คัดแยกได้เป็นเชื้อประจำถิ่นในน้ำล้างเยื่อกระดาษ โดยมีความสามารถในการทนสารพิษในน้ำล้างเยื่อกระดาษ เมื่อนำมาหาสภาวะในการย่อยลิกนิน พบว่า เชื้อสามารถเจริญโดยการย่อยลิกนินได้ในสภาวะจำเพาะที่จะช่วยส่งเสริมการเจริญที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นลิกนิน 1 กรัมต่อลิตร กลูโคส 5 กรัมต่อลิตร และยูเรีย 5 กรัมต่อลิตร เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อที่สภาวะนี้ พบว่าเชื้อสามารถปรับตัวต่ออาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อเจริญ ซึ่งเป็นสภาวะที่สมดุลโดยให้ค่าการย่อยลิกนินสูงสุด และเกิดปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงเป็นสารโพลิเมอร์ลิกนิน (polymerization) โดยการทำงานของเอนไซม์แลคเคสที่เชื้อผลิตขึ้น แตกต่างจากรายงานการย่อยลิกนินอื่นๆ ซึ่งให้ค่าลิกนิน (A_{280}) ลดลง แต่ในงานวิจัยนี้กลับพบการเพิ่มขึ้นของค่าลิกนิน (A_{280}) Jönsson et al. (1998) ได้อธิบายการเพิ่มขึ้นของค่าดูดกลืนแสงยูวีที่ 280 นาโนเมตรว่าเกิดจากกระบวนการล้างสารพิษของเอนไซม์แลคเคสโดยการนำอนุมูลฟีนอลอิสระไปต่อกับโมเลกุลลิกนินขนาดใหญ่ ทำให้สารละลายมีองค์ประกอบของลิกนิน 2 รูปแบบคือ ลิกนินขนาดใหญ่และขนาดเล็ก เมื่อเร็วๆ นี้ Brzonova et al. (2017) รายงานสภาวะสมดุลในการเพาะเลี้ยงเชื้อราเพื่อดัดแปลงโมเลกุลลิกนินให้ได้มวลโมเลกุลขนาดใหญ่ขึ้น เพื่อนำลิกนินที่ได้มาเป็นสารตั้งต้นในการทำ anionic hydrogels และจากรายงานอื่นๆ ที่ใช้เอนไซม์แลคเคสบริสุทธิ์ในการดัดแปลงโมเลกุลลิกนินจากอุตสาหกรรม ทำให้ผู้วิจัยทราบถึงแนวโน้มงานวิจัยในอนาคตที่มีจุดประสงค์ไม่เพียงย่อยลิกนินหรือบำบัดสารพิษในน้ำล้างเยื่อกระดาษให้หมดไปเท่านั้น แต่ยังสามารถเติมจุลินทรีย์ลงไปในน้ำล้างเยื่อกระดาษเพื่อดัดแปลงโมเลกุลลิกนิน จึงนำลิกนินที่ได้มาเป็นสารตั้งต้นในอุตสาหกรรมอื่นต่อไป ซึ่งข้อดีของการเติมจุลินทรีย์ลงไปโดยตรง คือ จุลินทรีย์มีความสามารถในการปรับตัวต่อสภาวะต่างๆ ได้ดี แต่ทั้งนี้ทั้งนั้นต้องวิจัยสภาวะสมดุลระหว่างการย่อยลิกนินและการดัดแปลงลิกนินก่อนทุกครั้งที่จะนำเชื้อนั้นๆ ไปใช้ประโยชน์จากการใช้เซลล์จุลินทรีย์โดยตรง คือ สามารถเพิ่มขนาดการผลิตให้มีขนาดใหญ่ขึ้นได้ ลดขั้นตอนการผลิตหรือการจัดหาซื้อเอนไซม์แลคเคส แต่อย่างไรก็ตามการใช้จุลินทรีย์

โดยตรงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องเติมสารส่งเสริมการเจริญและปรับสภาวะให้เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยง

โรงงานเยื่อกระดาษเป็นโรงงานที่ปลดปล่อยมลพิษอันดับต้น ๆ ของอุตสาหกรรมที่มีการปล่อยสารพิษออกสู่สิ่งแวดล้อม โดยมีน้ำล้างเยื่อกระดาษเป็นหนึ่งในของเสียที่ถูกปลดปล่อยออกมา ซึ่งการบำบัดน้ำล้างเยื่อกระดาษของโรงงานส่วนใหญ่ คือ การทำน้ำล้างเยื่อกระดาษให้เข้มข้น จากนั้นจะนำเข้าสู่เตาเผาเพื่อนำด่างหรือ NaOH กลับมาใช้ใหม่ ซึ่งเป็นวิธีที่ทำให้สารพิษเปลี่ยนรูปจากสภาวะของเหลวไปสู่สภาวะก๊าซ และไม่คุ้มค่าทางเศรษฐกิจ ปัญหาน้ำล้างเยื่อกระดาษจึงยังคงเป็นปัญหาให้เหล่านักวิจัยจากทั่วโลกศึกษาวิจัยเช่นโครงการ OXYPOL ที่มีแนวคิดเกี่ยวกับการย่อยลิกนินในน้ำล้างเยื่อกระดาษ จากนั้นเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงเป็นโพลิเมอร์ลิกนินขนาดใหญ่โดยใช้เอนไซม์ เพื่อนำลิกนินขนาดใหญ่ที่ได้ไปใช้เป็นวัตถุดิบตั้งต้นในการผลิตพลาสติกชีวภาพ ซึ่งจากผลการทดลองของงานวิจัยนี้ได้ตอบวัตถุประสงค์ของโครงการ OXYPOL โดยการใช้จุลินทรีย์ที่คัดแยกได้สกุล *Bacillus* ซึ่งมีหลักการทำงานคือ เชื้อย่อยลิกนินโดยการสร้างเอนไซม์แลคเคส จากนั้นเอนไซม์แลคเคสที่แบคทีเรียหลั่งออกมาจะทำปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงเป็นสารโพลิเมอร์ลิกนินขนาดใหญ่ โดยหนทางที่จะนำไปใช้ประโยชน์ คือ การตกตะกอนลิกนินขนาดใหญ่ที่ได้ด้วยกรด จากนั้นทำการสกัดแยกมวลโมเลกุขนาดเล็กไปใช้ประโยชน์ เช่น การสกัดแยกกรด ferulic acid โดยใช้เป็นสารแต่งกลิ่นรสชาติอาหาร ซึ่งปัจจุบันมีผลิตภัณฑ์ทางการค้าในลิขสิทธิ์ของบริษัท Borregaard หรือการสกัดกรดอินทรีย์ Kumar, & Alén (2015) หาวิธีการนำกรดคาร์บอกซิลิกมวลโมเลกุลต่ำมาใช้ ด้วยการตกตะกอนลิกนินด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ให้ได้พีเอชที่ 8.5 ในถังปฏิกรณ์เคมีอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส แรงดันโดยประมาณ 1.5 bar เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นนำไปปั่นแยกตะกอนลิกนินออกที่ 3,000 rpm เป็นเวลา 30 นาที จะได้ส่วนใส เรียกว่า "carbonated black liqour" จึงนำไปปรับกรดพีเอช 2.0 – 2.5 ด้วย 2M H_2SO_4 และระเหย (evaporation) เพื่อดึงกรดอินทรีย์ระเหยได้ออกมา เติมเมทานอล (1:1 v/v) ทำให้เกิดตะกอนของโซเดียมซัลเฟต (Na_2SO_4) ส่วนของเหลวที่ได้มีองค์ประกอบของกรดคาร์บอกซิลิกมวลโมเลกุลต่ำถูกนำไปทำปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชั่นโดยกลั่นที่ต่อเชื่อมกับ dean stark condenser โดยมีตัวเร่งปฏิกิริยาคือ Amberlyst 15 (0.2 wt%) ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จะได้ methyl glycolate, methyl lactate และ methyl 2-hydroxybutanoate

(low-molecular-mass-hydroxy acids) และกากตะกอนหลังจากผ่านการกลั่นประกอบไปด้วย 3,4-dideoxy-pentonic, 3-deoxy-pentonic, xyloisosaccharinic และ glucoisosaccharinic acids (high-molecular-mass-hydroxy acids) จากศักยภาพของโรงงานเยื่อกระดาษในด้านการนำของเหลือทิ้งมาใช้ให้เกิดประโยชน์ อาจก่อให้เกิดรายได้จากอุตสาหกรรมพ่วงเหล่านี้อีกทางหนึ่ง

บทที่ 5

บทสรุป

น้ำล้างเยื่อกระดาษเป็นของเสียจากกระบวนการผลิตเยื่อกระดาษ การบำบัดน้ำล้างเยื่อกระดาษสามารถทำได้หลายวิธี โดยวิธีการทางชีวภาพเป็นวิธีการหนึ่งที่ได้รับความสนใจในปัจจุบัน โดยอาศัยการทำงานของจุลินทรีย์ในการย่อยลิกนินที่เป็นองค์ประกอบหลักในน้ำล้างเยื่อกระดาษและสามารถได้ผลผลิตที่เป็นสารอื่นที่มีมูลค่าเพิ่มได้ งานวิจัยนี้ทำการคัดแยกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยลิกนินด้วยเทคนิคการเติมสารพิษลงในอาหารคัดแยก (toxic tolerance technique) และคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการเจริญในน้ำล้างเยื่อกระดาษ ซึ่งสามารถคัดแยกจุลินทรีย์ได้ทั้งหมดจำนวน 5 รหัสคัดแยก ได้แก่ 2B2-1LigB, 6B2-Al, mPDA7, MXYP5 และ MMX3 แสดงลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และแสดงลักษณะการเจริญที่แตกต่างกันในน้ำล้างเยื่อกระดาษ เมื่อนำจุลินทรีย์ทั้งหมดมาทำการระบุชื่อด้วยวิธีการทางชีวเคมีและวิธีการทางชีวโมเลกุล พบทั้งหมดอยู่ในสกุล *Bacillus* sp. โดย 2B2-1LigB, 6B2-Al, mPDA 7 และ MMX3 ถูกระบุว่าเป็นสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกับ *B. subtilis* ในขณะที่ MXYP5 ถูกระบุว่าเป็นสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกับ *B. licheniformis*

จากนั้นทำการคัดเลือกความสามารถในการย่อยลิกนินที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสภาวะที่มีการเติมและไม่เติมสารส่งเสริมการเจริญ เพื่อเลือกสายพันธุ์ที่เหมาะสมที่สุด มาทำการทดสอบปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อความสามารถในการย่อยลิกนิน ได้แก่ ความเข้มข้นลิกนิน แหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน และอุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ลิกนินทางการค้าเป็นส่วนประกอบ โดยตรวจวัดการเจริญเติบโตจากความขุ่นและเซลล์ที่มีชีวิต ปริมาณลิกนิน ค่าสีของน้ำหมัก แอคติวิตี้ของเอนไซม์แลคเคส พบว่า จุลินทรีย์รหัสคัดแยก 2B2-1LigB มีความสามารถในการย่อยลิกนินได้สูงสุด ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมกลูโคสและเปปโทนเป็นสารส่งเสริมการเติบโต จึงถูกเลือกมาทดลองต่อ จุลินทรีย์รหัสคัดแยก 2B2-1LigB สามารถย่อยสลายลิกนินได้สูงสุดเท่ากับร้อยละ 79.23 ที่สภาวะความเข้มข้นลิกนิน 1 กรัมต่อลิตร โดยใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

สุดท้ายนำสภาวะที่ได้มาใช้กับการเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยน้ำล้างเยื่อกระดาษความเข้มข้นต่างๆ ในสภาวะที่มีการเติมและไม่เติมสารส่งเสริมการเจริญ โดยตรวจวัดการเจริญจากความขุ่นและเซลล์ที่มีชีวิต ปริมาณลิกนิน ค่าสีของน้ำหมัก แอคติวิตี้ของเอนไซม์แลคเคส และนำน้ำหมัก

ที่ชั่วโมงสุดท้ายมาตรวจวิเคราะห์เพื่อระบุสารโมเลกุลต่ำที่สำคัญ โดยใช้แก๊สโครมาโตกราฟี แมสสเปกโตรสโคปี และหามวลโมเลกุลของโพลิเมอร์โดยใช้ Gel permeation chromatography พบว่า ความเข้มข้นของน้ำล้างเยื่อกระดาษที่เหมาะสม คือ ร้อยละ 2 โดยปริมาตร สารมวลโมเลกุลต่ำที่ตรวจพบมีทั้งที่เกิดการสลายตัวและสร้างขึ้นใหม่จากการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และยังตรวจพบอีกว่าจุลินทรีย์สามารถย่อยสลายลิกนินและสร้างสารโพลิเมอร์ลิกนินที่มีขนาดเพิ่มขึ้นเท่ากับ 2,282.66 ดาลตัน ทำให้สรุปได้ว่าจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้มีความสามารถในการเติบโตในน้ำล้างเยื่อกระดาษ เกิดปฏิกิริยาสลายและสร้างเป็นโพลิเมอร์ลิกนินที่มีขนาดมวลโมเลกุลใหญ่ขึ้นได้

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

Abd-Elsalam, H. E., & El-Hanafy, A. A. (2009). Lignin Biodegradation with Ligninolytic Bacterial Strain and Comparison of Bacillus subtilis and Bacillus sp. Isolated from Egyptian Soil. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci., 5*(1), 39-44.

Abhishek, A., Dwivedi, A., Tandan, N., & Kumar, U. (2015). Comparative bacterial degradation and detoxification of model and kraft lignin from pulp paper wastewater and its metabolites. *Applied Water Science, 7*(2), 757-767. doi:10.1007/s13201-015-0288-9

Ahmad, M., Taylor, C. R., Pink, D., Burton, K., Eastwood, D., Bending, G. R., & Bugg, T. D. H. (2010). Development of novel assays for lignin degradation: comparative analysis of bacterial and fungal lignin degraders. *Mol Biosyst, 6*(5), 815-821. doi:10.1039/b908966g

Alexander, B., & Priest, F. G. (1989). Bacillus glucanolyticus, a new species that degrades a variety of B-glucans. *Int. J. Syst. Bacteriol., 39*(2), 112-115.

Ali, M., & Sreekrishnan, T. R. (2000). Anaerobic treatment of agricultural residue based pulp and paper mill effluents for AOX and COD reduction. *Process Biochemistry, 36*(1–2), 25-29. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00167-9

Andreu, G., & Vidal, T. (2011). Effects of laccase-natural mediator systems on kenaf pulp. *Bioresource Technology, 102*(10), 5932-5937. doi:https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.008

Areskogh, D., Li, J., Gellerstedt, G., & Henriksson, G. (2010). Investigation of the Molecular Weight Increase of Commercial Lignosulfonates by Laccase Catalysis. *Biomacromolecules, 11*(4), 904-910. doi:10.1021/bm901258v

Arora, D. S., Chander, M., & Gill, P. K. (2002). Involvement of lignin peroxidase, manganese peroxidase and laccase in degradation and selective ligninolysis of wheat straw. *International Biodeterioration & Biodegradation, 50*(2), 115-120. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0964-8305(02)00064-1

Arora, D. S., & Sandhu, D. K. (1985). Laccase production and wood degradation by a white-rot fungus Daedalea flavida. *Enzyme and Microbial Technology, 7*(8), 405-408. doi:https://doi.org/10.1016/0141-0229(85)90131-0

Asina, F., Brzonova, I., Voeller, K., Kozliak, E., Kubátová, A., Yao, B., & Ji, Y. (2016). Biodegradation of lignin by fungi, bacteria and laccases. *Bioresource Technology, 220*(Supplement C), 414-424. doi:https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.08.016

Asina, F. N. U., Brzonova, I., Kozliak, E., Kubátová, A., & Ji, Y. (2017). Microbial treatment of industrial lignin: Successes, problems and challenges. *Renewable and Sustainable Energy Reviews, 77*(Supplement C), 1179-1205. doi:https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.03.098

Bandounas, L., Wierckx, N. J. P., de Winde, J. H., & Ruijssenaars, H. J. (2011). Isolation and characterization of novel bacterial strains exhibiting ligninolytic potential. *BMC Biotechnology, 11*(1), 1-11. doi:10.1186/1472-6750-11-94

Brown, M. E., & Chang, M. C. Y. (2014). Exploring bacterial lignin degradation. *Current Opinion in Chemical Biology, 19*, 1-7. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.11.015

Brzonova, I., Kozliak, E., Artemyeva, A., LaVallie, A., Kubátová, A., & Ji, Y. (2017). *Production of lignin based insoluble polymers (anionic hydrogels) by C. versicolor*. scientific reports. 7(17507), 1-13

Bugg, T. D., Ahmad, M., Hardiman, E. M., & Rahmanpour, R. (2011). Pathways for degradation of lignin in bacteria and fungi. *Nat Prod Rep, 28*, 1883-1896. doi:10.1039/c1np00042j

Bugg, T. D. H., Ahmad, M., Hardiman, E. M., & Singh, R. (2010). The emerging role for bacteria in lignin degradation and bio-product formation. *Curr Opin Biotechnol, 22*, 394-400. doi:10.1016/j.ceb.2010.01.003

Casa, R., D'Annibale, A., Pieruccetti, F., Stazi, S. R., Giovannozzi Sermanni, G., & Lo Cascio, B. (2003). Reduction of the phenolic components in olive-mill wastewater by an enzymatic treatment and its impact on durum wheat (Triticum durum Desf.) germinability. *Chemosphere, 50*(8), 959-966. doi:https://doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00707-5

Chandra, R., & Abhishek, A. (2011). Bacterial decolorization of black liquor in axenic and mixedcondition and characterization of metabolites. *Biodegradation, 22*, 603-611. doi:10.1007/s10532-010-9433-1

Chandra, R., Abhishek, A., & Sankhwar, M. (2011). Bacterial decolorization and detoxification of black liquor from rayon grade pulp manufacturing paper industry and detection of their metabolic products. *Bioresource Technology, 102*(11), 6429-6436. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.048

Chandra, R., Raj, A., Purohit, H. J., & Kapley, A. (2007). Characterisation and optimisation of three potential aerobic bacterial strains for kraft lignin degradation from pulp paper waste. *Chemosphere, 67*(4), 839-846. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.10.011

Chandra, R., & Singh, R. (2012). Decolourisation and detoxification of rayon grade pulp paper mill effluent by mixed bacterial culture isolated from pulp paper mill effluent polluted site. *Biochemical Engineering Journal, 61*, 49-58. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2011.12.004

Chandra, R., Singh, S., Krishna Reddy, M. M., Patel, D. K., J. Purohit, H., & Kapley, A. (2008). Isolation and characterization of bacterial strains <I>Paenibacillus </I>sp. and <I>Bacillus </I>sp. for kraft lignin decolorization from pulp paper mill waste. *The Journal of General and Applied Microbiology, 54*(6), 399-407. doi:10.2323/jgam.54.399

Chen, Y., Chai, L., Tang, C., Yang, Z., Zheng, Y., Shi, Y., & Zhang, H. (2012). Kraft lignin biodegradation by Novosphingobium sp. B-7 and analysis of the degradation process. *Bioresource Technology, 123*, 682-685. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.07.028

Chen, Y. H., Chai, L. Y., Zhu, Y. H., Yang, Z. H., Zheng, Y., & Zhang, H. (2012). Biodegradation of kraft lignin by a bacterial strain Comamonas sp. B-9 isolated from eroded bamboo slips. *J Appl Microbiol, 112*, 900-906. doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05275.x

Christopher, L. P., Yao, B., & Ji, Y. (2014). Lignin Biodegradation with Laccase-Mediator Systems. *Frontiers in Energy Research, 2*(12), 1-13 doi:10.3389/fenrg.2014.00012

Crawford, D. L. (1980). Microbial degradation of lignin. *Enzyme Microb Technol, 2*(1), 11- 22. doi:10.1016/0141-0229(80)90003-4

D'Annibale, A., Rita Stazi, S., Vinciguerra, V., Di Mattia, E., & Giovannozzi Sermanni, G. (1999). Characterization of immobilized laccase from Lentinula edodes and its use in olive-mill wastewater treatment. *Process Biochemistry, 34*(6–7), 697-706. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0032-9592(98)00144-7

Damiano, V. B., Bocchini, D. A., Gomes, E., & Da Silva, R. (2003). Application of crude xylanase from Bacillus licheniformis 77-2 to the bleaching of eucalyptus Kraft pulp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology, 19*(2), 139-144. doi:10.1023/A:1023244911314

Diamantidis, G., Effosse, A., Potier, P., & Bally, R. (2000). Purification and characterization of the first bacterial laccase in the rhizospheric bacterium Azospirillum lipoferum. *Soil Biology and Biochemistry, 32*(7), 919-927. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0038-0717(99)00221-7

Engel, N., Hundt, M., & Schapals, T. (2016). Increasing the lignin yield of the Alkaline Polyol Pulping process by treating black liquor with laccases of Myceliophthora thermophila. *Bioresource Technology, 203*(Supplement C), 96-102. doi:https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.12.027

Fisher, A. B., & Fong, S. S. (2014). Lignin biodegradation and industrial implications. *AIMS Bioengineering, 1*(2), 92-112. doi:http://dx.doi.org/10.3934/bioeng.2014.2.92

Gatson, J. W., Benz, B. F., Chandrasekaran, C., Satomi, M., Venkateswaran, K., & Hart, M. E. (2006). Bacillus tequilensis sp. nov., isolated from a 2000-year-old Mexican shaft-tomb, is closely related to Bacillus subtilis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 56*(7), 1475-1484. doi:doi:10.1099/ijs.0.63946-0

Giroux, H., Vidal, P., Bouchard, J., & Lamy, F. (1988). Degradation of Kraft Indulin Lignin by Streptomyces viridosporus and Streptomyces badius. *Appl Environ Microbiol, 54*(12), 3064 - 3070.

Gouveia, S., Fernández-Costas, C., Sanromán, M. A., & Moldes, D. (2012). Enzymatic polymerisation and effect of fractionation of dissolved lignin from Eucalyptus globulus Kraft liquor. *Bioresource Technology, 121*(Supplement C), 131-138. doi:https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.05.144

Gouveia, S., Fernández-Costas, C., Sanromán, M. A., & Moldes, D. (2013). Polymerisation of Kraft lignin from black liquors by laccase from Myceliophthora thermophila: Effect of operational conditions and black liquor origin. *Bioresource Technology, 131*(Supplement C), 288-294. doi:https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.155

Guan, G., Zhang, Z., Ding, H., Li, M., Shi, D., Zhu, M., & Xia, L. (2015). Enhanced degradation of lignin in corn stalk by combined method of Aspergillus oryzae solid state fermentation and H2O2 treatment. *Biomass and Bioenergy, 81*, 224-233. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2015.07.008

Guan, X., Guo, M., Lin, J., Li, J., & Liu, X. (2015). *Catalytic polymerization of lignin model compounds using laccase and mediators*. Bulgarian Chemical Communication, *47*(4), 1155-1162.

Gupta, V. K., Minocha, A. K., & Jain, N. (2001). Batch and continuous studies on treatment of pulp mill wastewater by Aeromonas formicans. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 76*(6), 547-552. doi:10.1002/jctb.417

Gutiérrez, A., Rodríguez, I. M., & del Río, J. C. (2006). Chemical Characterization of Lignin and Lipid Fractions in Industrial Hemp Bast Fibers Used for Manufacturing High-Quality Paper Pulps. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54*(6), 2138-2144. doi:10.1021/jf052935a

Hernández Fernaud, J. R., Carnicero, A., Perestelo, F., Hernández Cutuli, M., Arias, E., & Falcón, M. A. (2006). Upgrading of an industrial lignin by using laccase produced by Fusarium proliferatum and different laccase-mediator systems. *Enzyme and Microbial Technology, 38*(1), 40-48. doi:https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.01.043

Hernández, M., Hernández-Coronado, M. J., Ball, A. S., & Arias, M. E. (2001). Degradation of alkali-lignin residues from solid-state fermentation of wheat straw by streptomycetes. *Biodegradation, 12*(4), 219-223. doi:10.1023/A:1013110510633

Hullo, M.-F., Moszer, I., Danchin, A., & Martin-Verstraete, I. (2001). CotA of Bacillus subtilis Is a Copper-Dependent Laccase. *Journal of Bacteriology, 183*(18), 5426-5430. doi:10.1128/JB.183.18.5426-5430.2001

Jadhav, S. U., Jadhav, U. U., Dawkar, V. V., & Govindwar, S. P. (2008). Biodegradation of disperse dye brown 3REL by microbial consortium of Galactomyces geotrichum MTCC 1360 and Bacillus sp. VUS. *Biotechnology and Bioprocess Engineering, 13*(2), 232–239. doi:10.1007/s12257-007-0204-8

Jönsson, L., Palmqvist, E., Nilvebrant, N. O., & Hahn-Hägerdal, B. (1998). *Detoxification of wood hydrolysates with laccase and peroxidase from the white-rot fungus Trametes versicolor*, *49*(6), 691 - 697

Kamm, B., & Kamm, M. (2004). Principles of biorefineries. *Applied Microbiology & Biotechnology, 64*(2), 137.

Kawai, S., Nakagawa, M., & Ohashi, H. (2002). Degradation mechanisms of a nonphenolic β-O-4 lignin model dimer by Trametes versicolor laccase in the presence of 1-hydroxybenzotriazole. *Enzyme and Microbial Technology, 30*(4), 482-489. doi:https://doi.org/10.1016/S0141-0229(01)00523-3

Kim, S., Silva, C., Zille, A., Lopez, C., Evtuguin, D. V., & Cavaco-Paulo, A. (2009). Characterisation of enzymatically oxidised lignosulfonates and their application on lignocellulosic fabrics. *Polymer International, 58*(8), 863-868. doi:10.1002/pi.2600

Kirk, T., Jeffries, T., & Leatham, G. (1983). Biotechnology: applications and implications for the pulp and paper industry. *Biotechnology, 66*(5), 45-51.

Ko, C.-H., Chen, W.-L., Tsai, C.-H., Jane, W.-N., Liu, C.-C., & Tu, J. (2007). Paenibacillus campinasensis BL11: A wood material-utilizing bacterial strain isolated from black liquor. *Bioresource Technology, 98*(14), 2727-2733. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2006.09.034

Kolb, M., Sieber, V., Amann, M., Faulstich, M., & Schieder, D. (2012). Removal of monomer delignification products by laccase from Trametes versicolor. *Bioresource Technology, 104*(Supplement C), 298-304. doi:https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.080

Koschorreck, K., Richter, S. M., Ene, A. B., Roduner, E., Schmid, R. D., & Urlacher, V. B. (2008). Cloning and characterization of a new laccase from Bacillus licheniformis catalyzing dimerization of phenolic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology, 79*(2), 217-224. doi:10.1007/s00253-008-1417-2

Kumar, H., & Alén, R. (2015). Recovery of aliphatic low-molecular-mass carboxylic acids from hardwood kraft black liquor. *Separation and Purification Technology, 142*, 293-298. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.seppur.2014.12.038

Li, H., Zhang, R., Tang, L., Zhang, J., & Mao, Z. (2014). Evaluation of Bacillus sp. MZS10 for decolorizing Azure B dye and its decolorization mechanism. *Journal of Environmental Sciences, 26*(5), 1125-1134. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S1001-0742(13)60540-9

Li, K., Xu, F., & Eriksson, K.-E. L. (1999). Comparison of Fungal Laccases and Redox Mediators in Oxidation of a Nonphenolic Lignin Model Compound. *Applied and Environmental Microbiology, 65*(6), 2654-2660.

Luong, N. D., Binh, N. T. T., Duong, L. D., Kim, D. O., Kim, D.-S., Lee, S. H., . . . Nam, J.-D. (2012). An eco-friendly and efficient route of lignin extraction from black liquor and a lignin-based copolyester synthesis. *Polymer Bulletin, 68*(3), 879-890. doi:10.1007/s00289-011-0658-x

Madad, N., Chebil, L., Charbonnel, C., Ioannou, I., & Ghoul, M. (2013). Enzymatic polymerization of sodium lignosulfonates: effect of catalysts, initial molecular weight, and mediators. *Canadian Journal of Chemistry, 91*(3), 220-225. doi:10.1139/cjc-2012-0036

Malherbe, S., & Cloete, T. E. (2002). Lignocellulose biodegradation: Fundamentals and applications. *Reviews in Environmental Science and Bio/technology, 1*(2), 105-114. doi:10.1023/A:1020858910646

Malik, A. (2004). Metal bioremediation through growing cells. *Environment International, 30*(2), 261-278. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2003.08.001

Masai, E., Katayama, Y., & Fukuda, M. (2007). Genetic and Biochemical Investigations on Bacterial Catabolic Pathways for Lignin-Derived Aromatic Compounds. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 71*(1), 1-15. doi:10.1271/bbb.60437

Mathews, S. L., Ayoub, A. S., Pawlak, J., & Grunden, A. M. (2013). Methods for Facilitating Microbial Growth on Pulp Mill Waste Streams and Characterization of the Biodegradation Potential of Cultured Microbes. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*(82), e51373, 1-7. doi:10.3791/51373

Mathews, S. L., Grunden, A. M., & Pawlak, J. (2016). Degradation of lignocellulose and lignin by Paenibacillus glucanolyticus. *International Biodeterioration & Biodegradation, 110*, 79-86. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.02.012

Mathews, S. L., Pawlak, J., & Grunden, A. M. (2015). Bacterial biodegradation and bioconversion of industrial lignocellulosic streams. *Applied Microbiology and Biotechnology, 99*(7), 2939-2954. doi:10.1007/s00253-015-6471-y

Mathews, S. L., Pawlak, J. J., & Grunden, A. M. (2014). Isolation of Paenibacillus glucanolyticus from pulp mill sources with potential to deconstruct pulping waste. *Bioresource Technology, 164*, 100-105. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.04.093

Mattinen, M.-L., Suortti, T., Gosselink, R., Argyropoulos, D. S., Evtuguin, D., Suurnäkki, A., . . . Tamminen, T. (2008). POLYMERIZATION OF DIFFERENT LIGNINS BY LACCASE. *BioResources; 3*(2), 549-565.

McMahon, A. M., Doyle, E. M., Brooks, S., & O'Connor, K. E. (2007). Biochemical characterisation of the coexisting tyrosinase and laccase in the soil bacterium Pseudomonas putida F6. *Enzyme and Microbial Technology, 40*(5), 1435-1441. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.10.020

Minu, K., Jiby, K. K., & Kishore, V. V. N. (2012). Isolation and purification of lignin and silica from the black liquor generated during the production of bioethanol from rice straw. *Biomass and Bioenergy, 39*, 210-217. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.01.007

Mishra, M., & Thakur, I. S. (2010). Isolation and characterization of alkalotolerant bacteria and optimization of process parameters for decolorization and detoxification of pulp and paper mill effluent by Taguchi approach. *Biodegradation, 21*(6), 967-978. doi:10.1007/s10532-010-9356-x

Mongkolthanaruk, W. (2012). *Independent behavior of bacterial laccases to inducers and metal ions during production and activity*. African Journal of Biotechnology, *11*(39), 9391-9398.

Mougin, C., Boyer, F.-D., Caminade, E., & Rama, R. (2000). Cleavage of the Diketonitrile Derivative of the Herbicide Isoxaflutole by Extracellular Fungal Oxidases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48*(10), 4529-4534. doi:10.1021/jf000397q

Moya, R., Saastamoinen, P., Hernández, M., Suurnäkki, A., Arias, E., & Mattinen, M.-L. (2011). Reactivity of bacterial and fungal laccases with lignin under alkaline conditions. *Bioresource Technology, 102*(21), 10006-10012. doi:https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.08.046

Narayanan P. Muthukumarasamy, Beenie Jackson, Antony Joseph Raj, & Sevanan, M. (2015). Production of Extracellular Laccase from Bacillus subtilis MTCC 2414 Using Agroresidues as a Potential Substrate,. *Biochemistry Research International, 13*(5), 196 - 205. doi:10.1155/2015/765190

Narayanan P. Muthukumarasamy, & Murugan, S. (2014). Production, Purification and Application of Bacterial Laccase: A Review. *Biotechnology, 13*, 196-205. doi:http://dx.doi.org/10.3923/biotech.2014.196.205

Nugroho Prasetyo, E., Kudanga, T., Østergaard, L., Rencoret, J., Gutiérrez, A., del Río, J. C., . . . Guebitz, G. M. (2010). Polymerization of lignosulfonates by the laccase-HBT (1-hydroxybenzotriazole) system improves dispersibility. *Bioresource Technology, 101*(14), 5054-5062. doi:https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.048

Okuda, N., Soneura, M., Ninomiya, K., Katakura, Y., & Shioya, S. (2008). Biological detoxification of waste house wood hydrolysate using Ureibacillus thermosphaericus for bioethanol production. *Journal of Bioscience and Bioengineering, 106*(2), 128-133. doi:http://dx.doi.org/10.1263/jbb.106.128

Oliveira, P. L. d., Duarte, M. C. T., Ponezi, A. N., & Durrant, L. R. (2009a). Purification and Partial characterization of manganese peroxidase from Bacillus pumilus AND Paenibacillus sp. *Brazilian Journal of Microbiology, 40*, 818-826.

Oliveira, P. L. d., Duarte, M. C. T., Ponezi, A. N., & Durrant, L. R. (2009b). Use of Bacillus pumilus CBMAI 0008 and Paenibacillus sp. CBMAI 868 for colour removal from paper mill effluent. *Brazilian Journal of Microbiology, 40*, 354-357.

Paliwal, R., Rawat, A. P., Rawat, M., & Rai, J. P. N. (2012). Bioligninolysis: Recent Updates for Biotechnological Solution. *Applied Biochemistry and Biotechnology, 167*(7), 1865-1889. doi:10.1007/s12010-012-9735-3

Paliwal, R., Uniyal, S., & Rai, J. P. N. (2015). Evaluating the potential of immobilized bacterial consortium for black liquor biodegradation. *Environmental Science and Pollution Research, 22*(9), 6842-6853. doi:10.1007/s11356-014-3872-x

Paliwal, R., Uniyal, S., Verma, M., Kumar, A., & Rai, J. P. N. (2016). Process optimization for biodegradation of black liquor by immobilized novel bacterial consortium. *Desalination and Water Treatment, 57*(40), 18915-18926. doi:10.1080/19443994.2015.1092892

Palmqvist, E., & Hahn-Hägerdal, B. (2000). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology, 74*(1), 25-33. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00161-3

Patil, S. R. (2014). Production and purification of lignin peroxidase from Bacillus megaterium and its application in bioremediation. *CIBTech Journal of Microbiology, 3*(1), 22-28.

Pokhrel, D., & Viraraghavan, T. (2004). Treatment of pulp and paper mill wastewater—a review. *Science of The Total Environment, 333*(1–3), 37-58. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.05.017

Pollegioni, L., Tonin, F., & Rosini, E. (2015). Lignin-degrading enzymes. *FEBS Journal, 282*(7), 1190-1213. doi:10.1111/febs.13224

Raghukumar, C., & Rivonkar, G. (2001). Decolorization of molasses spent wash by the white-rot fungus Flavodon flavus , isolated from a marine habitat. *Applied Microbiology and Biotechnology, 55*(4), 510-514.

Raj, A., Chandra, R., Reddy, M. M. K., Purohit, H. J., & Kapley, A. (2007). Biodegradation of kraft lignin by a newly isolated bacterial strain, Aneurinibacillus aneurinilyticus from the sludge of a pulp paper mill. *World Journal of Microbiology and Biotechnology, 23*(6), 793-799. doi:10.1007/s11274-006-9299-x

Raj, A., Krishna Reddy, M. M., & Chandra, R. (2007a). Identification of low molecular weight aromatic compounds by gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) from kraft lignin degradation by three Bacillus sp. *International Biodeterioration & Biodegradation, 59*(4), 292-296. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2006.09.006

Raj, A., Kumar, S., Haq, I., & Singh, S. K. (2014). Bioremediation and toxicity reduction in pulp and paper mill effluent by newly isolated ligninolytic Paenibacillus sp. *Ecological Engineering, 71*, 355-362. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoleng.2014.07.002

Raj, A., Reddy, M. M. K., & Chandra, R. (2007b). Decolourisation and treatment of pulp and paper mill effluent by lignin-degrading Bacillus sp. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 82*(4), 399-406. doi:10.1002/jctb.1683

Raj, A., Reddy, M. M. K., Chandra, R., Purohit, H. J., & Kapley, A. (2007). Biodegradation of kraft-lignin by Bacillus sp. isolated from sludge of pulp and paper mill. *Biodegradation, 18*(6), 783-792. doi:10.1007/s10532-007-9107-9

Rajwar, D., & Rai, J. (2015). Kraft black liquor decolorization by fungi isolated from contaminated pulp and paper mill sludge. *International Journal of Recent Scientific Research, 6*(12), 7770-7775.

Ramalingam, B., Sana, B., Seayad, J., Ghadessy, F. J., & Sullivan, M. B. (2017). Towards understanding of laccase-catalysed oxidative oligomerisation of dimeric lignin model compounds. *RSC Advances, 7*(20), 11951-11958. doi:10.1039/C6RA26975C

Rana, T., Gupta, S., Kumar, D., Sharma, S., Rana, M., Rathore, V. S., & Pereira, B. M. J. (2004). Toxic effects of pulp and paper-mill effluents on male reproductive organs and some systemic parameters in rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology, 18*(1), 1-7. doi:https://doi.org/10.1016/j.etap.2004.04.005

Renugadevi, R., Aryyappadas, M. P., Preethy, P. H., & Savetha, S. (2011). Isolation, screening and induction of mutation in strain for extracellular lignin peroxidase producing bacteria from soil and its partial purification. *Journal of Research in Biology, 1*(5), 312-318.

Rittstieg, K., Suurnakki, A., Suortti, T., Kruus, K., Guebitz, G., & Buchert, J. (2002). Investigations on the laccase-catalyzed polymerization of lignin model compounds using size-exclusion HPLC. *Enzyme and Microbial Technology, 31*(4), 403-410. doi:https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00102-3

Rivera-Hoyos, C. M., Morales-Álvarez, E. D., Poutou-Piñales, R. A., Pedroza-Rodríguez, A. M., RodrÍguez-Vázquez, R., & Delgado-Boada, J. M. (2013). Fungal laccases. *Fungal Biology Reviews, 27*(3), 67-82. doi:https://doi.org/10.1016/j.fbr.2013.07.001

Rooney, A. P., Price, N. P. J., Ehrhardt, C., Swezey, J. L., & Bannan, J. D. (2009). Phylogeny and molecular taxonomy of the Bacillus subtilis species complex and description of Bacillus subtilis subsp. inaquosorum subsp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 59*(10), 2429-2436. doi:doi:10.1099/ijs.0.009126-0

Sánchez-González, Á., Martín-Martínez, F. J., & Dobado, J. A. (2017). The role of weak interactions in lignin polymerization. *Journal of Molecular Modeling, 23*(3), 80. doi:10.1007/s00894-017-3257-4

Schoemaker, H. E., Harvey, P. J., Bowen, R. M., & Palmer, J. M. (1985). On the mechanism of enzymatic lignin breakdown. *FEBS Letters, 183*(1), 7-12. doi:https://doi.org/10.1016/0014-5793(85)80942-X

Shi, Y., Chai, L., Tang, C., Yang, Z., Zhang, H., Chen, R., . . . Zheng, Y. (2013). Characterization and genomic analysis of kraft lignin biodegradation by the beta-proteobacterium Cupriavidus basilensis B-8. *Biotechnology for Biofuels, 6*(1), 1-14. doi:10.1186/1754-6834-6-1

Shi, Y., Chai, L., Tang, C., Yang, Z., Zheng, Y., Chen, Y., & Jing, Q. (2013). Biochemical investigation of kraft lignin degradation by Pandoraea sp. B-6 isolated from bamboo slips. *Bioprocess and Biosystems Engineering, 36*(12), 1957-1965. doi:10.1007/s00449-013-0972-9

Shida, O., Takagi, H., Kadowaki, K., Nakamura, L. K., & K., K. (1997). Transfer of Bacillus alginolyticus, Bacillus chondroitinus, Bacillus curdlanolyticus, Bacillus glucanolyticus, Bacillus kobensis, and Bacillus thiaminolyticus to the Genus Paenibacillus and Emended Description of the Genus Paenibacillus. *Int. J. Syst. Bacteriol., 47*(2), 289–298.

Shleev, S., Persson, P., Shumakovich, G., Mazhugo, Y., Yaropolov, A., Ruzgas, T., & Gorton, L. (2006). Interaction of fungal laccases and laccase-mediator systems with lignin. *Enzyme and Microbial Technology, 39*(4), 841-847. doi:https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.01.010

Singh, G., Capalash, N., Goel, R., & Sharma, P. (2007). A pH-stable laccase from alkali-tolerant γ-proteobacterium JB: Purification, characterization and indigo carmine degradation. *Enzyme and Microbial Technology, 41*(6–7), 794-799. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.07.001

Singhal, A., & Thakur, I. S. (2009). Decolourization and detoxification of pulp and paper mill effluent by Emericella nidulans var. nidulans. *Journal of hazardous materials, 171*(1-3), 619-625. doi:10.1016/j.jhazmat.2009.06.041

Sondhi, S., Sharma, P., Saini, S., Puri, N., & Gupta, N. (2014). Purification and Characterization of an Extracellular, Thermo-Alkali-Stable, Metal Tolerant Laccase from Bacillus tequilensis SN4. *PLoS ONE, 9*(5), e96951. doi:10.1371/journal.pone.0096951

Sticklen, M. B. (2008). Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol. *Nat Rev Genet, 9*(6), 433-443.

Sun, Y., Qiu, X., & Liu, Y. (2013). Chemical reactivity of alkali lignin modified with laccase. *Biomass and Bioenergy, 55*(Supplement C), 198-204. doi:https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.02.006

Taylor, C. R., Hardiman, E. M., Ahmad, M., Sainsbury, P. D., Norris, P. R., & Bugg, T. D. H. (2012). Isolation of bacterial strains able to metabolize lignin from screening of environmental samples. *Journal of Applied Microbiology, 113*(3), 521-530. doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05352.x

Tiku, D. K., Kumar, A., Chaturvedi, R., Makhijani, S. D., Manoharan, A., & Kumar, R. (2010). Holistic bioremediation of pulp mill effluents using autochthonous bacteria. *International Biodeterioration & Biodegradation, 64*(3), 173-183. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2010.01.001

Toledano, A., Serrano, L., & Labidi, J. (2014). Improving base catalyzed lignin depolymerization by avoiding lignin repolymerization. *Fuel, 116*(Supplement C), 617-624. doi:https://doi.org/10.1016/j.fuel.2013.08.071

Tyagi, S., Kumar, V., Singh, J., Teotia, P., Bisht, S., & Sharma, S. (2014). Bioremediation of Pulp and Paper mill Effluent by Dominant Aboriginal Microbes and Their Consortium. *International Journal of Environmental Research, 8*(3), 561-568.

Ulmer, D. C., Leisola, M. S. A., Schmidt, B. H., & Fiechter, A. (1983). Rapid Degradation of Isolated Lignins by Phanerochaete chrysosporium. *Applied and Environmental Microbiology, 45*(6), 1795-1801.

Upton, B. M., & Kasko, A. M. (2016). Strategies for the Conversion of Lignin to High-Value Polymeric Materials: Review and Perspective. *Chemical Reviews, 116*(4), 2275-2306. doi:10.1021/acs.chemrev.5b00345

Vora, K. A., Singh, C., & Modi, V. V. (1988). Degradation of 2-fluorobenzoate by a pseudomonad. *Current Microbiology, 17*(5), 249-254. doi:10.1007/BF01571323

Wang, Y., Liu, Q., Yan, L., Gao, Y., Wang, Y., & Wang, W. (2013). A novel lignin degradation bacterial consortium for efficient pulping. *Bioresource Technology, 139*, 113-119. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.04.033

Wells, T., Kosa, M., & Ragauskas, A. J. (2013). Polymerization of Kraft lignin via ultrasonication for high-molecular-weight applications. *Ultrasonics Sonochemistry, 20*(6), 1463-1469. doi:https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2013.05.001

Woo, H. L., Hazen, T. C., Simmons, B. A., & DeAngelis, K. M. (2014). Enzyme activities of aerobic lignocellulolytic bacteria isolated from wet tropical forest soils. *Systematic and Applied Microbiology, 37*(1), 60-67. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2013.10.001

Wu, J., Xiao, Y.-Z., & Yu, H.-Q. (2005). Degradation of lignin in pulp mill wastewaters by white-rot fungi on biofilm. *Bioresource Technology, 96*(12), 1357-1363. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2004.11.019

Yadav, S., & Chandra, R. (2015). Syntrophic co-culture of Bacillus subtilis and Klebsiella pneumonia for degradation of kraft lignin discharged from rayon grade pulp industry. *Journal of Environmental Sciences, 33*, 229-238. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jes.2015.01.018

Yan, L., & Qi, X. (2014). Degradation of Cellulose to Organic Acids in its Homogeneous Alkaline Aqueous Solution. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2*(4), 897-901. doi:10.1021/sc400507s

Yang, C., Cao, G., Li, Y., Zhang, X., Ren, H., Wang, X., . . . Xu, P. (2008). A Constructed Alkaline Consortium and Its Dynamics in Treating Alkaline Black Liquor with Very High Pollution Load. *PLoS ONE, 3*(11), e3777. doi:10.1371/journal.pone.0003777

Yang, C., Niu, Y., Su, H., Wang, Z., Tao, F., Wang, X., . . . Xu, P. (2010). A novel microbial habitat of alkaline black liquor with very high pollution load: Microbial diversity and the key members in application potentials. *Bioresource Technology, 101*(6), 1737-1744. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.09.092

Yewale, T., Panchwagh, S., Rajagopalan, S., Dhamole, P. B., & Jain, R. (2016). Enhanced xylitol production using immobilized Candida tropicalis with non-detoxified corn cob hemicellulosic hydrolysate. *3 Biotech, 6*(1), 75. doi:10.1007/s13205-016-0388-8

Zaied, M., & Bellakhal, N. (2009). Electrocoagulation treatment of black liquor from paper industry. *Journal of hazardous materials, 163*(2–3), 995-1000. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.07.115

Zhang, D., Ong, Y. L., Li, Z., & Wu, J. C. (2013). Biological detoxification of furfural and 5-hydroxyl methyl furfural in hydrolysate of oil palm empty fruit bunch by Enterobacter sp. FDS8. *Biochemical Engineering Journal, 72*, 77-82. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2013.01.003

Zheng, Y., Chai, L.-Y., Yang, Z.-H., Tang, C.-J., Chen, Y.-H., & Shi, Y. (2013). Enhanced remediation of black liquor by activated sludge bioaugmented with a novel exogenous microorganism culture. *Applied Microbiology and Biotechnology, 97*(14), 6525-6535. doi:10.1007/s00253-012-4453-x

Zhu, D., Zhang, P., Xie, C., Zhang, W., Sun, J., Qian, W.-J., & Yang, B. (2017). Biodegradation of alkaline lignin by Bacillus ligniniphilus L1. *Biotechnology for Biofuels, 10*(1), 44. doi:10.1186/s13068-017-0735-y

Zimmermann, W. (1990). Degradation of lignin by bacteria. *J Biotechnol, 13*(2-3), 119 - 130. doi:10.1016/0168-1656(90)90098-V

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
บทความสำหรับเผยแพร่

Degradation and Polymerization of Black Liquor Lignin using *Bacillus* sp. Isolated from a Pulp Mill

Nipatcharaporn Sapapporn,[a] Sirilux Chaijamrus,[a] Wassana Chatdumrong,[b] and Worasit Tochampa [c,*]

A strain of *Bacillus* bacteria, which was able to increase the molecular weight (*M*) of black liquor (BL) lignin through polymerization, enabling the subsequent industrial use of lignin, was isolated and characterized. This study is believed to be the first time that actual bacteria cells, rather than pure laccase, have been used to polymerize BL lignin. Black liquor is a toxic waste product from the pulp and paper industry that contains lignin. However, the *M* of lignin is too low for commercial use. The bacteria performed two processes. First, the bacteria produced laccase, which degraded lignin into low *M* aromatic compounds (LMWACs). Second, the laccase transformed the LMWACs into quinone intermediates, which polymerized and became high *M* lignin. Five bacterial strains were isolated from a pulp mill, and the best strain was selected. The optimum growing conditions and BL concentration were determined. The optimum growth conditions when using pure lignin were 1 g/L lignin, 5 g/L urea, and 35 °C. When using BL instead of pure lignin, the optimum concentration was 2% BL (v/v). This information could help develop effective industrial utilization of BL lignin.

Keywords: Black liquor treatment; Bacillus sp.; Degradation and polymerization; Pulp mill

Contact information: a: Department of Biology, Faculty of Science, Naresuan University, 65000, Phitsanulok, Thailand; b: Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medical Science, Naresuan University, 65000, Phitsanulok, Thailand; c: Department of Agro-Industry, Faculty of Agriculture, Natural Resources and Environment, Naresuan University, 65000, Phitsanulok, Thailand;
** Corresponding author: worasitt@nu.ac.th*

INTRODUCTION

Black liquor (BL) is produced as a toxic waste product from the pulp and paper industry, and is characterized by a dark brown color, high initial temperature, strong odor, highly alkaline pH, high chemical oxygen demand (COD; 200000 mg/L), and high biochemical oxygen demand (BOD; 40000 mg/L to 50000 mg/L). Manufacturing 1 ton of paper produces approximately 150 m^3 of BL (Pokhrel and Viraraghavan 2004). Black liquor contains valuable lignin, but the molecular weight (*M*) of lignin is too low for commercial use and must first be increased.

Until recently, retrieval of usable lignin has only been accomplished through the use of certain fungi to polymerize the lignin (Brzonova *et al.* 2017). The bacteria described in this study are the first known alternatives to fungi that can polymerize BL lignin and render it commercially useful. Even though BL is toxic because of its large number of organic compounds, certain microorganisms are able to survive in BL, adapt physiologically, and remain active (Wang *et al.* 2010). This study isolated and characterized a toxin-tolerant strain of *Bacillus* bacteria that can be used to increase the *M*

of BL lignin in preparation for subsequent industrial use. Optimum conditions for growing the bacteria were also determined.

This bacterial strain increases the *M* of lignin with two processes. First, the bacteria degrade the lignin into low *M* aromatic compounds (LMWACs) by secreting the enzyme laccase. Second, the laccase converts the LMWACs to quinone intermediates, which polymerize and become high *M* lignin. In biological treatment systems, a wide variety of microorganisms have been utilized for lignin biodegradation. Several bacterial strains have been observed to degrade and assimilate lignin (Chandra *et al.* 2007), but only a few strains have been isolated based on their toxin tolerance, such as tolerance to furfural, 5-hydroxy methyl furfural (HMF), and acetic acid. These toxins are potential inhibitors to microbial growth. They damage microbes by reducing enzymatic and biological activities, breaking down DNA, and inhibiting protein and RNA synthesis (Okuda *et al.* 2008). Fungi have also been considered for use as agents to biodegrade lignin, but fungi have shown weaker performances compared with bacteria when exposed to extreme environmental conditions (Chandra and Bharagava 2013). This study therefore used bacteria, rather than fungi, to degrade and polymerize BL lignin.

According to Ghoul and Chebil (2012), the balance between lignin degradation and fragment polymerization depends on the reaction temperature, solvents added, enzyme origin, and lignin structure. This study demonstrated the promise and possibilities of using laccase-producing bacteria to make lignin from BL commercially usable and valuable. The optimum conditions for growth of the isolated strain were evaluated to determine the effects of the lignin concentration, temperature, nitrogen source, and nitrogen source concentration on the degradation and polymerization of lignin. Finally, the optimum BL concentration was determined to make lignin commercially useful.

EXPERIMENTAL

Materials

All of the reagents used were of analytical grade. Lignin (alkali) was purchased from Aldrich (St. Louis, USA).

Sample Collection and Media Composition

To begin isolating toxin-tolerant bacteria, three kinds of samples were collected in sterile containers from the Environment Pulp & Paper, Ltd. (EPPCO) mill in Nakhon Sawan province, Thailand. This mill processes sugarcane bagasse to produce pulp by the soda process. Specifically, the three samples collected from the site were BL-contaminated soil, sediment from activated sludge, and liquid seeping out from the bagasse heap. Two kinds of isolation medium were used and referred to as mMXYP (modified Malt extract, Xylose, Yeast extract, and Peptone) and mPDB (modified Potato & Dextrose Broth). The mMXYP contained 3 g/L malt extract, 20 g/L xylose, 3 g/L yeast extract, and 5 g/L peptone (Yewale *et al.* 2016). Added to this base were acetic acid, 5-HMF, and furfural at concentrations of 2.1 g/L, 0.25 g/L, and 0.6 mL/L, respectively. The mPDB contained 200 g/L potatoes and 20 g/L glucose. Added to this base was 2 mL/L furfural. The pH of the mPDB was adjusted to 5.5 (Zhang *et al.* 2013).

Bacterial Isolation, Purification, and Screening

Altogether there were six culture flasks, three for each of the two media (modified MXYP and modified PDB), and within those three, there was one for each sample type (BL-contaminated soil, sediment from activated sludge, and liquid seeping out from the bagasse heap). A 10-g (= 10 mL) aliquot of the sample material was inserted to inoculate each Erlenmeyer flask that contained 90 mL of mMXYP or mPDB broth. After that, the flasks were incubated aerobically in a temperature-controlled shaking incubator (120 rpm) at 40 °C for 36 h. Samples from the flasks were then spread on agar plates, one plate for each flask for a total of six plates, that contained a corresponding, but non-toxic medium (*i.e.*, MXYP agar or PDA agar, no added toxins). The various colonies that grew on the agar plates were then purified using the cross-streak technique. A total of five phenotypically different bacterial colonies were picked out, selected from across all six plates, and designated as 2B2-1ligB, 6B2-A1, MXYP5, mPDA7, and MMX3. These isolated strains were freeze-dried in ampoules and deposited at the Thailand Institute of Scientific and Technological Research (TISTR) Culture Collection.

The most lignin-tolerant bacteria was sought by screening for lignin tolerance using alkali lignin on agar plates of mineral salt medium (MSM) containing 2.4 g/L Na_2HPO_4, 2.0 g/L K_2HPO_4, 0.1 g/L NH_4NO_3, 0.01 g/L $MgSO_4$, and 0.01 g/L $CaCl_2$ (Chandra *et al.* 2011) amended with six different lignin concentrations (100 mg/L, 200 mg/L, 300 mg/L, 400 mg/L, 500 mg/L, and 600 mg/L) and with or without a combination of 1% glucose and 0.5% peptone (w/v) as additional carbon and nitrogen sources (Chandra *et al.* 2007). Unfortunately, all five strains were equally tolerant.

A separate test was done to determine which various lignin-related LMWACs the bacteria could tolerate, such as vanillin, ferulic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, *t*-cinnamic acid, gallic acid, guaiacol, and syringic acid. This second test was performed on MSM agar plates that contained the various LMWACs (50 mg/L) as the sole source of carbon and energy. The plates were incubated at 30 °C and growth was observed for 6 d (Raj *et al.* 2007c). This experiment was used to identify an effective lignin degrader because these LMWACs are the basic components of lignin moieties, including *p*-coumaryl alcohol (H units), coniferyl alcohol (S units), and sinapyl alcohol (G units), that build natural lignin polymers (Raj *et al.* 2007c).

16S rDNA Identification

Whole DNA was prepared from pure cultures of the five bacterial strains. The 16S rRNA gene was amplified using universal eubacterial primers (Narde *et al.* 2004) and was BLAST searched in the NCBI nucleotide database to identify the strains.

Black Liquor Analysis

Physico-chemical analysis of the black liquor

Fresh BL was collected from the EPPCO mill and analyzed by testing for the pH, BOD, COD, total dissolved solids (TDS), and heavy metals as per the methods described in APHA, AWWA, WEF (2012). The BL-dissolved lignin content was determined by the Pearl-Benson method (Pearl and Benson 1940). The lignin content of the BL was determined by the acid precipitation method. The initial pH of the BL was in the range of 12 to 13, and the final pH values of the BL were adjusted to between 2 and 1 by adding concentrated sulfuric acid, followed by vigorous mechanical stirring for 30 min. Then, the solutions were centrifuged at 5000 rpm for 15 min. The pellets were carefully washed with either distilled water or high-performance liquid chromatography (HPLC)-grade water

(using two separate beakers) to eliminate impurities. Finally, either distilled water or HPLC-grade water was added (depending on the beaker) to the precipitate to make a slurry. The slurry was oven-dried overnight at 105 °C to remove the moisture.

Comparing the lignin structures using FTIR

To prepare the Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy samples, KBr crystals were mixed with the precipitated lignin powder and the mixture was mechanically pressed to create transparent discs, according to the method by Minu *et al.* (2012). Each strong peak in the FTIR spectra was labeled.

Growth Analysis

Bacterial growth in the high black liquor concentration

Cotton-plugged Erlenmeyer flasks (250 mL) containing autoclaved (15 min at 121 °C) 10% BL diluted with MSM media (BL-MSM), without a supplement source or pH adjustment, were used to inoculate pure cultures (1% v/v on NB) of all five isolated strains. These flasks were incubated at 40 °C and 200 rpm for 144 h. A sample from each flask was analyzed for the pH (ST3100 OHAUS, Parsippany, USA) and viable cell count on nutrient agar plates using the serial dilution technique. Final samples from the flasks were collected to analyze the final product for the LMWACs using gas chromatography-mass spectroscopy (GC-MS).

Determining the optimum conditions for lignin degradation

The process of lignin degradation was optimized with different nutritional and environmental parameters, namely the lignin concentration, temperature, nitrogen source, and nitrogen source concentration. To do so, a full factorial design was conducted with Erlenmeyer flasks (250 mL).

Prior to preparing the experimental flasks, one inoculum flask (as a bacteria source) was prepared. That inoculum flask had an initial base medium of 0.5 g/L lignin MSM media, along with 5 g/L glucose and 5 g/L peptone. After sterilization and cooling, the flask was inoculated with a loopful of the isolated 2B2-1ligB strain and then incubated for 24 h in a rotary shaking incubator.

The full factorial design had 16 possible parameter combinations, and there were two identical flasks for each combination. The flasks contained a base of MSM media supplemented with 5 g/L glucose (Raj *et al.* 2014) and was not pH adjusted. Added to this base were the specific materials for each parameter combination. The various parameters were the lignin concentration (1 g/L and 2 g/L), incubation temperature (35 °C and 40 °C), nitrogen source (sodium nitrate and urea), and nitrogen source concentration (2.5 g/L and 5 g/L). At this point the flasks were sterilized for 20 min at 110 °C, and then cooled to room temperature.

The finished contents of the single inoculum flask were used to inoculate the 32 experimental flasks at a rate of 10% (v/v). The inoculated experimental flasks were then put in an incubator and agitated at 200 rpm for 6 d.

During the 6 d of experimental flask incubation, samples were collected daily at approximately the same time, starting at 24 h (1 d after inoculation) and finishing at 144 h (6 d after inoculation). At each sampling time, two samples were taken from each experimental flask. The first of these two samples was analyzed for cell growth using two separate tests (A_{620} and CFU/mL). The second sample was centrifuged at 5000 rpm for 15 min. The resulting supernatant was referred to as the base supernatant. A portion of the

base supernatant was diluted with phosphate buffer (pH = 7.6) and its absorbance was measured at 465 nm for color and at 280 nm for acid-soluble lignin on an ultraviolet-visible spectrophotometer (7315 Jenway, Bibby Scientific Ltd., Stone, Staffordshire, UK) (Chandra *et al.* 2007). Because the results of the acid-soluble lignin test were not as expected, an alternative acid-insoluble lignin test was also performed.

A second portion of the base supernatant was used to precipitate the acid-insoluble lignin. To do that, 2.5 mL of the supernatant were brought to a pH between 2.5 and 3.0 with HCl. The lignin was allowed to precipitate overnight and was then centrifuged and resolubilized in 0.5% (w/v) NaOH. After proper dilution, the (acid-insoluble) absorbance at 280 nm was measured (Ulmer *et al.* 1983).

A third portion of the base supernatant was used for the laccase assay. The assay was performed by adding 1.0 mL of base supernatant to 10 mM guaiacol (prepared in 100 mM phosphate buffer, pH = 7.0) and incubating the mixture for 15 min at 30 °C. The absorbance was measured at 470 nm (Arora and Sandhu 1985). One unit (U/mL) of enzyme activity was defined as the amount of enzyme required to oxidize 1 μmol of substrate per min under assay conditions.

Finally, a fourth portion of the base supernatant was analyzed for the pH. The experiments were conducted in duplicate and the data were presented as the average.

Lignin degradation and polymerization under the optimum conditions

After determining the optimum parameters for lignin degradation in the previous section, the best performing bacterial strain (2B2-1ligB) was introduced to the optimum conditions (*i.e.*, lignin concentration, temperature, nitrogen source, and nitrogen source concentration) and the resulting bio-reaction was observed for 144 h of incubation. During that time, the following types of information were collected at 24-h intervals: cell turbidity, cell viability, acid-insoluble lignin levels, acid-soluble lignin levels, color, laccase levels, and pH.

Black liquor concentration optimization

As will be discussed later, a high BL concentration was not a suitable carbon source for bacterial growth. Therefore, the effects of four low BL concentrations on the bacterial growth were analyzed. Twelve Erlenmeyer flasks (250 mL) containing 150 mL of 1% to 4% BL-MSM medium supplemented with 5 g/L glucose and 5 g/L urea were sterilized for 20 min at 110 °C. The flasks were inoculated with 15 mL of 24-h grown 2B2-1ligB culture (from the same inoculum flask used in the previous procedure), with an inoculum size of 10% (v/v). The inoculated flasks and controls (uninoculated growing medium) were incubated at 35 °C and 200 rpm for 144 h. Samples were taken at 24-h intervals after inoculation and analyzed for growth, acid-soluble lignin, acid-insoluble lignin, color, laccase activity, and pH. The final samples (collected at 144 h after inoculation) were analyzed for LMWACs using GC-MS and lignin *M* using size exclusion chromatography (SEC). The experiments were conducted in triplicate. Data were presented as the mean.

GC-MS analysis

A GC-MS analysis (GC7890 A MS5973C, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) was used to verify BL detoxification. The four final samples (50 mL) and controls from the low BL concentration procedure were centrifuged (5000 rpm for 20 min) to remove suspended solids. The supernatants were acidified to a pH of 1 to 2 with concentrated HCl and thoroughly extracted with three volumes (50 mL) of ethyl acetate.

The organic layer was collected, dewatered over anhydrous Na_2SO_4, and filtered through Whatman no. 54 filter paper. The residues were dried under a stream of nitrogen gas. The ethyl acetate extract residues were analyzed as trimethyl silyl derivatives. Next, dioxane (100 µL) and pyridine (10 µL) were added to the sample, followed by a silylated reagent that contained 50 µL of trimethyl silyl and trimethylchlorosilane (99:1). The mixture was heated at 60 °C for 15 min with periodic shaking to dissolve the residues, and then analyzed by GC-MS as described by Raj *et al.* (2007b).

SEC analysis

A SEC analysis was used to verify lignin polymerization. Beginning in the same manner as for the GC-MS analysis, the final samples (50 mL) and controls from the low BL concentration procedure were centrifuged (5000 rpm for 20 min) to remove suspended solids. The supernatants were analyzed using Waters Ultrahydrogel columns (Milford, USA) at 40 °C and a NaOH flowrate of 0.6 mL/min. Before injection into the columns, the samples were adjusted to 50 mM NaOH by adding 5 M NaOH. Column calibration was performed with narrow distributed pullulan-standards (Rittstieg *et al.* 2002).

RESULTS AND DISCUSSION

Isolation and Screening of the Lignin-degrading Bacteria

The five bacterial strains that were isolated from the pulp mill samples were identified with 16S rDNA sequencing, and the results are shown in Table 1. The isolates identified were all in the *Bacillus* genus. This species is common in the polluted environment of pulp mills and has naturally developed a tolerance against toxins, such as lignin, acetic acid, furfural, and 5-HMF.

Table 1. 16S rDNA Identification of the Isolated Bacterial Strains

TISTR No.	Original Code	Source of Isolation	Name of Microorganism	Similarity (%)
2580	2B2-1LigB	BL-contaminated soil	*Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum*	99.86
			Bacillus tequilensis	99.86
			Bacillus subtilis subsp. *subtilis*	99.80
2581	6B2-Al	BL-contaminated soil	*Bacillus subtilis*	100.00
2582	MXYP5	Sediment from activated sludge	*Bacillus licheniformis*	99.92
2583	mPDA7	BL-contaminated soil	*Bacillus subtilis*	100.00
2584	MMX3	liquid seeping from bagasse heap	*Bacillus subtilis*	100.00

Note: The TISTR number is the ID number of the isolated strains deposited at the Culture Collection of the Thailand Institute of Scientific and Technological Research.

Similar results were previously obtained from both 16S rDNA sequencing and polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis analysis. Yang *et al.* (2010) reported a bacterial community that occurred naturally in alkaline BL, all of which belonged to the dominant genera *Alkalibacterium*, *Clostridium*, *Halomonas*, and *Bacillus*.

The *Bacillus* genus appeared in all four libraries and showed the lowest variations, which suggested that *Bacillus* was the most stable group in all of the samples. The global problems of how to detoxify BL and make it reusable could be addressed by the use of these microorganisms (Yang *et al.* 2010).

Similar aerobic lignin-degrading strains were also previously isolated from pulp and paper mills by others. For example, Raj *et al.* (2007c) isolated eight bacterial strains on kraft lignin mineral salt medium (L-MSM) agar with glucose and peptone from the sludge of pulp and paper mills. The ITRC-S8 strain was selected for identification by 16S rRNA gene sequencing. This isolate shared 95.8% of its identity with the strain *B. thuringiensis* and 95.2% with the standard ATCC isolates *B. thuringiensis* and *B. cereus*. More recently, *B. ligniniphilus* L1 was isolated from sediment from the South China Sea by Zhu *et al.* (2017), who used GC-MS and proteomic analysis to confirm the ability of strain L1 to degrade lignin. The toxin tolerance isolation test yielded rather specific results. Only the *Bacillus* sp. survived the high concentration of toxins.

The isolated bacteria were screened for tolerance of different lignin concentrations (100 mg/L to 600 mg/L), as is shown in Table 2. All of the isolates showed tolerance for growth on the L-MSM agar in the presence and absence of glucose and peptone during the screening procedure. These strains showed fast and luxuriant growth at various lignin concentrations after 24 h (with supplementation) and 72 h (without supplementation) of incubation. However, only slight growth was shown at 600 mg/L lignin without glucose and peptone (Table 2). These findings indicated that a high lignin concentration could inhibit bacterial growth. These bacterial screening results showed greater tolerance than the earlier results from Chandra *et al.* (2007), who screened for tolerance and observed no growth of different bacterial isolates in L-MSM media without supplementation.

The results of the test done to find out which various lignin-related LMWACs the bacteria could tolerate are shown in Table 3. Those results showed that the five isolated strains were able to grow on all seven versions of the LMWACs medium. Each isolated strain consumed a wide range of the lignin-related LMWACs within 72 h. This suggested that the isolated strains had a great capacity for tolerating toxic LMWACs. That is why these isolates were detected by an earlier toxin tolerance isolation technique. The successful growth on the lignin-related compounds suggested a capacity to degrade lignin.

These screening experiments provided useful information related to lignin degradation by *Bacillus* sp., which might assist future works.

Black Liquor Analysis

Physico-chemical analysis of the black liquor

The results of the physico-chemical analysis of the BL taken from sugarcane bagasse at the pulp mill (before bacterial treatment) are shown in Table 4. These results indicated that the BL had high levels of COD, BOD, TDS, heavy metals, and lignin. With the high pH of the BL, these compounds all contributed to making the BL toxic to the environment. The BL wastewater sample was determined to be of complex character with a low biodegradability (BOD/COD) of 0.159. The parameters in the BL sample resembled the results of Zheng *et al.* (2013) for a reed pulp mill. The black color of BL is because of its lignin and lignin derivatives, according to Raj *et al.* (2007a). Two different methods were used to determine the lignin content in the BL (Pearl-Benson method and H_2SO_4 precipitation method). The results of the two methods were quite different because the Pearl-Benson method can measure all of the lignin present, but the H_2SO_4 precipitation method can only measure the lignin that precipitates (Minu *et al.* 2012).

Table 2. Screening for Tolerance Patterns of Various Bacterial Isolates with and without Glucose and Peptone

Strain	100 ppm Lignin		200 ppm Lignin		300 ppm Lignin		400 ppm Lignin		500 ppm Lignin		600 ppm Lignin	
	1% Glu and 0.5% Pep	0% Glu and 0% Pep	1% Glu and 0.5% Pep	0% Glu and 0% Pep	1% Glu and 0.5% Pep	0% Glu and 0% Pep	1% Glu and 0.5% Pep	0% Glu and 0% Pep	1% Glu and 0.5% Pep	0% Glu and 0% Pep	1% Glu and 0.5% Pep	0% Glu and 0% Pep
2B2-1 LigB	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++
6B2-Al	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++
MXYP5	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++
mPDA7	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	+
MMX3	+++	++	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+
Control	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Note: Glu = glucose; Pep = peptone; +++ = fast and luxuriant growth; ++ = moderate growth; + = slow growth; and - = no growth (Chandra *et al.* 2007)

Table 3. Investigating the Tolerance of the Bacterial Strains to Various Lignin-related LMWACs

Strain	Isolate Growth on MSM-agar Plates Containing Lignin-related LMWACs at 50 mg/L (pH = 7.6)						
	Vanillin[a]	Ferulic Acid[a]	*p*-Hydroxybenzoic Acid[a]	*t*-Cinnamic Acid[a]	Gallic Acid[a]	Guaiacol[a]	Syringic Acid[a]
2B2-1 LigB	+++	+++	++	+	+	+	+++
6B2-Al	+++	+++	+++	+++	+	+	+++
MXYP5	++	+++	+++	+++	+	+++	+++
mPDA7	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
MMX3	++	+++	+++	+++	+	+	+++
Control	-	-	-	-	-	-	-

Note: [a]: analysis within 72 h, with 0% glucose and 0% peptone; +++ = fast and luxuriant growth; ++ = moderate growth; + = slow growth; and - = no growth (Raj *et al.* 2007c)

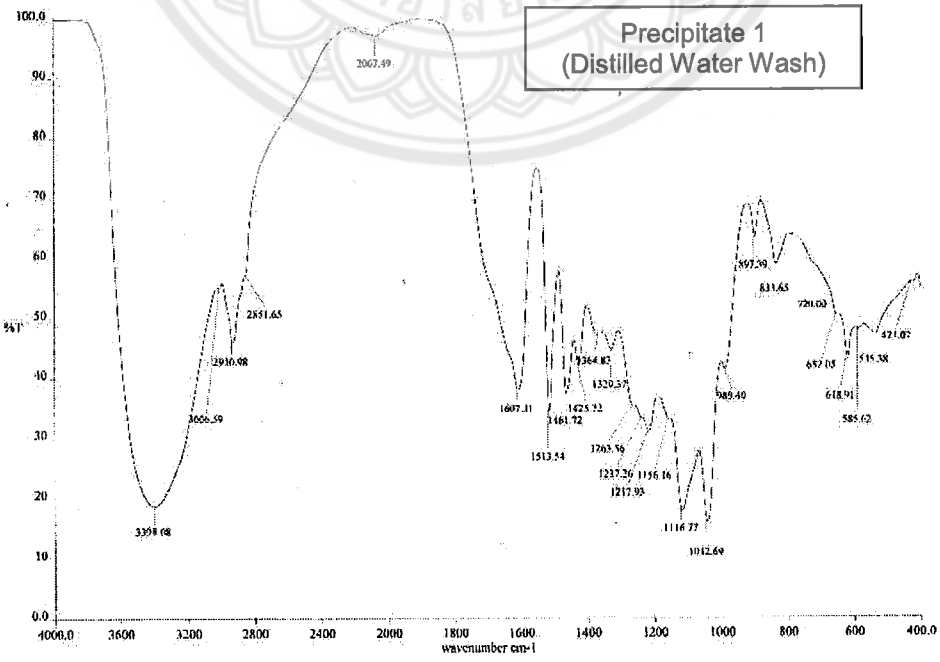
Table 4. Physico-chemical Characteristics of the Untreated BL

Parameter	BL
pH*	12.8
BOD (mg/L)*	25800
COD (mg/L)*	161680
TDS (mg/L)*	93176
TKN (mg/L)*	350
Color (CU)	361702
Lignin (mg/L) (Pearl and Benson 1940)	58840
Precipitated Lignin (mg/L) (precipitation by H_2SO_4)	11814
Cd (mg/L)*	0.09
Cu (mg/L)*	0.2
Fe (mg/L)*	35.2
Mn (mg/L)*	2.8
Ni (mg/L)*	0.6
Zn (mg/L)*	0.8

* Detection provided by Project On Environmental Services (Faculty of Environment and Resource Studies, Mahidol University, Thailand

The precipitate from the H_2SO_4 precipitation method was confirmed to be lignin by FTIR analysis, after comparison with a commercial lignin sample (Aldrich, St. Louis, USA) as a reference (Fig. 1). According to Upton and Kasko (2016), lignin isolated by acid precipitation has a great purity.

The FTIR spectra of the precipitates from the BL were nearly identical with the spectrum of the commercial lignin. For example, the strong and broad peak at 3395 cm^{-1} to 3399 cm^{-1} was characteristic of OH groups and phenolic compounds. The two bands at 1598 cm^{-1} to 1607 cm^{-1} and 1513 cm^{-1} were characteristic of aromatic rings. This result showed that the precipitates from the BL were lignin.



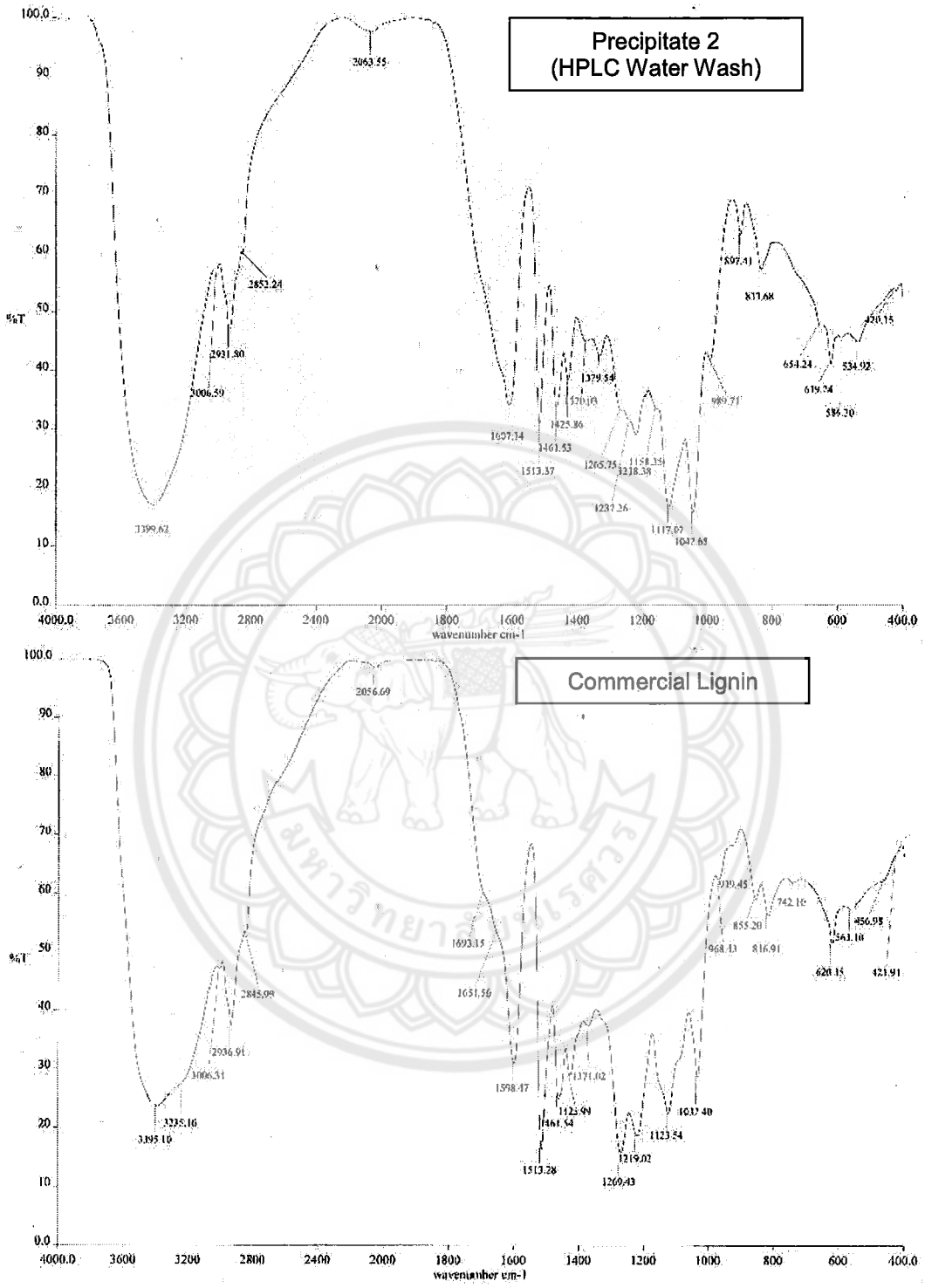


Fig.1. FTIR absorption bands for the BL lignin samples and commercial lignin

Analysis of the Bacterial Growth in the High Black Liquor Concentration

The isolated bacterial growth in a 10% BL medium without supplementation is shown in Fig. 2A. The pH of the same medium is shown in Fig. 2B.

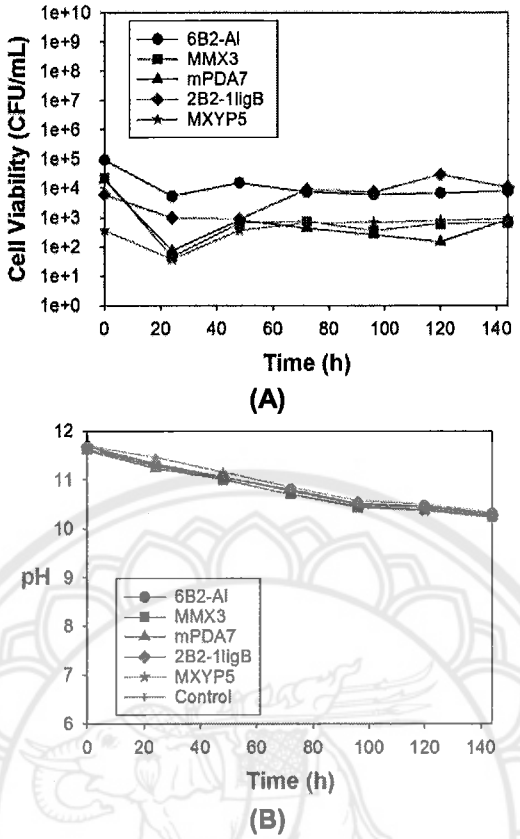


Fig. 2. (A) Growth of strain 2B2-1ligB during 144 h of incubation with 10% BL and without supplementation (no glucose or nitrogen); and (B) pH of the same medium

Cell growth of all of the strains (on the high BL concentration medium without supplementation) decreased during the first 24 h of incubation, followed by a slight increase in the growth. Of the five bacterial strains, the growth of strain 2B2-1ligB stood out from the others and reached maximum cell growth after 120 h of incubation. This demonstrated adaptation of this strain to a harsh medium (Fig. 2A). The ability of strain 2B2-1ligB to grow better than the other strains is important because a bacterial strain that is a robust, stable lignin degrader, even under extreme environmental and substrate conditions, such as a high pH, limited oxygen, and a high lignin concentration, is needed for the detoxification treatment of BL (Bugg *et al.* 2011).

A slight decrease in the pH was noted in the 10% BL medium (Fig. 2B). This pH change was not caused by the bacterial growth, but rather by the oxidation of the culture medium during agitation. This phenomenon showed that a high BL concentration inhibited the growth of bacteria.

The results of the GC-MS analysis can be seen in Table 5. The ethyl acetate extracts after 144 h of cultivation showed low molecular weight compounds in the BL control. Major peaks detected in the control samples at different retention times (RT) were butanoic acid (5.97), propanoic acid (8.75), hexanoic acid (8.82), acetic acid (8.88), succinic acid (10.97), benzaldehyde (11.44), trimethylsilyl vanillin (12.52), benzoic acid (13.03), trimethylsilyl 3,5-dimethoxy-4-(trimethylsilyloxy) benzoate (14.51), *p*-coumaric acid (14.78), hexadecanoic acid (15.16), ferulic acid (15.48), and 9,12-octadecadienoic acid (16.02).

Table 5. GC-MS Analysis Identified the Presence of the Following Compounds in the Final Five BL Samples after Treatment

RT (min)	Identified Compound	Control (No Bacteria)	2B2-1ligB		6B2-Al		MMX3		MXYP5		mPDA7	
				%De		%De		%De		%De		%De
5.87	Trisiloxane	√	√	-5	√	-30	√	3	√	-16	√	-6
5.97	Butanoic acid	√	√	42	√	53	√	36	√	24	√	33
7.04	Trifluoromethyl-bis-(trimethylsilyl) methyl ketone	√	√	14	√	31	√	1	√	1	√	5
7.55	Pentanoic acid	√	√	43	√	48	√	36	√	26	√	33
8.53	Silane	√	–	100	√	58	–	100	–	100	–	100
8.75	Propanoic acid	√	√	47	√	47	√	42	√	30	√	38
8.82	Hexanoic acid	√	√	50	√	51	√	43	√	32	√	39
8.88	Acetic acid	√	√	39	√	37	√	32	√	20	√	30
9.56	Propanoic acid	√	√	61	√	44	√	57	√	40	√	56
9.77	Heptanoic acid	√	√	55	√	49	√	45	√	31	√	42
10.00	Propanoic acid	√	–	100	–	100	√	47	√	36	√	42
10.37	Butanoic acid	√	√	49	√	47	√	46	√	42	√	39
10.56	Octanoic acid	√	–	100	√	51	–	100	√	26	–	100
10.97	Butanedioic acid	√	–	46	√	49	√	43	√	28	–	33
11.06	Pyrotartaric acid	√	√	49	–	100	√	48	√	31	√	42
11.44	Benzaldehyde	√	√	51	√	49	√	47	√	29	√	38
11.71	Hydrocinnamic acid	√	√	52	√	53	–	100	–	100	–	100
12.19	Malic acid	√	–	100	–	100	√	26	√	13	√	29
12.52	Trimethylsilyl vanillin	√	√	46	√	47	√	45	–	100	–	100
12.71	Pentanedioic acid	√	√	45	–	100	√	42	√	7	√	37
13.03	Benzoic acid	√	√	47	√	53	√	41	√	20	√	33
13.50	3,5-dimethoxy-4-trimethylsilyloxybenzaldehyde	√	√	63	√	66	√	62	√	60	√	36
13.77	Hydrocinnamic acid	√	–	100	√	-50	–	100	–	100	–	100
13.80	Vanillic acid	–	√	-	–	-	–	-	√	-	–	-
13.80	Benzoic acid	√	–	100	–	100	√	44	–	100	√	29
14.51	Benzoate	√	√	62	√	55	√	48	√	40	√	50
14.78	p-Coumaric acid	√	√	47	√	44	√	41	√	26	√	35
15.11	Vanillyl lactic acid	–	–	-	–	-	–	-	√	-	√	-
15.16	Hexadecanoic acid	–	√	68	√	61	√	62	√	40	√	52
15.48	Ferulic acid	√	√	58	√	51	√	61	√	49	√	68
16.02	9,12-octadecadienoic acid	√	–	79	√	76	√	74	√	36	√	65
16.17	Octadecanoic acid	√	–	100	–	100	–	100	–	100	–	100

Notes: √ = present; - = absent; %De = degradation of each compound was calculated from the initiation of the absorption peak area minus the inoculation of the absorption peak area; negative degradation numbers indicate an increasing amount of the compound

According to Yan and Qi (2014), acidic compounds, such as those identified in the BL sample, are commonly produced during the degradation of sugarcane, which happens at a pulp mill. Examples of acidic compounds in the GC-MS analysis list include butanoic acid (5.97), pentanoic acid (7.55), propanoic acid (8.75), hexanoic acid (8.82), acetic acid (8.88), heptanoic acid (9.77), and butanedioic acid (10.97).

As can be seen in Table 5, some compounds were degraded by the inoculated bacteria. These included silane (8.53), propanoic acid (10.00), octanoic acid (10.56), malic acid (12.19), hydrocinnamic acid (13.77), benzoic acid (13.80), 9,12-octadecadienoic acid (16.02), and octadecanoic acid (16.17). The bacterial strain 2B2-1ligB was able to degrade these recalcitrant compounds under harsh conditions. These results showed only limited lignin degradation because the inoculated bacteria could not flourish in a high BL concentration without supplementation.

The GC-MS analysis results for the high BL concentration showed that each of the five isolated strains was able to degrade its own particular set of recalcitrant compounds. Of the five strains, 2B2-1ligB was selected for investigating the optimum conditions for lignin degradation because it was able to adapt and survive in high BL concentrations.

To find the optimum BL concentration for bacterial growth, the experiment was performed again using four lower BL concentrations.

Parameter Optimization

Strain 2B2-1ligB was selected to determine the optimum conditions for the efficient degradation of lignin on MSM broth with commercial lignin. Commercial lignin was used because it was pure lignin and avoided contaminants from the BL. The nitrogen sources selected were $NaNO_3$ and urea.

Table 6. Lignin Degradation Percentage of Each Experiment as Calculated from the Acid-insoluble Lignin

Run	Lignin Conc.(g/L)	Temperature (°C)	Nitrogen Source (NS)	NS Conc. (%w/v)	Lignin Degradation* (%)
1	1	35	$NaNO_3$	0.25	1.56
2	2	35	$NaNO_3$	0.25	3.85
3	1	40	$NaNO_3$	0.25	0.00
4	2	40	$NaNO_3$	0.25	0.07
5	1	35	Urea	0.25	1.19
6	2	35	Urea	0.25	0.14
7	1	40	Urea	0.25	1.91
8	2	40	Urea	0.25	0.00
9	1	35	$NaNO_3$	5.00	6.42
10	2	35	$NaNO_3$	5.00	13.37
11	1	40	$NaNO_3$	5.00	8.30
12	2	40	$NaNO_3$	5.00	1.49
13	1	35	Urea	5.00	79.23
14	2	35	Urea	5.00	5.58
15	1	40	Urea	5.00	39.79
16	2	40	Urea	5.00	0.00

* Lignin degradation percentage was calculated from the acid-insoluble lignin

Determining the optimum conditions for lignin degradation

Table 6 shows the results of the full factorial design experiment to optimize the parameters for lignin degradation.

The results in Table 6 show that lignin degradation varied greatly depending on the situation. The best result was obtained from Run 13 with 1 g/L lignin, a temperature of 35 °C, urea as the nitrogen source, and a 5% (w/v) nitrogen source concentration. The maximum lignin degradation percentage was 79.2%. The second-best result was obtained from Run 15 with 39.8% lignin degradation. The conditions in Run 15 were the same as those of Run 13, except the temperature was higher (40 °C). The percentages of lignin degradation based on acid-insoluble lignin were calculated using the method from Ulmer *et al.* (1983). The culture media composition, temperature, and nitrogen source concentration affect cell growth and enzymatic production to support lignin degradation. The results of this parameter combination can be seen in Fig. 3. In every experiment, strain 2B2-1ligB produced detectable laccase when it was grown in lignin-added media (lignin as an inducer for laccase production), but only the optimum conditions showed maximum lignin degradation.

Lignin degradation and polymerization under the optimum conditions

Lignin degradation was observed under the optimum conditions. The results provided further insight into lignin degradation and polymerization by strain 2B2-1ligB. These results are shown in Fig. 3.

The lignin concentration, temperature, nitrogen source, and nitrogen source concentration had a great effect on the growth and laccase production of the selected strain. The optimum conditions for strain 2B2-1ligB growth were determined to be a MSM medium with 1 g/L lignin, 5 g/L glucose, 5 g/L urea, and a temperature of 35 °C (incubation for 144 h at an agitation rate of 200 rpm).

Growth of the single bacterial strain 2B2-1ligB was measured by the cell viability (Fig. 3; red line) and cell turbidity (Fig. 3; blue line). Based on the cell viability test, cell growth appeared modest for the first 48 h of incubation and then increased sharply, reaching peak growth at 72 h. However, in reality, the growth probably increased steadily, even during the first 24 h. The first 24 h of growth only appeared flat because, while many cells were reproducing, many were also dying initially because they could not adapt to the culture medium.

In contrast, cell growth based on the turbidity test rose steadily for the first 24 h, and then growth continued at a steady, mostly unchanged rate until 72 h. The fact that cell growth as measured by both methods began to decline after 72 h indicated that the bacteria ran out of nutrients.

During the incubation period, the rate of laccase production (Fig. 3; pink line) rose sharply during the first 24 h, with a mostly unchanged laccase production rate after that until 120 h, at which time the production rate increased again. Laccase only attacks the phenolic subunits of lignin, which leads to Cα oxidation, Cα-Cβ cleavage, and aryl-alkyl cleavage. Laccase is able to reduce one molecule of dioxygen to two molecules of water, while performing one-electron oxidation of a wide range of aromatic compounds. This oxidation results in an oxygen-centered free radical, which can then be converted to quinone *via* a second enzyme-catalyzed reaction. The quinone and free radicals can then undergo polymerization (Viswanath *et al.* 2014).

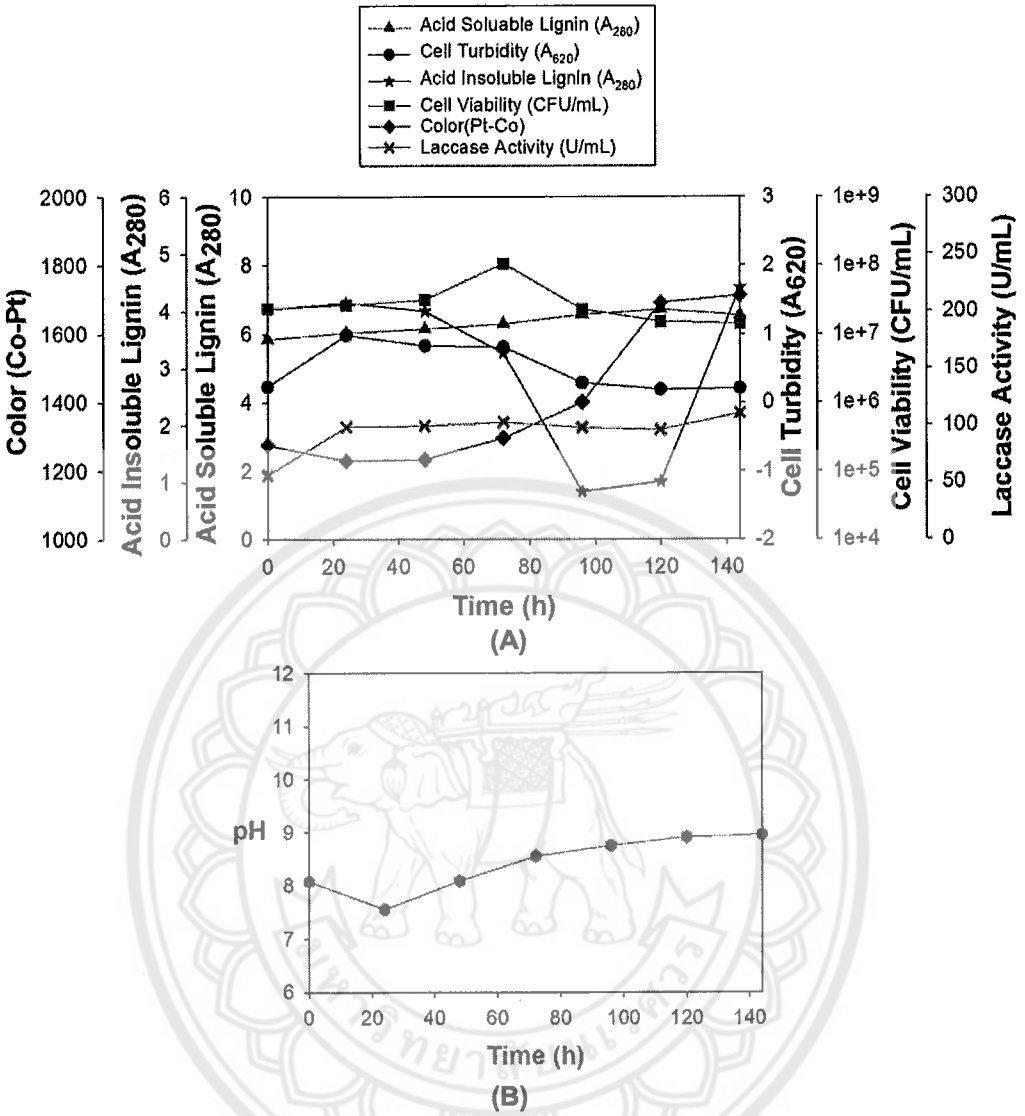


Fig. 3. (A) Strain 2B2-1ligB growth under the optimum conditions for lignin degradation; and (B) pH during growth of strain 2B2-1ligB under the optimum conditions

Kim *et al.* (2017) successfully prevented quinone methide formation and repolymerization during lignin depolymerization by chemo-selective blocking of the phenolic hydroxyl (Ar-OH) group by methylation. The quinone methide intermediates are partly responsible for repolymerization reactions. In the same way, acid-soluble lignin (Fig. 3; green line) increased from 5.85 to 6.55 (absorbance at 280 nm, A_{280}) during incubation, which was different from the lignin degradation reported by Zhu *et al.* (2017). Lignin degradation showed that the A_{280} was reduced from 0.36 to 0.22 during incubation. This meant that approximately 38.9% of the lignin was degraded by *B. ligniniphilus* L1. As a result, the quinone methide intermediates were possibly formed in the medium by laccase.

The amount of acid-soluble lignin measured by the A_{280} wavelength absorbance (green line) did not decrease, which was counter to expectations. In fact, it increased by 12.0%. The amount of acid-insoluble lignin (Fig. 3; black line) was measured at the same time, and the acid-insoluble lignin decreased after 48 h of incubation. It reached a minimum

level (79%) at 96 h as the lignin degraded. This decrease was similar to the results of Ulmer *et al.* (1983).

As it degrades, lignin releases LMWACs, also called mediators. Mediators are small enough to penetrate the highly impermeable lignin structure to oxidize non-phenolic aromatic groups because laccase is only able to oxidize phenolic end groups in lignin. This process is called the laccase-mediator system, and a number of naturally-occurring components have been suggested as potential redox mediators *in vivo* (Areskogh *et al.* 2010).

The acid-insoluble lignin began to increase because of polymerization after reaching its minimum level at 96 h, increased sharply from 120 h onward, and returned to its initial value (before incubation) at 144 h.

The color units (purple line) increased by 34.3% (measured after 144 h of incubation). This increase in color was similar to the results of Fernaud *et al.* (2006), who found that laccase produces an early intense functionalization by introducing both chromogene (*e.g.*, C=O) and auxochrome groups (*e.g.*, -OH) into laccase-treated lignin. Furthermore, these groups combined with quinones and contributed to the color change observed in the reaction mixture (Fernaud *et al.* 2006). In the current study, the initial color units of the culture media were 1275 PtCO. The culture media went through a modest color decrease during the first 24 h, probably because of lignin degradation. After 24 h, the color of the media increased because of polymerization. After the full 144 h, the color units had increased to 1713 PtCO.

The pH of the solution (Fig. 3B) decreased in response to the growth of the bacteria for the first 24 h, and then the pH increased. This pH change was similar to the results of Raj *et al.* (2007c).

Black Liquor Concentration Optimization

The above results showed the degradation and polymerization of pure lignin (not BL) under optimum conditions. The next procedure determined the best BL concentration for producing high *M* lignin.

Growth analysis in the 1% to 4% BL

The effects of four low BL concentrations on bacterial growth are shown below. The information collected in each case was the bacterial growth (as cell viability and cell turbidity), lignin (acid-insoluble and acid-soluble lignin), color units, amount of laccase, and pH.

Figure 4 illustrates representative growth of the bacterial strain 2B2-1ligB in four different concentrations of BL. At 1% BL, the bacteria grew quickly during the first 24 h, followed by slower growth from 24 h to 48 h. After 48 h, the bacteria content remained more or less unchanged until 144 h (Fig. 4A; red and blue lines). Because this initial growth was not seen in the control in Fig. 4B, which had no glucose or urea, the bacteria in Fig. 4A probably consumed the glucose and urea in the beginning, and after that it consumed low molecular weight compounds (LMWCs) that were released when laccase degraded the lignin.

In the 1% BL control, which had no glucose or urea (Fig. 4B), the bacterial growth decreased during the first 24 h because this BL concentration had fewer LMWCs to fuel growth. During the 24-h to 72-h period, the bacteria were able to grow and produce laccase by consuming LMWCs, and after that bacterial growth decreased because of dwindling LMWCs (Fig. 4B; red line).

With 2% BL (Fig. 4C), there was less bacterial growth in the first 48 h than with the previous concentration of 1% BL. However, the growth in the first 48 h was more or less stable, unlike the two-step growth in the first 48 h with 1% BL. The 2% flask stopped growing after 48 h, and after that, the bacteria content remained at approximately the same level until 144 h, though still lower than that in the 1% flask. The 2% BL flask produced a bit more laccase than the 1% BL flask (pink line). The acid-insoluble lignin reached its lowest level at 72 h. After that it increased, returning to its original levels. This changing level of acid-insoluble lignin showed that lignin degradation occurred, followed by lignin polymerization (Fig. 4C; black line).

In the 2% BL control, which had no glucose or urea (Fig. 4D), the bacteria took 72 h to adapt to the new environment, and then it was able to grow. Laccase production was first observed at 96 h. The inhibitory effect of the concentrated BL adversely affected metabolism of the bacteria cells (Fig. 4D; red and blue lines). The acid-insoluble lignin increased slightly at 96 h. Polymerization was first observed at 96 h even with no prior degradation of lignin to release LMWCs. That was because BL also contains naturally-occurring LMWCs. After 96 h, these compounds were still available to the bacteria to fuel growth. The increase in acid-insoluble lignin showed that polymerization occurred in the media because of bacterial laccase (Fig. 4D; black line), even though lignin degradation was not detected in the culture medium (no decreasing black line). The decrease in the acid-insoluble lignin showed that supplementation (glucose and urea) was necessary to fuel growth and cause lignin degradation for polymerizing high *M* lignin.

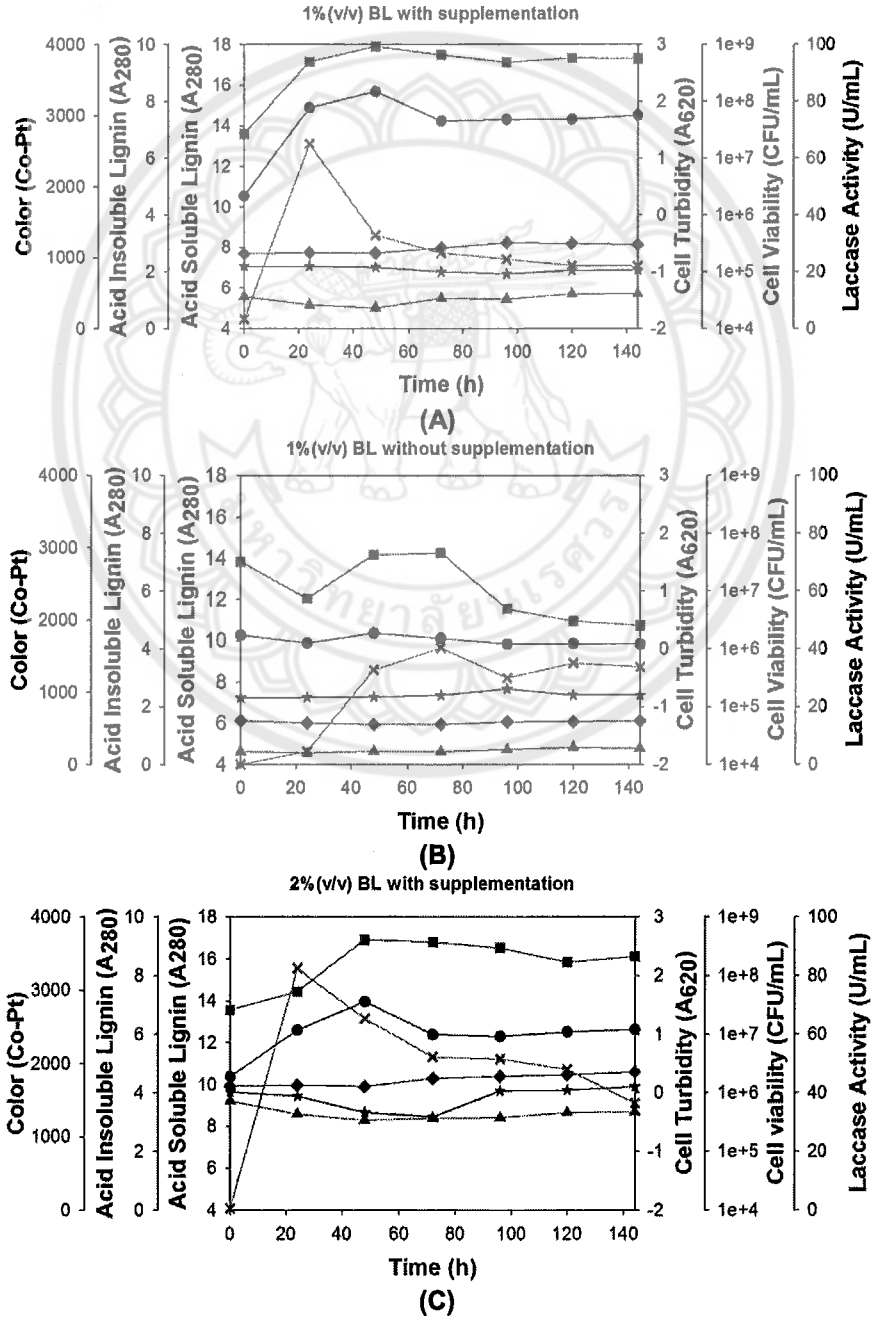
Growth inhibition of the bacteria by lignin did not appear to occur with either a 1% or 2% supplemented BL concentration. However, with 3% BL (Fig. 4E), the growth was clearly inhibited in the first 24 h because of the higher BL concentration. The bacteria probably took 24 h to adapt to the new environment, and they were able to grow after that, reaching a maximum population at 48 h, which remained unchanged until 144 h. The amount of laccase was inhibited by the higher BL concentration, which reflected the initial inhibition of the bacteria. The fastest production of laccase occurred between 24 h to 48 h. This high amount of laccase degraded the lignin, which lowered the amount of acid-insoluble lignin (black line), but polymerization began at 72 h and the amount of acid-insoluble lignin increased, eventually returning to its original level and even a bit higher. This increase in acid-insoluble lignin clearly showed that polymerization occurred in the reaction. In the 3% BL control without glucose or urea (Fig. 4F), the bacteria grew slowly during 24 h to 48 h of incubation (Fig. 4F; red and blue line). This growth showed that the bacteria consumed small compounds in the BL, which caused the amount of acid-insoluble lignin to decrease (Fig. 4F; black line). The amount of laccase was inhibited by the high BL concentration because the bacteria were not able to grow (Fig. 4F; pink line).

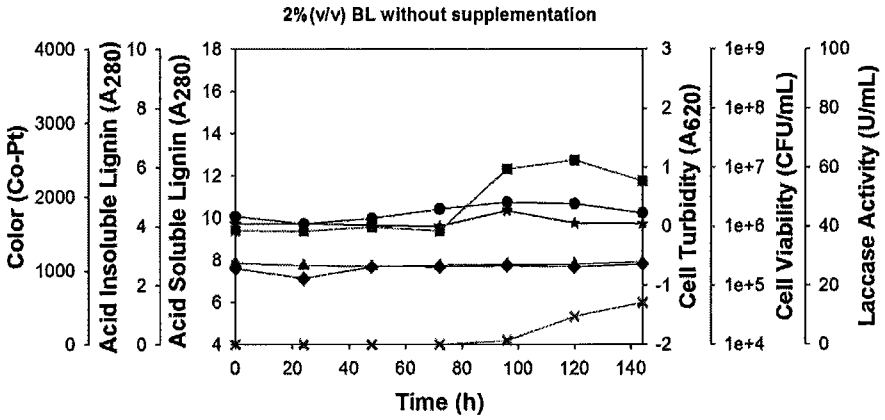
Finally, with 4% BL (Fig. 4G), the bacteria took 48 h to adapt. After that the growth increased sharply, reaching peak growth at 72 h. Then, the growth continually decreased until 144 h because of BL inhibition (Fig. 4G; red and blue lines). This adaptation and subsequent decrease in bacteria clearly showed growth inhibition of the bacteria by the BL. The laccase production was also inhibited by the BL at the start of incubation. The amount of laccase increased at 72 h when bacteria grew (Fig. 4G; pink lines).

In the 4% BL control without glucose or urea (Fig. 4H), the bacterial growth decreased early in the incubation process. Then, the bacteria were able to grow slowly, which was observed first at 48 h of incubation (Fig. 4H; red line). When bacteria grew (from 0 h to 48 h), the amount of acid-insoluble lignin decreased. After that, the amount of acid-insoluble lignin increased. The increase in the amount of acid-insoluble lignin

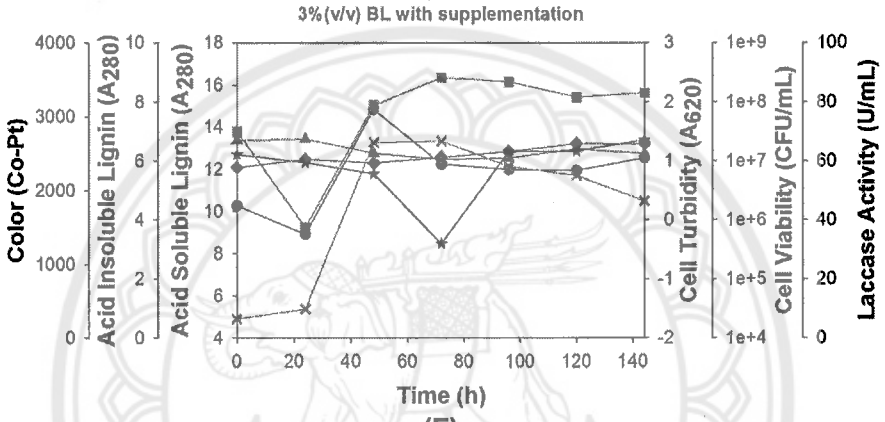
indicated that polymerization occurred (Fig. 4H; black line). Only a small amount of laccase was detected because the bacteria were not able to grow effectively (Fig. 3H; pink line).

The culture media color units basically did not change with any of these BL concentrations, supplemented or not. There were only slight increases. The color results showed that when lignin polymerization occurred in the media, it became darker. This was because the strain 2B2-1ligB was not able to produce cellobiose:quinone oxidoreductase (CBQase) for the reduction of quinone during laccase-catalyzed lignin degradation (Westermark and Eriksson 1974) or quinone dehydrogenase enzyme for decolorization of the BL lignin (Bandounas *et al.* 2013). The diversity of the *Bacillus* sp. showed that some strains degraded lignin without decolorization/mineralization, but continued lignin polymerization.

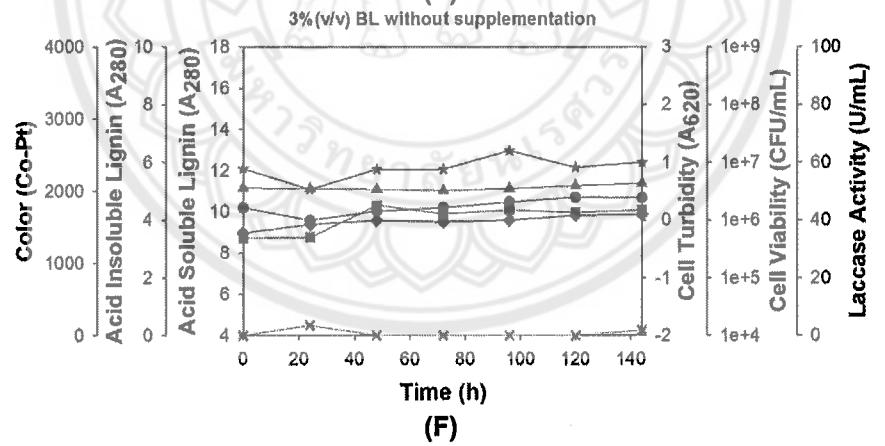



2%(v/v) BL without supplementation
Color (Co-Pt)
Acid Insoluble Lignin (A280)
Acid Soluble Lignin (A280)
Cell Turbidity (A620)
Cell Viability (CFU/mL)
Laccase Activity (U/mL)
Time (h)

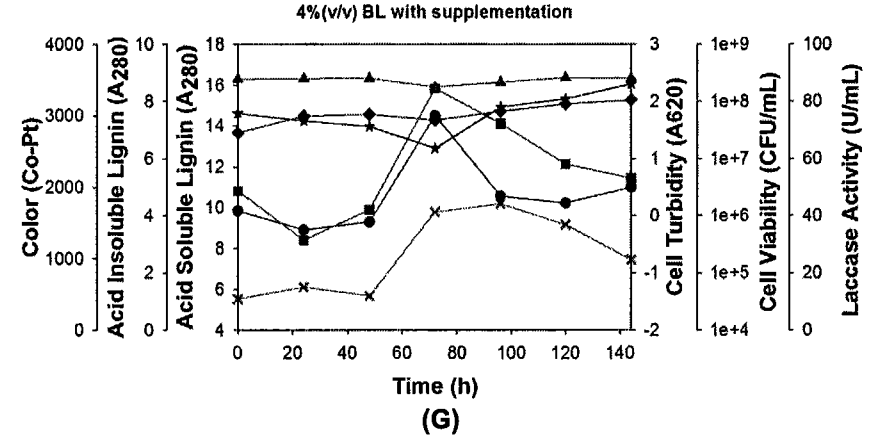
(D)


3%(v/v) BL with supplementation
Color (Co-Pt)
Acid Insoluble Lignin (A280)
Acid Soluble Lignin (A280)
Cell Turbidity (A620)
Cell Viability (CFU/mL)
Laccase Activity (U/mL)
Time (h)

(E)


3%(v/v) BL without supplementation
Color (Co-Pt)
Acid Insoluble Lignin (A280)
Acid Soluble Lignin (A280)
Cell Turbidity (A620)
Cell Viability (CFU/mL)
Laccase Activity (U/mL)
Time (h)

(F)


4%(v/v) BL with supplementation
Color (Co-Pt)
Acid Insoluble Lignin (A280)
Acid Soluble Lignin (A280)
Cell Turbidity (A620)
Cell Viability (CFU/mL)
Laccase Activity (U/mL)
Time (h)

(G)

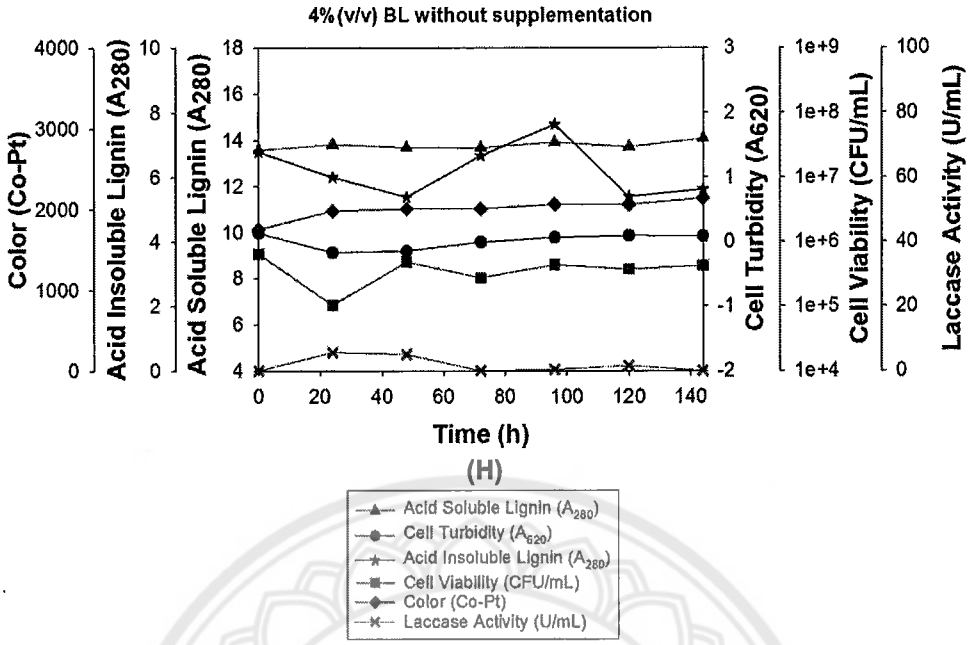


Fig. 4. Growth of bacteria strain 2B2-1ligB during 144 h of incubation with four different concentrations of BL: A and B = 1%; C and D = 2%; E and F = 3%; G and H = 4%; flasks A, C, E, G also contained 5 g/L glucose and 5 g/L urea; flasks B, D, F, and H were controls and contained no glucose or urea; in all of the cases, the temperature was 35 °C and the agitation rate was 200 rpm.

The pH of the media with the four BL concentrations was measured during incubation, as is shown in Fig. 5.

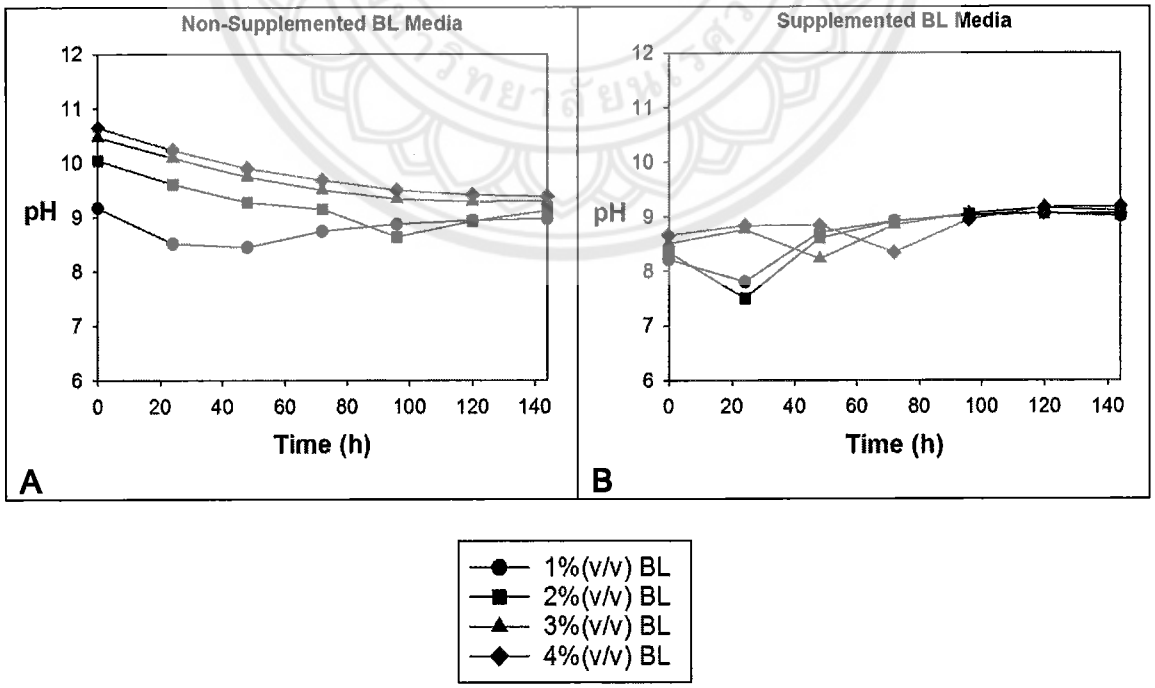


Fig. 5. pH of the (A) non-supplemented BL media and (B) supplemented BL media

The pH of the non-supplemented 1% and 2% BL media (Fig. 5A) decreased in response to the growth of bacteria. With 1% BL, the pH decreased during the first 48 h because the bacteria were able to grow in this BL dilution (black line). With 2% BL, the strain was able to grow for the first 96 h, and so the pH decreased during the same period. The slight decrease in the pH of the non-supplemented 3% and 4% BL media (red and green lines) was not caused by bacteria, but by oxidation of the media during agitation, as was mentioned previously.

The swift decrease in the pH in the 1% and 2% (v/v) BL media supplemented with glucose and urea indicated that these two dilution rates were conducive to bacterial growth because the bacteria took little time to adapt and begin to grow, especially with 2% BL. The pH of the 2% BL media decreased more than the pH of the 1% BL media (Fig. 5B; blue line). In contrast, 3% and 4% BL were not conducive to bacterial growth.

To summarize these various BL concentration trials, less bacterial growth occurred when the BL concentration was higher, regardless of supplementation. Inhibition of the bacteria by the BL affected the degradation and polymerization of lignin because these two processes were dependent upon bacterial growth. The bacteria cells produced laccase, which degraded lignin and released LMWCs (*i.e.*, phenolic compounds and organic compounds) into the media. A large amount of LMWCs was released during lignin degradation, which are called natural mediators, and some turned into quinone intermediates. These natural mediators and quinone intermediates were used during polymerization to produce high *M* lignin, similar to the experiment by Prasetyo *et al.* (2010). The mediators, because of their small size, were able to oxidize lignin in a way that was impossible for the large laccase molecule itself to do. This process is referred to as the laccase-mediator system, and it provides new insight into potential biotechnological applications of the bi-functionality of bacteria. Bi-functionality in this case refers to detoxification (*i.e.*, degradation) and bioremediation (*i.e.*, polymerization) (Jeon and Chang 2013) of the BL lignin.

The polymerization of lignin using fungi has been reported in several studies. For example, Lara *et al.* (2003) has reported that treatment of BL with the fungus *Trametes elegans* in liquid media caused degradation and polymerization even though no nutrients were added. At the same time, Font *et al.* (2003) cultured the fungus *T. versicolor* for BL detoxification. The *M* distribution of the initial and final effluent (after treatment) profiles suggested a possible polymerization from low to high *M* compounds. Recently, Brzonova *et al.* (2017) observed the fungus *Coriolus versicolor* in liquid media containing 2 g of kraft lignin. The kraft lignin was first solubilized in 2.0% (v/v) dimethyl sulfoxide (DMSO), and then distilled water was added. The *M* of the kraft lignin increased. Finally, Ramalingam *et al.* (2017) concluded that laccase-catalyzed polymerization by oxidative coupling dominated over oxidative cleavage (lignin degradation). Although laccase has the potential to cleave lignin in the presence of mediators to phenol-containing monomers or dimers, these phenolic compounds may undergo re-polymerization more readily under similar reaction conditions (Ramalingam *et al.* 2017).

The next procedures used GC-MS and SEC to verify that degradation and polymerization occurred.

GC-MS analysis

After the above growth experiments using BL, GC-MS was used to confirm that BL lignin degradation occurred. This can be done through GC-MS by checking the lignin

degradation products in the final samples and comparing them with the non-incubated samples (Table 7).

The GC-MS detection of propanoic acid (7.68), hexanoic acid (7.76), pentanoic acid (9.13), butanedioic acid (10.04), 1-hexadecene (11.85), and *p*-coumaric acid (13.79) in the non-autoclaved BL sample were attributed to chemical degradation of lignin because of the pulping process.

The presence of compounds in the non-incubated sample (0 h), such as laevulic acid (8.48), urea (9.65), phosphoric acid (9.80), propanoic acid (10.21), 3-hydroxy glutaric acid (11.16), benzoic acid (12.10), and cinnamic acid (13.00, 13.76), were attributed to the release of thermal degradation products produced under the elevated temperature and pressure of the autoclave. After the media were incubated with the strain 2B2-1ligB for 144 h, the presence of LMWCs was checked through testing, but pentanoic acid (6.33), propanoic acid (7.68), hexanoic acid (7.76), butanedioic acid (10.04), propanoic acid (10.21), malic acid (11.18), cinnamic acid (14.52), and 9,12-octadecadienoic acid (15.00) were not found when compared with the initial culture medium (0 h). This data confirmed that the bacteria could degrade lignin.

Looking at the degradation percentages of the degraded compounds, acetic acid (7.86), propanoic acid (8.44), laevulic acid (8.48), butanedioic acid (10.04), pyrotartaric acid (10.13), 3-hydroxy glutaric acid (11.16), 1-hexadecene (11.85), cinnamic acid (13.76), and hexadecanoic acid (14.24) were considerably degraded during detoxification by the laccase-producing bacteria. The toxicity reduction that was achieved indicated polymerization occurred (Font *et al.* 2003).

These laccase-producing bacteria have potential for not only producing commercial lignin and detoxifying wastewater, but also for enhancing biogas production by reducing compounds that inhibit biogas production. Schroyen *et al.* (2017) investigated successful laccase pretreatment of phenolic compounds that inhibit biogas production during anaerobic digestion. A combination of enzymatic detoxification and subsequent biogas production showed that a decrease in the phenolic compounds by laccase treatment could considerably lower the inhibition levels of biogas production.

The negative degradation percentages of benzoic acid indicated the formation of intermediate compounds as a result of lignin degradation. The intermediate compounds underwent de-aromatization through the so-named central pathway, and then different intermediary metabolites, such as acetyl-CoA, succinyl-CoA, and pyruvate, were produced to enter the tricarboxylic acid cycle (Fuchs *et al.* 2011). Benzoic acid was used as an energy source for cell production. This accumulation of benzoic acid was similar to the results of Sachan *et al.* (2006).

There were some compounds other than benzoic acid that were also produced as intermediate compounds by 2B2-1ligB growth, namely octamethyl trisiloxane (7.78), unknown (8.03), benzeneacetic acid (9.90), and benzoate (13.59) (Table 8). The small compounds could effectively strengthen the catalysis of laccase to polymerize lignin as natural mediators (2-methoxyphenol, *etc.*). Laccase oxidized these small molecules, including lignin, to phenoxy radicals with a concomitant reduction in oxygen. Thus, the generated phenoxy radicals are unstable and reactions involving polymerization and depolymerization of lignin can take place (Leonowicz *et al.* 1985).

The GC-MS results showed that the lignin was degraded by the bacteria. The BL lignin was degraded in three ways: the bacteria degraded some compounds, reduced the amount of some compounds, and produced some intermediate compounds.

Table 7. Compounds Identified from the Four Different Low BL Concentrations and Corresponding Degradation

RT (min)	Identified Compound	1% BL*	Inoculated BL (Autoclaved)											
			1% (v/v)			2% (v/v)			3% (v/v)			4% (v/v)		
			0 h	144 h	%De	0 h	144 h	%De	0 h	144 h	%De	0 h	144 h	%De
6.33	Pentanoic acid	√	√	–	100	√	–	100	√	–	100	√	√	66
7.68	Propanoic acid	√	√	–	100	√	–	100	√	–	100	√	√	12
7.76	Hexanoic acid	√	√	–	100	√	–	100	√	–	100	√	√	73
7.78	Octamethyl trisiloxane	–	–	–	–	–	√	–	–	√	–	–	–	–
7.86	Acetic acid	√	√	√	35	√	√	44	√	√	39	√	√	26
8.03	Unknown	–	–	√	–	–	√	–	–	–	–	–	–	–
8.44	Propanoic acid	√	√	√	84	√	√	83	√	√	64	√	√	34
8.48	Laevulic acid	–	√	√	53	√	√	43	√	√	35	√	√	37
8.52	Ethanedioic acid	–	–	–	–	–	–	–	√	–	100	√	–	100
8.60	Propanoic acid	–	√	–	100	√	√	73	√	√	58	–	√	0
8.80	Heptanoic acid	√	√	–	100	–	–	0	√	–	100	√	√	57
9.13	Pentanoic acid	√	–	–	–	–	–	–	√	–	100	√	–	100
9.17	Malonic acid	–	–	–	–	–	–	–	√	–	100	√	–	100
9.34	2-Methoxyphenol	√	–	–	–	–	–	–	√	√	7	√	–	100
9.65	Urea	–	√	√	39	√	√	62	√	√	63	√	√	41
9.80	Phosphoric acid	–	√	√	2	√	√	55	√	√	59	√	√	35
9.90	Benzeneacetic acid	–	–	–	–	–	–	–	–	√	–	–	–	–
10.04	Butanedioic acid	√	√	√	72	√	–	100	√	√	92	√	√	21
10.13	Pyrotartaric acid	√	√	√	32	√	√	40	√	√	35	√	√	39
10.21	Propanoic acid	–	√	–	100	√	–	100	√	–	100	√	√	0
11.16	3-Hydroxy glutaric acid	–	√	√	54	√	√	58	√	√	53	√	√	39
11.18	Malic acid	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	√	–	100
11.80	Pentanedioic acid	–	√	√	1	√	–	100	√	√	62	√	√	63
11.85	1-Hexadecene	√	√	√	23	√	–	100	√	√	53	–	–	-
12.10	Benzoic acid	–	√	√	-159	√	√	-208	√	√	-197	√	–	0
12.84	Hydrocinnamic acid	√	–	–	–	–	–	–	–	√	–	–	–	–
12.87	Benzoic acid	–	√	–	100	√	√	32	√	√	-14	√	√	57
13.00	Cinnamic acid	–	√	–	100	√	–	100	√	–	100	√	√	35
13.01	*p*-Coumaric acid	√	–	–	–	–	√	–	–	√	–	–	–	–
13.59	Benzoate	√	–	√	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
13.76	Cinnamic acid	–	√	√	98	√	√	89	√	√	46	√	√	44
13.79	*p*-Coumaric acid	√	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
14.24	Hexadecanoic acid	√	√	√	42	√	√	44	√	√	48	√	√	47
14.52	Cinnamic acid	√	√	√	96	√	–	100	√	√	77	√	√	51
15.00	9,12-Octadecadienoic acid	√	√	–	100	√	–	100	√	–	100	√	√	44
15.02	Oleic acid	√	√	√	38	√	√	36	√	–	100	√	√	41
15.13	Octadecanoic acid	√	√	√	31	√	√	19	√	√	21	√	√	40
15.82	9-Octadecanamide	–	√	√	43	√	√	6	√	√	-16	–	–	–

Table 7 notes: √ = present; - = absent; 1% BL* = non-autoclaved BL; %De = degradation percentage of each compound was calculated from the area peak at 0 h and the area peak at 144 h for each BL concentration

SEC analysis

To verify lignin polymerization, SEC analysis was used to determine the *M* of the lignin in the samples from the four BL concentrations collected after 144 h of cultivation. The *M* of the lignin in the control samples with the same BL concentrations taken at 0 h was also checked to compare the two weights. If the results showed that the *M* of the lignin in the final samples was higher than that of the initial samples, then it was indicated that polymerization occurred. After measuring the initial and final *M*s in each set, the percent *M* change (% *M*) was calculated. The effectiveness of various polymerization methods can be compared by comparing the resulting percent *M* change. Table 8 shows the initial and final *M*s of lignin in four different BL concentrations before and after treatment with the current bacterial strain 2B2-1ligB.

Table 8 shows that the greatest change in the lignin *M*, which indicated the greatest amount of polymerization, occurred in the 2% BL solution (26.4% *M* change). Although the 1% and 3% BL solutions were not as hospitable to the bacteria (13.0% and 14.1% *M* change, respectively), polymerization nevertheless occurred in those two solutions as well (as indicated by their positive percent *M* changes), albeit to a lesser extent than in the 2% BL solution. The 4% BL solution was too concentrated for the bacteria to tolerate, and so polymerization did not occur (-7.2% *M* change), and only degradation occurred, which was indicated by the negative percent *M* change. When BL emerged from the pulping process, it naturally contained pieces of lignin in many different sizes, with some pieces quite broken down. That was the situation in all of the solutions at 0 h. After 144 h of incubation, these different-sized pieces of lignin were merged by the laccase through polymerization into large pieces of high *M* lignin. The various changes in the percent *M* showed how polymerization was accelerated by using the optimum BL concentration.

Table 8. *M* Analysis and Percent *M* Change of the Samples at Four Different BL Concentrations

Sample	Average *M* (Dalton)	% *M* Change
1%, 0 h	17757.97	12.98
1%, 144 h	20408.58	
2%, 0 h	13939.09	26.41
2%, 144 h	18943.02	
3%, 0 h	14394.39	14.09
3%, 144 h	16756.14	
4%, 0 h	12686.07	-7.16
4%, 144 h	11838.85	

When Brzonova *et al.* (2017) used fungi (*C. versicolor*) to polymerize kraft lignin, they were able to increase the lignin *M* from 4690 Da to 28760 Da (61.3% *M* change) by polymerization in liquid media that contained 2 g of kraft lignin and 2 vol.% DMSO, at a temperature of 29 °C for 6 d. The current study is believed to be the first to utilize bacteria to degrade and polymerize BL lignin. Utilizing bacteria rather than fungi for this purpose had the advantages of taking less preparation time and requiring fewer supplementary ingredients in the medium. Most importantly, fungi research has only been done using pure commercial lignin, not BL. These bacteria have a natural tolerance for extreme environmental conditions, like those found in BL, where the current study showed that the bacteria can operate effectively. Because of the extreme environment of the BL, fungi may not even be able to survive in it.

To summarize the results and discussion of the current study, the toxin tolerance technique isolated a specific spore-forming bacterial strain with the ID 2B2-1ligB, which by producing laccase, caused phenolic removal of BL (lignin degradation) and lignin polymerization. This showed that strain 2B2-1ligB could be used for detoxification and bioremediation of BL. The strain could be useful to treat BL before wastewater treatment. The optimum conditions for growth determined above should apply: a 2% BL concentration, supplementation of 5 g/L glucose and 5 g/L urea, a temperature of 35 °C, and agitation at 200 rpm. Six days after the start of inoculation, high *M* lignins were harvested by acid precipitation and subsequent filtration or sedimentation. After lignin harvest, the final waste could be sent to the activated sludge process to reduce the color and other contaminants. The high *M* lignin can serve as a replacement for various petroleum-derived chemicals, including resins, plastics, and fillers (Allen *et al.* 1980).

CONCLUSIONS

1. Five *Bacillus* sp. were isolated from a pulp mill, after which the single strain 2B2-1ligB was selected to determine the optimum conditions for lignin degradation. When the optimum conditions were utilized, a 79.2% lignin degradation was obtained. Those ideal conditions were lignin concentration 1 g/L, temperature of 35 °C, and urea concentration of 5 g/L. The full process demonstrated lignin degradation, followed by polymerization.
2. The best BL concentration for growth of the strain 2B2-1ligB and enhancement of the *M* of lignin was 2% (v/v).
3. Degradation of the BL lignin by the bacteria was demonstrated by the subsequent absence of small recalcitrant compounds, while polymerization of the BL lignin was demonstrated by the increase in the *M*. In light of these results, the strain 2B2-1ligB showed great potential for application in the bio-refinery process, where it could generate additional income by recovering commercial grade lignin from BL.
4. The A_{280} wavelength absorbance of the acid-soluble lignin remained practically unchanged, which was unexpected. However, degradation was subsequently confirmed by GC-MS testing.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was made possible in part by a generous grant from the Royal Thai Government and Naresuan University (Grant No. R2561B064).

REFERENCES CITED

Allen, B. R., Cousin, M. J., and Pierce, G. E. (1980). *Pretreatment Methods for the Degradation of Lignin*, National Technical Information Service, Springfield, VA.

APHA, AWWA, WEF (2012). Standard methods for the examination of water and waste water, 22nd Ed., American Public Health Association, Washington, DC.

Areskogh, D., Li, J., Gellerstedt, G., and Henriksson, G. (2010). "Investigation of the molecular weight increase of commercial lignosulfonates by laccase catalysis," *Biomacromolecules* 11(4), 904-910. DOI: 10.1021/bm901258v

Arora, D. S., and Sandhu, D. K. (1985). "Laccase production and wood degradation by a white-rot fungus *Daedalea flavida*," *Enzyme Microb. Tech.* 7(8), 405-408. DOI: 10.1016/0141-0229(85)90131-0

Bandounas, L., Pinkse, M., de Winde, J. H., and Ruijssenaars, H. J. (2013). "Identification of a quinone dehydrogenase from a *Bacillus* sp. involved in the decolourization of the lignin-model dye, Azure B," *New Biotechnol.* 30(2), 196-204. DOI: 10.1016/j.nbt.2012.04.003

Brzonova, I., Kozliak, E. I., Andrianova, A. A., LaVallie, A., Kubátová, A., and Ji, Y. (2017). "Production of lignin based insoluble polymers (anionic hydrogels) by *C. versicolor*," *Sci. Rep.-UK* 7, 1-13. DOI: 10.1038/s41598-017-17696-1

Bugg, T. D. H., Ahmad, M., Hardiman, E. M., and Singh, R. (2011). "The emerging role for bacteria in lignin degradation and bio-product formation," *Curr. Opin. Biotech.* 22(3), 394-400. DOI: 10.1016/j.copbio.2010.10.009

Chandra, R., Abhishek, A., and Sankhwar, M. (2011). "Bacterial decolorization and detoxification of black liquor from rayon grade pulp manufacturing paper industry and detection of their metabolic products," *Bioresour. Technol.* 102(11), 6429-6436. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.03.048

Chandra, R., and Bharagava, R. N. (2013). "Bacterial degradation of synthetic and kraft lignin by axenic and mixed culture and their metabolic products," *J. Environ. Biol.* 34(6), 991-999.

Chandra, R., Raj, A., Purohit, H. J., and Kapley, A. (2007). "Characterisation and optimisation of three potential aerobic bacterial strains for kraft lignin degradation from pulp paper waste," *Chemosphere* 67(4), 839-846. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2006.10.011

Fernaud, J. R. H., Carnicero, A., Perestelo, F., Cutuli, M. H., Arias, E., and Falcón, M. A. (2006). "Upgrading of an industrial lignin by using laccase produced by *Fusarium proliferatum* and different laccase-mediator systems," *Enzyme Microb. Tech.* 38(1-2), 40-48. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2005.01.043

Font, X., Caminal, G., Gabarrell, X., Romero, S., and Vicent, M. T. (2003). "Black liquor detoxification by laccase of *Trametes versicolor* pellets," *J. Chem. Technol. Biot.* 78(5), 548-554. DOI: 10.1002/jctb.834

Fuchs, G., Boll, M., and Heider, J. (2011). "Microbial degradation of aromatic compounds—From one strategy to four," *Nat. Rev. Microbiol.* 9(11), 803-816. DOI: 10.1038/nrmicro2652

Ghoul, M., and Chebil, L. (2012). *Enzymatic Polymerization of Phenolic Compounds by Oxidoreductases*, Springer Netherlands, Dordrecht, Netherlands.

Jeon, J.-R., and Chang, Y.-S. (2013). "Laccase-mediated oxidation of small organics: Bifunctional roles for versatile applications," *Trends Biotechnol.* 31(6), 335-341. DOI: 10.1016/j.tibtech.2013.04.002

Kim, K. H., Dutta, T., Walter, E. D., Isern, N. G., Cort, J. R., Simmons, B. A., and Singh, S. (2017). "Chemoselective methylation of phenolic hydroxyl group prevents quinone methide formation and repolymerization during lignin depolymerization," *ACS Sustain. Chem. Eng.* 5(5), 3913-3919. DOI: 10.1021/acssuschemeng.6b03102

Areskogh, D., Li, J., Gellerstedt, G., and Henriksson, G. (2010). "Investigation of the molecular weight increase of commercial lignosulfonates by laccase catalysis," *Biomacromolecules* 11(4), 904-910. DOI: 10.1021/bm901258v

Arora, D. S., and Sandhu, D. K. (1985). "Laccase production and wood degradation by a white-rot fungus *Daedalea flavida*," *Enzyme Microb. Tech.* 7(8), 405-408. DOI: 10.1016/0141-0229(85)90131-0

Bandounas, L., Pinkse, M., de Winde, J. H., and Ruijssenaars, H. J. (2013). "Identification of a quinone dehydrogenase from a *Bacillus* sp. involved in the decolourization of the lignin-model dye, Azure B," *New Biotechnol.* 30(2), 196-204. DOI: 10.1016/j.nbt.2012.04.003

Brzonova, I., Kozliak, E. I., Andrianova, A. A., LaVallie, A., Kubátová, A., and Ji, Y. (2017). "Production of lignin based insoluble polymers (anionic hydrogels) by *C. versicolor*," *Sci. Rep.-UK* 7, 1-13. DOI: 10.1038/s41598-017-17696-1

Bugg, T. D. H., Ahmad, M., Hardiman, E. M., and Singh, R. (2011). "The emerging role for bacteria in lignin degradation and bio-product formation," *Curr. Opin. Biotech.* 22(3), 394-400. DOI: 10.1016/j.copbio.2010.10.009

Chandra, R., Abhishek, A., and Sankhwar, M. (2011). "Bacterial decolorization and detoxification of black liquor from rayon grade pulp manufacturing paper industry and detection of their metabolic products," *Bioresour. Technol.* 102(11), 6429-6436. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.03.048

Chandra, R., and Bharagava, R. N. (2013). "Bacterial degradation of synthetic and kraft lignin by axenic and mixed culture and their metabolic products," *J. Environ. Biol.* 34(6), 991-999.

Chandra, R., Raj, A., Purohit, H. J., and Kapley, A. (2007). "Characterisation and optimisation of three potential aerobic bacterial strains for kraft lignin degradation from pulp paper waste," *Chemosphere* 67(4), 839-846. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2006.10.011

Fernaud, J. R. H., Carnicero, A., Perestelo, F., Cutuli, M. H., Arias, E., and Falcón, M. A. (2006). "Upgrading of an industrial lignin by using laccase produced by *Fusarium proliferatum* and different laccase-mediator systems," *Enzyme Microb. Tech.* 38(1-2), 40-48. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2005.01.043

Font, X., Caminal, G., Gabarrell, X., Romero, S., and Vicent, M. T. (2003). "Black liquor detoxification by laccase of *Trametes versicolor* pellets," *J. Chem. Technol. Biot.* 78(5), 548-554. DOI: 10.1002/jctb.834

Fuchs, G., Boll, M., and Heider, J. (2011). "Microbial degradation of aromatic compounds—From one strategy to four," *Nat. Rev. Microbiol.* 9(11), 803-816. DOI: 10.1038/nrmicro2652

Ghoul, M., and Chebil, L. (2012). *Enzymatic Polymerization of Phenolic Compounds by Oxidoreductases*, Springer Netherlands, Dordrecht, Netherlands.

Jeon, J.-R., and Chang, Y.-S. (2013). "Laccase-mediated oxidation of small organics: Bifunctional roles for versatile applications," *Trends Biotechnol.* 31(6), 335-341. DOI: 10.1016/j.tibtech.2013.04.002

Kim, K. H., Dutta, T., Walter, E. D., Isern, N. G., Cort, J. R., Simmons, B. A., and Singh, S. (2017). "Chemoselective methylation of phenolic hydroxyl group prevents quinone methide formation and repolymerization during lignin depolymerization," *ACS Sustain. Chem. Eng.* 5(5), 3913-3919. DOI: 10.1021/acssuschemeng.6b03102

Lara, M. A., Rodríguez-Malaver, A. J., Rojas, O. J., Holmquist, O., González, A. M., Bullón, J., Peñaloza, N., and Araujo, E. (2003). "Black liquor lignin biodegradation by *Trametes elegans*," *Int. Biodeter. Biodegr.* 52(3), 167-173. DOI: 10.1016/S0964-8305(03)00055-6

Leonowicz, A., Szklarz, G., and Wojtaś-Wasilewska, M. (1985). "The effect of fungal laccase on fractionated lignosulphonates (peritan Na)," *Phytochemistry* 24(3), 393-396. DOI: 10.1016/S0031-9422(00)80734-7

Minu, K., Jiby, K. K., and Kishore, V. V. N. (2012). "Isolation and purification of lignin and silica from the black liquor generated during the production of bioethanol from rice straw," *Biomass Bioenerg.* 39, 210-217. DOI: 10.1016/j.biombioe.2012.01.007

Narde, G. K., Kapley, A., and Purohit, H. J. (2004). "Isolation and characterization of *Citrobacter* strain HPC255 for broad-range substrate specificity for chlorophenols," *Curr. Microbiol.* 48(6), 419-423. DOI: 10.1007/s00284-003-4230-2

Okuda, N., Soneura, M., Ninomiya, K., Katakura, Y., and Shioya, S. (2008). "Biological detoxification of waste house wood hydrolysate using *Ureibacillus thermosphaericus* for bioethanol production," *J. Biosci. Bioeng.* 106(2), 128-133. DOI: 10.1263/jbb.106.128

Pearl, I., and Benson, H. K. (1940). "The determination of lignin in sulphide pulping liquor," *Paper Trade Journal* 111, 35-36.

Pokhrel, D., and Viraraghavan, T. (2004). "Treatment of pulp and paper mill wastewater—A review," *Sci. Total Environ.* 333(1-3), 37-58. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2004.05.017

Prasetyo, E. N., Kudanga, T., Østergaard, L., Rencoret, J., Gutiérrez, A., del Río, J. C., Santos, J. I., Nieto, L., Jiménez-Barbero, J., Martínez, A. T., *et al.* (2010). "Polymerization of lignosulfonates by the laccase-HBT (1-hydroxybenzotriazole) system improves dispersibility," *Bioresour. Technol.* 101(14), 5054-5062. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.01.048

Raj, A., Reddy, M. M. K., and Chandra, R. (2007a). "Decolourisation and treatment of pulp and paper mill effluent by lignin-degrading *Bacillus* sp.," *J. Chem. Technol. Biot.* 82(4), 399-406. DOI: 10.1002/jctb.1683

Raj, A., Reddy, M. M. K., and Chandra, R. (2007b). "Identification of low molecular weight aromatic compounds by gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) from kraft lignin degradation by three *Bacillus* sp.," *Int. Biodeter. Biodegr.* 59(4), 292-296. DOI: 10.1016/j.ibiod.2006.09.006

Raj, A., Reddy, M. M. K., Chandra, R., Purohit, H. J., and Kapley, A. (2007c). "Biodegradation of kraft-lignin by *Bacillus* sp. isolated from sludge of pulp and paper mill," *Biodegradation* 18(6), 783-792. DOI: 10.1007/s10532-007-9107-9

Raj, A., Kumar, S., Haq, I., and Singh, S. K. (2014). "Bioremediation and toxicity reduction in pulp and paper mill effluent by newly isolated ligninolytic *Paenibacillus* sp.," *Ecol. Eng.* 71, 355-362. DOI: 10.1016/j.ecoleng.2014.07.002

Ramalingam, B., Sana, B., Seayad, J., Ghadessy, F. J., and Sullivan, M. B. (2017). "Towards understanding of laccase-catalysed oxidative oligomerisation of dimeric lignin model compounds," *RSC Adv.* 7(20), 11951-11958. DOI: 10.1039/C6RA26975C

Rittstieg, K., Suurnakki, A., Suortti, T., Kruus, K., Guebitz, G., and Buchert, J. (2002). "Investigations on the laccase-catalyzed polymerization of lignin model compounds using size-exclusion HPLC," *Enzyme Microb. Tech.* 31(4), 403-410. DOI: 10.1016/S0141-0229(02)00102-3

Sachan, A., Ghosh, S., and Mitra, A. (2006). "Biotransformation of *p*-coumaric acid by *Paecilomyces variotii*," *Lett. Appl. Microbiol.* 42(1), 35-41. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2005.01801.x

Schroyen, M., Van Hulle, S. W. H., Holemans, S., Vervaeren, H., and Raes, K. (2017). "Laccase enzyme detoxifies hydrolysates and improves biogas production from hemp straw and miscanthus," *Bioresource Technol.* 244(Part 1), 597-604. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.07.137

Ulmer, D. C., Leisola, M. S. A., Schmidt, B. H., and Fiechter, A. (1983). "Rapid degradation of isolated lignins by *Phanerochaete chrysosporium*," *Appl. Environ. Microb.* 45(6), 1795-1801.

Upton, B. M., and Kasko, A. M. (2016). "Strategies for the conversion of lignin to high-value polymeric materials: Review and perspective," *Chem. Rev.* 116(4), 2275-2306. DOI: 10.1021/acs.chemrev.5b00345

Viswanath, B., Rajesh, B., Janardhan, A., Kumar, A. P., and Narasimha, G. (2014). "Fungal laccases and their applications in bioremediation," *Enzyme Res.* 2014. DOI: 10.1155/2014/163242

Wang, Q., Dai, J., Yu, Y., Zhang, Y., Shen, T., Liu, J., and Wang, R. (2010). "Efficiencies of different microbial parameters as indicator to assess slight metal pollutions in a farm field near a gold mining area," *Environ. Monit. Assess.* 161(1-4), 495-508. DOI: 10.1007/s10661-009-0763-6

Westermark, U., and Eriksson, K.-E. (1974). "Cellobiose: Quinone oxidoreductase, a new wood-degrading enzyme from white-rot fungi," *Acta Chem. Scand.* 28b, 209-214. DOI: 10.3891/acta.chem.scand.28b-0209

Yan, L., and Qi, X. (2014). "Degradation of cellulose to organic acids in its homogeneous alkaline aqueous solution," *ACS Sustain. Chem. Eng.* 2(4), 897-901. DOI: 10.1021/sc400507s

Yang, C., Niu, Y., Su, H., Wang, Z., Tao, F., Wang, X., Tang, H., Ma, C., and Xu, P. (2010). "A novel microbial habitat of alkaline black liquor with very high pollution load: Microbial diversity and the key members in application potentials," *Bioresour. Technol.* 101(6), 1737-1744. DOI: 10.1016/j.biortech.2009.09.092

Yewale, T., Panchwagh, S., Rajagopalan, S., Dhamole, P. B., and Jain, R. (2016). "Enhanced xylitol production using immobilized *Candida tropicalis* with non-detoxified corn cob hemicellulosic hydrolysate," *3 Biotech* 6(1), 75. DOI: 10.1007/s13205-016-0388-8

Zhang, D., Ong, Y. L., Li, Z., and Wu, J. C. (2013). "Biological detoxification of furfural and 5-hydroxyl methyl furfural in hydrolysate of oil palm empty fruit bunch by *Enterobacter* sp. FDS8," *Biochem. Eng. J.* 72, 77-82. DOI: 10.1016/j.bej.2013.01.003

Zheng, Y., Chai, L.-Y., Yang, Z.-H., Tang, C.-J., Chen, Y.-H., and Shi, Y. (2013). "Enhanced remediation of black liquor by activated sludge bioaugmented with a novel exogenous microorganism culture," *Appl. Microbiol. Biot.* 97(14), 6525-6535. DOI: 10.1007/s00253-012-4453-x

Zhu, D., Zhang, P., Xie, C., Zhang, W., Sun, J., Qian, W.-J., and Yang, B. (2017). "Biodegradation of alkaline lignin by *Bacillus ligniniphilus* L1," *Biotechnol. Biofuels* 10(1), 44. DOI: 10.1186/s13068-017-0735-y

Article submitted: August 24, 2018; Peer review completed: October 28, 2018; Revised version received: November 15, 2018; Accepted: November 30, 2018; Published: December 12, 2018. DOI: 10.15376/biores.14.1.1049-1076

ภาคผนวก ข

ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนไว้ กิจกรรมที่ดำเนินการ และผลที่ได้รับ

ตาราง 21 เปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนไว้ กิจกรรมที่ดำเนินการมา และผลที่ได้รับตลอดโครงการ

ลำดับ	วัตถุประสงค์ กิจกรรม	กิจกรรมที่วางแผนไว้	กิจกรรมที่ดำเนินการ	ผลที่ได้รับตลอดโครงการ
1	ได้แบคทีเรียที่ระบุชื่อแล้วอย่างน้อย 5 สปีชีร์ เก็บรักษาอยู่ในศูนย์จุลินทรีย์แห่งประเทศไทย	คัดแยกแบคทีเรียและเก็บรักษาแบคทีเรียที่คัดแยกได้	ฝากเก็บรักษาแบคทีเรียที่คัดแยกได้ที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย	สำเร็จ
2	ทราบสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยลิกนินและการเปลี่ยนแปลงเป็นสารโพลีเมอร์ลิกนินของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ 1 สปีชีร์	ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยลิกนินและการเปลี่ยนแปลงเป็นสารโพลีเมอร์ลิกนินของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ 1 สปีชีร์	ทำการทดลองทางวิทยาศาสตร์	ได้สภาวะที่เหมาะสมในการย่อยลิกนินและการเปลี่ยนแปลงเป็นสารโพลีเมอร์ลิกนิน
3	ทราบความเข้มข้นน้ำล้างเยื่อกระดาษที่เหมาะสมในการย่อยลิกนินและการเปลี่ยนแปลงเป็นสารโพลีเมอร์ลิกนินของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ 1 สปีชีร์	ศึกษาความเข้มข้นน้ำล้างเยื่อกระดาษที่เหมาะสมในการย่อยลิกนินและการเปลี่ยนแปลงเป็นสารโพลีเมอร์ลิกนินของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ 1 สปีชีร์	ทำการทดลองทางวิทยาศาสตร์	ได้ความเข้มข้นน้ำล้างเยื่อกระดาษที่เหมาะสมในการย่อยลิกนินและการเปลี่ยนแปลงเป็นสารโพลีเมอร์ลิกนิน

ลำดับ	วัตถุประสงค์ กิจกรรม	กิจกรรมที่วางแผนไว้	กิจกรรมที่ดำเนินการ	ผลที่ได้รับตลอดโครงการ
4	ตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติที่อยู่ในฐานข้อมูล Scopus	ตีพิมพ์ในวารสาร	ตีพิมพ์วารสาร BioRsources ซึ่งอยู่ในฐานข้อมูล Scopus	สำเร็จ 1 ฉบับ