



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การผลิตเยื่อใยจากกาบหมากด้วยเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินจากแบคทีเรียที่ผ่าน
การคัดแยก

Biopulping of arecanut leaf sheath by lignin degrading enzyme
produced by isolated bacteria

โดย

ดร. ฉนกร หยกสหาชาติ

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินกองทุนส่งเสริมงานวิจัย ประจำปี พ.ศ. 2565

คณะเทคโนโลยีการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ

การผลิตเยื่อใยจากกากหมากด้วยเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินจากแบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือก
ฉนกร หยกสหชาติ สุณิสสา สุวรรณพันธ์ กมลวรรณ โตทอง และเสาวลักษณ์ ดอกไม้ดี
คณะเทคโนโลยีการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ

บทคัดย่อ

การเพิ่มมูลค่าให้กับกากหมากที่ไม่ได้นำไปใช้ประโยชน์ด้วยการผลิตเป็นเยื่อใย กระดาษ และบรรจุภัณฑ์เป็นแนวทางหนึ่งที่น่าสนใจ ซึ่งการผลิตเยื่อใยด้วยวิธีการดั้งเดิมมักใช้วิธีการทางเคมีภายใต้อุณหภูมิและความดันสูง ดังนั้นการใช้เอนไซม์ย่อยสลายลิกนินที่ผลิตจากแบคทีเรียจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่ประหยัดพลังงาน เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม และเพิ่มผลผลิตเยื่อใย งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตเยื่อใยจากกากหมากด้วยเอนไซม์จากแบคทีเรีย โดยคัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างดิน จากการฝังเยื่อกระดาษในดินบริเวณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ และตัวอย่างดินและน้ำจากโรงงานผลิตกระดาษลูกฟูก พบว่าคัดแยกแบคทีเรียบนอาหาร Lignin modifying basal medium (LMB) ได้จำนวน 78 ไอโซเลท มีเพียง 9 ไอโซเลท ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสูงกว่า 4.00 โดยแบคทีเรียไอโซเลท H7 มีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินหรือเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสสูงสุด เท่ากับ 0.07 ยูนิตต่อมิลลิกรัม เมื่อใช้ 2,6-ไดเมทออกซีฟีนอล (DMP) เป็นสับสเตรท ให้ผลได้ของเยื่อใยเท่ากับ 42.21 เปอร์เซ็นต์ เมื่อจัดจำแนกแบคทีเรียไอโซเลท H7 พบว่าเป็นเชื้อ *Pseudomonas* sp. H7 เอนไซม์ H7 มีพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ เท่ากับ 6.0 ถึง 7.0 และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ มีความคงตัวที่พีเอชระหว่าง 5.0 ถึง 8.0 และอุณหภูมิ 30 ถึง 60 องศาเซลเซียส สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเยื่อใยจากกากหมากอยู่ที่พีเอช 6.0 ถึง 7.0 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อศึกษาสมบัติของเยื่อใยที่ได้จากการเตรียมด้วยต่างและเอนไซม์ H7 พบว่าเยื่อใยที่ได้จากการเตรียมด้วยเอนไซม์มีความสว่างมากกว่า แต่มีค่าสีแดงและเหลืองต่ำกว่าเยื่อใยที่เตรียมจากต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเยื่อใยที่ได้จากการเตรียมจากทั้งสองวิธีไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทางด้านความหนา (0.22 ถึง 0.30 มิลลิเมตร) ปริมาณความชื้น (16.48 ถึง 16.88 เปอร์เซ็นต์) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเยื่อใย (0.37 ถึง 0.40 มิลลิเมตร) และปริมาณของลิกนิน (21.47 ถึง 23.66 เปอร์เซ็นต์) นอกจากนี้เยื่อใยที่ได้จากการเตรียมด้วยต่างมีค่าความต้านทานแรงดึงและระยะยืดสูงกว่าเยื่อใยที่เตรียมด้วยเอนไซม์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเยื่อใยจากการเตรียมด้วยเอนไซม์จะขาดง่ายกว่าเยื่อใยจากการเตรียมด้วยต่าง โดยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของน้ำหนักมาตรฐาน (75.3 ถึง 95.6 กรัมต่อตารางเมตร) และระยะยืด (1.23 ถึง 1.45 เปอร์เซ็นต์) ระหว่างกระดาษจากเยื่อใยที่เตรียมด้วยต่างและเอนไซม์ นอกจากนี้กระดาษจากเยื่อใยที่เตรียมด้วยต่างมีความหนาน้อยกว่า แต่มีความต้านทานแรงดึงสูงกว่ากระดาษจากเยื่อใยที่เตรียมด้วยเอนไซม์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งเยื่อใยจากกากหมากที่เตรียมด้วยเอนไซม์สามารถขึ้นรูปเป็นกระดาษได้ โดยเป็นวิธีที่ประหยัดพลังงาน เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ได้เยื่อใยและกระดาษที่มีความหนาและขาวแต่ไม่แข็งแรงเท่ากับต่าง

Biopulping of arecanut leaf sheath by lignin degrading enzyme produced by isolated bacteria

Chanakorn Yokesahachart, Sunisa Suwannaphan, Kamonwan Tothong and
Saowalak Dokmaidee

Faculty of Agricultural Technology and Agro-Industry, Rajamangala University of
Technology Suvarnabhumi

Abstract

Value added products from arecanut leaf sheath (ALS) like pulping, papermaking and packaging is an interesting way. In the conventional process, the chemicals have been used for pulping at high temperature and high pressure. Therefore, biopulping of ALS by lignin degrading enzyme obtained from bacteria is alternative way to energy-saving eco-friendly and more yield pulp. The aim of the study is biopulping of arecanut leaf sheath by enzyme produced by bacteria. The bacteria were isolated from pulp buried in soil at Rajamangala University of Technology Suvarnabhumi and soil and water from corrugated paper manufacturing. Out of 78 isolates, 9 isolates exhibited the high hydrolysis value (HC) higher than 4.00 on Lignin modifying basal medium (LMB). Among them, isolate H7 showed the highest lignin degrading activity or manganese peroxidase activity with the specific activity of 0.07 U/mg using 2,6-dimethoxyphenol as a substrate and gained the pulp yield of 42.21 %. The isolated H7 was identified as *Pseudomonas* sp. H7. The optimum pH and temperature of crude enzyme H7 was 6.0-7.0 and 40°C. The crude enzyme was stable at pH and temperature range of 5.0-8.0 and 30-60°C. The best condition to produce pulp from ALS was pH 6.0-7.0 at 40°C for 48 h. The properties of the fiber treated with alkaline and enzyme were further investigated. The results showed that the fiber treated with enzyme showed a significantly higher in L^* value but lower a^* and b^* values than the fiber treated with alkaline. There was no significant difference in thicknesses (0.22-0.30 mm.), moisture contents (16.48-16.88%), diameters of the fiber (0.37-0.40 mm.) and lignin contents (21.47-23.66%) between the fiber treated with alkaline and enzyme. Furthermore, the fiber treated with alkaline revealed a significantly higher in the tensile strength and extensibility than the fiber treated with enzyme. This result indicated that the fiber treated with enzyme can break more easily than fiber treated with alkaline. There was no significant difference in basis weight (75.3 to 95.6 g/m²) and extensibility (1.23 to 1.45 percent) between paper obtained from the fiber treated with alkaline and enzyme. Furthermore, paper obtained from the fiber treated with alkaline had a thickness less than the fiber treated with enzyme but had higher the tensile strength. The fiber obtained treated arecanut leaf sheath with enzyme can be used to prepare the paper. This method is energy-saving, eco-friendly and obtained the brightness fiber and paper but not strength when compare to fiber treated with alkaline.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณทุนอุดหนุนการวิจัยงบกองทุนส่งเสริมงานวิจัย ประจำปี 2565 ที่ให้ทุนอุดหนุนในการทำวิจัยในครั้งนี้ ทำให้คณะผู้วิจัยมีโอกาสดำเนินงานทางด้านการเตรียมเยื่อกระดาษจากกากหมาก โดยใช้เทคโนโลยีเอนไซม์จากจุลินทรีย์ แทนกระบวนการแบบดั้งเดิมที่ใช้สารละลายต่าง ซึ่งการใช้เอนไซม์เป็นวิธีที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมและประหยัดพลังงาน

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ดูแลเครื่องมือและอุปกรณ์ห้องปฏิบัติการเคมีที่ให้คำปรึกษา ช่วยเหลือและคำแนะนำในการใช้เครื่องมือและอุปกรณ์มือต่างๆ ในการทำทดลองตลอดระยะเวลาที่ทำการวิจัย

ผู้วิจัย

พ.ศ. 2565

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	(1)
สารบัญ	(2)
สารบัญตาราง	(3)
สารบัญภาพ	(4)
บทนำ	1
ตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการ	16
ผลการทดลองและวิจารณ์ผล	25
สรุปผลการทดลอง	39
เอกสารอ้างอิง	40
ภาคผนวก	47

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แหล่งปลูกหมากที่สำคัญ 10 จังหวัดแรกในประเทศไทย	4
2	องค์ประกอบทางเคมีของกาบหมาก	5
3	การคัดแยกแบคทีเรียย่อยสลายลิกนินจากตัวอย่างดินและน้ำ	25
4	กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสของแบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือก	26
5	ค่าสีของเยื่อใยจากการเตรียมด้วยเอนไซม์	33
6	ความหนาของเยื่อใย	33
7	ความชื้นของเยื่อใย	34
8	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเยื่อใย	34
9	ปริมาณลิกนินในเยื่อใย	35
10	ความต้านทานแรงดึงและระยะยืดของเยื่อใย	36
11	น้ำหนักมาตรฐานของกระดาษจากเยื่อใยกาบหมาก	37
12	ความหนาของกระดาษที่เตรียมจากเยื่อใยกาบหมาก	37
13	ความต้านทานแรงดึงและระยะยืดของกระดาษ	38
ตารางผนวกที่		
1	ประสิทธิภาพการย่อยสลายลิกนินบนอาหาร LBM agar	48
2	ผลได้ของเยื่อใยที่ได้จากการย่อยกาบหมากของแบคทีเรียจำนวน 9 ไอโซเลท	49
3	พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส	49
4	ความคงตัวของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสที่พีเอชต่างๆ	50
5	อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส	50
6	ความคงตัวของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสที่อุณหภูมิต่างๆ	50
7	ผลของพีเอชต่อการผลิตเยื่อใยจากกาบหมากของเอนไซม์ H7	50
8	ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเยื่อใยจากกาบหมากของเอนไซม์ H7	51
9	การเตรียมสารละลาย BSA มาตรฐานด้วยวิธี Lowry	52

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ประสิทธิภาพการย่อยสลายลิกนินบนอาหาร LBM agar	26
2	ผลได้ของเยื่อใยที่ได้จากการย่อยกากหมากของแบคทีเรียจำนวน 9 ไอโซเลท เมื่อย่อยกากหมากเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และ 72 ชั่วโมง	27
3	ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์และความคงตัวของเอนไซม์ที่พีเอชต่างๆของเอนไซม์ H7	29
4	อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์และความคงตัวของเอนไซม์ที่พีเอชต่างๆของเอนไซม์ H7	30
5	ผลของพีเอชต่อการผลิตเยื่อใยจากกากหมากของเอนไซม์ H7	31
6	ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเยื่อใยจากกากหมากของเอนไซม์ H7	32
7	เยื่อใยที่ได้จากการเตรียมด้วยต่างและเอนไซม์	33
8	ภาพถ่ายได้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอที่กำลังขยาย 5 เท่า ของเยื่อใยจากการเตรียมด้วยต่างและเอนไซม์	35
9	กระดาษจากเยื่อใยจากการเตรียมด้วยต่างและเอนไซม์	37
 ภาพผนวกที่		
1	กราฟมาตรฐานของ BSA ด้วยวิธี Lowry	52

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

ในปัจจุบันทั่วโลกให้ความสำคัญกับการผลิตกระดาษและบรรจุภัณฑ์จากเส้นใยธรรมชาติมากยิ่งขึ้น ทั้งผลิตจากขานอ้อย (Juntralux และ Watanasriyaku, 2012) ใบไม้ (Churung และคณะ, 2011) และกาบหมาก (นาวิ, 2562) เพื่อใช้ทดแทนวัสดุ/บรรจุภัณฑ์ที่เป็นพลาสติกที่ย่อยสลายได้ยาก หรือไม่สามารถแตกสลายได้ทางชีวภาพ ดังนั้นการใช้บรรจุภัณฑ์จากกระดาษจึงเป็นแนวทางหนึ่งที่ช่วยลดการใช้พลาสติก กาบหมากเป็นวัสดุธรรมชาติที่กำลังได้รับความนิยมที่นำมาผลิตเป็นภาชนะบรรจุ (ณภัค และคณะ, 2561; นาวิ, 2562) แต่ยังมีผู้นำมาผลิตเป็นเยื่อใยหรือกระดาษไม่มากนัก และใช้วิธีทางเคมี (นาวิ, 2562) ซึ่งวิธีทางเคมีเป็นวิธีที่ใช้กรดและด่าง ภายใต้อุณหภูมิและความดันสูง จึงเป็นการสิ้นเปลืองพลังงานและสร้างมลพิษให้กับสิ่งแวดล้อม อีกทั้งหลังจากการใช้สารเคมี จำเป็นต้องมีการปรับพีเอชให้เป็นกลางด้วยการแช่/ล้างด้วยน้ำ ซึ่งเป็นขั้นตอนที่ใช้เวลานาน สิ้นเปลืองน้ำ เพื่อดำเนินการผลิตในโรงงานอุตสาหกรรมกระดาษ ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะใช้เทคโนโลยีเอนไซม์มาช่วยลดปัญหาดังกล่าว ซึ่งเป็นวิธีการผลิตเยื่อทางชีวภาพ โดยใช้เอนไซม์ย่อยสลายลิกนินที่ผลิตจากแบคทีเรีย เนื่องจากแบคทีเรียเจริญเติบโตไว ผลิตเอนไซม์ปริมาณมากในระยะเวลาอันสั้น เช่น เอนไซม์จากเชื้อ *Burkholderia* sp. H1 (Yang และคณะ, 2017), *Bacillus pumilus* C6 และ *Bacillus atrophaeus* B7 (Haung และคณะ, 2013) นอกจากนี้ยังช่วยประหยัดพลังงาน เนื่องจากใช้สภาวะที่ไม่รุนแรง ลดการใช้น้ำในการปรับพีเอช เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม และปรับปรุงคุณภาพของเยื่อใย (Singh และคณะ, 2010) มาใช้เพื่อแยกเยื่อใยจากกาบหมาก และนำไปผลิตเป็นกระดาษขึ้นรูป

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำการคัดแยกเชื้อสร้างเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินจากตัวอย่างดินจากการฝังเยื่อกระดาษในบริเวณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ และน้ำจากโรงงานผลิตเยื่อกระดาษในจังหวัดพระนครศรีอยุธยา จากนั้นศึกษาอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อที่คัดเลือก เพื่อนำไปศึกษาประสิทธิภาพของเอนไซม์ในการผลิตเยื่อใยจากกาบหมาก ศึกษาสมบัติของเยื่อใยและกระดาษที่ได้จากการเตรียมด้วยด่างและเอนไซม์

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 เพื่อคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินจากตัวอย่างดินและน้ำในจังหวัดพระนครศรีอยุธยา ในการเตรียมเยื่อใยจากกาบหมาก

1.2.2 เพื่อศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินที่ผลิตจากเชื้อที่คัดแยกได้ทางด้านอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ และความคงตัวของเอนไซม์ที่อุณหภูมิและพีเอชต่างๆ

1.2.3 เพื่อศึกษาสมบัติของเยื่อใยที่ได้จากการเตรียมด้วยต่างและเอนไซม์ ทางด้านสี ความหนา ความชื้น ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเยื่อใย ปริมาณลิกนิน ความต้านทานแรงดึง และระยะยืด

1.2.4 เพื่อศึกษาสมบัติของกระดาษจากเยื่อใยที่ได้จากการเตรียมด้วยต่างและเอนไซม์ ทางด้าน ทางด้านน้ำหนักมาตรฐาน ความหนา ความต้านทานแรงดึง และระยะยืด

1.3 ผลที่คาดว่าจะได้รับ/ประโยชน์สูงสุดที่จะได้จากโครงการหรือสมมติฐาน

1.3.1 สามารถคัดแยกเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินจากที่มีประสิทธิภาพในการย่อยกากหมาก

1.3.2 ทราบถึงคุณสมบัติของเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินจากแบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือก

1.3.3 ทราบถึงสมบัติของเยื่อใยที่ได้จากการเตรียมด้วยต่างและเอนไซม์ ทางด้านสี ความหนา ความชื้น ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเยื่อใย ปริมาณลิกนิน ความต้านทานแรงดึง และระยะยืด

1.3.4 ทราบถึงสมบัติของกระดาษจากเยื่อใยที่ได้จากการเตรียมด้วยต่างและเอนไซม์ ทางด้าน ทางด้านน้ำหนักมาตรฐาน ความหนา ความต้านทานแรงดึง และระยะยืด

ตรวจเอกสาร

2.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับหมาก

หมากเป็นพืชเขตร้อนที่พบได้ในหลายประเทศของเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ แหล่งปลูกหมากที่เป็นเชิงทางการค้าของโลก ได้แก่ อินเดีย ศรีลังกา พม่า มาเลเซีย ฟิลิปปินส์ ไต้หวัน อินโดนีเซีย และไทย หมากมีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมหลายชนิด และมีการส่งออกไปจำหน่ายยังต่างประเทศ คิดเป็นมูลค่านับร้อยล้าน ดังนั้นหมากจึงเป็นพืชเศรษฐกิจที่น่าสนใจอีกชนิดหนึ่ง หมากเป็นพืชที่ปลูกง่าย การดูแลรักษาไม่ยุ่งยาก โรคแมลงรบกวนน้อย รวมทั้งค่าใช้จ่ายในการลงทุนไม่สูงนัก ทำรายได้ให้เกษตรกรผู้ปลูกอย่างสม่ำเสมอ และต่อเนื่องเป็นเวลานาน โดยการปลูกหมากในไทยส่วนใหญ่เป็นการปลูกในลักษณะผสมผสานร่วมกับพืชเศรษฐกิจอื่นๆ เพื่อเสริมรายได้ ส่วนใหญ่ปลูกอยู่ในภาคใต้และภาคกลาง ในปี 2559 พื้นที่ปลูกหมากของไทยมีประมาณ 40,874 ไร่ จำนวนผู้ปลูก 25,413 ราย ผลผลิตรวม 40,514 ตัน ผลผลิตต่อไร่ 1,192 กิโลกรัม จังหวัดที่มีการปลูกหมากมากที่สุดคือ ชุมพร รองลงมา คือ ระนอง ฉะเชิงเทรา พัทลุง ชัยภูมิ พังงา ระยอง จันทบุรี ตาก และนครศรีธรรมราช ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 แหล่งปลูกหมากที่สำคัญ 10 จังหวัดแรกในประเทศไทย

จังหวัด	จำนวน ครัวเรือน เกษตรกร	เนื้อที่ปลูก (ไร่)	เนื้อที่ให้ผล (ไร่)	เนื้อที่เก็บ เกี่ยวผลผลิต (ไร่)	ผลผลิตที่เก็บเกี่ยว ได้ (กิโลกรัม)	ผลผลิตเนื้อที่ เก็บเกี่ยว (กิโลกรัม)	ราคาที่เกษตรกร ขายได้เฉลี่ย (บาทต่อ กิโลกรัม)
ชุมพร	3,478	7,676	7,400	6,074	10,730,771	1,450	22.16
ระนอง	4,758	7,466	6,872	6,872	9,921,124	1,444	15.97
ฉะเชิงเทรา	1,393	6,091	4,340	4,227	6,929,100	1,597	25.23
พัทลุง	3,337	2,891	2,840	2,705	1,287,639	453	7.09
ชัยภูมิ	1,222	2,610	1,395	-	-	-	-
พังงา	1,132	2,346	2,185	1,649	3,131,530	1,433	22.70
ระนอง	626	2,059	1,885	1,722	900,480	478	28.38
จันทบุรี	341	972	707	459	362,666	513	23.90
ตาก	185	962	527	503	1,163,720	2,208	77.79
นครศรีธรรมราช	1,264	888	799	153	98,448	123	42.77

ที่มา: กรมส่งเสริมการเกษตร (2560)

2.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของหมาก

หมากมีชื่อภาษาอังกฤษว่า Betel Nuts เรียกว่า Arecanut หรือ Arecanut Palm มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Areca catechu* Linn เป็นไม้ยืนต้น ตระกูลปาล์มเช่นเดียวกับมะพร้าว

2.2.1 ราก

หมากมีระบบรากฝอย ไม่มีรากแก้ว จำนวนรากจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับอายุ ความสมบูรณ์ของดิน และสิ่งแวดล้อม หากหมากถูกน้ำท่วมขังชั่วคราว จะสร้างรากอากาศขึ้นที่โคนต้น ทำให้หมากไม่ตาย แต่ไม่ควรปล่อยน้ำให้ท่วมขังเป็นเวลานาน เนื่องจากรากหมากไม่สามารถเจริญเติบโตอยู่ในน้ำได้นาน

2.2.2 ลำต้น

หมากเป็นไม้ยืนต้นที่มีลำต้นเดี่ยว ไม่มีแก่น และไม่แตกกอ การเจริญเติบโตในระยะแรก ลำต้นจะขยายออกทางด้านกว้างและด้านสูง จนลำต้นมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 6 นิ้ว จากนั้นจะมีการเจริญเติบโตด้านสูงหรือด้านยอดเท่านั้น รูปทรงต้นหมากเป็นทรงกระบอกและตั้งตรง โดยส่วนโคนต้นเหนือผิวดิน เรียกว่า สะโพก จะมีลักษณะใหญ่กว่าลำต้นตอนส่วนบนเล็กน้อย เนื้อไม้ของต้นหมากเป็นเสี้ยนยาว จับตัวกันแน่น เสี้ยนไม้จะแข็งแรงและเหนียว ไม่หักง่าย หมากที่มีอายุน้อย ลำต้นจะเป็นสีเขียว เมื่ออายุมากขึ้นเป็นต้นหมากแก่ ลำต้นจะเปลี่ยนเป็นสีเทา

2.2.3 ใบ

ใบเกิดจากเนื้อเยื่อเจริญตรงส่วนปลายยอด โดยแตกเป็นกระจุกที่ปลายลำต้น ประกอบด้วยก้านใบหรือกาบหมาก ก้านทางใบ และใบย่อย ซึ่งเรียงเป็นแถวทั้งสองข้างของก้านทางใบ กาบหมากมีลักษณะเป็นแผ่นใหญ่หุ้มติดอยู่กับลำต้น มีความกว้างและยาวประมาณ 12 และ 20 นิ้ว ตามลำดับ เมื่อแก่จัดจะหลุดลงมามีลักษณะเป็นแผ่นแข็งเหนียวและทนต่อแรงดึงได้ดี มีปริมาณเซลลูโลสสูงจึงเหมาะที่จะนำไปทดลองผลิตเป็นเยื่อใย เพื่อนำไปพัฒนาเป็นกระดาษและบรรจุภัณฑ์ (นาวิ, 2562) องค์ประกอบทางเคมีของกาบหมาก แสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 องค์ประกอบทางเคมีของกาบหมาก

องค์ประกอบ	ปริมาณ (เปอร์เซ็นต์)
สารสกัดที่ละลายน้ำ	0.72
ไขมัน	5.06
เพคติก	1.15
ลิกนิน	19.59
แอลฟา-เซลลูโลส	66.08
เฮมิเซลลูโลส	7.40
ทั้งหมด	100

ที่มา: Poddar และคณะ (2016)

2.2.4 ดอก

ดอกหมากหรือจันทน์หมากจะเกิดที่ซอกโคนก้านใบหรือกาบหมาก ดอกออกรวมเป็นช่อใหญ่ ประกอบด้วยแกนกลางหรือโคนจันทน์ติดติดอยู่ข้อของลำต้น และก้านช่อดอกเป็นเส้นยาวๆ จำนวนมาก แตกออกจากแกนกลาง ก้านช่อดอกแต่ละเส้นจะมีดอกหมากติดอยู่ทั้งดอกตัวผู้และดอกตัวเมีย โดยดอกตัวผู้จะอยู่ที่ส่วนปลาย และดอกตัวเมียจะอยู่ที่โคน เมื่อกาบหุ้มจันทน์แตกออก ดอกตัวผู้จะบานจากปลายกิ่งแขนงไปหาโคนแขนงหรืออาจบานก่อนกาบหุ้มจันทน์แตกออกก็ได้

2.2.5 ผล

ผลหมากมีลักษณะกลมหรือกลมรี ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 ถึง 2.5 นิ้ว ผลอยู่รวมกันเป็นทะลาย ใน 1 ทะลายมีผลประมาณ 100 ถึง 150 ผล ผลอ่อนจะมีสีเขียว เรียกว่าหมากดิบหรือหมากสด เมื่อผลแก่จะเปลี่ยนเป็นสีเขียวมเหลืองหรือสีเหลืองอมส้มทั้งผล เรียกว่าหมากสุกหรือหมากสง สีของผลหมากที่แก่จัดชาวบ้านเรียกว่า สีหมากสุก

2.3 การปลูกและการดูแลรักษา

หมากจะเจริญเติบโตดี ตกผลเร็ว และให้ผลผลิตสูง ขึ้นอยู่กับการปลูกและการดูแลรักษาหมากให้ผลผลิตถึง 20 ถึง 30 ปี การปลูกและการดูแลรักษามีแนวปฏิบัติ ดังนี้

2.3.1 การเลือกพื้นที่ปลูก

หมากเป็นพืชที่ชอบขึ้นทั่วไปในเขตอบอุ่นถึงร้อนชื้น เจริญเติบโตได้ดี พื้นที่ที่หมากควรเป็นที่โล่งแจ้ง ได้รับแสงแดดทั่วถึง ดินควรเป็นดินร่วนเหนียว ดินตะกอน หรือดินเหนียวที่มีอินทรีย์วัตถุสูง มีการระบายน้ำดี และมีหน้าดินลึก 1 เมตร เพื่อให้รากกระจายได้ง่าย สถานที่ปลูกควรอยู่ใกล้แหล่งน้ำ จะทำให้มีการเจริญเติบโตดีและให้ผลผลิตสูง

2.3.2 ฤดูปลูก

ฤดูที่เหมาะสมต่อการปลูกอยู่ในช่วงฤดูฝน ระหว่างเดือนพฤษภาคมถึงเดือนสิงหาคม เพื่อให้ต้นหมากได้รับน้ำอย่างเพียงพอ รวมทั้งเป็นการประหยัดแรงงานในการรดน้ำ

2.3.3 การวางผังปลูก มีอยู่ 2 วิธี คือ

2.3.3.1 วางผังปลูกแบบสี่เหลี่ยมจัตุรัส เหมาะสำหรับร่องปลูกที่มีขนาดใหญ่ สันร่องกว้างประมาณ 5 เมตร

2.3.3.2 วางผังปลูกแบบสามเหลี่ยมด้านเท่าหรือสลับฟันปลา เหมาะสำหรับร่องที่มีขนาดเล็ก สันร่องกว้างประมาณ 3 ถึง 4 เมตร

2.3.4 ระยะปลูก

การปลูกหมากมี 2 แบบ คือ ปลูกแบบยกร่อง และปลูกบนพื้นราบ

2.3.4.1 การปลูกแบบยกร่อง

เหมาะสำหรับพื้นที่ราบลุ่ม บริเวณใกล้แม่น้ำลำคลอง ส่วนมากนิยมปลูกริมร่อง เพราะหมากเป็นพืชชอบน้ำและรากจะช่วยป้องกันไม่ให้ดินข้างๆ ร่องพัง สำหรับระยะปลูกแบบยกร่อง ใช้ระยะปลูกไม่แน่นอน ซึ่งขึ้นกับขนาดของร่องและชนิดพืช

2.3.4.2 การปลูกพื้นราบ

การปลูกบนพื้นราบเหมาะสำหรับพื้นที่ที่มีการระบายน้ำดี ไม่มีปัญหาน้ำท่วมขัง ใช้ระยะปลูก 2x2 เมตร ซึ่งการวางผังปลูกแบบสี่เหลี่ยมจัตุรัสได้ไร่ละประมาณ 400 ต้น แต่ถ้าวางผังปลูกแบบสามเหลี่ยมด้านเท่าจะปลูกได้ไร่ละประมาณ 461 ต้น

2.3.5 การเตรียมหลุมปลูก

โดยทั่วไปจะขุดหลุมขนาดประมาณ 50x50x50 เซนติเมตร เพราะรากจะสามารถไขว่ซอนในดินได้สะดวก ร่องกันหลุมด้วยกาบมะพร้าว 1 ถึง 2 ชั้น เพื่อช่วยเก็บความชื้นในช่วงฤดูแล้ง ในการกลบดินควรใช้ปุ๋ยคอก ปุ๋ยหมัก หรือปุ๋ยฟอสเฟตคลุกเคล้าให้เข้ากับดิน แล้วใส่ลงหลุม

2.3.6 วิธีปลูก

เมื่อเตรียมหลุมดีแล้วก็ย้ายต้นกล้าหมากมาปลูกในหลุม โดยใช้พลั่วแทงลงไปดินรอบๆ ต้น ให้ห่างจากโคนต้นหมากประมาณ 10 เซนติเมตร ลึกประมาณ 15 ถึง 20 เซนติเมตร ขุดต้นกล้าขึ้นจากแปลงแล้วนำไปปลูกทันที หลังจากนั้นกลบดินให้เสมopakหลุม เหยียบดินให้แน่นพอสมควร รดน้ำให้ชุ่ม

2.3.7 การให้น้ำ

การปลูกหมากส่วนใหญ่อาศัยน้ำฝนเป็นหลัก หมากเป็นพืชที่ต้องการน้ำมาก ถ้าขาดน้ำจะทำให้หมากเจริญเติบโตช้า ต้นเล็กเรียว ให้ผลผลิตต่ำ ถ้าฝนทิ้งช่วงนานเกินไป ควรให้น้ำแก่ต้นหมาก โดยแบ่งเป็น 2 ช่วง ดังนี้

2.3.7.1 การให้น้ำแก่หมากต้นเล็ก

หลังจากปลูกแล้วรดน้ำให้ชุ่มต่อไป ควรรดน้ำ 2 วันต่อครั้ง ประมาณ 1 เดือน ต้นหมากจะเกิดรากใหม่และตั้งตัวได้

2.3.7.2 การให้น้ำแก่หมากต้นโต

1) สวนที่ปลูกแบบยกร่อง ในฤดูฝนไม่จำเป็นต้องรดน้ำ ในฤดูแล้งชาวสวนจะใช้กระบวยตักน้ำในร่องขึ้นมารดที่โคนต้นหมาก

2) สวนหมากแบบยกร่องที่อยู่ใกล้ทะเล มักมีปัญหาในช่วงฤดูแล้ง จะมีน้ำทะเลหนุน ทำให้น้ำในแม่น้ำลำคลองเป็นน้ำเค็มหรือน้ำกร่อย ดังนั้นในเดือนมกราคม ชาวสวนจะต้องกักน้ำจืดไว้ในท้องร่อง เพื่อใช้รดต้นหมากในฤดูแล้งจนกว่าจะถึงฤดูฝน

3) สวนหมากที่ปลูกบนพื้นราบ ถ้าเป็นฤดูฝนก็ไม่จำเป็นต้องรดน้ำ แต่ถ้าเกิดระยะฝนทิ้งช่วงนานๆ หรือในฤดูแล้งก็ต้องให้น้ำตามความเหมาะสม

2.3.8 การให้ปุ๋ย

การให้ปุ๋ยจะทำให้ผลผลิตเพิ่มขึ้น ควรให้ปุ๋ยหลังจากเก็บเกี่ยวผลหมากหมดแล้ว ควรให้ปุ๋ยตรงกลางระหว่างต้นหมาก เพื่อให้รากสามารถดูดน้ำและแร่ธาตุอาหารได้จะอยู่ที่ปลายรากห่างจากโคนต้นหมาก ปุ๋ยที่ใช้มีดังนี้

2.3.8.1 ปุ๋ยอินทรีย์ ส่วนมากจะให้ปุ๋ยหมักและปุ๋ยคอก ใส่ปีละ 1 ถึง 4 ครั้ง อัตรา 500 ถึง 1,000 กิโลกรัม ต่อไร่ต่อปี

2.3.8.2 ปุ๋ยเคมี ในหมากต้นเล็ก ใส่ปุ๋ย 46-0-0 อัตรา 25-50 กิโลกรัมต่อไร่ต่อปี ถ้าเป็นหมากที่ให้ผลแล้ว ใส่ปุ๋ยสูตร 15-15-15, 13-13-21 หรือ 12-12-17-2 ใส่ปีละ 1 ถึง 4 ครั้ง อัตรา 500 ถึง 1,000 กิโลกรัม ต่อไร่ต่อปี เมื่อใส่ปุ๋ยแล้วควรพรวนดินตื้นๆ กลบปุ๋ยและรดน้ำ

2.4 โรคที่เกิดกับต้นหมาก

2.4.1 โรคผลเน่า

เกิดจากน้ำฝนซึ่งอยู่ในบริเวณชั้วผล ซึ่งมีลักษณะเป็นร่อง จากนั้นเชื้อราที่มีอยู่ในอากาศจะเข้าทำลาย ทำให้ชั้วผลเน่าแล้วลุกลามมายังผลหมาก ผลจะเน่าและร่วงก่อนถึงระยะเก็บเกี่ยว

2.4.2 โรคโคนเน่าและรากเน่า โรคนี้เกิดจากผลหมากที่เน่า เมื่อร่วงลงดินเชื้อราจะแพร่กระจายได้ง่าย ถ้าสภาพดินฟ้าอากาศเหมาะสม เช่น พื้นดินชื้นแฉะมีน้ำขัง เชื้อรานี้จะเข้าทำลายที่โคนต้นแล้วลุกลามไปที่รากอย่างรวดเร็ว ทำให้ต้นหมากแสดงอาการใบเหลืองและเหี่ยวเฉาเมื่อ

ตรวจดูที่โคนต้นจะพบรอยเน่า และเมื่อขุดดูรากก็เห็นรากเน่าเช่นเดียวกัน ถ้าลองดึงรากดูรากจะถุดออกมาเป็นปलอกแล้วต้นหมากก็จะตายในที่สุด

2.4.3 โรคยอดเน่า

เกิดจากเชื้อรา *Pythium* sp. โรคนี้พบทั้งในระยะต้นกล้าและต้นโตที่ตกผลแล้วในสภาพที่มีฝนตกชุกและอากาศมีความชื้นสูง อาการของโรคในระยะแรกจะพบแผลเน่าดำบริเวณโคนดอก จากนั้นจะขยายลุกลามต่อไปจนทำให้ใบยอดเน่า หลังจากนั้นต้นหมากจะค่อยๆ ตายในที่สุด

2.4.4 โรคใบจุด

เกิดจากเชื้อรา *Curvularia* sp. โรคนี้ทำความเสียหายให้แก่หมากในระยะที่เป็นต้นกล้ามากกว่าต้นที่ปลูกในแปลง เกิดเป็นจุดแผลสีเหลืองอ่อนขนาดเล็กแล้วเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแดงหรือสีเทา แผลจะขยายใหญ่ขึ้นจนแผลชนกัน ทำให้ใบแห้ง หมากชะงักการเจริญเติบโตและอาจถึงตายได้ในที่สุด

2.5 เยื่อกระดาษ

เยื่อ (pulp) และกระดาษ (paper) ถูกผลิตจากวัตถุดิบที่ประกอบด้วยเส้นใยเซลลูโลส (cellulose fibers) เช่น ไม้ กระดาษรีไซเคิล และวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เส้นใยเซลลูโลสในประเทศกำลังพัฒนามีปริมาณมากถึง 60 เปอร์เซ็นต์ มาจากพืชล้มลุก (non wood) เช่น ชานอ้อย (bagasse) ฟาง (cereal straw) ไม้ (bamboo) กก (reeds) หญ้า (grass) ปอกระเจา (jute) ป่าน (flax) และ ป่านศรนารายณ์ (sisal) เป็นต้น (Bajpai, 2012)

กระดาษเป็นคำแปลมาจากภาษาอังกฤษว่า paper มีรากศัพท์มาจากคำว่า papyrus หรือ ต้นปาปิรัส ที่ชาวอียิปต์นำมาบันทึกเรื่องราวต่างๆ ให้ชาวโลกได้รับทราบประวัติและวัฒนธรรมของอียิปต์อย่างแพร่หลาย ส่วนในประเทศไทยสันนิษฐานว่า กระดาษถูกนำเข้ามาครั้งแรกโดยชาวโปรตุเกสในสมัยก่อนอยุธยา เพราะคำว่ากระดาษเป็นคำที่แปลมาจากภาษาโปรตุเกสว่า cartas ซึ่งแปลว่า กระดาษ คำว่ากระดาษจึงติดปากและใช้กันมาตั้งแต่สมัยนั้น กระดาษเป็นแผ่นวัสดุบางที่ผลิตมาจากเส้นใยผสมกับสารเติมแต่งต่างๆ ตั้งแต่หนึ่งชนิดขึ้นไป เส้นใยที่ใช้ในการผลิตกระดาษอาจเป็นเส้นใยจากสัตว์ เส้นใยจากพืช เส้นใยจากแร่ หรือเส้นใยสังเคราะห์ แต่เส้นใยจากพืชจัดเป็นวัตถุดิบสำคัญที่สุดในการทำกระดาษ ซึ่งพืชที่เหมาะสมจะนำมาทำกระดาษควรมีปริมาณเส้นใยมาก และมีลักษณะเส้นใยยาว (ปาณิ, 2549) โดยสามารถจำแนกตามแหล่งที่มาออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ดังนี้คือ (i) พืชยืนต้น (wood) แหล่งเส้นใยแบ่งตามขนาดความยาวของเส้นใยได้เป็น 2 ประเภท คือ ไม้เนื้ออ่อน (soft wood) เป็นพืชยืนต้นจำพวกสน (coniferous) โดยทั่วไปมีใบเป็นรูปเข็ม เช่น ต้นสนสปรูซ (spruce) ไพน์ (pine) และเฟอร์ (fir) ในประเทศไทยมีเพียง 2 ชนิด คือ สนสองใบ และสนสามใบ และไม้เนื้อแข็ง (hard wood) เป็นพืชยืนต้นพวกไม้ผลัดใบ (deciduous) ซึ่งโดยทั่วไปมีใบกว้าง เช่น

ยูคาลิปตัส (eucalyptus) เบิร์ช (birch) และไม้ใบกว้างต่างๆ ในประเทศไทย ยกเว้นไม้บางชนิดในเขตอบอุ่น เช่น สนทะเล (ii) พืชล้มลุก (non wood) แหล่งเส้นใยจากพืชล้มลุก เช่น ส่วนที่เหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว (rice straw) ชานอ้อย (bagasse) เป็นต้น พืชที่ปลูกขึ้นหรือเกิดขึ้นเอง เช่น หญ้า (grass) ผักตบชวา (water hyacinth) เป็นต้น เส้นใยจากพืชผลที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกันได้แก่ เส้นใยจากเปลือกในและลำต้น เช่น ปอสา (paper mulberry) กระเจี๊ยบ (okra) เตื่อ (fig) หม่อน (mulberry) และเส้นใยจากใบหรือกาบใบของลำต้นเทียม เช่น สับปะรด (pineapples) กล้วย (banana) (ปาณี, 2549)

การผลิตกระดาษหัตถกรรมจากวัตถุดิบในท้องถิ่นกำลังได้รับความสนใจจากชุมชนต่างๆ เนื่องจากเป็นการนำวัตถุดิบที่หาง่ายในท้องถิ่นมาเพิ่มมูลค่าของผลิตภัณฑ์ เช่น เปลือกปอสา ใบสับปะรด ชานอ้อย ผักตบชวา ฟางข้าว เป็นต้น โดยใช้วิธีการที่ไม่ซับซ้อน และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม เพื่อสร้างงานสร้างรายได้ให้กับคนในชุมชน และสามารถพัฒนาสินค้าเพื่อต่อยอดในระดับอุตสาหกรรมได้ (ปาณี, 2549)

2.6 กระบวนการผลิตเยื่อใย

ขั้นตอนการผลิตเยื่อใย เป็นขั้นตอนแรกในการผลิตกระดาษในโรงงานอุตสาหกรรม ในการผลิตเยื่อใยมักใช้สารเคมี เพื่อแยกเส้นใยจากไม้ และใช้วิธีการเพื่อแยกไฟเบอร์ให้เป็นเยื่อใย ปัจจุบันโรงงานกระดาษและโรงงานเยื่อใยใช้เอนไซม์ในการตัดแปลง สังเคราะห์ และย่อยสลายวัตถุดิบเหล่านี้มากยิ่งขึ้น ในปัจจุบันมีการใช้วิธีผลิตเยื่อใยทางชีวภาพ (Bio-pulping) ทดแทนการใช้ด่างและสารเคมีเพื่อแยกเฮมิเซลลูโลสและลิกนิน โดยทั่วไปการผลิตเยื่อใยทำได้ 3 วิธี ได้แก่

2.6.1 วิธีทางกล

วิธีทางกลเป็นวิธีที่ใช้ในการเตรียมเยื่อใยจากไม้ ซึ่งเป็นการ grind บริเวณพื้นผิวของวัตถุดิบ ทำให้เส้นใยแยกออกจากกัน โดยลิกนินไม่ได้ถูกแยกออก โดยได้ผลได้ (yield) ประมาณ 95 เปอร์เซ็นต์ แต่กระดาษจะกลายเป็นสีเหลืองเมื่อทิ้งไว้เป็นเวลานาน รวมทั้งใช้พลังงานไฟฟ้าค่อนข้างสูง แต่อย่างน้อยกว่าวิธีทางเคมี

2.6.2 วิธีทางเคมี

วิธีทางเคมีเป็นวิธีการแยกเส้นใยจากวัตถุดิบด้วยการใช้สารเคมีที่อุณหภูมิและความดันสูง ซึ่งมีอยู่ 2 กระบวนการ คือ กรด (ซัลไฟต์) และด่าง (kraft) โดยประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ ใช้สารซัลไฟต์ ขณะที่ประมาณ 75 เปอร์เซ็นต์ จะใช้ด่าง คือ โซดาไฟและซัลเฟอร์ ภายใต้ความร้อนและความดันสูง ได้เป็นกระดาษคราฟท์ วิธีนี้ได้ผลได้น้อยกว่าวิธีกล (50-60 เปอร์เซ็นต์) แต่ได้คุณภาพของเยื่อใยที่ดีกว่า แต่อย่างไรก็ตาม ทำให้เกิดน้ำเสียปริมาณมาก และส่งผลเสียต่อสิ่งแวดล้อม

2.6.3 วิธีทางกลร่วมกับวิธีทางเคมี

เป็นวิธีที่ใช้ความร้อนสูง ใช้ในการเตรียมเยื่อกระดาษจากไม้สับ (wood chip) เพื่อลดขนาดของเส้นใย จากนั้นพ่นสารเคมีลงบนไม้สับร่วมกับการใช้อุณหภูมิสูงและวิธีทางกลต่อไป ระหว่างกระบวนการนี้จะเกิดการฟอกสีของเยื่อใย ทำให้ได้เยื่อใยที่ขาวขึ้น

จากทั้งสามวิธีดังกล่าวข้างต้น เป็นวิธีที่รุนแรง ใช้พลังงานสูง รวมทั้งก่อสารพิษให้กับสิ่งแวดล้อม ปัจจุบันจึงมีการผลิตเยื่อทางชีวภาพด้วยการใช้เอนไซม์ ซึ่งประหยัดพลังงานและได้ผลิตภัณฑ์ที่แข็งแรง

2.6.4 การผลิตเยื่อกระดาษทางชีวภาพ

มีการประยุกต์ใช้เอนไซม์ย่อยสลายลิกนินจากจุลินทรีย์ในอุตสาหกรรมเยื่อใยและกระดาษกันอย่างแพร่หลายในปัจจุบันในการเตรียมเยื่อ (pulping) เพื่อนำไปทำเป็นกระดาษ โดยการสลายพันธะในวัสดุหลายชนิด เช่น วัสดุที่เป็นไม้และไม้ไผ่ หญ้า และวัสดุทางการเกษตรอื่นๆ

2.6.4.1 การใช้เอนไซม์ย่อยสลายลิกนินในการผลิตเยื่อใย

ข้อเสียของการเตรียมเยื่อใยด้วยวิธีกล คือ เส้นใยที่ได้มีความละเอียดและแข็งแรงรวมทั้งใช้พลังงานสูง เป็นการเพิ่มต้นทุนการผลิตในโรงงานอุตสาหกรรม ดังนั้นการใช้เอนไซม์ย่อยสลายลิกนินจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่ประหยัดพลังงานได้มากกว่า 20 ถึง 40 เปอร์เซ็นต์ และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม การประยุกต์ใช้เอนไซม์ย่อยสลายลิกนินในการเตรียมเยื่อใย พบว่าช่วยปรับปรุงผลได้ของเยื่อใย ลดความหนืดของเยื่อใย Mardones และคณะ (2006) ได้ใช้เอนไซม์ย่อยสลายลิกนินที่ผลิตจากเชื้อ *C. subvermispora* ในการเตรียมเยื่อใยจากไม้ยูคาลิปตัส *Eucalyptus nitens* พบว่าได้เยื่อใยที่มีความหนืดเพิ่มขึ้นจาก 1.5 เป็น 55.26 เปอร์เซ็นต์ มี kappa number เท่ากับ 16 และ Costa และคณะ (2005) ใช้เอนไซม์ย่อยสลายลิกนินจากเชื้อ *C. subvermispora* เตรียมเยื่อใยจากขานอ้อย พบว่าได้เยื่อใยลดน้อยลงแต่มีความหนืดดีขึ้น หลังจากการย่อยเป็นเวลา 120 นาที นอกจากนี้การใช้วิธีการทางชีวภาพด้วยเอนไซม์ช่วยปรับปรุงดัชนีความต้านแรงดึง ความต้านทานแรงดันทะลุ และ double fold และดัชนีความต้านแรงฉีกขาด Gautam และคณะ (2016) ได้ใช้เอนไซม์จาก *Schizophyllum commune* ARC-11 ในการเตรียมเยื่อใยจาก *Eulaliopsis binate* ก่อนการใช้โซดา พบว่าได้ค่าดัชนีความต้านแรงดึง ความต้านทานแรงดันทะลุ และ double fold เท่ากับ 24.94 เปอร์เซ็นต์ 14.03 เปอร์เซ็นต์ และ 48.45 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการเตรียมเยื่อใยด้วยโซดา

1) เอนไซม์ย่อยสลายลิกนิน

เอนไซม์ย่อยสลายลิกนินหรือเอนไซม์ลิกนินโนไลติก (ligninolytic enzyme) มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายวัสดุที่เป็นลิกโนเซลลูโลส ประกอบด้วยเอนไซม์แลคเคส (laccase)

ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (lignin peroxidase) แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (manganese peroxidase) และ versatile peroxidase กิจกรรมของเอนไซม์สามารถเพิ่มสูงขึ้นด้วยการทำงานร่วมกับเอนไซม์บางชนิด เช่น feruloyl esterase, aryl-alcohol oxidase, quinone reductase, lipase และ 2,3-dioxygenase เป็นต้น การย่อยสลายลิกนินจากวัสดุต่างๆ มีบทบาทสำคัญในการเพิ่มคุณค่าให้กับผลิตภัณฑ์กระดาษด้วยการปรับปรุงคุณภาพและสมบัติของเยื่อใย ซึ่งเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินเป็นการนำลิกนินออกจากลิกโนเซลลูโลส และได้เป็นส่วนหนึ่งของเซลลูโลสหรือเยื่อใย (Kumar และ Chandra, 2020)

2.7 จุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์ย่อยสลายลิกนิน

มีรายงานการคัดแยกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนิน มีทั้งที่เป็นเชื้อรา *Phanerochaete chrysosporium* และ *Trametes* ซึ่งผลิตเอนไซม์ออกซิเดเทฟ ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงกับลิกนิน (Zhang และคณะ, 2012; Knezevic และคณะ, 2013 และ Zeng และคณะ, 2013) และเชื้อรา *Porodaedalea pini* สร้างเอนไซม์ไฮโดรไลสและเอนโดกลูคาเนสที่มีกิจกรรมย่อยสลายลิกนิน (Tanabe และคณะ, 2016) และแบคทีเรีย เช่น *Bacillus pumilus* C6 และ *Bacillus atrophaeus* B7 ที่แยกได้จากป่าฝนในประเทศเปรู (Huang และคณะ, 2013) *Rhodococcus jostii* RHA1 ที่สร้างเอนไซม์ dye-decolorizing peroxidase (DypB) (Singh และคณะ, 2013) และ *Burkholderia* sp. H1 ที่มีความสามารถในการย่อยสลายลิกนินและไม้ที่เน่า (Yang และคณะ, 2017)

2.8 การเตรียมเยื่อใย กระดาษและบรรจุภัณฑ์จากวัสดุทางการเกษตร

มีรายงานการผลิตเยื่อใย กระดาษ และบรรจุภัณฑ์ จากวัสดุทางการเกษตรหลายชนิด เช่น กาบกล้วย ผักตบชวา ใบสับปะรด เป็นต้น ด้วยกรรมวิธีโซดา และเอนไซม์

2.8.1 กรรมวิธีโซดา

ชยาภาส (2549) ผลิตกระดาษทำมือจากกาบกล้วย ด้วยการแช่กาบกล้วยแห้งในสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 17 ชั่วโมง โดยใช้อัตราส่วนระหว่างสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์กับกาบกล้วยแห้ง เท่ากับ 25 ต่อ 1 และนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่ากระดาษมีดัชนีความต้านแรงดึง ดัชนีความต้านทานแรงทะลุ และดัชนีความต้านทานแรงฉีกขาด เท่ากับ 64.86 kN·m/kg 2.76 kPa·m²/g และ 15.22 mN·m²/g ตามลำดับ

กาญจนา และคณะ (2016) เติรียมกระดาศคราฟท์จากผักตบชวา ใบสับปะรด และกาบกล้วย โดยการใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 90 ถึง 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ฟอกเยื่อด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 90 ถึง 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และนำไปขึ้นรูปและทดสอบความแข็งแรงของกระดาศพบว่าอัตราส่วนที่เหมาะสมที่ใช้ในการขึ้นรูปกระดาศ คือ เยื่อก้านผักตบชวา เยื่อใบสับปะรด เยื่อกาบกล้วย 70, 10 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ได้กระดาศที่ทนแรงดันทะลุ 31.10 กิโลนิวตันต่อตารางเมตร และความคงทนต่อแรงฉีกขาด 309.17 มิลลินิวตัน

พินิจกานต์และวรรณิษา (2555) ผลิตเยื่อกระดาศจากฟางข้าวด้วยวิธีทางชีวภาพด้วยการเพาะเลี้ยง *Trichoderma viride* ร่วมกับกรรมวิธีโซดาที่ระดับความเข้มข้น 5, 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ พบว่าการใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นสูงขึ้น ส่งผลให้ค่า Kappa number และผลผลิตเยื่อที่ได้ลดลง แต่ค่า Kappa number และผลผลิตเยื่อที่ได้จากการใช้กรรมวิธีโซดามีค่าสูงกว่าการใช้วิธีทางชีวภาพร่วมกับกรรมวิธีโซดา เมื่อทำการทดสอบคุณสมบัติการต้านทานแรงฉีกขาดและค่าความสว่าง พบว่าการใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นสูงขึ้น จะลดค่าความต้านทานแรงฉีกขาด แต่เพิ่มความสว่าง ขณะที่การใช้วิธีทางชีวภาพร่วมกับกรรมวิธีโซดา จะได้กระดาศที่มีแรงต้านทานแรงฉีกขาด แต่ความสว่างน้อยกว่าการใช้กรรมวิธีโซดาที่ทุกระดับความเข้มข้น

มลสุดา (2556) ผลิตภาชนะย่อยสลายได้ทางชีวภาพจากกาบกล้วย โดยใช้กาบกล้วยเป็นวัตถุดิบหลักในการผลิตเส้นใย และใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นตัวประสาน และนำไปขึ้นรูปด้วยวิธีการอัดขึ้นรูปร้อน พบว่าปริมาณของเส้นใยที่สูงขึ้น ลดค่าการต้านแรงดัดโค้ง สมบัติการต้านแรงดึง ขณะที่สมบัติการต้านแรงกระแทก ค่าความหนาแน่น และค่าการซึมผ่านน้ำมีค่าเพิ่มขึ้น โดยการใช้อัตราส่วนระหว่างเส้นใยกล้วยต่อแป้งมันสำปะหลัง เท่ากับ 66.67 ต่อ 33.33 โดยน้ำหนัก ทำให้ได้ชิ้นงานที่มีสมบัติทางกลและสมบัติทางกายภาพที่ดีที่สุด

โสริยา (2557) ศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตกระดาศอย่างง่ายจากเปลือกกล้วยสด และจากผลผลิตเหลือทิ้งหลักการหมักเอทานอล พบว่าการผลิตเยื่อกระดาศจากการใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 3 โมลต่อลิตร ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที ให้ปริมาณเซลลูโลสสูงสุด 60 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก ขณะที่เยื่อที่ผลิตจากผลผลิตเหลือทิ้งทางการเกษตรที่ผ่านการย่อยด้วยน้ำส้มสายชู และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที ให้เซลลูโลส 7 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก และเยื่อที่ได้จากการย่อยด้วยน้ำส้มสายชูด้วยไมโครเวฟ 465 วัตต์ เป็นเวลา 20 นาที ได้เซลลูโลส 11 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก

2.8.2 เอนไซม์จากจุลินทรีย์

เซลลูโลส เกิดจากการจับกันของลิกโนเซลลูโลสร่วมกับเฮมิเซลลูโลสและลิกนิน ทำให้เกิดเป็นโครงสร้างแบบคริสตัลที่จับกันอย่างแข็งแรง ยากต่อการย่อยสลาย ดังนั้นการพรีทรีตเมนต์ประเภทเซลลูโลสจึงเป็นที่จำเป็น เพื่อให้โครงสร้างที่จับกันอย่างแน่นหนาอ่อนตัวลง ง่ายต่อการย่อย ซึ่งอาจใช้วิธีทางกล เคมี หรือชีวภาพ การใช้เอนไซม์ย่อยสลายลิกนินเป็นวิธีทางชีวภาพที่ใช้ในการแยกเส้นใย รวมทั้งปรับปรุงพันธะระหว่างเส้นใยในระหว่างขั้นตอนการบดเยื่อ (refining) ช่วยเพิ่มความเหนียวของผลิตภัณฑ์กระดาษ เพิ่มความทนต่อแรงดึง ความเป็นรูปทรง

Blanchette และคณะ (1988) ใช้เอนไซม์ย่อยสลายลิกนินจากเชื้อราผุขาว ได้แก่ *Coriolus versicolor*, *Dichomitus squalens*, *Phellinus pini*, *Phlebia tremellosus*, *Poria medullapanis*, *Scytinostroma galactinum* พบว่า *S. galactinum* ย่อยสลายลิกนินได้ดีที่สุด (89 เปอร์เซ็นต์) ทำให้เกิดการสูญเสียน้ำหนัก เท่ากับ 37 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ *C. versicolor* ทำให้เกิดการสูญเสียกลูโคสและไซโลสมากที่สุด

14

Ujji และคณะ (2544) แยกเชื้อราย่อยสลายลิกนิน *Phanerochaete sordida* สายพันธุ์ YK624 จากไม้เน่าเปื่อยในประเทศญี่ปุ่น ที่สามารถแยกปอสาได้ภายในเวลา 70 ชั่วโมง ได้ผลผลิตเยื่อใย เท่ากับ 3.6 ถึง 5.9 เปอร์เซ็นต์ ลดค่า kappa number 9.7 ถึง 14.4 เปอร์เซ็นต์ เพิ่มความสว่าง 9.6 ถึง 13.6 เปอร์เซ็นต์ ดัชนีต้านทานแรงดึง 8.4 เปอร์เซ็นต์ และความต้านทานแรงฉีกขาด 9.2 ถึง 12.3 เปอร์เซ็นต์ ช่วยปรับปรุงคุณภาพของเยื่อใย

ชวนิภู และคณะ (2544) แยกเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ N10 จากเปลือกปอสา สร้างเอนไซม์เพคติเนสได้สูงสุด พบว่าได้เยื่อปอสาที่มีความนิ่มและเปื่อยยุ่ย เมื่อตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน เห็นเส้นใยแยกออกจากกัน มีปริมาณไฮโดรเซลลูโลสเพิ่มขึ้น 5 เปอร์เซ็นต์ แอลฟาเซลลูโลสเพิ่มขึ้น 2 เปอร์เซ็นต์ และเฮมิเซลลูโลสเพิ่มขึ้น 3 เปอร์เซ็นต์ และลิกนินลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับเปลือกปอสดิบ

Liew และคณะ (2011) ได้ใช้เอนไซม์ย่อยสลายลิกนินจากราฟุสีขาว *Phellinus* sp., *Daedalea* sp., *Trametes versicolor* และ *Pycnoporus coccineus* ในการเตรียมเยื่อกระดาษจากกระถินเทพา พบว่าสามารถย่อยสลายลิกนินได้ 20 ถึง 30 เปอร์เซ็นต์ หลังจากการย่อยเป็นเวลา 60 วัน ซึ่ง *T. versicolor* ย่อยสลายลิกนินจากใบกระถินเทพาได้มากที่สุดถึง 26.9 เปอร์เซ็นต์

Kumar และคณะ (2019) ได้ใช้เอนไซม์ย่อยสลายลิกนินที่ผลิตจากเชื้อรา *Ceriporiopsis subvermispota*, *Trametes versicolor* และ *Rochaete chrysosporium* ในการเตรียมเส้นใย พบว่าได้เส้นใยที่ขาว มีสมบัติความต้านทานแรงดึงและความต้านทานต่อการฉีกขาดที่ดี และมีค่า kappa number ที่ลดลง

อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 วัตถุดิบ

- 3.1.1 กาบหมาก จากอำเภอเขาย้อย จังหวัดเพชรบุรี
- 3.1.2 ตัวอย่างน้ำและดิน จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิและโรงงานผลิตกระดาษลูกฟูก

3.2 แบคทีเรีย

- 3.2.1 *Pseudomomas* sp. H7

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

3.3.1 สำหรับการคัดแยกแบคทีเรียย่อยสลายลิกนินบนอาหารแข็ง

- 3.3.1.1 เพปโทน (Oxoid, อังกฤษ)
- 3.3.1.2 ไดโพลแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Univer, ออสเตรเลีย)
- 3.3.1.3 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Univer, ออสเตรเลีย)
- 3.3.1.4 แมกนีเซียมซัลเฟต (Univer, ออสเตรเลีย)
- 3.3.1.5 โซเดียมคลอไรด์ (Qrec, นิวซีแลนด์)
- 3.3.1.6 แคลเซียมคลอไรด์ (Univer, นิวซีแลนด์)
- 3.3.1.7 แอมโมเนียมซัลเฟต (Qrec, นิวซีแลนด์)
- 3.3.1.8 แอมโมเนียมไนเตรท (Qrec, นิวซีแลนด์)
- 3.3.1.9 เพอร์ริกคลอไรด์ (Qrec, นิวซีแลนด์)
- 3.3.1.10 2,6-ไดเมทอกซีฟินอล (DMP) (Sigma, สหรัฐอเมริกา)
- 3.3.1.11 ฐัน (Himedia, อินเดีย)

3.3.2 สำหรับการคัดแยกแบคทีเรียสร้างเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสในอาหารเหลว

- 3.3.2.1 เพปโทน (Oxoid, อังกฤษ)
- 3.3.2.2 บีฟอกซ์แทรกซ์ (Titan biotech, อินเดีย)
- 3.3.2.3 สารสกัดจากยีสต์ (Pronadisa, สเปน)
- 3.3.2.4 โซเดียมคลอไรด์ (Qrec, นิวซีแลนด์)
- 3.3.2.5 คอปเปอร์ซัลเฟต (Qrec, นิวซีแลนด์)
- 3.3.2.6 แมงกานีสซัลเฟต (Qrec, นิวซีแลนด์)

3.3.3 สำหรับวัดกิจกรรมเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส

- 3.3.3.1 ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Unilab, ออสเตรเลีย)
- 3.3.3.2 โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต โมโนไฮเดรต (Sigma-Aldrich, อินเดีย)

3.3.3.3 2,6-ไดเมทอกซีฟีนอล (DMP) (Sigma, สหรัฐอเมริกา)

3.3.3.4 แมงกานีสซัลเฟต (Qrec, นิวซีแลนด์)

3.3.3.5 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Qrec, นิวซีแลนด์)

3.3.4 สำหรับวัดปริมาณโปรตีน

3.3.4.1 โซเดียมคาร์บอเนต (Carlo erba, ฝรั่งเศส)

3.3.4.2 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Merck, Germany)

3.3.4.3 คอปเปอร์ซัลเฟต (Qrec, นิวซีแลนด์)

3.3.4.4 โพแทสเซียมโซเดียมทาร์เทรต (Kemaus, ออสเตรเลีย)

3.3.4.5 สารละลายโพลิน-ซีโอแคลทู (Carlo erba, ฝรั่งเศส)

3.3.5 สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณลิพิด

3.3.5.1 กรดซัลฟิวริก (Qrec, นิวซีแลนด์)

3.3.5.2 เอทานอล (Emsure, เยอรมัน)

3.4 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.4.1 ปีกเกอร์ (Pyrex, สหรัฐอเมริกา)

3.4.2 หลอดทดลอง (Pyrex, สหรัฐอเมริกา)

3.4.3 ฟลาสก์ (Pyrex, เยอรมนี)

3.4.4 ปีเปต (HBG, เยอรมนี)

3.4.5 จานเพาะเชื้อ (Pyrex, สหรัฐอเมริกา)

3.4.6 ตู้บ่มเชื้อ (Memmert, เยอรมนี)

3.4.7 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Thermo scientific, สหรัฐอเมริกา)

3.4.8 เครื่องให้ความร้อน (Unilab, สหรัฐอเมริกา)

3.4.9 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (N-Biotek, เกาหลี)

3.4.10 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (ALP, ไทย)

3.4.11 เครื่องชั่งน้ำหนัก (Mettler Toledo, สวิตเซอร์แลนด์)

3.4.12 ตู้อบลมร้อน (Binder, สหรัฐอเมริกา)

3.4.13 เครื่องวัดสี (UltraScan VIS, HunterLab, ไทย)

3.4.14 เครื่องวิเคราะห์เนื้อสัมผัส (TA-XT plus Texture Analyzer, อังกฤษ)

วิธีการ

4.1. การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ย่อยสลายลิกนิน

ทำการแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ย่อยสลายลิกนิน จากตัวอย่างดินจากการฝังเยื่อกระดาษบริเวณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ และตัวอย่างดินและน้ำจากโรงงานผลิตกระดาษลูกฟูกในจังหวัดพระนครศรีอยุธยา โดยการชั่งตัวอย่างดินหนัก 25 กรัม และตัวอย่างน้ำปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในถุงตีปั่นที่มีสารละลายเพปโทนเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 225 มิลลิลิตร และปริมาตร 90 มิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นทำการเจือจางที่ระดับการเจือจางต่างๆ ดูดสารละลายที่ทำการเจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Lignin modifying basal medium (LBM) agar ประกอบด้วย (กรัมต่อลิตร) ไคโทแซสเซียมฟอสเฟต 1.6; โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.5; แมกนีเซียมซัลเฟต 0.58; โซเดียมคลอไรด์ 0.25; แคลเซียมคลอไรด์ 0.013; แอมโมเนียมซัลเฟต 1.25; แอมโมเนียมไนเตรต 1.0 และเฟอร์ริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต 0.0025 กรัม; วุ้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ และ 2,6-ไดเมทอกซีฟีนอล (DMP) เข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ ตามวิธีของ Sakpetch และคณะ (2017) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ถึง 48 ชั่วโมง คัดเลือกเฉพาะโคโลนีที่สร้างโซนสีเหลืองรอบโคโลนี เพื่อนำไปศึกษาประสิทธิภาพการสร้างเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินต่อไป

4.2 ศึกษาประสิทธิภาพการสร้างเอนไซม์ย่อยสลายลิกนิน

ศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินบนอาหาร LBM agar อาหาร DMP broth และประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์จากกากหมาก

18

4.2.1 ศึกษาประสิทธิภาพการสร้างเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินบนอาหาร LBM agar

ทำการจุดเชื้อที่ผ่านการคัดแยกจากข้อ 4.1 ลงบนอาหาร LBM agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนสีเหลืองรอบโคโลนีและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อ คำนวณประสิทธิภาพการย่อยสลาย (hydrolytic capacity; HC) ตามสมการ

$$\text{ประสิทธิภาพการย่อยสลาย} = \frac{\text{ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนสีเหลืองรอบโคโลนี}}{\text{ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อ}}$$

คัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพการย่อยสลายลิกนินมากกว่า 4.00 ไปศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินในอาหาร DMP broth และประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์จากกากหมากต่อไป

4.2.2 ศึกษาประสิทธิภาพการสร้างเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินด้วยการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส

4.2.2.1 การเตรียมเอนไซม์

เพาะเชื้อที่ผ่านการคัดเลือกจากข้อ 4.2.1 ลงในอาหาร DMP broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วยเพปโทน 0.5 เปอร์เซ็นต์; บีฟอกซ์แทรกซ์ 0.3 เปอร์เซ็นต์; สารสกัดยีสต์ 0.5 เปอร์เซ็นต์; โซเดียมคลอไรด์ 1 เปอร์เซ็นต์; คอปเปอร์ซัลเฟต 0.2 มิลลิโมลาร์ และแมงกานีสซัลเฟต 0.027 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ถึง 24 ชั่วโมง เพื่อเตรียมเป็นกล้าเชื้อ จากนั้นดูดกล้ำเชื้อปริมาตร 12.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหาร DMP broth ปริมาตร 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ถึง 24 ชั่วโมง เก็บเอนไซม์ (crude enzyme) ด้วยการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวส์ที่ความเร็วรอบ 8,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แยกเก็บส่วนใส นำไปวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส

4.2.2.2 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส

การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสด้วยการใช้ DMP เป็นสับสเตรท ตามวิธีดัดแปลงของ Lueangjaroenkit และคณะ (2018) โดยผสมฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7.0 เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 250 ไมโครลิตร; สารละลาย DMP เข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร; สารละลายแมงกานีสซัลเฟตเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 250 ไมโครลิตร; เอนไซม์หยาบปริมาตร 500 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นปริมาตร 750 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส เติมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 469 นาโนเมตร ทุก 15 วินาที เป็นเวลา 3 นาที คำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ จากความชันของกราฟที่สร้างระหว่างระยะเวลา (วินาที) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 469 นาโนเมตร

4.2.2.3 การวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry

วัดปริมาณโปรตีนในสารละลายตามวิธีของ Lowry และคำนวณความเข้มข้นของโปรตีนโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ Bovine serum albumin

4.2.3 การศึกษาประสิทธิภาพการผลิตเยื่อจากกากหมาก

4.2.3.1 การเตรียมเยื่อด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

ตัดกากหมากให้มีขนาด 3×10 มิลลิเมตร นำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักกากหมากคงที่ เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้อัตราส่วนระหว่างกากหมากต่อสารละลายต่าง เท่ากับ 1 ต่อ 50 นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 85 ถึง 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ล้างต่างออกด้วยน้ำกลั่น แยกเก็บเฉพาะส่วนของเยื่อ นำไป

อบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ชั่งน้ำหนักตัวอย่างที่ผ่านการอบและบันทึกผล เพื่อหาเปอร์เซ็นต์ผลได้ (yield) ตามสมการ

$$\text{ผลได้ (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{น้ำหนักเยื่อใย (กรัม)}}{\text{น้ำหนักกากหมากเริ่มต้น (กรัม)}} \times 100$$

4.2.3.2 การเตรียมเยื่อใยด้วยเอนไซม์จากแบคทีเรีย

1) การเตรียมเอนไซม์

ทำการเตรียมเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสด้วยการเพาะเชื้อที่ผ่านการคัดเลือกจากข้อ 4.2.1 ลงในอาหาร DMP broth ตามข้อ 4.2.2.1

2) การเตรียมเยื่อใยด้วยเอนไซม์

ตัดกากหมากให้มีขนาด 3×10 มิลลิเมตร นำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักกากหมากคงที่ แยกกากหมากที่ผ่านการอบในน้ำกลั่น โดยใช้อัตราส่วนระหว่างกากหมากต่อน้ำกลั่น เท่ากับ 1 ต่อ 50 (น้ำหนักต่อปริมาตร) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แยกน้ำกลั่นออก เตรียมเอนไซม์ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7.0 เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ โดยอัตราส่วนของกากหมากต่อเอนไซม์ เท่ากับ 1 ต่อ 50 (น้ำหนักต่อปริมาตร) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ล้างกากหมากที่ผ่านการย่อยด้วยน้ำประปา ชั่งน้ำหนักตัวอย่างที่ผ่านการอบและบันทึกผล เพื่อหาผลได้ของเยื่อใย เติมเอนไซม์ใหม่ บ่มต่ออีก 24 ชั่วโมง ล้างเอนไซม์ออกจากการหมักด้วยน้ำประปาอีกครั้ง คำนวณผลได้ในครั้งที่ 2 ของการย่อย เติมเอนไซม์ใหม่อีกครั้ง บ่มต่ออีก 24 ชั่วโมง คำนวณผลได้ในครั้งที่ 3 ของการย่อย

4.3 การจัดจำแนกเชื้อ

ทำการจัดจำแนกเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์สูงสุดด้วยวิธีทางชีวเคมีและลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณของยีน 16S rDNA

4.4 การศึกษาสมบัติของเอนไซม์

คัดเลือกแบคทีเรียที่มีกิจกรรมของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและผลิตเยื่อใยจากกากหมากได้สูงสุด นำไปศึกษาสมบัติของเอนไซม์ด้วยการใช้ DMP เป็นสับสเตรท และประสิทธิภาพการย่อยกากหมากที่สภาวะต่างๆ

4.4.1 ศึกษาสถานะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ด้วยการใช้ DMP เป็นสับสเตรท

4.4.1.1 พีเอช

เจือจางเอนไซม์ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม แล้วนำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ โดยใช้ DMP เป็นสับสเตรท ในสารละลายบัฟเฟอร์เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอชต่างๆ ได้แก่ อะซิเตทบัฟเฟอร์พีเอช 4.0, 5.0 และ 6.0; สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7.0 และ 8.0 และ ไกลซีน-โซเดียมไฮดรอกไซด์บัฟเฟอร์พีเอช 9.0, 10.0 และ 11.0 และวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 4.2.2.2

4.4.1.2 อุณหภูมิ

เจือจางเอนไซม์ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม และนำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ โดยใช้ DMP เป็นสับสเตรท ในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 ถึง 70 องศาเซลเซียส และวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 4.2.2.2

4.4.2 ความคงตัวของเอนไซม์ที่พีเอชและอุณหภูมิต่างๆ

4.4.2.1 พีเอช

เจือจางเอนไซม์ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วยสารละลายบัฟเฟอร์พีเอชต่างๆ ซึ่งสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ ได้แก่ อะซิเตทบัฟเฟอร์พีเอช 4.0, 5.0 และ 6.0; สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7.0 และ 8.0 และ ไกลซีน-โซเดียมไฮดรอกไซด์บัฟเฟอร์พีเอช 9.0, 10.0 และ 11.0 บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำเอนไซม์แช่ในน้ำแข็ง จากนั้นนำไปวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 4.2.2.2

4.4.2.2 อุณหภูมิ

บ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 30 ถึง 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำเอนไซม์แช่ในน้ำแข็ง จากนั้นเจือจางเอนไซม์ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม แล้วนำไปวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 4.2.2.2

4.4.3 ศึกษาพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเยื่อใยจากกาบหมาก

4.4.3.1 พีเอช

ปรับเอนไซม์ให้มีพีเอชเท่ากับ 4.0 ถึง 11.0 ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ให้มีความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอชต่างๆ ได้แก่ อะซิเตทบัฟเฟอร์พีเอช 4.0, 5.0 และ 6.0; สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7.0 และ 8.0 และ ไกลซีน-โซเดียมไฮดรอกไซด์บัฟเฟอร์พีเอช 9.0, 10.0 และ 11.0 จากนั้นนำเอนไซม์ไปย่อยกาบหมากที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มควบคุม

อุณหภูมิแบบเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ตามวิธีข้อ 4.2.3.2(2) ทำการย่อยเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เปลี่ยนเอนไซม์ และย่อยต่ออีกครั้งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง วิเคราะห์ผลได้ของเยื่อใย

4.4.3.2 อุณหภูมิ

ปรับเอนไซม์ให้มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการย่อยกากหมาก จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 ถึง 70 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ตามวิธีข้อ 4.2.3.2(2) ทำการย่อยเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เปลี่ยนเอนไซม์ และย่อยต่ออีกครั้งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง วิเคราะห์ผลได้ของเยื่อใย

4.5 ศักยภาพของเยื่อใยจากกากหมาก

4.5.1 ค่าสี

นำเส้นใยกากหมากทั้งจากการย่อยด้วยต่างและเอนไซม์มาทำการวัดค่าสีโดยเครื่องวัดสี (UltraScan VIS, HunterLab, ประเทศไทย) ซึ่งค่าสีที่ทำการวัดเป็นดังนี้ คือ L^* คือความสว่าง มีค่าตั้งแต่ 0-100 ซึ่งแสดงสีดำไปจนถึงสีขาว a^* คือ สีเขียว-สีแดง มีค่าตั้งแต่ -a ถึง +a ซึ่งแสดงค่าสีเขียวไปจนถึงสีแดง และ b^* คือ สีน้ำเงิน-สีเหลือง มีค่าตั้งแต่ -b ถึง +b ซึ่งแสดงค่าสีน้ำเงินไปจนถึงสีเหลือง การทดลองทำตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

4.5.2 ความหนา (thickness)

วิเคราะห์ความหนาของเยื่อใยด้วยวิธีมาตรฐาน ASTM D 645/D 645M นำตัวอย่างของเยื่อใยจากหมากที่มีขนาดความยาวประมาณ 4 เซนติเมตร นำไปวัดความหนาด้วยเครื่อง Mitutoyo 547 Thickness Gauge (ประเทศไทย) การทดลองทำตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

4.5.3 ความชื้น (moisture content)

วิเคราะห์ปริมาณความชื้นด้วยวิธีมาตรฐาน ASTM D 644-99 ในขั้นแรกนำกระป๋องอะลูมิเนียมไปอบเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลานำกระป๋องอะลูมิเนียมไปใส่โถดูดความชื้นเป็นเวลาประมาณ 30 นาที จนกระป๋องอะลูมิเนียมเย็นจนถึงอุณหภูมิห้อง และชั่งน้ำหนักกระป๋องอะลูมิเนียม (W_0) จากนั้นชั่งน้ำหนักตัวอย่างเยื่อใยจากหมาก 1 กรัม ใส่ในกระป๋องอะลูมิเนียมที่ผ่านการอบแล้ว นำไปเข้าอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำกระป๋องอะลูมิเนียมใส่โถดูดความชื้นเป็นเวลาประมาณ 30 นาที และชั่งน้ำหนักกระป๋องอะลูมิเนียมที่มีตัวอย่างเส้นใย (W_1) เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณความชื้น โดยใช้สูตรดังต่อไปนี้

$$\text{ปริมาณความชื้น (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{(w_1 - w_0) \times 100}{\text{น้ำหนักเยื่อใยจากหมาก}}$$

4.5.4 ลักษณะทางกายภาพของเส้นใย

นำเยื่อใยกาบหมากส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (Olympus Stereo zoom microscope SZX7, ญี่ปุ่น)

4.5.5 วิเคราะห์ปริมาณลิกนิน

นำเยื่อใยกาบหมากหนัก 10 กรัม ล้างด้วยเอทานอลเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร โดยล้างเยื่อใยกาบหมากจำนวน 5 รอบ รอบละ 5 นาที เพื่อล้างส่วนของยางหรือ wax ในเยื่อใยกาบหมากออก นำเยื่อใยไปผึ่งให้แห้ง จากนั้นชั่งเยื่อใยกาบหมากใส่บีกเกอร์ ขนาด 250 มิลลิลิตร ประมาณ 2 กรัม เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 72 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 40 มิลลิลิตร เขย่าด้วยมือเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายองค์ประกอบอื่นๆ ในเยื่อใยกาบหมาก เช่น เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส เป็นต้น ภายหลังจากย่อยด้วยกรดซัลฟิวริกจนครบเวลาแล้ว จึงเติมน้ำร้อนเพิ่มจนครบ 500 มิลลิลิตร แล้วพักทิ้งไว้ให้ตกตะกอน จากนั้นล้างตะกอนด้วยน้ำร้อนจำนวน 4 ครั้ง ครั้งละประมาณ 500 มิลลิลิตร จนกรดซัลฟิวริกมีความเข้มข้นลดลงเหลือ 3 เปอร์เซ็นต์ นำตะกอนไปกรองโดยใช้กระดาษกรอง no. 1 อบตะกอนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นชั่งน้ำหนัก เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณลิกนิน โดยใช้สูตรดังต่อไปนี้

$$\text{ปริมาณลิกนิน (เปอร์เซ็นต์)} = (\text{น้ำหนักหลังอบ} - \text{น้ำหนักเส้นใยกาบหมาก}) \times 100$$

4.5.6 ความต้านทานแรงดึงและระยะยืด

นำเยื่อใยกาบหมากที่มีขนาดความยาวประมาณ 4 เซนติเมตร มาวิเคราะห์โดยใช้เครื่องวิเคราะห์เนื้อสัมผัส (TA-XT plus Texture Analyzer, อังกฤษ) โดยใช้สภาวะในการวิเคราะห์ดังนี้คือ โหลดเซลล์เท่ากับ 5 กิโลนิวตัน อัตราเร็วในการดึงเท่ากับ 0.5 มิลลิเมตรต่อวินาที ซึ่งกำหนด pre-test speed เท่ากับ 0.2 มิลลิเมตรต่อวินาที และ post-test speed เท่ากับ 10.0 มิลลิเมตรต่อวินาที ระยะห่างในการจับตัวอย่างเท่ากับ 20 มิลลิเมตร

4.6 ศักยภาพของกระดาษจากเยื่อใยกาบหมาก

4.6.1 การเตรียมชิ้นรูปกระดาษจากเยื่อใยที่เตรียมด้วยด่างและเอนไซม์ H7

นำเยื่อใยที่เตรียมด้วยด่างและเอนไซม์ H7 ประมาณ 20 กรัม กระจายลงในตะแกรงแม่พิมพ์ขนาดกว้างเท่ากับ 21 เซนติเมตร และยาวเท่ากับ 30 เซนติเมตร ซึ่งตะแกรงแม่พิมพ์จะถูกใส่ในภาชนะที่มีน้ำประมาณ 500 มิลลิลิตร จากนั้นเกลี่ยเยื่อใยให้ทั่วตะแกรงแม่พิมพ์ แล้วยกตะแกรงแม่พิมพ์ขึ้น นำไปทำให้แห้ง หลังจากนั้นลอกกระดาษที่เตรียมได้ออกจากตะแกรงแม่พิมพ์

4.6.2 การทดสอบน้ำหนักมาตรฐาน (Basic weight)

ทดสอบน้ำหนักมาตรฐานของกระดาษตามวิธีมาตรฐาน ISO 536 โดยตัดตัวอย่างกระดาษที่เตรียมได้จากข้อที่ 4.6.1 ให้มีขนาดกว้างเท่ากับ 2 เซนติเมตร และยาว 2 เซนติเมตร จากนั้นนำไปชั่งน้ำหนักอย่างโดยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง แสดงค่าน้ำหนักมาตรฐานเป็นน้ำหนักต่อพื้นที่ คือ กรัมต่อตารางมิลลิเมตรเมตร การทดลองทำ 3 ซ้ำ

4.6.3 การทดสอบความหนา

นำกระดาษที่เตรียมได้จากข้อที่ 4.6.1 มาวัดความหนาตามวิธีมาตรฐาน ASTM D 645/D 645M ด้วยเครื่องวัดความหนา (Mitutoyo 547, Japan) การทดลองทำ 3 ซ้ำ

4.6.4 สมบัติเชิงกลในโหมดแรงดึง

การศึกษาสมบัติเชิงกลในโหมดแรงดึง ดำเนินการตามวิธีมาตรฐาน ASTM D 828 ตัดกระดาษให้เป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้าขนาดกว้างเท่ากับ 15 มิลลิเมตร และยาวเท่ากับ 100 มิลลิเมตร แล้วนำไปทดสอบสมบัติเชิงกลในโหมดแรงดึงโดยเครื่อง Texture analyzer สภาวะในการวิเคราะห์ดังนี้คือ โหลดเซลล์เท่ากับ 5 กิโลนิวตัน อัตราเร็วในการดึงเท่ากับ 125 มิลลิเมตรต่อนาที และระยะห่างในการจับตัวอย่างเท่ากับ 50 มิลลิเมตร การทดลองทำ 3 ซ้ำ

ผลและวิจารณ์ผล

5.1 การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ย่อยสลายลิกนิน

จากการคัดแยกแบคทีเรียย่อยสลายลิกนินจากตัวอย่างดินที่ฝังเยื่อกระดาษในบริเวณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ และตัวอย่างดินและน้ำจากโรงงานผลิตกระดาษลูกฟูกบนอาหาร LMB agar พบแบคทีเรียจำนวน 31 ไอโซเลท ที่สร้างโซนสีเหลืองรอบโคโลนี (ตารางที่ 3) โดยตัวอย่างน้ำจากโรงงานผลิตกระดาษลูกฟูกเป็นแหล่งสำคัญที่สามารถคัดแยกแบคทีเรียย่อยสลายลิกนินได้ดีที่สุด คิดเป็น 69.70 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากเป็นบริเวณที่มีการสะสมของเยื่อและเศษกระดาษ ดังนั้นจึงพบแบคทีเรียที่สามารถใช้เยื่อกระดาษเป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อการเจริญเติบโต และมีแบคทีเรียเพียง 1 ไอโซเลทที่คัดแยกได้จากการฝังเยื่อกระดาษในดินบริเวณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ เป็นเวลา 1 เดือน เนื่องจากเยื่อกระดาษที่นำไปฝังมีความแข็ง ยากต่อการย่อยสลาย ดังนั้นแบคทีเรียที่ย่อยสลายลิกนินได้ด้วยการใช้เยื่อกระดาษเป็นแหล่งอาหารจึงมีปริมาณเพียงเล็กน้อย และจะพบมากขึ้น เมื่อระยะเวลาการย่อยสลายนานขึ้นที่เวลา 3 เดือน

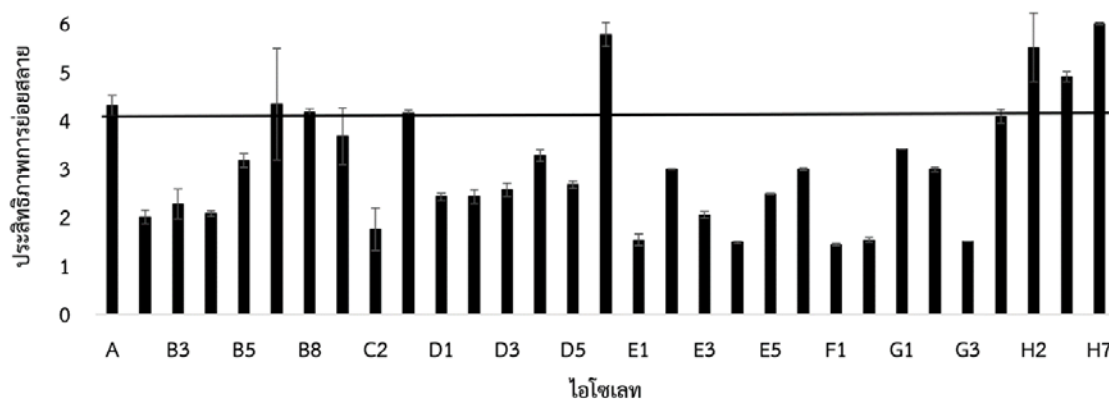
ตารางที่ 3 การคัดแยกแบคทีเรียย่อยสลายลิกนินจากตัวอย่างดินและน้ำ

แหล่ง	ตัวอย่าง	จำนวน (ไอโซเลท)	รหัสไอโซเลท
เยื่อกระดาษฝังดินในมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ			
1 เดือน	3	1	A
3 เดือน	3	9	B2, B3, B4, B5, B6, B8, B9, C2 และ C10
น้ำจากโรงงานผลิตกระดาษลูกฟูก	4	23	D1-D6, F1, F5, G1-G3, H1, H2, H6 และ H7
ดินจากโรงงานผลิตกระดาษลูกฟูก	3	6	E1-E6
ทั้งหมด	16	31	

5.2 ศึกษาประสิทธิภาพการสร้างเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินบนอาหาร LBM agar

จากการจุดเชื้อแบคทีเรียทั้ง 31 ไอโซเลท ลงบนอาหาร LMB agar และคำนวณประสิทธิภาพการย่อยสลาย DMP พบว่ามีแบคทีเรียจำนวน 9 ไอโซเลท ที่มีค่าประสิทธิภาพการย่อยสลาย หรือค่า HC สูงกว่า 4.0 อยู่ในช่วง 4.03 ถึง 5.99 (ภาพที่ 1) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินที่ฝังเยื่อกระดาษและตัวอย่างน้ำจากโรงงานผลิตกระดาษลูกฟูก โดยมีแบคทีเรียไอโซเลท H7 แสดงค่า HC

สูงสุด เท่ากับ 5.99 จากรายงานวิจัยของ Sadhu และ Maiti (2013) พบว่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใสอาจไม่ได้แสดงถึงกิจกรรมของเอนไซม์ที่แท้จริงได้อย่างแม่นยำ ดังนั้นจึงศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียทั้ง 9 ไอโซเลท จากการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส และประสิทธิภาพการผลิตเยื่อใยจากกาบหมากต่อไป



ภาพที่ 1 ประสิทธิภาพการยับยั้งสลายลิกนินบนอาหาร LBM agar

5.3 ศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส

จากการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสของเชื้อทั้ง 9 ไอโซเลท ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร DMP broth พบว่าแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสมีกิจกรรมของเอนไซม์อยู่ระหว่าง 0.01 ถึง 0.07 ยูนิตต่อมิลลิกรัม โดยแบคทีเรียไอโซเลท H7 แสดงกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 0.07 ยูนิตต่อมิลลิกรัม (ตารางที่ 4) ซึ่งน้อยกว่าจากรายงานการวิจัยของ Shin และคณะ (2005) และ Oliveira และคณะ (2009) ที่เชื้อรา *Irpex lacteus* เชื้อ *B. pumilus* CBMAI 0008 และ *Paenibacillus* sp. CBMAI 868 มีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส เท่ากับ 0.38, 5.37 และ 6.60 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ

ตารางที่ 4 กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสของแบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือก

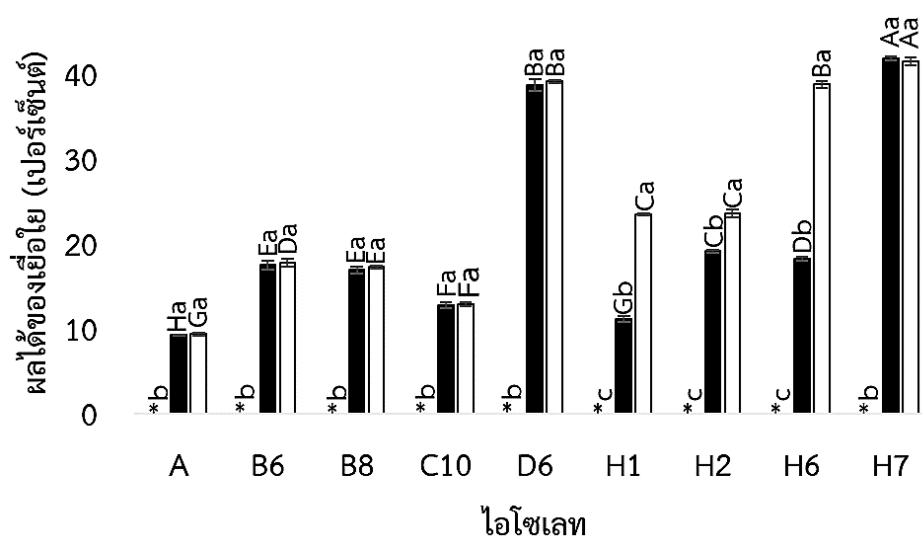
ไอโซเลท	กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (ยูนิตต่อมิลลิกรัม)
A	0.01±0.00
B6	0.02±0.00
B8	0.02±0.00
C10	0.04±0.00
D6	0.05±0.01
H1	0.01±0.00
H2	0.01±0.00

ตารางที่ 4 กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสของแบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือก (ต่อ)

ไอโซเลท	กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (ยูนิตต่อมิลลิกรัม)
H6	0.02±0.00
H7	0.07±0.00

5.4 การศึกษาประสิทธิภาพการผลิตเยื่อใยจากกาบหมาก

จากการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยกาบหมากของเอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พีเอช 7.0 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยทำการเปลี่ยนเอนไซม์จำนวน 2 ครั้ง ทุก 24 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรียทั้ง 9 ไอโซเลท ไม่สามารถผลิตเยื่อใยจากกาบหมากได้ หลังบ่มที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งผลได้ของเยื่อใยจะเพิ่มสูงขึ้น เมื่อระยะเวลาการบ่มนานขึ้น (ภาพที่ 2) โดยแบคทีเรียไอโซเลท H7 ให้ผลได้ของเยื่อใยจากกาบหมากสูงสุด เท่ากับ 41.55 ± 0.49 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่าผลได้ของเยื่อใยที่ได้จากแบคทีเรียไอโซเลท D6 (39.16 ± 0.16 เปอร์เซ็นต์) และ H6 (38.80 ± 0.36 เปอร์เซ็นต์) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ รวมทั้งยังสูงกว่าตัวอย่างควบคุมที่ใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ซึ่งได้ผลได้ของเยื่อใยเท่ากับ 34.01 ± 0.47 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของผลได้ของเยื่อใยของแบคทีเรียไอโซเลท H7 ระหว่างการย่อยกาบหมากเป็นเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง ดังนั้นจากผลการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและการผลิตเยื่อใยจากกาบหมาก พบว่าแบคทีเรียไอโซเลท H7 มีประสิทธิภาพในการผลิตเยื่อใยจากกาบหมากที่สุด จึงคัดเลือกไอโซเลท H7 เพื่อนำไปศึกษาสมบัติของเอนไซม์ ทางด้านอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส และการผลิตเยื่อใยจากกาบหมากต่อไป



ภาพที่ 2 ผลได้ของเยื่อใยที่ได้จากการย่อยกาบหมากของแบคทีเรียจำนวน 9 ไอโซเลท เมื่อย่อยกาบหมากเป็นเวลา 48 ชั่วโมง (■) และ 72 ชั่วโมง (□)

หมายเหตุ

* หมายถึง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของผลได้ของเยื่อใย เมื่อเปรียบเทียบระหว่างผลได้ของเยื่อใยทั้ง 9 ไอโซเลท

ตัวอักษรตัวพิมพ์เล็ก หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของผลได้เยื่อใย เมื่อย่อยกากหมากที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบเชื้อตัวเดียวกัน

ตัวอักษรตัวพิมพ์ใหญ่ หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของผลได้เยื่อใย เมื่อเปรียบเทียบผลได้ของเยื่อใยทั้ง 9 ไอโซเลท

5.5 การจัดจำแนกแบคทีเรียไอโซเลท H7

จากการจัดจำแนกแบคทีเรียไอโซเลท H7 พบว่าเป็นเชื้อ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ H7 และได้หมายเลขจากการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ลงในฐานข้อมูล เท่ากับ OK509793 มีรายงานแบคทีเรียในจีนัส *Pseudomonas* ที่สามารถย่อยสลายลิกนิน เช่น *Pseudomonas putida* KT2440 (Salvachúa และคณะ, 2015), *P. putida* A514 (Lin และคณะ, 2016) และ *P. putida* NX-1 (Xu และคณะ, 2018)

5.6 การศึกษาสมบัติของเอนไซม์แอมกานีสเปอร์ออกซิเดส

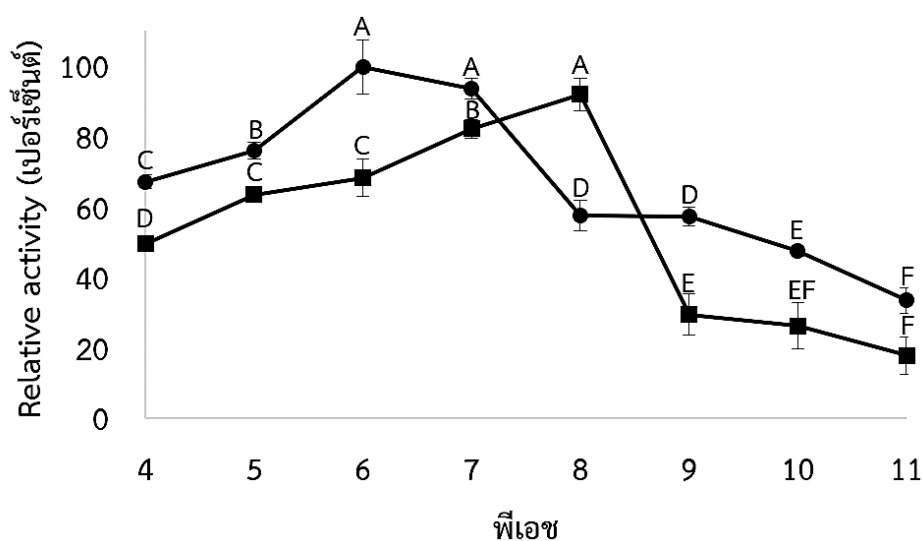
แบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ H7 ถูกคัดเลือก เพื่อศึกษาสมบัติของเอนไซม์และการผลิตเยื่อใยจากกากหมาก

5.6.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์แอมกานีสเปอร์ออกซิเดส

5.6.1.1 พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์และความคงตัวของเอนไซม์

จากการศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ H7 ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่า relative activity ระหว่างพีเอช 6.0 และ 7.0 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 99.76 และ 93.06 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และกิจกรรมของเอนไซม์จะมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทั้งในสภาวะกรด (4.0 ถึง 5.0) และด่าง (8.0-11.0) โดยมีค่า relative activity อยู่ระหว่าง 67.14 ถึง 76.07 เปอร์เซ็นต์ และ 33.41 ถึง 57.58 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังนั้นเอนไซม์ H7 มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อยู่ที่ 6.0 ถึง 7.0 ซึ่งสูงกว่าเอนไซม์จาก *Bjerkandera adusta* (พีเอช 5.0) (Wang และคณะ, 2002) จาก *Trichophyton rubrum* LSK-27 (พีเอช 4.5) (Bermek และคณะ, 2004) และจาก *P. ostreatus* ARC280 (พีเอช 4.5) (Othman และคณะ, 2014) และต่ำกว่าเอนไซม์จาก *Aspergillus terreus* LD-1 (พีเอช 12.5) (Kanayama และคณะ, 2002) นอกจากนี้เอนไซม์มีความคงตัวอยู่ในช่วงกว้างระหว่าง 5.0 ถึง 8.0 โดยมีค่า relative activity อยู่ระหว่าง 63.55 ถึง 92.06 เปอร์เซ็นต์ โดยจะมีการสูญเสียกิจกรรมอย่างมาก เมื่อพีเอชต่ำกว่า 5.0 และสูงกว่า 8.0 เอนไซม์ H7 มีความคงตัวมากกว่าเอนไซม์จาก *Aspergillus terreus* LD-1 (พีเอช 11.0 ถึง 12.5) (Kanayama และคณะ, 2002) และจากเอนไซม์ลูกผสมจากแบคทีเรีย *Rhodococcus*

(พีเอช 6 ถึง 7) (Vignali และคณะ, 2018) แต่คงตัวน้อยกว่าเอนไซม์จาก *P. ostreatus* ARC280 (พีเอช 4 ถึง 10) (Othman และคณะ, 2014)



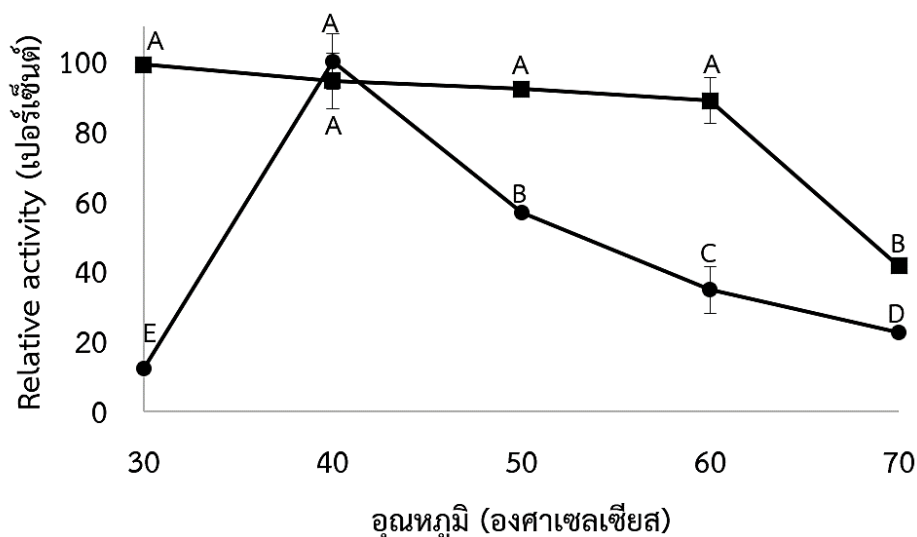
ภาพที่ 3 ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์ (●) และความคงตัวของเอนไซม์ที่พีเอชต่างๆ (■) ของเอนไซม์ H7

หมายเหตุ

ตัวอักษรตัวพิมพ์ใหญ่ หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่า relative activity เมื่อเปรียบเทียบที่พีเอช 4.0 ถึง 11.0

5.6.1.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์และความคงตัวของเอนไซม์

เมื่อทำการวิเคราะห์หาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ พบว่าเอนไซม์ H7 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ที่ 40 องศาเซลเซียส และเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นเท่ากับ 50 ถึง 70 องศาเซลเซียส จะมีค่า relative activity ลดลงอย่างรวดเร็ว โดยมีค่า relative activity เท่ากับ 56.76, 34.68 และ 22.52 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เช่นเดียวกับที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสที่มีค่า relative activity เท่ากับ 12.16 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4) ดังนั้นการมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์อยู่ที่ 40 องศาเซลเซียส ทำให้ไม่สิ้นเปลืองพลังงานในการผลิตเชื้อจากกากหมาก อุณหภูมิที่เหมาะสมนี้สูงกว่าเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสที่ผลิตจาก *Aspergillus terreus* LD-1 (37 องศาเซลเซียส) (Kanayama และคณะ, 2002) และต่ำกว่าเอนไซม์จาก *P. ostreatus* ARC280 (50 องศาเซลเซียส) (Othman และคณะ, 2014) เอนไซม์ H7 มีความคงตัวที่อุณหภูมิในช่วงกว้าง (30 ถึง 60 องศาเซลเซียส) โดยมีค่า relative activity อยู่ระหว่าง 88.79 ถึง 99.07 เปอร์เซ็นต์ หลังจากการบ่มเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ซึ่งเอนไซม์มีความคงตัวใกล้เคียงกับเอนไซม์จาก *P. ostreatus* ARC280 (30 ถึง 60 องศาเซลเซียส) (Othman และคณะ, 2014) แต่คงตัวมากกว่าเอนไซม์จาก *Trichophyton rubrum* LSK-27 (30 ถึง 50 องศาเซลเซียส) หลังการบ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง (Bermek และคณะ, 2004)



ภาพที่ 4 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์ (●) และความคงตัวของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆ (■) ของเอนไซม์ H7

หมายเหตุ

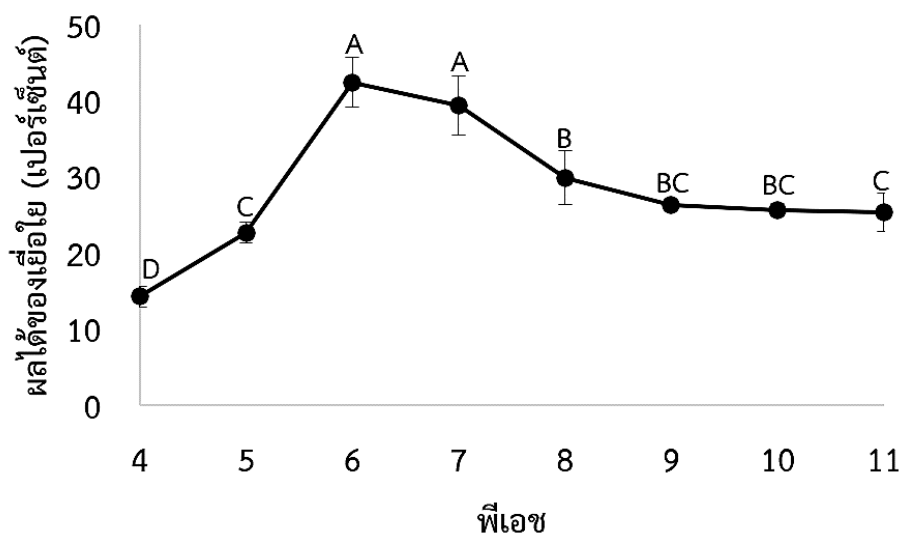
ตัวอักษรตัวพิมพ์ใหญ่ หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่า relative activity เมื่อเปรียบเทียบที่อุณหภูมิ 30 ถึง 70 องศาเซลเซียส

5.6.2 ศึกษาพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเยื่อใยจากกากหมาก

พีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสของเอนไซม์ H7 เท่ากับ 7.0 และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ดังนั้นเพื่อเป็นการยืนยันประสิทธิภาพการย่อยกากหมากจึงศึกษาการผลิตผลได้ของเยื่อใยจากกากหมากโดยตรง ที่พีเอช 4.0 ถึง 11.0 และ 30 ถึง 70 องศาเซลเซียส

5.6.2.1 ผลของพีเอชต่อการผลิตเยื่อใยจากกากหมาก

ผลได้ของเยื่อใยจากกากหมากสูงสุด เมื่อทำการย่อยกากหมากที่พีเอช 6.0 และ 7.0 ซึ่งมีผลได้ของเยื่อใย เท่ากับ 42.49 และ 39.42 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยที่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของผลได้เยื่อใย และผลได้ของเยื่อใยจะลดลง เมื่อพีเอชอยู่ในช่วง 8.00 ถึง 11.00 มีค่าอยู่ระหว่าง 25.36 ถึง 29.93 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 5) ซึ่งผลได้ของเยื่อใยจะลดลงอย่างมากในสภาวะเป็นกรดที่พีเอช 4.0 และ 5.0 มีผลได้เท่ากับ 14.32 และ 22.73 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งแนวโน้มของพีเอชที่มีผลต่อการย่อยกากหมากของเอนไซม์ H7 เป็นไปในทิศทางเดียวกับพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส



ภาพที่ 5 ผลของฟิเอชต่อการผลิตเชื้อจากกาบหมากของเอนไซม์ H7

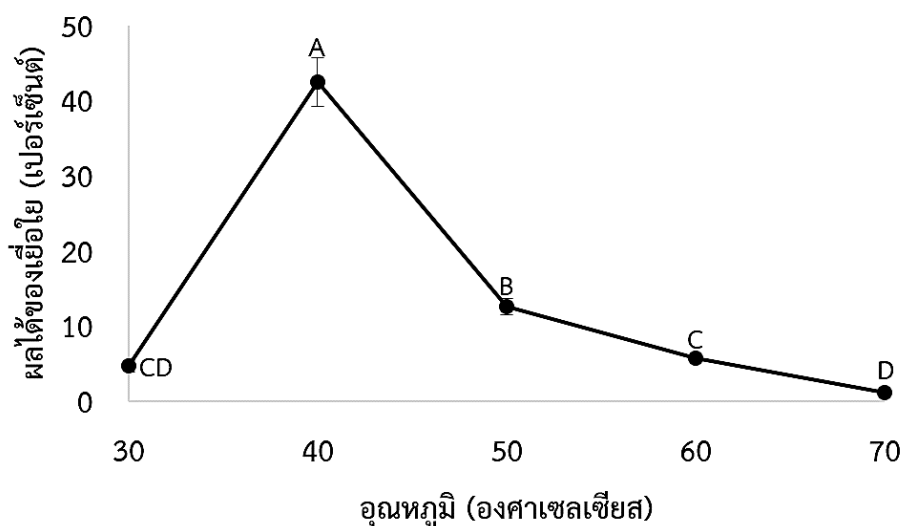
หมายเหตุ

ตัวอักษรตัวพิมพ์ใหญ่ หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของผลได้ของเชื้อ เมื่อเปรียบเทียบที่ฟิเอช 4.0 ถึง 11.0

5.6.2.2 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเชื้อจากกาบหมาก

อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเชื้อจากกาบหมาก คือ 40 องศาเซลเซียส ได้ผลได้เท่ากับ 42.21 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีแนวโน้มเช่นเดียวกับผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสของเอนไซม์ H7 (ภาพที่ 6) ซึ่งผลได้ของเชื้อจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ หากอุณหภูมิต่ำกว่าหรือสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส โดยมีผลได้ของเชื้อเท่ากับ 4.64 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ 1.15 ถึง 12.54 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิระหว่าง 50 ถึง 70 องศาเซลเซียส ซึ่งแสดงให้เห็นว่าความเที่ยงตรงของอุณหภูมิที่ใช้ในการย่อยกาบหมากมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งต่อผลได้ของเชื้อ

ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการผลิตเชื้อจากกาบหมาก คือ ฟิเอช 6.0 ถึง 7.0 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ได้ผลได้ของเชื้อเท่ากับ 42.21 เปอร์เซ็นต์ โดยให้ผลได้สูงกว่าการย่อยกาบหมาก โดยการใช้ซัลไฟด์ที่อุณหภูมิ 162 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3.5 ชั่วโมง ซึ่งมีผลได้เท่ากับ 36 ถึง 40 เปอร์เซ็นต์ (Raghupathy และคณะ, 2002) ซึ่งกระบวนการเตรียมเชื้อจากกาบหมากด้วยเอนไซม์ H7 เป็นกระบวนการที่ประหยัดพลังงานและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม แต่อาจใช้ระยะเวลานาน



ภาพที่ 6 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเยื่อใยจากกากหมากของเอนไซม์ H7

หมายเหตุ

ตัวอักษรตัวพิมพ์ใหญ่ หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของผลได้ของเยื่อใย เมื่อเปรียบเทียบที่อุณหภูมิ 30 ถึง 70 องศาเซลเซียส

5.7 ศึกษาสมบัติของเยื่อใยจากหมาก

5.7.1 คำสี

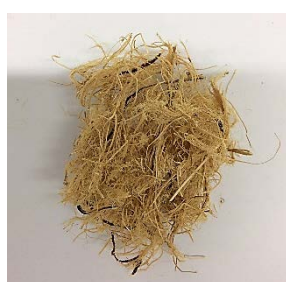
จากตารางที่ 5 แสดงค่าสีของเยื่อใยที่เตรียมด้วยต่างและเอนไซม์ พบว่าเยื่อใยที่ได้จากการเตรียมด้วยต่างมีความสว่างน้อยกว่า แต่มีค่าสีแดงและสีเหลืองสูงกว่าเยื่อใยจากการเตรียมด้วยเอนไซม์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงให้เห็นว่าเยื่อใยที่เตรียมด้วยต่างมีสีเข้ม ออกแดงและเหลืองมากกว่าเยื่อใยจากการเตรียมด้วยเอนไซม์ (ภาพที่ 7) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Loganathan และคณะ (2020) ที่รายงานว่าการใช้สารละลายต่างเตรียมเยื่อใยจากกากหมากแดงทำให้เส้นใยเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลมากขึ้น รวมทั้งเส้นใยจะมีลักษณะขรุขระ เนื่องจากการกำจัดองค์ประกอบประเภทเฮมิเซลลูโลส ลิกนิน และสารเคลือบที่อยู่บนเยื่อใย ขณะที่เยื่อใยจากการเตรียมด้วยเอนไซม์มีความสว่างกว่า เนื่องมาจากแบคทีเรียที่คัดแยกมีสมบัติในการย่อยสลายลิกนินหรือมีกิจกรรมของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสจึงสามารถกำจัดลิกนิน ได้เยื่อใยที่ขาวขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Zainith และคณะ (2019) ที่พบว่าเอนไซม์จาก *Bacillus aryabhattai* ช่วยลดปริมาณลิกนินในน้ำเสียจากโรงงานผลิตเยื่อกระดาษและกระดาษได้ 54 เปอร์เซ็นต์ และจากงานวิจัยของ Rajan และคณะ (2021) ที่พบว่าเชื้อรา *Phanerochaete chrysosporium* ผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส ทำให้เส้นใยจากกากหมากมีความสว่างและนุ่มมากขึ้น

ตารางที่ 5 ค่าสีของเยื่อใยจากการย่อยด้วยต่างและเอนไซม์

ตัวอย่าง	ค่าสี		
	L*	a*	b*
เยื่อใยจากการเตรียมด้วยต่าง	58.60±0.59 ^b	4.24±0.53 ^a	13.22±1.42 ^a
เยื่อใยจากการย่อยเตรียมเอนไซม์ H7	69.62±6.41 ^a	2.70±0.72 ^b	10.71±0.92 ^b

หมายเหตุ

ตัวอักษรตัวพิมพ์เล็ก หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่า L*, a* และ b* เมื่อเปรียบเทียบตามแนวตั้ง



(ก)



(ข)

ภาพที่ 7 เยื่อใยที่ได้จากการเตรียมด้วยต่าง (ก) และเอนไซม์ (ข)

5.7.2 ความหนาของเยื่อใย

เยื่อใยที่ได้จากการเตรียมด้วยต่างและเอนไซม์มีความหนาเท่ากับ 0.22 และ 0.30 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 6) โดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งต่ำกว่าจากงานวิจัยของ Dinakaran และคณะ (2019) ที่รายงานว่าเส้นใยจากกากหมากที่ผ่านการแช่น้ำร้อนและบีบอัดด้วยความร้อนมีความหนา 2.5 ถึง 3.0 มิลลิเมตร

ตารางที่ 6 ความหนาของเยื่อใย

ตัวอย่าง	ความหนา (มิลลิเมตร)
เยื่อใยจากการเตรียมด้วยต่าง	0.22±0.09 ^{ns}
เยื่อใยจากการเตรียมด้วยเอนไซม์ H7	0.30±0. ^{ns}

หมายเหตุ

ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของความหนาของเยื่อใย

5.7.3 ความชื้นของเยื่อใย

จากการวิเคราะห์ความชื้นของเยื่อใยจากการเตรียมด้วยต่างและเอนไซม์ H7 พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของความชื้น (ตารางที่ 7) โดยมีค่าอยู่ระหว่าง 16.48 ถึง 16.88 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าสูงกว่าจากงานวิจัยของ Das และคณะ (2021) ที่รายงานว่าเส้นใยจากกาก

หมากที่ผ่านการต้มด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 20 นาที และทำให้แห้งด้วยวิธีการธรรมชาติที่อุณหภูมิห้อง มีความชื้นประมาณ 11 เปอร์เซ็นต์ โดยเส้นใยจากกาบหมากมีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นเซลลูโลสที่มีความเป็นไฮโดรฟิลิกสูง เนื่องจากมีหมู่ไฮดรอกซิลในโมเลกุลเป็นจำนวนมาก ทำให้โมเลกุลของน้ำง่ายต่อการจับกับหมู่ไฮดรอกซิลภายในเส้นใย

ตารางที่ 7 ความชื้นของเยื่อใย

ตัวอย่าง	ความชื้น (เปอร์เซ็นต์)
เยื่อใยจากการเตรียมด้วยต่าง	16.88 ± 0.34^{ns}
เยื่อใยจากการเตรียมด้วยเอนไซม์ H7	16.48 ± 0.53^{ns}

ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของความชื้น

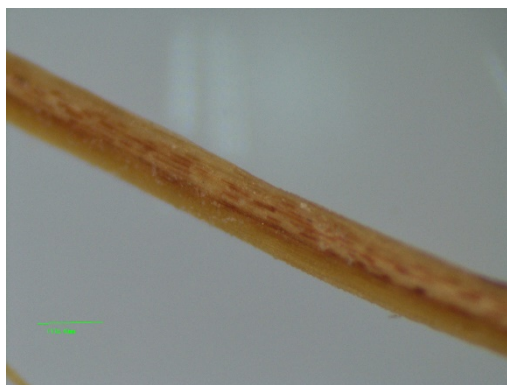
5.7.4 ลักษณะทางกายภาพของเส้นใย

จากการศึกษาลักษณะทางกายภาพของเยื่อใยทางด้านขนาดเส้นผ่านของเยื่อใยและสีภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ พบว่าเยื่อใยจากการเตรียมด้วยต่างมีเส้นผ่านศูนย์กลางไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับเยื่อใยจากการเตรียมด้วยเอนไซม์ โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ระหว่าง 0.37 ถึง 0.40 มิลลิเมตร (ตารางที่ 8) ซึ่งมีขนาดมากกว่าเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของเยื่อใยจากกาบหมากที่เตรียมด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 20 นาที (0.06 มิลลิเมตร) แต่อยู่ในช่วงของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางที่น้อยและมากที่สุดที่มีการรายงาน ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.02 ถึง 0.40 มิลลิเมตร (Das และคณะ, 2021) แต่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางต่ำกว่าจากงานวิจัยของ Mahyudin และคณะ (2020) (0.43 มิลลิเมตร) นอกจากนี้เยื่อใยจากการเตรียมด้วยต่างมีสีน้ำตาลเข้มกว่าเยื่อใยจากการเตรียมด้วยเอนไซม์ที่มีสีน้ำตาลอ่อนอย่างชัดเจน (ภาพที่ 8)

ตารางที่ 8 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเยื่อใย

ตัวอย่าง	เส้นผ่านศูนย์กลาง (มิลลิเมตร)
เยื่อใยจากการเตรียมด้วยต่าง	0.40 ± 0.06^{ns}
เยื่อใยจากการเตรียมด้วยเอนไซม์ H7	0.37 ± 0.13^{ns}

ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง



(ก)



(ข)

ภาพที่ 8 ภาพถ่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอที่กำลังขยาย 5 เท่า ของเยื่อใยจากการเตรียมด้วยต่าง (ก) และเอนไซม์ (ข)

5.7.5 ปริมาณลิกนินในเยื่อใย

จากการทดลองพบว่าปริมาณลิกนินในเยื่อใยจากการเตรียมด้วยต่างมีปริมาณสูงกว่าเยื่อใยจากการเตรียมด้วยเอนไซม์ H7 เล็กน้อย แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 9) ซึ่งมีความใกล้เคียงกับปริมาณลิกนินในกากหมาก เท่ากับ 19.59 เปอร์เซ็นต์ (Poddar และคณะ, 2018) แสดงให้เห็นว่าการเตรียมเยื่อใยด้วยต่างและเอนไซม์สามารถกำจัดลิกนินจากกากหมากได้หมด และการที่เยื่อใยที่เตรียมจากต่างมีสีน้ำตาลเข้ม อาจเนื่องมาจากการใช้สภาวะต่างร่วมกับการใช้อุณหภูมิสูง แต่ไม่ใช่จากปริมาณลิกนินที่เหลืออยู่

ตารางที่ 9 ปริมาณลิกนินในเยื่อใย

ตัวอย่าง	ปริมาณลิกนิน (เปอร์เซ็นต์)
เยื่อใยจากการเตรียมด้วยต่าง	23.66 ± 4.52^{ns}
เยื่อใยจากการเตรียมด้วยเอนไซม์ H7	21.47 ± 2.06^{ns}

ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของปริมาณลิกนิน

5.7.6 ค่าความต้านทานแรงดึงและระยะยืด

จากการวิเคราะห์สมบัติเชิงกลในโหมดแรงดึงของเยื่อใย พบว่าเยื่อใยที่ได้จากการเตรียมด้วยต่างมีความต้านทานแรงดึง (0.97 เมกะปาสคาล) สูงกว่าเยื่อใยจากการเตรียมด้วยเอนไซม์ (0.09 เมกะปาสคาล) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 10) ค่าความต้านทานแรงดึงที่เตรียมจากเอนไซม์และต่างน้อยกว่าจากรายงานการวิจัยของ Ashok และคณะ (2018) ที่รายงานว่าเส้นใยกากหมากมีค่าความต้านทานแรงดึงสูง ประมาณ 92.7 เมกะปาสคาล รวมทั้งยังน้อยกว่าจากงานวิจัยของ

Rajan และคณะ (2021) ที่รายงานว่าค่าความต้านทานแรงดึงของเยื่อใยที่ได้จากการเตรียมด้วยเอนไซม์จากเชื้อรา *P. chrysosporium* และ *Phanerochaete* sp. มีค่าเท่ากับ 125.2 และ 116.5 เมกะปาสคาล ตามลำดับ ผลของค่าความต้านทานแรงดึงมีความสอดคล้องกับผลของระยะยัด พบว่าเยื่อใยที่เตรียมด้วยต่างมีระยะยัดสูงกว่าเยื่อใยที่เตรียมด้วยเอนไซม์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงให้เห็นว่าเยื่อใยจากการเตรียมด้วยเอนไซม์จะขาดง่ายกว่าเยื่อใยจากการเตรียมด้วยต่าง เนื่องจากเยื่อใยจากการเตรียมด้วยต่างมีปริมาณของลิกนินสูงกว่าเยื่อใยจากการเตรียมด้วยเอนไซม์เล็กน้อย ทำให้ยังคงช่วยยัดเหนี่ยวเยื่อใยให้มีความแข็งแรง รวมทั้งงานวิจัยนี้คัดแยกแบคทีเรียย่อยสลายลิกนินจากการสร้างเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส โดยไม่ได้ทำการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสที่ย่อยสลายเซลลูโลส ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเยื่อใย ทำให้เอนไซม์ H7 อาจมีกิจกรรมของเอนไซม์ดังกล่าวและย่อยเซลลูโลสของเส้นใยกาบหมาก ทำให้เยื่อใยที่ได้ไม่แข็งแรงและขาดง่าย

ตารางที่ 10 ความต้านทานแรงดึงและระยะยัดของเยื่อใย

ตัวอย่าง	ความต้านทานแรงดึง (เมกะปาสคาล)	ระยะยัด (เปอร์เซ็นต์)
เยื่อใยจากการเตรียมด้วยต่าง	0.97 ± 0.00^b	3.48 ± 0.46^a
เยื่อใยจากการเตรียมด้วยเอนไซม์ H7	0.09 ± 0.01^b	2.10 ± 0.46^a

หมายเหตุ

ตัวอักษรตัวพิมพ์เล็ก หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่าความต้านทานแรงดึงและระยะยัดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

5.8 ศึกษาสมบัติของกระดาษจากเยื่อใยกาบหมาก

5.8.1 การทดสอบน้ำหนักมาตรฐานของกระดาษ

กระดาษจากเยื่อใยที่เตรียมด้วยต่างและเอนไซม์ แสดงดังภาพที่ 9 จากการทดลองพบว่ากระดาษจากเยื่อใยที่เตรียมด้วยต่างและเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของน้ำหนักมาตรฐานของกระดาษ (ตารางที่ 11) ซึ่งสามารถประยุกต์ใช้เป็นกระดาษหุ้มจดหมาย หน้าเนื้อในของหนังสือและสมุด เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตาม มีน้ำหนักมาตรฐานน้อยกว่ากระดาษจากปอกระเจาและไม้ไผ่ที่มีน้ำหนักเท่ากับ 1.8×10^{-4} ถึง 3.4×10^{-4} กรัมต่อตารางมิลลิเมตร (Hossen และคณะ, 2020) และ 1.3×10^{-4} กรัมต่อตารางมิลลิเมตร (Amri และ Masrol, 2022) ตามลำดับ แต่มีน้ำหนักมาตรฐานมากกว่ากระดาษจากปอควบา (5.2×10^{-5} กรัมต่อตารางมิลลิเมตร) (Umair และคณะ, 2020)



(ก)



(ข)

ภาพที่ 9 กระดาษจากเยื่อใยจากการเตรียมด้วยต่าง (ก) และเอนไซม์ (ข)

ตารางที่ 11 น้ำหนักมาตรฐานของกระดาษจากเยื่อใยจากหมาก

ตัวอย่าง	น้ำหนักมาตรฐาน (กรัมต่อตารางมิลลิเมตร)
กระดาษจากเยื่อใยจากการเตรียมด้วยต่าง	$7.53 \times 10^{-5} \pm 2.25 \times 10^{-6}$ ns
กระดาษจากเยื่อใยจากการเตรียมด้วยเอนไซม์ H7	$9.56 \times 10^{-5} \pm 2.27 \times 10^{-6}$ ns

หมายเหตุ

ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของน้ำหนักมาตรฐาน

5.8.2 ความหนาของกระดาษ

กระดาษจากเยื่อใยจากการเตรียมด้วยเอนไซม์ H7 มีความหนากว่ากระดาษจากเยื่อใยจากการเตรียมด้วยต่าง 1.94 เท่า (ตารางที่ 12) และหนากว่ากระดาษที่เตรียมจากเยื่อปอกระเจา ปอควบา และไม้ไผ่ ที่มีความหนา 0.28 มิลลิเมตร (Hossain และคณะ, 2010) 0.09 มิลลิเมตร (Umair และคณะ, 2020) และ 0.60 มิลลิเมตร (Amri และ Masrol, 2022) ตามลำดับ

ตารางที่ 12 ความหนาของกระดาษที่เตรียมจากเยื่อใยจากหมาก

ตัวอย่าง	ความหนา (มิลลิเมตร)
กระดาษจากเยื่อใยจากการเตรียมด้วยต่าง	0.36 ± 0.21^b
กระดาษจากเยื่อใยจากการเตรียมด้วยเอนไซม์ H7	0.70 ± 0.03^a

หมายเหตุ

ตัวอักษรตัวพิมพ์เล็ก หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่าความหนาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

5.8.3 ความต้านทานแรงดึงและระยะยืดของกระดาษ

กระดาษจากเยื่อใยที่เตรียมด้วยด่างมีความต้านทานแรงดึงมากกว่ากระดาษจากเยื่อใยที่เตรียมด้วยเอนไซม์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับค่าความต้านทานแรงดึงของเยื่อใยที่พบว่าเยื่อใยจากกากหมากที่เตรียมด้วยด่างมีค่าสูงกว่าเยื่อใยที่เตรียมด้วยเอนไซม์ (ตารางที่ 13) ซึ่งแสดงให้เห็นว่ากระดาษจากเยื่อใยที่เตรียมด้วยด่างมีความแข็งแรงกว่ากระดาษที่เตรียมด้วยเอนไซม์ โดยค่าความต้านทานแรงดึงของกระดาษที่เตรียมจากทั้งสองวิธีมีค่าต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกระดาษที่ทำจากลำต้นเทียมกล้วย และลำต้นฝ้ายที่มีความต้านทานแรงดึงประมาณ 40 นิวตันเมตรต่อกรัม (Khan และคณะ, 2014) และ 29.43 นิวตันต่อตารางเมตร (Li และคณะ, 2018) ตามลำดับ ขณะที่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างระยะยืดของกระดาษจากเยื่อใยจากการเตรียมด้วยด่างและเอนไซม์ (1.23 ถึง 1.45 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งต่ำกว่ากระดาษจากฝ้ายและไม้ที่มีระยะยืดเท่ากับ 7.07 และ 7.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Hassan และ Mohamed, 2018)

ตารางที่ 13 ความต้านทานแรงดึงและระยะยืดของกระดาษ

ตัวอย่าง	ความต้านทานแรงดึง (เมกะปาสคาล)	ระยะยืด (เปอร์เซ็นต์)
กระดาษจากเยื่อใยจากการเตรียมด้วยด่าง	3.48 ± 0.03^a	1.45 ± 0.24^{ns}
กระดาษจากเยื่อใยจากการเตรียมด้วยเอนไซม์ H7	0.55 ± 0.02^b	1.23 ± 0.33^{ns}

หมายเหตุ

ตัวอักษรตัวพิมพ์เล็ก หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่าความต้านทานแรงดึงและระยะยืดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของระยะยืด

สรุปและข้อเสนอแนะ

จากการคัดแยกแบคทีเรียย่อยสลายลิกนินจากตัวอย่างน้ำและดิน จากการฝังเยื่อกระดาษในดินบริเวณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ และโรงงานผลิตเยื่อกระดาษ พบว่า *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ H7 มีกิจกรรมของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและผลิตผลได้ของเยื่อใยสูงสุด โดยมีกิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 0.07 ยูนิตต่อมิลลิกรัม พีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์ เท่ากับ 6.0 ถึง 7.0 และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ โดยเอนไซม์มีความคงตัวที่ 5.0 ถึง 8.0 และอุณหภูมิ 30 ถึง 60 องศาเซลเซียส ซึ่งสอดคล้องกับผลการผลิตเยื่อใยจากกากหมาก ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมต่อผลิตเยื่อใยจากกากหมากของเอนไซม์ H7 คือ พีเอช 6.0 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยมีการเปลี่ยนเอนไซม์ 1 ครั้ง หลังจากการบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยให้ผลได้ของเยื่อใยเท่ากับ 42.21 เปอร์เซ็นต์ เมื่อศึกษาสมบัติของเยื่อใยที่ได้จากการเตรียมด้วยต่างและเอนไซม์ พบว่าเยื่อใยที่ได้จากการเตรียมด้วยต่างมีความสว่างน้อยกว่า แต่มีค่าสีแดงและสีเหลืองสูงกว่าเยื่อใยที่ได้จากการเตรียมด้วยเอนไซม์ ขณะที่ไม่มี ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทางด้านความหนา ความชื้น ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเยื่อใย และปริมาณลิกนินระหว่างเยื่อใยที่ได้จากการเตรียมทั้งสองวิธี แต่เยื่อใยที่ได้จากการเตรียมด้วยเอนไซม์จะมีค่าความต้านทานแรงดึงและระยะยืดต่ำกว่าเยื่อใยที่ได้จากการเตรียมด้วยต่าง แสดงให้เห็นว่าเยื่อใยที่ได้จากการเตรียมด้วยเอนไซม์ไม่แข็งแรงเท่าต่าง เมื่อศึกษาสมบัติของกระดาษจากเยื่อใยที่เตรียมจากต่างและเอนไซม์ พบว่ากระดาษที่เตรียมจากทั้งสองวิธีไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของน้ำหนักมาตรฐานและระยะยืด ขณะที่กระดาษจากเยื่อใยที่เตรียมด้วยเอนไซม์มีความหนามากกว่า แต่มีค่าความต้านทานแรงดึงต่ำกว่ากระดาษจากเยื่อใยที่เตรียมด้วยต่าง ซึ่งการใช้เทคโนโลยีเอนไซม์จากแบคทีเรียในการผลิตเยื่อใยจากกากหมากเป็นวิธีที่ประหยัดพลังงาน เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม แต่ใช้เวลานาน ได้เยื่อใยและกระดาษที่มีความขาว หนา แต่ไม่แข็งแรงเมื่อเปรียบเทียบกับต่าง

เอกสารอ้างอิง

- กรมส่งเสริมการเกษตร. 2560. ระบบจัดเก็บและรายงานข้อมูลภาวะการผลิตพืชรายเดือน ระดับ.
ตำบล (รต.).กรกฎาคม.
- กาญจนา ลือพงษ์ นงนุช ศศิธร และเกษม มานะรุ่งวิทย์. 2016. การเตรียมกระดาษกราฟท์จาก
ผักตบชวา ใบสับปะรด และกากกล้วย. RMUTP Research Journal. 11: 15-22.
- ชวนิษฐ์ สิทธิติลกรัตน์ พิลาณี ไฉนอมสัจย์ ญัฐกานต์ แซ่ไคว้ วราภรณ์ อภิวัฒนาภิต สุรางค์ สุธิราชู
และ ปรีศนา สิริอาษา. 2544. การคัดเลือกแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์เพคติเนสและทดสอบ
ประสิทธิภาพของเอนไซม์ในการแยกเยื่อจากเปลือกปอสา. IWPC International
Symposium on Wood Chemistry.
- ชยาภาศ ทับทอง. 2549. กระดาษทำมือจากต้นกล้วย. รายงานการวิจัยจากทุนการวิจัยจาก
งบประมาณแผ่นดิน. ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทร
วิโรฒ.
- ณภัค แสงจันทร์ นาวิ เปลี่ยวจิตร และจุฑาทิพย์ นามวงษ์. 2561. การแยกเส้นใยจากกากหมาก
สำหรับแนวทางในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์. งานประชุมวิชาการระดับชาติวิจัยรำไพพรรณี
ครั้งที่ 12. วันที่ 19 ธันวาคม 2561. มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี.
- นาวิ เปลี่ยวจิตร. 2562. การวิจัยเส้นใยจากหมากเพื่อพัฒนาเป็นเคหะสิ่งทอ. วารสารวิจัยรำไพพรรณี
ปีที่ 13 ฉบับที่ 3 เดือนกันยายน – ธันวาคม 2562.
- ปาณี เดชวิทยพร. 2549. กระดาษทำมือ กระดาษเชิงหัตถกรรม. บริษัท สำนักพิมพ์แม็ค จำกัด.
หน้า 1-8.
- มลสุตา ลิ่วไสง. 2556. การผลิตภาชนะย่อยสลายได้ทางชีวภาพจากกากกล้วย. วิทยานิพนธ์ระดับ
ปริญญาโท. สาขาวิชาวิศวกรรมเครื่องกล. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
- พินิจกานต์ อาริวงษ์ และวรรณิษา นาคแกมทอง. 2555. การผลิตเยื่อกระดาษจากฟางข้าวร่วมกับ
กรรมวิธีโซดา. วิทยานิพนธ์ระดับปริญญาตรี. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ.
- โสธยา สัมเขียวหวาน. 2557. ศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตกระดาษอย่างง่ายจากเปลือกกล้วยสด
และผลผลิตเหลือทิ้งหลังการหมักเอทานอล. วิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโท. สาขาวิชา
วิศวกรรมเคมี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- Amri, F.Z. and Masrol, S.R. 2022. Characteristic of pulp and paper made from middle
section of betong bamboo (*Dedrocalamus asper*) by soda pulping method.
Progress in Engineering Application and Technology. 3: 691-702.

- Ashok, R.B., Srinivasa, C.V. and Basavaraju, B. 2018. A review on the mechanical properties of areca fiber reinforced composites. **Science and Technology of Materials**. 30: 120-130.
- ASTM D646-13. 2013. Standard Test Method for Mass Per Unit Area of Paper and Paperboard of Aramid Papers (Basis Weight). ASTM International. West Conshohocken. PA.
- ASTM D 645/D645/M. 2013. Standard Test Method for Thickness of Paper and Paperboard, ASTM International. West Conshohocken. PA. 2013.
- ASTM D6/D6M-95. 2018. Standard Test Method for Loss on Heating of Oil and Asphaltic Compounds. ASTM International. West Conshohocken. PA.
- ASTM D774/D774M-97. 2018. Standard Test Method for Bursting Strength of Paper. ASTM International. West Conshohocken. PA.
- Bermek, H., Yazici, H., Öztürk, H., Tamerler, C., Jung, H., Li, K., Brown, K.M., Ding, H. and Xu, F. 2004. Purification and characterization of manganese peroxidase from wood-degrading fungus *Trichophyton rubrum* LSK-27. **Enzyme and Microbial Technology**. 35: 87-92.
- Bajpai, P. 2012. Brief Description of the Pulp and Paper Making Process. In: Bajpai, P., Ed., *Biotechnology for Pulp and Paper Processing*, Springer Science + Business Media, Berlin, 7-14.
- Blanchette, R.A., Abad, A.R., Farrell, R.L. and Leathers, T.D. 1988. Detection of lignin peroxidase and xylanase by immunocytochemical labeling in wood decayed by basidiomycetes. **Applied and Environmental Microbiology**. 55: 1457–1465.
- Churang, K., Yuddika, C. and Premchai, R. 2011. Utilization of banana leaves by producing as an extrusion container, replacing food, foam and plastic boxes. Academic work seminar. Future Farmers of Thailand: (F.F.T.).
- Costa, S.M., Gonçalves, A.R. and Esposito, E. 2005. *Ceriporiopsis subvermispora* used in delignification of sugarcane bagasse prior to soda/anthraquinone pulping. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 122: 695–706.
- Das, S., Chaudhuri, A. and Singha, A.K. 2021. Fabrication, microstructural and mechanical properties of arecanut leaf sheath fibre reinforced polyester resin composites. **The Journal of The Textile Institute**. 1-8.

- Deeijing, S. 2014. Isolation and screening of cellulase producing microorganisms and the study some characteristics of enzymes. 25th Biennial Conference of the Asian Association for Biology Education 13-16 October 2014, Living Lab for Sustainability Sciences, University of Malaya, Malaysia.
- Dinakaran, K., Ramesh, H., Joseph, A.D., Murugan, R. and Jothi, S. 2019. Development and characterization of areca fiber reinforced polymer composite. **Materials Today: Proceedings**. 18: 934-940.
- Eida, M.F., Nagaoka, T., Wasaki, J. and Kouno, K. 2012. Isolation and characterization of cellulose-decomposing bacteria inhabiting sawdust and coffee residue composts. **Microbes and Environments**. 27: 226-233.
- Freiermuth, B., Garrett, M. and Jokinen, O. 1994. The use of enzymes in the production of release papers. **Paper Technology**. 25: 21-23.
- Gautam, A., Kumar, A. and Dutt, D. 2016. Effects of ethanol addition and biological pretreatment on soda pulping of *Eulaliopsis binata*. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**. 7:78-90.
- Hassan, R.R.A. and Mohamed, W.S. 2018. The impact of methyl methacrylate hydroxyethyl methacrylate loaded with silver nanoparticles on mechanical properties of paper. **Applied Physics A**. 124: 551.
- Hossain, H.M.Z., Uddin, Md.K., Saifullah, K., Rashid, M.M. and Mollah, M.M. 2010. Hydrophobic property of handmade jute paper treated by sizing material 'rosin'. Daffodil International University **Journal of Science and Technology**. 5: 48-52.
- Hossen, Md.Z., Akhter, S., Tahmina, Akter, S. and Dayan, Md.A.R. 2020. Jute fibre: a suitable alternative to wood fibre for paper and pulp production. **American Journal of Pure and Applied Biosciences**. 2: 177-182.
- Huang, X.F., Santhanam, N., Badri, D.V., Hunter, W.J., Manter, D.K., Decker, S.R., Vivanco, J.M. and Reardon, K.F. 2013. Isolation and characterization of lignin-degrading bacteria from rainforest soils. **Biotechnology Bioengineering**. 110: 1616-1626.
- International Standard ISO 530:1975, Aircraft - General purpose push-pull single-pole circuit-breakers – Dimension. Switzerland.

- Jacob, C.J., Venditti, R. A. and Joyce, T. W. 1987. Effect of enzyme pretreatments on conventional kraft pulping, 1997 Pulping Conference Proceedings. Tappi Press, San Francisco. 593-602.
- Juntralux, N. and Watanasriyaku, S. 2012. Design and construction of ware forming machine from nature pulp. Industrial Engineering Network Conference. 1770-1775.
- Kanayama, N., Suzuki, T. and Kawai, K. 2002. Purification and characterization of an alkaline manganese peroxidase from *Aspergillus terreus* LD-1. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. 93: 405-410.
- Kenealy, W.R. and Jeffries, T.W. 2003. Enzyme Processes for Pulp and Paper: A Review of Recent Developments. American Chemical Society.
- Khan, M.Z.H., Sarkar, M.A.R., Imam, F.I.A., Khan, M.Z.H. and Malinen, R.O. 2014. Paper making from banana pseudo-stem: characterization and comparison. **Journal of Natural Fibers**. 11: 199-211.
- Khatiwada, P., Ahmed, J., Sohag, M.S., Islam, K. and Azad, A.K. 2016. Isolation, screening and characterization of cellulase producing bacterial isolates from municipal solid wastes and rice straw wastes. **Journal of Bioprocessing and Biotechniques**. 6: 1-5.
- Kuhad, R.C., Gupta, R. and Singh, A. 2011. Microbial cellulases and their industrial applications. **Enzyme Research**. 2011: 1-10.
- Kumar, A., Gautam, A. and Dutt, D. 2019. Bio-pulping: An energy saving and environment-friendly approach. **Physical Sciences Reviews**. 20190043.
- Li, H., Zhao, C., Han, W., Jiang, Y. and Wang, S. 2018. Preparation and research of environment-friendly degradable paper mulching film of cotton stalk fiber. IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science. 199: 042052.
- Liew, C.Y., Husaini, A., Hussain, H., Muid, S., Liew, K.C. and Roslan, H.A. 2011. Lignin biodegradation and ligninolytic enzyme studies during biopulping of Acacia mangium wood chips by tropical white rot fungi. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 27:1457–1468.
- Lim, T.K. 2016. Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants: Volume 12. Modified Stems, Roots, Bulbs. Springer International Publishing AG. Switzerland.

- Lin, L., Cheng, Y., Pu, Y., Sun, S., Li, X., Jin, M., Pierson, E.A., Gross, D.C., Dale, B.E. and Dai, A.J. 2016. Systems biology-guided biodesign of consolidated lignin conversion. **Green Chemistry**. 18: 5536–5547.
- Loganathan, T.M., Sultan, M.T.H., Ahsan, Q., Jawaid, M., Naveen, J., Md Shah, A.U. and Hua, L.S. 2020. Characterization of alkali treated new cellulosic fibre from *Cyrtostachys renda*. **Journal of Materials Research and Technology**. 9: 3537-3546.
- Mahyudin, M., Arief, S., Abral, H., Emriadi, Muldarisnur, M. and Artika, M.P. 2020. mechanical properties and biodegradability of areca nut fiber-reinforced polymer blend composites. **Joint Journal of Novel Carbon Resource Sciences & Green Asia Strategy**. 7: 366-372.
- Mansfield, S.D., Wong, K.K.Y., De Jong, E. and Saddler, J.N. 1996. Modification of Douglas-fir mechanical and kraft pulps by enzyme treatment. **Tappi Journal**. 79: 125–132.
- Manzum, A.A. and Mamun, M.A.A. 2018. Isolation of *Bacillus* spp. Bacteria from soil for production of cellulase. **Nepal Journal of Biotechnology**. 6: 57-61.
- Mardones, L., Gomide, J.L., Freer, J., Ferraz, A. and Rodríguez, J. 2006. Kraft pulping of Eucalyptus nitenswood chips biotreated by *Ceriporiopsis subvermispora*. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**. 81: 608–613.
- Miller, G.L. 1959. Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**. 31: 426-428.
- Mohlin, U.B. and Pettersson, B. 2001. Improved papermaking by cellulase treatment before refining. In: Vahala, P., Lantto, R. (Eds.). VTT Biotechnology. Helsinki. Finland. pp78.
- Oliveira, P.L., Duarte, M.C.T., Ponezi, A.N. and Durrant, L.R. 2009. Purification and characterization of manganese peroxidase from *Bacillus pumilus* and *Paenibacillus* sp. **Brazilian Journal of Microbiology**. 40: 818-826.
- Othman, A., Elshafei, A.M., Hassan, M.M., Haroun, B.M., Elsayed, M.A. and Farrag, A.A. 2014. Purification, biochemical characterization and applications of *Pleurotus ostreatus* ARC280 laccase. **British Microbiology Research Journal**. 4: 1418-1439.
- Pala, H., Mota, M. and Gama, F.M. 2006. Factors influencing MOW deinking: Laboratory scale studies. **Enzyme and Microbial Technology**. 38: 81-87.

- Patagundi, B.I., Shivasharan, C.T. and Kaliwal, B.B. 2014. Isolation and characterization of cellulase producing bacteria from soil. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**. 3: 59-69.
- Poddar, P., Asad, M.A., Islam, M.S., Sultana, S., Nur, H.P. and Chowdhury, A.M.S. 2016. Mechanical and morphological study of arecanut leaf sheath (ALS), coconut leaf sheath (CLS), coconut stem fiber (CSF). **Advanced Materials Science**. 1: 1-4.
- Poddar, P., Sultana, S., Akbar, A., Nur, H.P. and Chowdhury, S. 2018. Environmentally sustainability of short Areca-nut leaf sheath fiber reinforced polypropylene composites. **MOJ Polymer Science**. 2: 48-50.
- Rajan, A., Kurup, J.G. and Abraham, E.T. 2021. Biosoftening of arecanut fiber for value added products. **Biochemical Engineering Journal**.
- Reddy, K.V., Vijayalashmi, T., Ranjit, P. and Raju, M.N. 2017. Characterization of some efficient cellulase producing bacteria isolated from pulp and paper mill effluent contaminated soil. **Biological and Applied Science**. 60: e17160226.
- Salvachúa, D., Karp, E.M., Nimlos, C.T., Vardon, D.R. and Beckham, G.T. 2015. Towards lignin consolidated bioprocessing: simultaneous lignin depolymerization and product generation by bacteria. **Green Chemistry**. 17: 4951-4967.
- Sango, C., Kaur, P., Bhardwaj, N. and Sharma, J. 2018. Bacterial cellulase treatment for enhancing reactivity of pre-hydrolysed kraft dissolving pulp for visco. **3 Biotech**. 8: 271.
- Shin, K.S., Kim, Y.H. and Lim, J.S. 2005. Purification and characterization of manganese peroxidase of the white rot fungus *Irpelex lacteus*. **The Journal of Microbiology**. 43: 503-509.
- Singh, P., Sulaiman, O., Haskim, R. Rupani, P.F. and Peng, L.C. 2010. Biopulping of lignocellulosic material using different fungal species: a review. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**. 9: 141-151.
- Singh, R., Grigg, J.C., Qin, W., Kadla, J.F., Murphy, M.E. and Eltis, L.D. 2013. Improved manganese-oxidizing activity of DypB, a peroxidase from a lignolytic bacterium. **ACS Chemical Biology**. 8: 700–706.

- Umair, M., Azis, N., Halis, R. and Jasni, J. 2020. Investigation of kenaf paper in the presence of PVA for transformers application. **Materials**. 13: 2-23.
- Ujjin, S., Sumakprakone, S., Chuprayoon, B., Kondo, R. and Haruthaithanasan, V. 2544. Biopulping of paper mulberry by lignin-degrading fungus. IWPC International Symposium on Wood Chemistry.
- Vignali, E., Tonin, F. and Pollegioni, L. 2018. Characterization and use of a bacterial lignin peroxidase with an improved manganese-oxidative activity. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 102: 10579.
- Wang, Y., Vazquez-Duhalt, R. and Pickard, M.A. 2002. Purification, characterization, and chemical modification of manganese peroxidase from *Bjerkandera adusta* UAMH 8258. **Current Microbiology**. 45. 77-87.
- Xu, Z., Qin, L., Cai, M., Hua, W. and Jin, M. 2018. Biodegradation of kraft lignin by newly isolated *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas putida*, and *Ochrobactrum tritici* strains. **Environmental Science and Pollution Research**. 25: 14171–14181.
- Yang, C.X., Wang, T., Gao, L.N., Yin, H.J. and LÜ. 2017. Isolation, identification and characterization of lignin-degrading bacteria from Qinling, China. **Journal of Applied Microbiology**. 123: 1447-1460.
- Zainith, S., Purchase, D., Saratale, G.D., Ferreira, L.F.R., Bilal, M. and Bharagava, R.N. 2019. Isolation and characterization of lignin-degrading bacterium *Bacillus aryabhatai* from pulp and paper mill wastewater and evaluation of its lignin-degrading potential. **3 Biotech**. 9: 92.
- Zhang, S., Jiang, M., Zhou, Z., Zhao, M. and Li, Y. 2012. Selective removal of lignin in steam-exploded rice straw by *Phanerochaete chrysosporium*. **International Biodeterioration Biodegradation**. 75:89–95.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ตารางผนวกที่ 1 ประสิทธิภาพการย่อยสลายลิกนินบนอาหาร LBM agar

ไอโซเลท	ประสิทธิภาพการย่อยสลายลิกนิน
A	4.3±0.21
B2	2.00±0.14
B3	2.27±0.31
B4	2.07±0.06
B5	3.17±0.14
B6	4.33±1.15
B8	4.16±0.08
B9	3.67±0.58
C2	1.75±0.43
C10	4.15±0.05
D1	2.42±0.08
D2	2.43±0.14
D3	2.57±0.14
D4	3.27±0.12
D5	2.67±0.08
D6	5.77±0.25
E1	1.53±0.12
E2	2.99±0.01
E3	2.04±0.07
E4	1.48±0.02
E5	2.48±0.02
E6	2.99±0.02
F1	1.43±0.02
F5	1.53±0.05
G1	3.40±0.00
G2	2.98±0.04
G3	1.50±0.00
H1	4.90±0.10

ตารางผนวกที่ 1 ประสิทธิภาพการย่อยสลายลิกนินบนอาหาร LBM agar (ต่อ)

ไอโซเลท	ประสิทธิภาพการย่อยสลายลิกนิน
H2	5.50±0.71
H6	4.90±0.10
H7	5.99±0.02

ตารางผนวกที่ 2 ผลได้ของเยื่อใยที่ได้จากการย่อยกากหมากของแบคทีเรียจำนวน 9 ไอโซเลท

ไอโซเลท	ค่าเฉลี่ยของผลได้จากกากหมาก (เปอร์เซ็นต์)		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
A	0.00±0.00	9.26±0.03	9.33±0.15
B6	0.00±0.00	17.52±0.51	17.79±0.42
B8	0.00±0.000	16.95±0.40	17.26±0.13
C10	0.00±0.00	12.73±0.36	12.91±0.20
D6	00.00±0.00	38.73±0.69	39.16±0.16
H1	00.00±0.00	11.19±0.34	23.46±0.14
H2	00.00±0.00	19.16±0.18	23.60±0.46
H6	00.00±0.00	18.28±0.24	38.80±0.36
H7	00.00±0.00	41.89±0.18	41.55±0.49

ตารางผนวกที่ 3 พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส

พีเอช	ค่า relative activity (เปอร์เซ็นต์)
4	67.14±1.97
5	76.07±2.35
6	99.76±7.71
7	93.60±3.02
8	57.58±4.36
9	57.35±2.68
10	47.39±1.34
11	33.41±3.69

ตารางผนวกที่ 4 ความคงตัวของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสที่พีเอชต่างๆ

พีเอช	ค่า relative activity (เปอร์เซ็นต์)
4	49.53±1.32
5	63.55±1.62
6	68.22±5.29
7	82.24±2.64
8	92.06±4.63
9	29.44±5.95
10	26.17±6.61
11	17.76±5.29

ตารางผนวกที่ 5 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส

อุณหภูมิ	ค่า relative activity (เปอร์เซ็นต์)
30	12.16±1.91
40	100.00±5.10
50	56.76±2.55
60	34.68±4.46
70	22.52±2.55

ตารางผนวกที่ 6 ความคงตัวของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสที่อุณหภูมิต่างๆ

อุณหภูมิ	ค่า relative activity (เปอร์เซ็นต์)
30	49.53±1.32
40	63.55±1.62
50	68.22±5.29
60	82.24±2.64
70	92.06±4.63

ตารางผนวกที่ 7 ผลของพีเอชต่อการผลิตเยื่อใยจากกากหมากของเอนไซม์ H7

พีเอช	ผลได้เยื่อใยจากกากหมากเฉลี่ย (เปอร์เซ็นต์)
4	14.32±1.39
5	22.73±1.39
6	42.49±3.23

ตารางผนวกที่ 7 ผลของพีเอชต่อการผลิตเยื่อใยจากกากหมากของเอนไซม์ H7

พีเอช	ผลได้เยื่อใยจากกากหมากเฉลี่ย (เปอร์เซ็นต์)
7	39.42±3.84
8	29.93±3.51
9	26.36±0.32
10	25.67±0.82
11	25.36±2.49

ตารางผนวกที่ 8 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเยื่อใยจากกากหมากของเอนไซม์ H7

อุณหภูมิ	ผลได้เยื่อใยจากกากหมากเฉลี่ย (เปอร์เซ็นต์)
30	4.62±0.81
40	42.49±3.23
50	12.54±1.07
60	5.71±0.29
70	1.15±0.17

6.9 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีการ Lowry (ดัดแปลงจาก Ferrero *et al.*, 1996)

6.1.1 สารเคมี

6.1.1.1 เตรียมสารละลาย Bovine serum albumin (BSA) เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการชั่ง BSA ด้วยเครื่องชั่งสารอย่างละเอียดหนัก 0.01 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร จนกระทั่ง BSA ละลายหมด เก็บเป็น stock solution จากนั้นนำมาเจือจางให้ได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้นของ BSA ตั้งแต่ 0 ถึง 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

6.1.1.2 การเตรียมสารละลาย Lowry

สารละลาย A: ละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) หนัก 20 กรัมในน้ำกลั่นปริมาตร 960 มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 3 โมลาร์ ปริมาตร 35 มิลลิลิตร

สารละลาย B: ละลายคอปเปอร์ซัลเฟต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 1 กรัมในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร

สารละลาย C: ละลายโพแทสเซียมโซเดียมทาร์เทรต ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$) หนัก 2 กรัมละลายในน้ำ 100 มิลลิลิตร

สารละลาย D: ผสมสารละลาย A: B: C ในอัตราส่วน 100: 1: 1 (V/V/V)

สารละลาย E: เตรียมสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent เข้มข้น 1 นอร์มอลด้วยการผสมสารละลาย Folin-Ciocalteu กับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 ต่อ 1

6.1.2 วิธีการวิเคราะห์

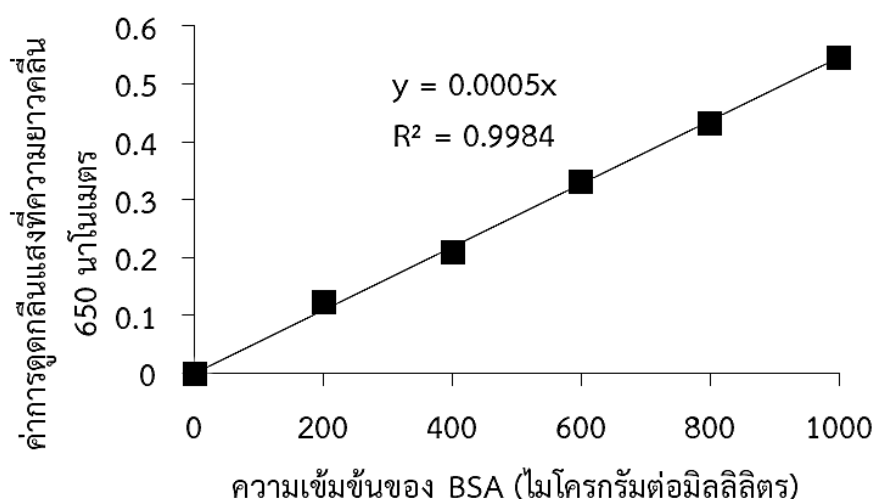
6.1.2.1 สร้างกราฟมาตรฐานของ BSA โดยเจือจางสารละลายมาตรฐาน BSA ให้มีความเข้มข้น 0, 200, 400, 600, 800 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังตารางผนวกที่ 1

ตารางผนวกที่ 9 การเตรียมสารละลาย BSA มาตรฐานด้วยวิธี Lowry

ความเข้มข้นของสารละลาย BSA (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	สารละลาย BSA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ไมโครลิตร)	น้ำกลั่น (ไมโครลิตร)
0	0	100
200	20	80
400	40	60
600	60	40
800	80	20
1,000	100	0

6.1.2.2 บีเปิดต์สารละลายตัวอย่าง สารละลายในหลอดควบคุม และสารละลายมาตรฐานลงในหลอดทดลอง หลอดละ 100 ไมโครลิตร ตามลำดับ ส่วนหลอดควบคุมจะใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์แทน

6.1.2.3 เติมสารละลาย D หลอดละ 2.5 มิลลิลิตร ลงในข้อ 1.2.2 ที่ทิ้งไว้ 10 นาที จากนั้นเติมสารละลาย E ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ที่ทิ้งไว้ 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าดูดกลืนแสงกับปริมาณของ BSA แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างมาเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของ BSA จากกราฟมาตรฐาน และคำนวณหาปริมาณ BSA ที่มีในตัวอย่าง



ภาพผนวกที่ 1 กราฟมาตรฐานของ BSA ด้วยวิธี Lowry