รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยเรื่อง การใช้ *Bacillus subtilis* A2 ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสในการแยกน้ำมันจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร.อรัญ หันพงศ์กิตติกูล

รองศาสตราจารย์ ดร. พูนสุข ประเสริฐสรรพ์

นางฉวีวรรณ มลิวัลย์

37

สิงหาคม 2553

ชื่อโครงการวิจัย การใช้ *Bacillus subtilis* A2 ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสในการแยกน้ำมันจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

ชื่อนักวิจัย อรัญ หันพงศ์กิตติกูล, พูนสุข ประเสริฐสรรพ์ และณวีวรรณ มลิวัลย์

E-mail address aran.h @ psu.ac.th

ระยะเวลาโครงการ 2550-2553

บทคัดย่อ

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 พบว่าอาหารพื้นฐานที่เหมาะสมประกอบด้วย CMC 10 กรัม, KH_2PO_4 1.0 กรัม , K_2HPO_4 1.0 กรัม, ยีสต์สกัด 4.5 กรัม, $NH_4H_2PO_4$ 4.1 กรัม, $MgSO_4.7H_2O$ 0.3 กรัม และ $CaCl_2$ 0.3 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับพีเอช 6.0 บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เชื้อผลิตเอนไซม์เซลลูเลสมีกิจกรรมสูงสุด 0.15 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 6 ชั่วโมง การทำบริสุทธิ์เอนไซม์ขั้นต้นโดยการตกตะกอนด้วยอะซิโตน ได้เอนไซม์เซลลูเลสหยาบ 44.05 เปอร์เซ็นต์ กิจกรรมจำเพาะ 0.84 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ความบริสุทธิ์ 3.39 เท่า สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ได้ดีที่สุดในบัฟเฟอร์พีเอช 5.0 ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และมีความคงตัวดีที่พีเอช 5.0 และอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสเช่นกัน

การแยกน้ำมันจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยใช้ส่วนใสที่มีเอนไซม์เซลลูเลสจากการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 มีการแยกน้ำมันออกจากน้ำทิ้งได้ปริมาณน้อย ไม่เห็นความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ส่วนการทดลองที่เติมเอนไซม์เซลลูเลสหยาบซึ่งผ่านการตกตะกอนด้วยอะซิโตนมาแยกน้ำมันในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ ปริมาณตะกอนจะลดลงจาก 24.00 กรัมต่อลิตรเป็น 20.33 กรัมต่อลิตร และปริมาณน้ำมันในตะกอนลดลงจาก 2.45 กรัมต่อกิโลกรัม เป็น 1.8 กรัมต่อกิโลกรัม ที่เวลา 12 ชั่วโมง ส่วนการใช้เชื้อ *Bacillus subtilis* A2 แยกน้ำมันในน้ำทิ้ง ในกระบอกตวง 50 มิลลิลิตร พบว่าไม่สามารถแยกน้ำมันในน้ำทิ้งดีแคนเตอร์ได้

การใช้เชื้อ *Bacillus subtilis* A2 ในการเจริญและแยกน้ำมันในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ โดยการเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เวลา 72 ชั่วโมง ชุดที่มีการเติมเชื้อจะมีปริมาณตะกอนลดลงมากที่สุด และมีปริมาณน้ำมันในส่วนใสหลังจากปั่นเหวี่ยงแยกตะกอน 0.41 กรัมต่อปริมาณน้ำทิ้ง 50 มิลลิลิตร และการเจือจางน้ำทิ้งความเข้มข้นระดับ 1:1 ให้ผลการแยกน้ำมันออกจากตะกอนดีที่สุด แต่การเติมแหล่งคาร์บอน 1 เปอร์เซ็นต์หรือแหล่งไนโตรเจน (ยีสต์สกัดและ $NH_4H_2PO_4$ 0.1 เปอร์เซ็นต์ หรือเติมร่วมกัน) ทำให้การแยกน้ำมันในน้ำทิ้งลดลง และ

การใช้น้ำทิ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อสามารถแยกน้ำมันออกจากตะกอนในน้ำทิ้งได้ดีกว่าน้ำทิ้งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ

Research project Application of *Bacillus subtilis* A2 producing cellulase and xylanase for oil separation from palm oil mill effluent

Researcher Aran H-Kittikun, Poonsuk Prasertsan and Chaveewan Malewan

E-mail address aran.h @ psu.ac.th

Abstract

The optimal condition and medium composition for growth and cellulase production by *Bacillus subtilis* A2 were CMC 10 g, KH_2PO_4 1.0 g, K_2HPO_4 1.0 g, yeast extract 4.5 g, $NH_4H_2PO_4$ 4.1 g, $MgSO_4.7H_2O$ 0.3 g, $CaCl_2$ 0.3 g adjusted pH to 6.0 in 1 L distilled water and incubated at 45°C by shaking at 200 rpm. At optimal condition the bacterium produced the highest cellulose activity (0.15 U/ml) at 6 h. The primary purification of cellulase from the culture broth by precipitation with chilled acetone could recover crude cellulase 44.05% with 0.84 U/ml specific activity (3.39 purification folds). The crude cellulase had the optimal activity at pH 5.0 and 55°C and retained 80% activity at these conditions and was stable at pH 4-5 and 45°C.

The oil separation from palm oil mill effluent (POME) by the supernatant of *Bacillus subtilis* A2 culture was low and was not different from the control. When the crude cellulase was used to separate oil from the wastewater of the decanter, the amount of dry sludge was decreased from 24.00 to 20.33 g/L and the oil in sludge was reduced from 2.45 to 1.9 g/L. However, when cell culture of *Bacillus subtilis* A2 was used for oil separation, there was no oil separation.

When *Bacillus subtilis* A2 was cultivated in the wastewater from the decanter for oil separation under shaking at 200 rpm, 45°C for 72 h, the sludge dry weight was decreased and the amount of the oil in supernatant after centrifugation was increased to 0.41 g/50 ml wastewater. The treatment of wastewater with dilution 1:1 exhibited the highest oil separation from sludge. The addition of carbon (1% CMC) or nitrogen (0.1% Yeast extract and $NH_4H_2PO_4$) or combined the carbon and nitrogen source to the wastewater did not increase oil separation. When the sterilized wastewater was used to cultivated *B. subtilis* A2 under shaking condition it gave better oil separation than non sterile wastewater.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง การใช้ *Bacillus subtilis* A2 ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสในการแยกน้ำมันจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ได้รับทุนสนับสนุนจากงบอุดหนุนทุนวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ปี 2550-2551 คณะผู้วิจัยจึงขอขอบคุณมหาวิทยาลัยมา ณ โอกาสนี้

คณะผู้วิจัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ก
กิตติกรรมประกาศ	ข
สารบัญ	ค
สารบัญตาราง	ง
สารบัญภาพ	จ
บทที่	
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
บทตรวจเอกสาร	2
วัตถุประสงค์	25
2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ	26
วัสดุ อุปกรณ์	26
วิธีการวิเคราะห์	27
วิธีการวิจัย	28
3. ผลการทดลองและวิจารณ์	35
1.สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Bacillus subtilis* A2	35
1.1 ผลของแหล่งคาร์บอน	36
1.2 ผลของแหล่งไนโตรเจน	37
1.3 ผลของพีเอช	43
1.4 ผลของอุณหภูมิ	45
2. สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานและความคงตัวของเอนไซม์หยาบจาก *Bacillus subtilis* A2	47
2.1 การทำบริสุทธิ์ขั้นต้นของเอนไซม์เซลลูเลส	47
2.2 ผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส	48
2.3 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส	49
2.4 ผลของความคงตัวต่อพีเอชของเอนไซม์เซลลูเลส	50
2.5 ผลของความคงตัวต่ออุณหภูมิของเอนไซม์เซลลูเลส	52

สารบัญ

หน้า

3. การแยกน้ำมันจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* A2..... 54

3.1 การแยกน้ำมันจากน้ำทิ้งโดยใช้ส่วนใสที่มีเอนไซม์เซลลูเลส..... 54

3.2 การแยกน้ำมันจากน้ำทิ้งโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสที่ผ่านการตกตะกอน..... 55

3.3 การแยกน้ำมันจากน้ำทิ้งโดยใช้เชื้อ *Bacillus subtilis* A2 56

4. การใช้เชื้อ *Bacillus subtilis* A2 ในการเจริญและแยกน้ำมันในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์..... 59

4.1 ผลของเวลาต่อการแยกน้ำมันในน้ำทิ้ง..... 59

4.2 ผลของการเจือจางน้ำต่อการแยกน้ำมันในน้ำทิ้ง..... 61

4.3 ผลของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญและแยกน้ำมันน้ำทิ้ง..... 63

4.4 ผลของการฆ่าเชื้อน้ำทิ้งต่อการแยกน้ำมัน..... 65

5. การแยกน้ำมันจากน้ำทิ้งที่โรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม..... 67

บทสรุป..... 68

เอกสารอ้างอิง..... 70

ภาคผนวก..... 81

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ลักษณะของน้ำทิ้งจากแหล่งต่าง ๆ ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม.....	11
2	ลักษณะของน้ำทิ้งจากบ่อรวบรวมน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยทั่วไป....	12
3	องค์ประกอบทางเคมีของน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม.....	13
4	การตกตะกอนเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* A2.....	48
5	ผลของอุณหภูมิต่อการแยกน้ำมันในตะกอนของน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ที่เติมเอนไซม์เซลลูเลสหยาบจากเชื้อ *Bacillus subtilis* A2.....	55
6	ผลของเวลาต่อการแยกน้ำมันของตะกอนน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ที่เติมเอนไซม์เซลลูเลสหยาบจากเชื้อ *Bacillus subtilis* A2.....	56

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ส่วนประกอบของปาล์มทะลายสด.....	3
2	โมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์หรือไตรเอซิลกลีเซอรอล.....	3
3	โครงสร้างของเซลล์พืชโดยทั่วๆ ไป.....	4
4	โครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลส.....	5
5	โครงสร้างทางเคมีของไซแลน.....	6
6	โครงสร้างทางเคมีของเพคติน.....	7
7	โครงสร้างทางเคมีของลิกนิน.....	8
8	ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญ (A) และการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (B) ของเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 (ในอาหารพื้นฐานที่มีแหล่งคาร์บอนปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่ 45 องศาเซลเซียส เขย่า 200 รอบต่อนาที).....	36
9	ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญ (A) และการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (B) ของเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 (ในอาหารพื้นฐานที่มี CMC 1 เปอร์เซ็นต์ และแหล่งไนโตรเจนต่างๆ (0.1 เปอร์เซ็นต์) บ่มที่ 45 องศาเซลเซียส เขย่า 200 รอบต่อนาที).....	38
10	ผลของแหล่งไนโตรเจนผสมต่อการเจริญ (A) และการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (B) ของเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 (ในอาหารพื้นฐานที่มี CMC 1 เปอร์เซ็นต์ และแหล่งไนโตรเจนต่างๆ ความเข้มข้นรวม 0.1 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่ 45 องศาเซลเซียส เขย่า 200 รอบต่อนาที).....	41
11	ผลของแหล่งไนโตรเจนผสมต่อการเจริญ (A) และการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (B) ของเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 (ในอาหารพื้นฐานที่มี CMC 1 เปอร์เซ็นต์ และแหล่งไนโตรเจนความเข้มข้นรวม 0.1 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่ 45 องศาเซลเซียส เขย่า 200 รอบต่อนาที).....	42
12	ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการเจริญ (A) และการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (B) ของเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 (ในอาหารพื้นฐานที่มี CMC 1 เปอร์เซ็นต์ และยีสต์สกัด+$NH_4H_2PO_4$ ความเข้มข้นรวม 0.1 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เขย่า 200 รอบต่อนาที)	44

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
13	ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญ (A) และการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (B) ของเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 (ในพื้นฐานที่มี CMC 1 เปอร์เซ็นต์ และยีสต์สกัด+ $NH_4H_2PO_4$ ความเข้มข้นรวม 0.1 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 6.0 เขย่า 200 รอบต่อนาที)...	46
14	ผลของพีเอชต่อการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 (CMC 1% เป็นสับสเตรท บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที)	50
15	ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 (CMC 1% เป็นสับสเตรท ในซิเตรตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 มิลลิโมลาร์ พีเอช 5.0 เขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที).....	50
16	ผลของพีเอชต่อความคงตัวของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 (บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส).....	52
17	ผลของพีเอชต่อความคงตัวของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 (บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส).....	52
18	ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 (บ่มที่พีเอช 5.0).....	54
19	ผลของการแยกน้ำมันจากน้ำทิ้งดีแคนเตอร์ที่สภาวะต่างๆ (■; เติมอาหารที่ปราศจากเชื้อ, □; อาหารที่มีเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 และ ⊞ ; ส่วนใสที่แยกเซลล์ออก ใช้ 15 มิลลิลิตร เติมในน้ำทิ้งดีแคนเตอร์ 45 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส).....	58
20	ผลของการแยกน้ำมันจากตะกอนน้ำทิ้งดีแคนเตอร์ โดยการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 (▲: ไม่เติม *Bacillus subtilis* A2; ○: เติม *Bacillus subtilis* A2 โดยบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เขย่า 200 รอบต่อนาที).....	60

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
21	ผลของการแยกน้ำมันจากตะกอนน้ำทิ้งดีแคนเตอร์ ปริมาณตะกอน และปริมาณน้ำมันในส่วนใสหลังจากแยกตะกอนออก (▲, ■: ไม่เติม *Bacillus subtilis* A2; ○, □: เติม *Bacillus subtilis* A2ใช้น้ำทิ้งปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เขย่า 200 รอบต่อนาที ที่เวลา 72 ชั่วโมง).....	62
22	ผลของการแยกน้ำมันจากตะกอนน้ำทิ้งดีแคนเตอร์ ปริมาณตะกอน และปริมาณน้ำมันใน ส่วนใสหลังจากปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนออก (เติมแหล่งคาร์บอน (1% CMC) ไนโตรเจน (0.1% ยีสต์สกัด และ $NH_4H_2PO_4$ ความเข้มข้นรวม 0.1 เปอร์เซ็นต์ (% Total N)) และแหล่งคาร์บอนกับแหล่งไนโตรเจน (CMC, ยีสต์สกัด และ $NH_4H_2PO_4$) โดย ■ : ไม่เติม *Bacillus subtilis* A2; □: ไม่เติม *Bacillus subtilis* A2 บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เขย่า 200 รอบต่อนาที ที่เวลา 72 ชั่วโมง)	64
23	ผลของการแยกน้ำมันจากตะกอนน้ำทิ้งดีแคนเตอร์ ปริมาณตะกอน และปริมาณน้ำมันในส่วนใสหลังจากแยกตะกอนออก โดยใช้น้ำทิ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อและไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ (■:ไม่เติม *Bacillus subtilis* A2; □: เติม *Bacillus subtilis* A2 ใช้น้ำทิ้งปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส โดยการเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่เวลา 72 ชั่วโมง).....	66
24	กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส ที่ OD_{550}.....	83
25	การเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 บนอาหารพื้นฐานที่มี CMC 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....	84

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ปัจจุบันปาล์มน้ำมันจัดเป็นพืช เศรษฐกิจที่สำคัญอย่างหนึ่งของภาคใต้ นิยมปลูกกันมากในหลายจังหวัดอันเนื่องมาจากสภาพภูมิอากาศที่เหมาะสม และมีการนำน้ำมันปาล์มไปใช้ในระดับอุตสาหกรรมต่าง ๆ อย่างกว้างขวางเพราะสามารถนำไปใช้ทดแทนน้ำมันพืชอื่นๆ ได้ เช่น น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันถั่วลิสง น้ำมันมะพร้าว น้ำมันเมล็ดฝ้าย เป็นต้น ตลอดจนใช้แทนไขสัตว์ได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้ยังได้รับการส่งเสริมการเพาะปลูกจากทางภาครัฐบาล ทำให้มีอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับปาล์มน้ำมันเพิ่มมากขึ้น เช่น สบู่ ผงซักฟอก อาหารสัตว์และเนยเทียมเป็นต้น จากรายงานของธีระ เอกสมทราเมษฐ์ และคณะ (2548) กล่าวว่าในปี พ.ศ. 2546 จังหวัดที่มีพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันมากที่สุดในประเทศไทยได้แก่ กระบี่ สุราษฎร์ธานี ชุมพร สตูล และตรังตามลำดับ รวมเนื้อที่เพาะปลูกปาล์มน้ำมันของทั้ง 5 จังหวัดมีพื้นที่เพาะปลูกรวมกันร้อยละ 79.10 ของเนื้อที่ปลูกปาล์มน้ำมันทั้งประเทศ โดยในปี พ.ศ. 2546 ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันรวมกันทั้งสิ้น 1,799,150 ไร่ และเพิ่มเป็น 1,935,092 ไร่ ในปี พ.ศ. 2547 (นฤชิต มณีโชติ, 2549) ปัจจุบันจากการขยายการกำลังผลิตของอุตสาหกรรมน้ำมันปาล์มส่งผลให้เกิดของเสีย เช่น ทะลายปาล์มเปล่า เปลือกผลปาล์ม กะลาปาล์ม น้ำเสีย และสลัดจ์ (อารี กังแฮ, 2536; โสภา จันทภาโส, 2542) โดยเฉพาะน้ำทิ้งซึ่งเป็นวัสดุเศษเหลือที่ได้จากกระบวนการผลิต ซึ่งน้ำทิ้งส่วนใหญ่จะมาจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มแบบมาตรฐาน (แบบอบไอน้ำ) ในสองขั้นตอนคือ น้ำนึ่งปาล์มหรือน้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อ และน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์หรือเครื่องเซพาเรเตอร์ซึ่งก่อให้เกิดปัญหาทางด้านสิ่งแวดล้อมหลายด้านโดยน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มนั้น พบว่ามีค่าบีโอดีที่สูง เนื่องจากในน้ำทิ้งที่ถูกปล่อยออกมายังคงมีองค์ประกอบของน้ำมันอยู่จำนวนหนึ่งแทรกอยู่ในเซลล์ เช่น ผนังเซลล์ เยื่อหุ้มเซลล์ ในรูปของอิมัลชันซึ่งจะแยกออกได้ยากด้วยวิธีการทางเคมีและวิธีทางกายภาพ เช่น การใช้ความร้อน หรือการหมุนเหวี่ยงแยกน้ำมันก็ไม่สามารถแยกน้ำมันที่แทรกอยู่ในระหว่างชั้นของผนังเซลล์ปาล์มออกมาได้ เพราะน้ำมันส่วนใหญ่จับกับของแข็งอย่างซับซ้อน วิธีที่น่าจะเป็นไปได้ในการกำจัดน้ำมันออกจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มคือ วิธีการทางชีวภาพซึ่งทำได้โดยการใช้จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และเอนไซม์ไซลาเนสได้เพื่อให้เอนไซม์ทั้งสองย่อยสารแขวนลอยที่น้ำมันไปเกาะหรือแทรกเพื่อทำให้น้ำมันนั้นถูกปล่อยออกมาและลอยขึ้นสู่ด้านบน เมื่อทำการเก็บเกี่ยวน้ำมันส่วนนี้ออก ก็จะทำให้ได้น้ำมันเพิ่มขึ้นและยังเป็นการลดค่าบี

โอดีและค่าซีโอดีของน้ำทิ้ง ทำให้การบำบัดน้ำเสียในขั้นต่อไปทำได้ง่ายขึ้น ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะศึกษาการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสจากดินบริเวณบ่อรวบรวมน้ำทิ้งของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม เพื่อนำมาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ทั้งสองทั้งในระดับฟลาสก์และระดับถังหมัก รวมถึงการทดลองนำเอนไซม์ที่ผลิตโดยเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่สนใจไปประยุกต์ใช้ในการแยกน้ำมันออกจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

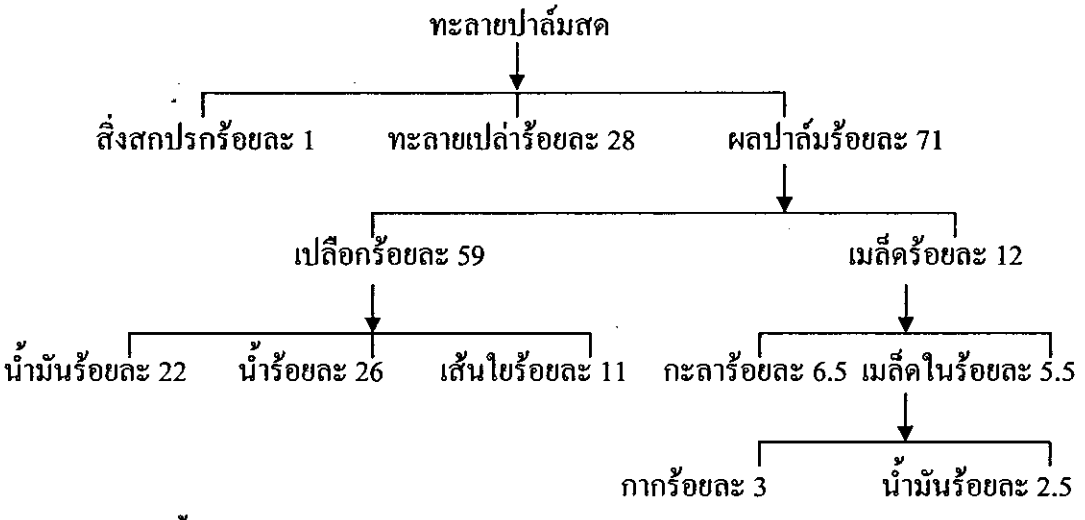
บทตรวจเอกสาร

1. ส่วนประกอบของปาล์มทะลายสด

ปาล์มทะลายสด (fresh fruit bunch, FFB) ของปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* jacq.) เป็นผลผลิตจากต้นปาล์มประกอบด้วยทะลายเปล่า (empty bunch) และผลปาล์ม (fruit) ภายในผลจะประกอบด้วยส่วนของชั้นเปลือก (mesocarp) ในชั้นนี้จะมีน้ำมันเรียกว่าน้ำมันปาล์ม (palm oil, PO) จากชั้นเปลือกจะมีกะลา (shell) หุ้มเมล็ดในอยู่ ภายในเมล็ดในมีน้ำมันอีกชนิดหนึ่งเรียกว่า น้ำมันเมล็ดใน (palm kernel oil, PKO) ซึ่งมีส่วนประกอบทางเคมีแตกต่างจากน้ำมันปาล์ม

สำหรับเมล็ดในปาล์มซึ่งมีอยู่ประมาณร้อยละ 5.5 ของน้ำหนักทะลายนั้น จะมีส่วนประกอบโดยประมาณดังภาพที่ 1 ดังนี้ (ธีระ เอกสมทราเมษฐ์ และคณะ, 2543)

ส่วนประกอบ	ร้อยละ
น้ำมัน	47-52
ความชื้น	6-8
โปรตีน	7.5-9.0
ซูโครส น้ำตาลและแป้ง	23-24
เซลลูโลส	5
ขี้เถ้า	2

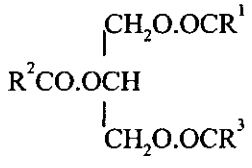


หมายเหตุ : ตัวเลขนี้อาจผันแปรได้ตามลักษณะพันธุ์ปาล์ม สภาพดินฟ้าอากาศ และการดูแลรักษา

ภาพที่ 1 ส่วนประกอบของปาล์มทะลายสด
ที่มา : ธีระ เอกสมทราเมษฐ์ และคณะ (2543)

2. ลักษณะและส่วนประกอบของน้ำมันปาล์มและน้ำมันเมล็ดในปาล์ม

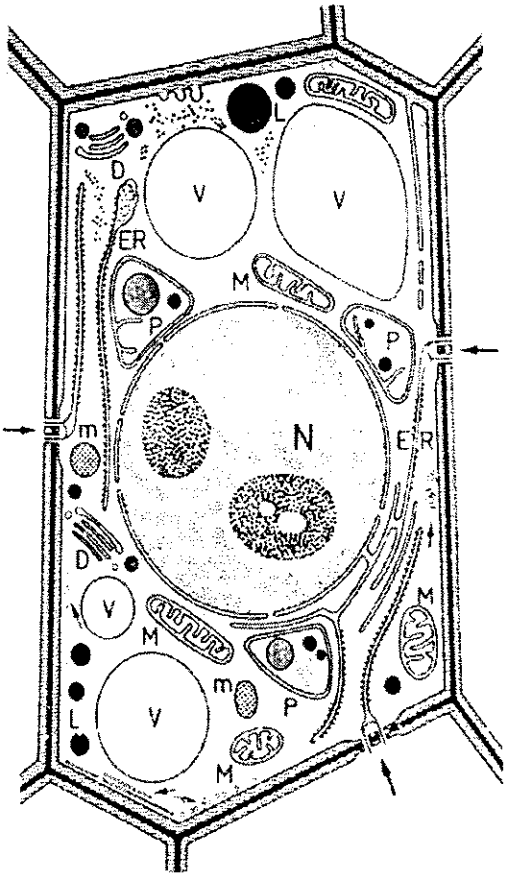
น้ำมันปาล์มและน้ำมันเมล็ดในปาล์มก็เหมือนกับน้ำมันพืชและไขมันสัตว์ที่รับประทานได้ชนิดอื่น ๆ เช่น น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันมะพร้าว น้ำมันหมู เป็นสารอินทรีย์ที่เป็นสารประกอบเอสเทอร์โมเลกุลประกอบด้วยสารสองชนิดคือ กลีเซอรอล หรือกลีเซอรีน และไขมันหรือกรดคาร์บอกซีลิกเชื่อมต่อเข้าด้วยกันด้วยพันธะเอสเทอร์ที่แข็งแรงกลายเป็นโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ หรือไตรเอซิลกลีเซอรอล (ภาพที่ 2) น้ำมันสามารถละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์เช่น ปิโตรเลียมอีเทอร์ เฮกเซน คลอโรฟอร์ม และเมทานอล



ภาพที่ 2 โมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์หรือไตรเอซิลกลีเซอรอล

3. โมเลกุลของน้ำมัน

ไตรกลีเซอไรด์หรือน้ำมันในเซลล์พืชจะถูกสะสมอยู่ในส่วนที่เรียกว่า oil bodies หรือ lipid bodies (ภาพที่ 3) ซึ่งจะมีชื่อเรียกที่ต่างกันเช่น spherosome และ oleosome มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางระหว่าง 0.2-0.6 ไมครอนแล้วแต่ชนิดของพืช โดยเมื่อพืชมีการเติบโตก็จะเพิ่มจำนวนของ oil bodies มากขึ้น (Brewley and Black, 1983 อ้างโดย Laohaprapanon, 2001) การสะสมน้ำมันจะมากหรือน้อยก็ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช โดยส่วนใหญ่จะอยู่ระหว่างร้อยละ 1-2 จนถึงร้อยละ 60



ภาพที่ 3 โครงสร้างของเซลล์พืชโดยทั่ว ๆ ไป (N = นิวเคลียส, ER = เอ็นโดพลาสมิกเรติคูลัม, V = แวคิวโอล, M = ไมโทคอนเดรีย, P = พลาสมิด, m = ไมโคร บอดี และ L = ไลปิดบอดี)
ที่มา : Mohr (1995)

4. ผนังเซลล์พืช

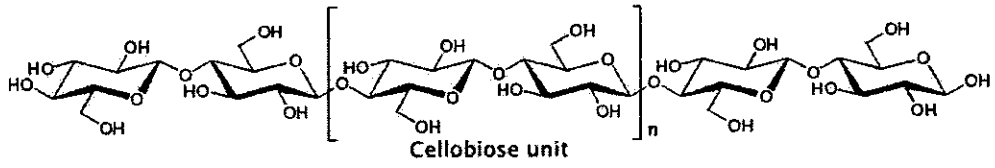
ผนังเซลล์ของพืชชั้นสูงจะประกอบด้วยโปรตีนร้อยละ 10 และอีกร้อยละ 90 จะเป็นสารประกอบพวกคาร์โบไฮเดรต ได้แก่ เซลลูโลส เพคติน เฮมิเซลลูโลส และสารเคลือบจำพวกลิกนิน (Hans-Walter, 2005) อัตราส่วนขององค์ประกอบแตกต่างกันตามแหล่งของวัตถุดิบ ชนิดและอายุของพืช โดยองค์ประกอบเหล่านี้ มีรายละเอียดของโครงสร้างแตกต่างกันดังนี้ (Hurst *et al.*, 2002)

4.1 เซลลูโลส (cellulose) เป็นสารประกอบโพลีแซคคาไรด์ ($[C_6H_{12}O_6]_n$) ประกอบด้วยหน่วยย่อยคือ D-glucose หรือ anhydroglucopyranose (ภาพที่ 4) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-1,4-glucosidic linkage มีจำนวนกลูโคส 2,000-14,000 หน่วย โครงสร้างของเซลลูโลสเรียกว่า ไฟบริล (fibril) แบ่งได้เป็นสองส่วน คือ

-ส่วนที่เป็นระเบียบ (crystalline) โครงสร้างจัดเรียงกันอย่างเป็นระเบียบเป็นผลึก มีเซลลูโลสเป็นจำนวนมากคิดเป็นร้อยละ 30-40 ของลิกโนเซลลูโลส

-ส่วนที่ไม่เป็นระเบียบ (amorphous) โครงสร้างจัดเรียงกันอย่างไม่เป็นระเบียบ รูปร่างไม่แน่นอน เป็นส่วนที่ดูดซับน้ำได้ดีสามารถย่อยสลายได้ง่ายกว่าส่วนที่เป็นผลึก

4.2 เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) เป็นสารประกอบโพลีแซคคาไรด์ที่มีน้ำหนักของโมเลกุลต่ำ ผนังเซลล์พืชมีเฮมิเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบประมาณร้อยละ 20-40 การแบ่งเฮมิเซลลูโลสขึ้นอยู่กับชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบหลัก คือ D-xylose, D-mannose, D-galactose และ L-arabinose เฮมิเซลลูโลสจึงมีชื่อเรียกแตกต่างกันตามกลุ่มของน้ำตาล เช่น ไซแลน (xylan), แมนแนน (mannan), กาแลกแทน (galactan) และอะราบิแนน (arabinan) ซึ่งในเซลล์พืชบกเฮมิ-เซลลูโลสที่พบมักเป็นกลุ่มของน้ำตาลไซโลส (Bastawde, 1992)



ภาพที่ 4 โครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลส
ที่มา : Klemm และคณะ (2005)

ลักษณะโครงสร้างของไซแลน

ไซแลนเป็น heterogeneous polysaccharides พบในเซลล์ของพืชบก เป็นเฮมิเซลลูโลสที่เป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์พืช ไซแลนประกอบด้วยน้ำตาล D-xylose ร้อยละ 85-93 ส่วนที่เหลือเป็นน้ำตาล L-arabinose และ glucuronic acid ไซแลนที่แยกได้จากพืชต่างๆ ล้วนแต่มีสายหลักของไซแลนที่เหมือนกันคือ พอลีเมอร์ของน้ำตาลไซโลส ซึ่งเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-1,4-D-xylopyranose (ภาพที่ 5) ความแตกต่างขึ้นอยู่กับประเภทและปริมาณของหน่วยย่อยที่มาต่อเป็นกิ่งก้าน เช่น glucuronic acid, น้ำตาล L-arabinose และ methylester ของ D-glucuronic acid

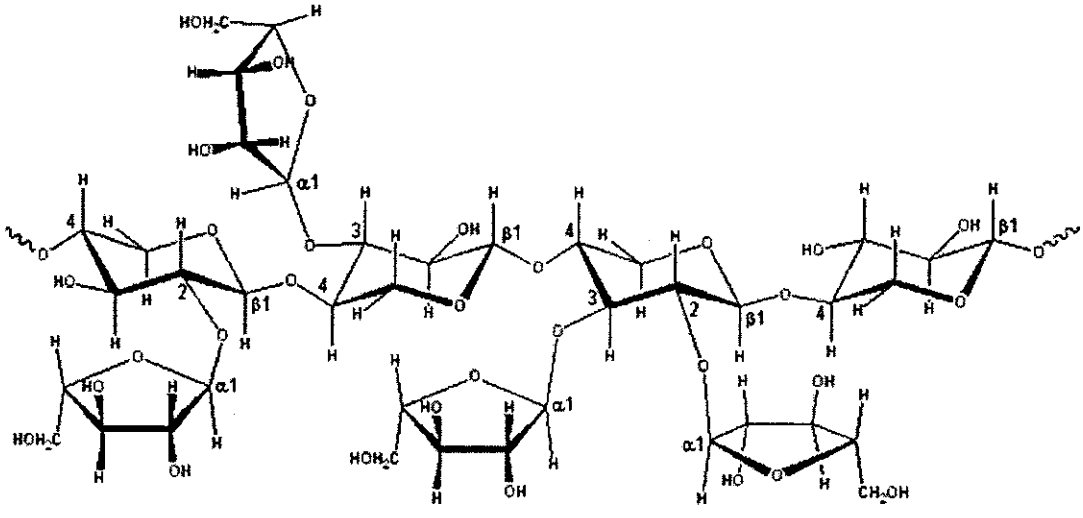
ในการแยกสกัดเฮมิเซลลูโลสออกจากลิกนินในพืชสามารถทำได้โดยทำปฏิกิริยากับด่าง เฮมิเซลลูโลสเพียงบางส่วนจากพืชถูกแยกสกัดได้โดยใช้ความร้อน หรือน้ำเย็น หรือด่างอ่อน โดยทั่วไปใช้ KOH หรือ NaOH ความเข้มข้นร้อยละ 4-10 จะมีประสิทธิภาพสูงสุดในการสกัด (หัสลินดา บินมะแอ, 2548)

คุณสมบัติของไซแลนโดยทั่วไปมีดังนี้

1. ไซแลนที่ไม่มีหมู่ acetyl จะไม่ละลายน้ำแต่ละลายในสารละลายด่าง และสลายด้วยกรดได้ง่าย

2. ไซแลนที่มีหมู่ acetyl สามารถถูกสกัดด้วยน้ำร้อน และละลายน้ำได้มาก

3. ไซแลนที่มีหมู่ acetyl ถูกย่อยสลายได้ง่ายโดย เอนไซม์จากจุลินทรีย์



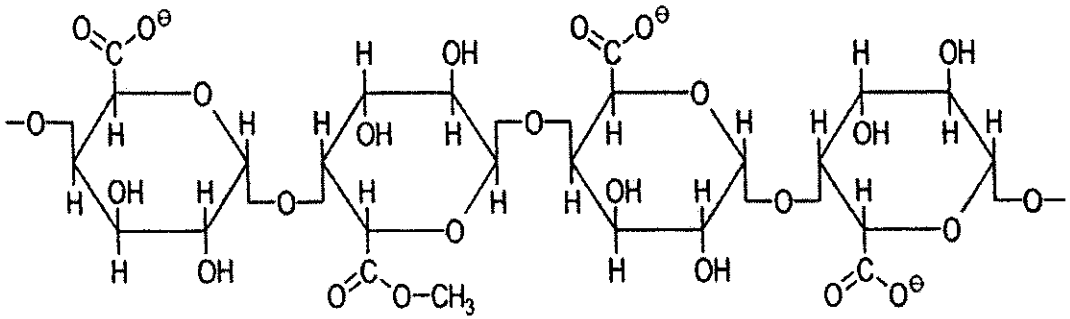
ภาพที่ 5 โครงสร้างทางเคมีของไซแลน

ที่มา : Hans-Walter (2005)

4.3 เพคติน (pectin) โดยทั่วไปเซลล์ของพืชจะมีสารประกอบประเภทเพคตินอยู่เป็นจำนวนมาก ซึ่งพบทั่วไปในผนังเซลล์พืชชั้นสูง ช่วยเพิ่มลักษณะคงตัวของเนื้อสัมผัส โดยในน้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม พบว่ามีปริมาณเพคติน 5.7 กรัมต่อลิตร (Barker *et al.*, 1981 อ้างโดย หัสลินดา บินมะแอ, 2548)

เพคตินเป็นกลุ่มสารพวก complex colloidal carbohydrates ในโมเลกุลประกอบด้วยกรดกาแลกทูโรนิก (galacturonic acid) ที่ต่อกันด้วยพันธะ α-1,4-glucosidic linkage (ภาพที่ 6) โดยที่ carboxyl group บางตัวของกรดกาแลกทูโรนิกถูก esterified ด้วย methyl groups เพคตินมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 40,000-50,000 ดาลตัล เพคตินเป็นสารพอลิเมอร์ของกรดกาแลกทูโรนิก โดย carboxyl groups ของกรดดังกล่าวจับกับ methyl groups หรือจับกับ arabinan, galactan หรือ polysaccharides ตัวอื่น ๆ ก็ได้ นอกจากนี้ hydroxyl groups บนอะตอมของคาร์บอนตัวที่ 2 และ 3 ของกรดดังกล่าวยังอาจจับกับ acetyl groups หรือเกิด ether-like linkages กับสาร

คาร์โบไฮเดรตกับตัวอื่น ๆ หรืออยู่เป็นอิสระก็ได้ ส่วน side chains ของเพคตินอาจเกิด ester linkages ระหว่าง carboxyl groups กับ hydroxyl groups ที่อยู่ปลาย polysaccharides กับ hydroxyl groups ของ polygalacturonides (นัยทัศน์ ภู่ศรัณย์, 2529)

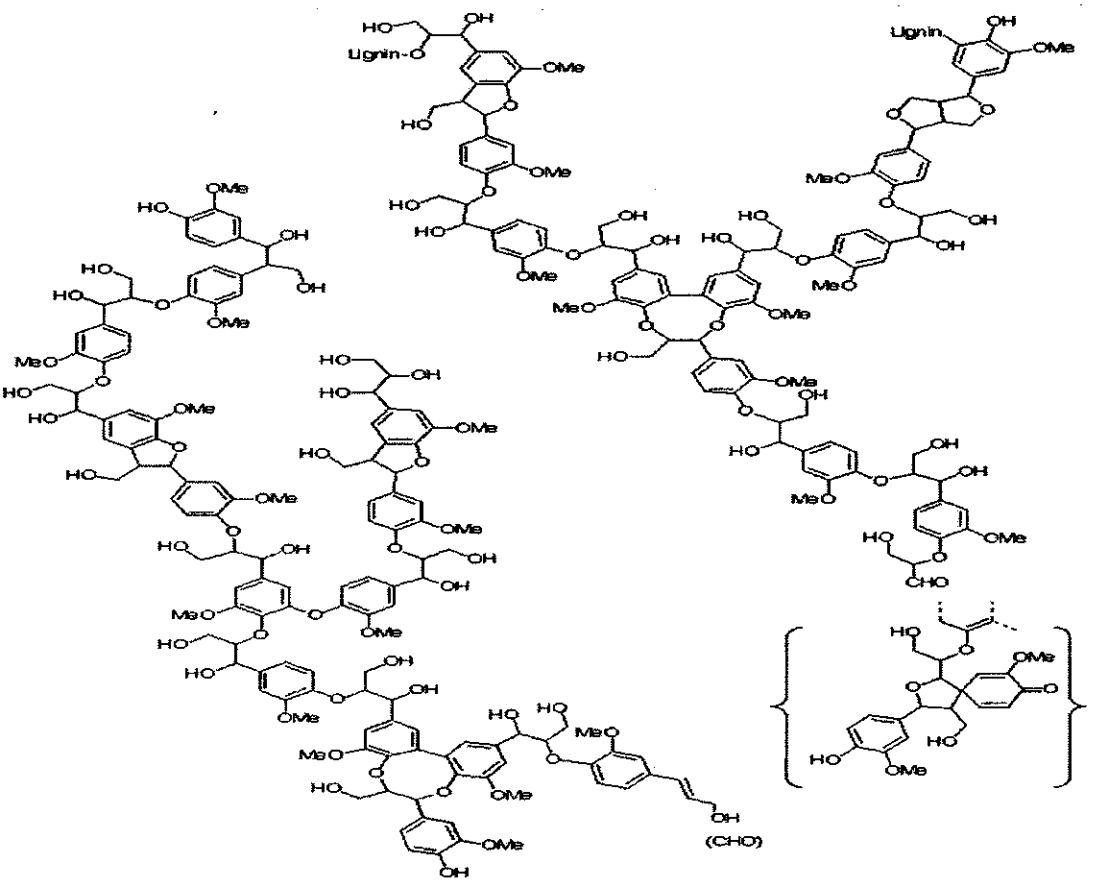


poly-α-1,4-D-Galacturonic acid, basic constituent of pectin

ภาพที่ 6 โครงสร้างทางเคมีของเพคติน

ที่มา : Hans-Walter (2005)

4.4 ลิกนิน (lignin) เป็นสารประกอบโพลีฟีนอลิก (polyphenolic compound) ที่มีโครงสร้างซับซ้อน เป็นพอลิเมอร์ของ p-hydroxy phenyl propane ที่มาจากการเชื่อมโยงขององค์ประกอบ 3 กลุ่มคือ coniferyl alcohol, sinapyl alcohol และ p-coumaryl alcohol พันธะที่พบภายในโครงสร้างหลักนั้นมีมากกว่า 10 ชนิด และพันธะที่สำคัญ คือ พันธะเอสเทอร์ (C-O-C) ซึ่งจะทนต่อการถูกย่อยสลายด้วยกรด นอกจากนี้ยังพบพันธะคาร์บอน (C-C) ซึ่งทนต่อการย่อยสลายด้วยกรดหรือด่างเป็นเหตุให้ลิกนินมีโครงสร้างที่แข็งแรง (ภาพที่ 7) ในเนื้อเยื่อไม้มีลิกนินเป็นองค์ประกอบร้อยละ 17-33 (Mohr, 1995)



ภาพที่ 7 โครงสร้างทางเคมีของลิกนิน

ที่มา : Mohr (1995)

5. กระบวนการผลิตน้ำมันปาล์ม

อุตสาหกรรมสกัดน้ำมันปาล์มในประเทศไทยมีกระบวนการผลิต 3 แบบ (ผาสุข กุลละวนิชย์ และคณะ, 2531)

5.1 กระบวนการผลิตแบบอบไอน้ำ ซึ่งเป็นแบบมาตรฐานมี 2 ลักษณะคือ แบบที่ใช้เครื่องแยกน้ำมันแบบ 3 เฟส ที่เรียกว่า decanter และแบบที่ใช้เครื่องแยกน้ำมันแบบ 2 เฟส ที่เรียกว่า separator ใช้ในโรงงานขนาดใหญ่และขนาดกลาง กระบวนการผลิตเริ่มจากการนำปาล์มทะลายสดมาอบด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิระหว่าง 120-130 องศาเซลเซียส ความดันประมาณ 40 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลาประมาณ 45 นาที มีน้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อเกิดขึ้น (เรียกว่าน้ำนึ่งปาล์ม) ทะลายปาล์มที่อบแล้วจะถูกนำไปป้อนเข้าเครื่องแยกผลปาล์ม ผลปาล์มที่ได้จะถูกนำไปย่อยด้วยเครื่องย่อยผลปาล์มซึ่งภายในมีใบพัดกวนผลปาล์มให้เส้นใยฉีกย่อยออกจากเมล็ดและเซลล์น้ำมันแตกตัวออกมา จากนั้นป้อนเข้าเครื่องหีบแบบเกลียวอัด (screw press) น้ำมันที่ได้จะถูกนำเข้าเครื่อง

decanter ซึ่งจะแยกน้ำมันออกจากน้ำ เศษเส้นใยและสิ่งเจือปน (กากสลัดจ์) บางโรงงานใช้เครื่อง separator ในการแยกน้ำมัน น้ำมันที่ได้จะนำเข้าเครื่องเหวี่ยงเพื่อแยกน้ำมันให้ใสสะอาดขึ้น จากนั้นนำไปไล่ความชื้นด้วยเครื่องดูดสุญญากาศ แล้วนำไปเก็บในถังเก็บน้ำมันขนาดใหญ่เพื่อเตรียมส่งจำหน่ายโรงงานสกัดน้ำมันบริสุทธิ์ต่อไป (พูนสุข ประเสริฐสรรพ์ และคณะ, 2533)

ส่วนกากผลปาล์มที่ออกจากเครื่องหีบแบบเกลียวอัดจะถูกนำมาแยกเอาเส้นใยออกจากเมล็ดด้วยเครื่องแยก โดยใช้แรงลมเป่าให้เส้นใยลอยไปตามท่อและใช้เป็นเชื้อเพลิงในเตาของหม้อกำเนิดไอน้ำ ส่วนเมล็ดที่แยกเส้นใยแล้วจะตกลงด้านล่างและถูกนำมาอบให้แห้ง จากนั้นนำไปคัดขนาดและกะเทาะเมล็ดด้วยเครื่องกะเทาะเมล็ด (ripple mill) แล้วนำไปแยกเศษกะลาออกจากเมล็ดในด้วยเครื่องแยกเศษกะลาแบบไฮโดรไซโคลนคือแยกด้วยแรงลม จากนั้นเมล็ดในก็จะถูกนำมาอบให้แห้งมีความชื้นไม่เกินร้อยละ 7 และบรรจุกระสอบจำหน่ายต่อไป

5.2 กระบวนการผลิตแบบย่างผลปาล์มหรือหีบน้ำมันผสม กระบวนการผลิตแบบนี้พัฒนามาจากโรงงานน้ำมันมะพร้าว ใช้ในโรงงานขนาดเล็ก จำนวนประมาณ 20 กว่าโรงงาน ส่วนใหญ่อยู่ในจังหวัดชุมพรและสงขลา กระบวนการผลิตเป็นแบบไม่ใช้น้ำ ผลปาล์มจะถูกนำมาอบโดยได้ความร้อนจากฟืนเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วผลปาล์มจะถูกส่งไปยังเครื่องหีบแบบเกลียวอัด ได้วัสดุเศษเหลือคือ กากปาล์มเพียงอย่างเดียว ซึ่งมีการซื้อขายเพื่อใช้เป็นส่วนผสมของอาหารสัตว์ ส่วนน้ำมันที่ได้ถูกทำให้ร้อน และผ่านเข้าเครื่องกรองแบบอัดหลายชั้น (filter press) เพื่อขจัดสิ่งสกปรกออก น้ำมันปาล์มดิบที่ได้เป็นน้ำมันผสมจากเปลือกและเมล็ดในซึ่งคุณภาพจะด้อยกว่าน้ำมันจากส่วนเปลือกเพียงอย่างเดียว (พูนสุข ประเสริฐสรรพ์ และคณะ, 2533)

5.3 กระบวนการผลิตแบบทอดผลปาล์ม เป็นเทคโนโลยีที่พัฒนาขึ้นที่ประเทศไทย ประมาณปี พ.ศ. 2522 ปัจจุบันมีโรงงานประเภทนี้ 2 โรงงาน กระบวนการผลิตสามารถใช้วัตถุดิบทั้งในรูปทะลายปาล์มสดและผลปาล์มร่วง วัตถุดิบพวกทะลายสดจะนำมาเข้าเครื่องอบทะลาย จากนั้นนำไปแยกผลปาล์มออกจากทะลายและถูกนำไปทอดในเกลียวลำเลียงด้วยน้ำมันปาล์มโดยใช้อุณหภูมิไม่เกิน 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-20 นาที โดยให้ความร้อนด้วยไอน้ำโดยรอบรางลำเลียงนี้ วัตถุดิบจำพวกผลปาล์มร่วงจะนำมาทอดตรงจุดนี้เช่นกัน จากนั้นผลปาล์มที่สุกแล้วจะถูกนำไปเข้าเครื่องหีบแบบเกลียวอัดคู่เช่นเดียวกับโรงงานประเภทแรก และนำน้ำมันที่หีบได้เอาไปไล่ความชื้นในสุญญากาศที่อุณหภูมิ 80-90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-60 นาที จากนั้นกรองผ่านเครื่องกรองแบบอัดหลายชั้น เพื่อแยกสิ่งสกปรกก่อนบรรจุลงถังเก็บ ส่วนกากผลปาล์มจะนำไปอบแห้งและหีบรวมกันเป็นน้ำมันผสมและได้กากปาล์มเป็นอาหารสัตว์ การผลิตน้ำมันจากผลปาล์มจะต้องนำผลปาล์มสดเข้าโรงงานเพื่อสกัดน้ำมันภายใน 24 ชั่วโมงหลังการเก็บ

เกี่ยว มิฉะนั้นจะเกิดกรดไขมันอิสระ (free fatty acid) ซึ่งสูงเกินค่ามาตรฐานคือร้อยละ 5 ทำให้น้ำมันมีคุณภาพต่ำไม่เหมาะที่จะนำไปใช้ในอุตสาหกรรมบางประเภท

6. ปริมาณและคุณลักษณะน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

องค์ประกอบของวัสดุเศษเหลือจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มแบบอบไอน้ำประกอบด้วยทะลายเปล่า เส้นใยปาล์ม กะลา กากเนื้อเมล็ดในปาล์ม และกากหรือตะกอนดีแคนเตอร์ สำหรับน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มก็จะมีคุณสมบัติแตกต่างกันขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของน้ำทิ้งและวิธีการสกัดน้ำมันปาล์ม สำหรับน้ำทิ้งจากการสกัดน้ำมันปาล์มโดยการนึ่งผลปาล์มจะประกอบด้วย น้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อ น้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์หรือเครื่องเซพาเรเตอร์ น้ำทิ้งจากบ่อรวบรวมน้ำเสีย และพูนสุข ประเสริฐสรรพ์และคณะ (2533) รายงานคุณลักษณะโดยรวมของน้ำทิ้งจากแหล่งต่าง ๆ เหล่านี้ไว้ในตารางที่ 1 ซึ่งจะเห็นว่าน้ำทิ้งจากบ่อรวบรวมน้ำเสียมีค่าบีโอดี ซีโอดี ของแข็งทั้งหมด ของแข็งแขวนลอยและกรีส ที่มีค่าเฉลี่ยสูงกว่าน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ หรือเครื่องเหวี่ยงและน้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อ เปรียบเทียบลักษณะโดยรวมของน้ำทิ้งในบ่อรวบรวมน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มดังตารางที่ 2 และองค์ประกอบทางเคมีของน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในตารางที่ 3

ตารางที่ 1 ลักษณะของน้ำทิ้งจากแหล่งต่าง ๆ ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

Parameter	First Pond	Wastewater from Sterilizer	Decanter
Color	Dark Brown	Brown	Brown-Black Brown
pH	4.34	5.10	4.75
BOD	57.38	32.39	23.74
COD	98.23	62.75	52.91
Volatile acid (as acetic acid)	4.50	4.06	2.06
Alkalinity (as $CaCO_3$)	0.13	0.81	0.28
Grease	1.22	0.56	0.05
Total solids (TS)	68.98	51.55	36.44
Volatile solids (VS)	61.97	46.03	31.34
Suspended solids (SS)	35.25	4.35	11.60
Nitrogen - ammonia	0.04	0.04	0.02
- organic	0.84	0.07	0.52

หมายเหตุ ทุกค่ามีหน่วยเป็นกรัมต่อลิตร ยกเว้นสีและพีเอช

ที่มา : พูนสุข ประเสริฐสรรพ์ และคณะ (2533)

ตารางที่ 2 ลักษณะของน้ำทิ้งจากบ่อรวบรวมน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยทั่วไป

pH	BOD ($g.l^{-1}$)	COD ($g.l^{-1}$)	TS ($g.l^{-1}$)	SS ($g.l^{-1}$)	O&G ($g.l^{-1}$)	TN ($g.l^{-1}$)	References
4.34	57.38	98.23	68.98	35.25	1.22	0.84	พูนสุข ประเสริฐสรรพ์ และคณะ (2533)
4.10	26.22	62.93	48.43	26.46	-	1.00	Ibrahim และคณะ (1984)
4.20	22.26	50.71	40.37	17.62	6.11	0.75	Ng และคณะ (1985)
4.10	21.25	34.72	46.19	21.17	-	0.41	Setiadi และคณะ (1996)
4.70	-	35.50	53.03	33.10	24.90	0.90	ปรีชา มุณีศรี (2539)
4.50	-	112.81	44.68	20.52	25.52	-	โสภา จันทภาโส (2542)
4.11	58.79	131.29	68.46	55.61	21.99	-	Laohaprapanon (2001)
4.50	58.50	110.00	71.90	43.30	25.60	0.90	Pechsuth และคณะ (2001)
4.35	54.56	90.40	65.36	45.92	34.31	0.83	Keawchai และ Prasertsan (2002)
4.70	25.00	50.00	10.50	18.00	4.00	0.75	Ahmad และคณะ (2003)
4.20	-	120.10	71.60	47.30	28.40	-	Laohaprapanon และคณะ(2005)
4.50	71.95	143.90	71.50	34.20	10.00	1.20	หัสลินดา บินมะแอ (2548)
3.50	24.71	59.30	-	17.26	-	0.69	Vijayaraghavan และ Ahmad (2006)
3.50	25.55	55.78	-	18.48	8.02	0.71	Vijayaraghavan และคณะ (2007)
-	38.15	85.75	38.50	10.25	9.45	0.88	O-Thong (2007)
4.05	22.70	44.30	-	19.78	4.85	0.78	Zinatizadeh และคณะ (2007)
4.35	20.00	83.50	23.75	9.5	8.35	1.08	รณชัย ไชยศรี (2550)
4.23	**37.64**	**80.54**	**51.66**	**27.86**	**15.19**	**0.84**	**ค่าเฉลี่ย**

หมายเหตุ TS = Total solids

SS = Suspended solids

O&G = Oil and grease

TN = Total nitrogen

ทุกค่ามีหน่วยเป็นกรัมต่อลิตร ยกเว้นสีและพีเอช

- ไม่ได้วิเคราะห์

ตารางที่ 3 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

Composition	Source		
	1	2	3
Ether extraction	-	31.60	34.60
Protein (N x 6.25)	0.37	8.20	8.8
Ash	-	14.10	14.20
Fiber	-	11.90	3.30
N-free extract	0.06	34.20	39.10
P	0.02	0.24	0.36
K	0.23	0.99	3.09
Ca	0.03	0.97	0.33
Mg	0.05	0.30	2.41
Na	0.003	0.08	0.05

หมายเหตุ ทุกค่ามีหน่วยเป็นร้อยละของน้ำหนักแห้ง

ที่มา 1. จารุวรรณ มณีศรี (2538)

2. Okiy (1987 อ้างโดยอารี กังแฮ, 2536)

3. Hwang และคณะ (1978)

7. การบำบัดน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

7.1 การบำบัดด้วยวิธีทางกายภาพและเคมี

การใช้วิธีการทางกายภาพและเคมีในการบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มนั้นมีได้หลายวิธี เช่น การใช้วิธีการตกตะกอนด้วยสารเคมี การใช้ความร้อน การกรองผ่านเยื่อกรอง (membrane ultrafiltration) (Wong *et. al.*, 2002) การเติมอากาศ การใช้กรด-ด่างในการย่อยสลาย เป็นต้น โดยอรัญ หันพงศ์กิตติกูล และคณะ (2537) ทดลองแยกน้ำมันจากน้ำทิ้งแหล่งต่าง ๆ ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ด้วยวิธีการต่าง ๆ พบว่าน้ำมันที่มีอยู่ในน้ำทิ้งจากหม้อนึ่งสามารถแยกได้ง่าย โดยตั้งทิ้งไว้ก็เกิดการแยกชั้น สำหรับตัวอย่างน้ำทิ้งจากเครื่องแยกหรือน้ำทิ้งจากบ่อพักน้ำทิ้งรวมไม่สามารถแยกน้ำมันออกได้ด้วยวิธีการตกจม (normal settling) การใช้ความร้อนพร้อมกับการกวนอย่างช้า ๆ (1.5 รอบต่อนาที) การใช้สารช่วยตกตะกอนเช่น $FeCl_3$, $Ca(OH)_2$ หรือ $Al_2(SO_4)_3$ การใช้วิธีเติมอากาศ (dissolved air flotation) ก็ไม่สามารถแยกน้ำมันออกจากน้ำทิ้งได้ ส่วนการหมุนเหวี่ยงสามารถแยกน้ำทิ้งออกเป็น 3 ชั้น โดยน้ำทิ้งจากเครื่องเซพาเรเตอร์ (separator) มีปริมาตรน้ำทิ้งชั้นบนร้อยละ 2-14 ชั้นกลางร้อยละ 57-77 และชั้นล่างร้อยละ 16-28 ในแต่ละชั้นมีปริมาณน้ำมันร้อยละ 1.09-1.37, 0.006-0.24 และ 4.00-5.64 ตามลำดับ สำหรับน้ำทิ้งจากบ่อน้ำทิ้งรวมเมื่อหมุนเหวี่ยงมีปริมาตรน้ำทิ้งชั้นบนร้อยละ 3-13 ชั้นกลางร้อยละ 60-79 และชั้นล่างร้อยละ 18-28 โดยในแต่ละชั้นมีปริมาณน้ำมันร้อยละ 1.67-2.64, 0.08-0.15 และ 3.41-4.97 ตามลำดับ การหมุนเหวี่ยงน้ำทิ้งจากเครื่องแยกน้ำมันจากบ่อน้ำทิ้งรวมสามารถแยกน้ำมันออกจากน้ำทิ้งร้อยละ 5-30 และทำให้น้ำทิ้งสุดท้ายมีค่าซีโอดีลดลงร้อยละ 50 และน้ำมันลดลงร้อยละ 85 นอกจากนี้วิธีการทางเคมีโดยการใช้สารช่วยตกตะกอน (โพลีเฟอริกซัลเฟตและแคลเซียมออกไซด์) ยังสามารถลดความเข้มสีได้ถึงร้อยละ 84.5 และยังช่วยลดปริมาณของสารอินทรีย์ในรูปของซีโอดีได้ร้อยละ 86.5 (พูนสุข ประเสริฐสรรพ์ และคณะ, 2533)

Laohaprapanon และคณะ (2005) เปรียบเทียบการใช้วิธีการทางกายภาพและเคมีในการแยกน้ำมันและกากน้ำมันปาล์มออกจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยวิธีต่าง ๆ คือใช้อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง การหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที และการใช้สารเคมี ($Ca(OH)_2$, $FeSO_4$ และ Alum) พบว่าการหมุนเหวี่ยงสามารถบำบัดน้ำทิ้งได้ดีที่สุด โดยสามารถลดค่าน้ำมันและกรีส ของแข็งแขวนลอย ของแข็งทั้งหมด และค่าซีโอดีได้ถึงร้อยละ 97.1, 95.4, 91.6 และ 94.2 ตามลำดับ

วิธีการทางกายภาพและเคมีเหล่านี้มีค่าใช้จ่ายที่ค่อนข้างสูงและการใช้แยกน้ำมันออกจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มได้ยากและยังอาจส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมตามมากรณีที่ใช้สารเคมี

7.2 การบำบัดด้วยวิธีทางชีวภาพโดยใช้จุลินทรีย์

การแยกน้ำมันด้วยวิธีการทางชีวภาพสามารถใช้จุลินทรีย์ ย่อยสลายสารอินทรีย์ต่าง ๆ ในน้ำเสีย มีรายงานการแยกหรือกำจัดน้ำมันในน้ำทิ้งโดยใช้วิธีการทางกายภาพร่วมกับวิธีทางชีวภาพ เช่น Okuda และคณะ (1991) บำบัดไลปิดที่มีอยู่ในน้ำเสียของโรงงานแปรรูปเนื้อ โดยวิธี 2 ขั้นตอนคือ บำบัดขั้นต้นโดยแยกไลปิดในน้ำทิ้งที่อยู่บริเวณผิวหน้าโดยอาศัยแรงดันอากาศจากปั๊มทำให้ไลปิดลอยตัว และทำให้เกิดการหมุนเวียนของน้ำทิ้งภายในถังบำบัด วิธีนี้สามารถกำจัดไลปิดได้ร้อยละ 76 (จากเดิม 252 พีพีเอ็มเหลือ 60 พีพีเอ็ม) จากนั้นนำมาบำบัดในขั้นที่ 2 โดยวิธี activated sludge ซึ่งมีการเติมเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ 351 พบว่าหลังให้อากาศ 24 ชั่วโมง ไลปิดลดลงเหลือ 9 พีพีเอ็ม หรือลดลงร้อยละ 96 ส่วน Ho และ Tan (1983) เปรียบเทียบการบำบัดน้ำทิ้งโรงงานน้ำมันปาล์มโดยใช้เครื่องหมุนเหวี่ยงและการบำบัดในถังหมักไร้อากาศ จากการใช้เครื่องหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกน้ำมันและอนุภาคต่าง ๆ ในน้ำทิ้งพบว่า การใช้ความเร็วในการหมุนเหวี่ยง 10,000 xg อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที สามารถลดค่า บีโอดี ของแข็งทั้งหมด ของแข็งแขวนลอยและน้ำมันร้อยละ 46, 40, 46 และ 50 ตามลำดับ และยังพบว่า อนุภาคต่าง ๆ โดยเฉพาะเซลล์ของผลปาล์มที่มีอยู่ปริมาณร้อยละ 1.7-2.6 ในน้ำทิ้งสามารถลดลงเหลือร้อยละ 0.32-0.37 ในขณะที่การบำบัดในถังหมักไร้อากาศสามารถลดค่าบีโอดี ซีโอดี ของแข็งทั้งหมด ของแข็งแขวนลอยและน้ำมัน ร้อยละ 96, 88, 82, 87 และ 98 ตามลำดับ โดยใช้เวลาในการบำบัด 20 วัน

Bentham และคณะ (1997) ทดลองเลี้ยงเชื้อ 8 สายพันธุ์ เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก 1 สายพันธุ์ และแบคทีเรียแกรมลบ 7 สายพันธุ์ เพื่อบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม พบว่า เมื่อเลี้ยงเชื้อไปได้ 10 วัน สามารถบำบัดไขมันในน้ำทิ้งได้ร้อยละ 40-50 แต่ Oswal และคณะ (2002) รายงานว่าการใช้เชื้อ *Barrowia lipolytica* สายพันธุ์ NCIM 3589 เพื่อบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมสามารถลดค่าซีโอดีได้มากถึงร้อยละ 95 ในเวลา 2 วัน ส่วน Beker และคณะ (1999) บำบัดน้ำมันมะกอกในน้ำทิ้งโดยใช้เชื้อ *Bacillus thermoleovorans* สายพันธุ์ IHI-91 ภายใต้สภาวะที่มีอากาศและอุณหภูมิสูง (65 องศาเซลเซียส) พบว่า สามารถบำบัดน้ำมันมะกอกในน้ำทิ้งได้มากกว่าร้อยละ 90 มีอัตราการย่อยสลาย 900 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

Keawchai และ Prasertsan (2002) เปรียบเทียบการใช้เชื้อ 3 สายพันธุ์ในการบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม คือ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ SM29, *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ WD90 และ *Enterobacter agglomerans* สายพันธุ์ SM38 พบว่าเชื้อ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ SM29 สามารถบำบัดน้ำทิ้งได้ดีที่สุด โดยลดค่าซีโอดี ของแข็งทั้งหมด และของแข็งแขวนลอยได้ถึงร้อยละ 88.60, 79.88 และ 84.49 ตามลำดับ ส่วน Najafpour และคณะ (2005) รายงานว่าการใช้

Saccharomyces cerevisiae ในการบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม พบว่าเชื้อสามารถลดค่าซีโอดีได้ถึงร้อยละ 88 ที่เวลาบ่ม 55 ชั่วโมง และลดค่าของแข็งแขวนลอยในน้ำทิ้งได้ร้อยละ 75-88

สำหรับเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการแยกหรือกำจัดน้ำมันและสารแขวนลอยได้แก่ เอนไซม์ไซลาเนสและเอนไซม์เซลลูเลส (จารุวรรณ มณีศรี, 2538) ซึ่งการที่เอนไซม์สามารถแยกสารแขวนลอยออกจากน้ำทิ้งได้เนื่องจากองค์ประกอบของน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ (decanter) มีเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสหรือไซแลนเป็นองค์ประกอบ โดยไซแลนจะมีทั้งส่วนที่ละลายน้ำและไม่ละลายน้ำ ไซแลนที่สามารถละลายน้ำได้เกิดจากการอบทะลายปาล์มด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 120 – 130 องศาเซลเซียสและอาจเกาะกับสายเซลลูโลสในลักษณะสารแขวนลอย ส่วนไซแลนที่ไม่ละลายน้ำซึ่งเกิดจากการตัดโครงสร้างด้านข้าง (side chain) ออกไปจากโครงสร้างหลัก (back bone) ของไซแลน เอนไซม์ไซลาเนสจะย่อยไซแลนที่ละลายน้ำและไซแลนที่เกาะอยู่ที่เส้นใย ส่วนเอนไซม์เซลลูเลสจะทำการย่อยโมเลกุลของเซลลูโลส ส่งผลให้สารแขวนลอยในน้ำทิ้งที่มีโมเลกุลของน้ำมันจับอยู่ถูกย่อยสลาย ส่วนของน้ำมันจึงถูกแยกออกจากสารแขวนลอยในน้ำทิ้ง สารแขวนลอยที่เหลือจากการย่อยด้วยเอนไซม์และส่วนของน้ำมันจะลอยเป็นตะกอนอยู่ด้านบน

จารุวรรณ มณีศรี (2538) รายงานว่าการใช้เอนไซม์ไซลาเนสและเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากเชื้อ *Aspergillus niger* สายพันธุ์ ATCC 6275 สามารถกำจัดน้ำมันและกรีสออกจากน้ำทิ้งได้มากถึงร้อยละ 99.00 ส่วน ปรีชา มุณีศรี (2539) รายงานว่าการบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยเชื้อราในสภาวะที่มีการเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน สามารถลดน้ำมันและกรีสที่มีอยู่ในน้ำทิ้งได้ร้อยละ 99.65 และค่าซีโอดีลดลงร้อยละ 65.54

โสภา จันทภาโส (2542) ศึกษาการใช้เอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจากเชื้อ *Aspergillus niger* สายพันธุ์ ATCC 6275 เพื่อแยกน้ำมันและสารแขวนลอยออกจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม พบว่าที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส พีเอชเท่ากับ 4.5 สามารถลดค่าซีโอดีและน้ำมันและกรีสในน้ำทิ้งได้ร้อยละ 35 และ 95 ตามลำดับ เช่นเดียวกับ พูนสุข ประเสริฐสรรพ์ และคณะ (2544) รายงานว่าค่าเหมาะสมของเอนไซม์ไซลาเนสต่อการแยกสารแขวนลอยและน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มคือ 200 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม (พีเอชเท่ากับ 5 อุณหภูมิ 40 – 60 องศาเซลเซียส ปริมาณน้ำมัน 15 กรัมต่อลิตร และใช้เวลา 3 ชั่วโมงในการแยก) พบว่าสามารถแยกสารแขวนลอยได้ปริมาตรตะกอนลอยร้อยละ 78 แยกน้ำมันและกรีสได้ร้อยละ 95 และลดค่าซีโอดีลงได้ร้อยละ 35 นอกจากนี้การศึกษาการใช้เอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสที่ผลิตได้จากเชื้อราที่ทนร้อนเพื่อบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มยังสามารถลดค่าของแข็งทั้งหมดได้ร้อยละ 52.97 และกำจัดน้ำมันและกรีสออกจากตะกอนได้ร้อยละ 98.66 (หัสลินดา บินมะแอ, 2548)

จิตรลดา กาญจนสาวิตรี และ ชญานุตม์ ศรีพิทักษ์ (2547) ศึกษาการใช้เอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสที่ผลิตได้จากเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ A2 ในการแยกน้ำมันออกจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม พบว่าสามารถลดน้ำมันในตะกอนและน้ำหนักแห้งของตะกอนได้มากขึ้นเมื่อใช้เวลาบ่มนานขึ้น ส่วน ซีหยัะ จันทอง และฮาราตี รอนิง (2548) รายงานว่าเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสที่ได้จาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ A2 สามารถลดน้ำหนักแห้งของตะกอนและน้ำมันในตะกอนได้สูงสุดร้อยละ 69.09 และ 32.83 ตามลำดับ

Laohaprapanon และคณะ (2007) ศึกษาการคัดเลือกจุลินทรีย์ทนร้อนที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสเพื่อใช้แยกน้ำมันจากน้ำเสียโรงงานน้ำมันปาล์ม พบว่าจุลินทรีย์ทนร้อนสายพันธุ์ SO1 และ SO2 คัดเลือกจากตัวอย่างดินใกล้กับบ่อบำบัดน้ำเสียโรงงานน้ำมันปาล์ม นำไปเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่มีการเติมคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส โดยจุลินทรีย์สายพันธุ์ SO1 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสสูงที่สุด 12.11 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ 50.98 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อผ่านการบ่ม 4 วัน ส่วนจุลินทรีย์สายพันธุ์ SO2 สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสสูงสุด 7.2 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ 20.42 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และเมื่อนำทั้งสองสายพันธุ์มาเลี้ยงในน้ำเสียที่ผ่านการฆ่าเชื้อเป็นเวลา 7 วัน พบว่าสายพันธุ์ SO1 สามารถลดปริมาณของน้ำมันและไขมันในชั้นล่างมากที่สุด คือ ทำให้น้ำหนักแห้งลดลง 64.66 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณน้ำมันในชั้นล่างสุดลดลงถึง 85.32 เปอร์เซ็นต์

8. เอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนส

8.1 เอนไซม์เซลลูเลส

วัสดุเศษเหลือจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มเป็นสารพวกลิกโนเซลลูโลสมีองค์ประกอบหลัก 3 ส่วนคือ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนิน เซลลูโลสเป็นสารโพลีแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วยโมเลกุลของกลูโคสต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะ β-D-1,4 glucosidic การย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลสทำได้ 2 วิธีคือ วิธีทางเคมีโดยการย่อยด้วยกรด และวิธีการใช้เอนไซม์ (Tsao and Chiang, 1983) การย่อยด้วยกรดเครื่องมือที่ใช้จะต้องทนทานต่อการกัดกร่อน นอกจากนี้ส่วนโมเลกุลของเซลลูโลสที่เป็นระเบียบ (crystalline) จะทนทานต่อกรดที่มีความเข้มข้นสูงและอุณหภูมิสูง และเนื่องจากปฏิกิริยาการใช้กรดไม่เฉพาะเจาะจง กลูโคสบางส่วนที่เกิดขึ้นและสารประกอบอื่นที่ติดมากับเซลลูโลสจะทำปฏิกิริยากับกรดต่อไปทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการ ส่วนการใช้เอนไซม์ซึ่งเป็นวิธีการทางชีวเคมีที่มีความจำเพาะเจาะจง ดังนั้นการใช้เอนไซม์ย่อยสลายจึงได้น้ำตาลกลูโคสที่ค่อนข้างบริสุทธิ์

เอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสได้แก่เอนไซม์เซลลูเลส (1,4-β-D-glucan glucanohydrolase (EC 3.2.1.4)) ซึ่งเป็นกลุ่มเอนไซม์ (multiple enzyme) ที่ประกอบด้วยเอนไซม์ 3 ชนิด ได้แก่ (Fan and Lee, 1983 อ้างโดยจารุวรรณ มณีศรี, 2538)

1. Endo-1,4-β-D-glucanase (CMCase (EC. 3.2.1.4)) ทำหน้าที่ย่อยโมเลกุลของเซลลูโลสทั้งในรูปที่เป็นระเบียบ และไม่เป็นระเบียบรวมทั้งโมเลกุลของ cellooligomer ที่ตำแหน่ง β-1,4 แบบสุ่มทำให้ได้ oligomer และเซลโลไบโอส

2. Exo-1,4-β-D-glucanase (FPase (EC. 3.2.1.91)) หรือ 1,4-β-D-glucan cellobiohydrolase (CBH) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ร่วมกับเอนไซม์ endo-β-1,4-glucanase ในการย่อยโมเลกุลของเซลลูโลสโดยย่อยจากปลายด้าน non-reducing ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายส่วนใหญ่คือน้ำตาลเซลโลไบโอส

3. β-D-Glucoside glucanohydrolase (cellobiase (EC. 3.2.21)) ทำหน้าที่ย่อยโมเลกุลของเซลโลไบโอส และ cellooligosaccharide ให้เป็นกลูโคส

8.2 เอนไซม์ไซลาเนส

เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลส ถูกเรียกรวมๆกันว่า เฮมิเซลลูเลส (hemicellulase) หรือ glucanhydrolase ซึ่งแบ่งย่อยออกเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ตัดอย่างจำเพาะตามชนิดของ substrate คือ L-arabinase ย่อยสลายเฉพาะพันธะ (1,3) และพันธะ (1,5)-2-L-arabino-furanosyl แล้วให้น้ำตาล L-arabinose ออกมา เอนไซม์ D-galactanase ย่อยสลายเฉพาะ galactan และน้ำตาล L-arabino-D-galactan เอนไซม์ D-mannanase เป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายพันธะ β-(1,4)-D-mannanopyranosyl ของน้ำตาล D-mannan และเอนไซม์ β-xylanase ตัดพันธะ β-(1,4)-D-xylopyranosyl ของไซแลน (Bastawde , 1992)

การย่อยไซแลน ให้ได้เป็นหน่วยย่อยที่เล็กที่สุด พบว่านอกจากสายหลักที่เป็นไซโลสต่อกันด้วยพันธะ β-(1,4)-D-xylopyranosyl แล้วยังต้องมีเอนไซม์อื่นอีกหลายประเภทเข้ามาเกี่ยวข้องเพื่อที่จะทำหน้าที่ย่อยกิ่งก้านซึ่งมีความหลากหลายหรือแม้แต่สายหลักที่อาจมีพันธะเป็น β-(1,2) , β-(1,3) หรือ β-(1,4) ได้ (Suto *et al.*, 2002) เอนไซม์แต่ละชนิดล้วนมีความแตกต่างและเฉพาะเจาะจงต่อหน่วยย่อยและพันธะที่เชื่อมซึ่งสามารถแบ่งเอนไซม์ตามลำดับขั้นตอนการทำงานดังนี้

1. เอนไซม์ย่อยกิ่งก้าน

Suto และคณะ (2002) พบว่า ไซแลนจากพืชจะเป็นแบบพอลิเมอร์ประกอบด้วยไซโลสเชื่อมต่อด้วยพันธะ β-(1,4) และสามารถปรับเปลี่ยนโครงสร้างได้โดยจะมีหมู่ acetyl group, arabinofuranosyl group หรือ glucuronic group เอนไซม์ที่มีหน้าที่ตัดหน่วยย่อยที่เป็นกิ่งก้าน จากการศึกษาพบว่าเอนไซม์ที่จะทำหน้าที่ย่อยสายหลักไม่สามารถทำงานได้หากไม่มีการตัดกิ่งก้านออก

ดังนั้นการย่อย จึงเริ่มต้นด้วยการตัดหน่วยย่อยของกิ่งก้านออกโดยเอนไซม์ต่อไปนี้ acetyl esterase, L-arabinofuranosidase และ glucuronidase

2. เอนไซม์ย่อยสายหลัก

เมื่อกิ่งก้านถูกกำจัดหมดสายหลักก็จะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ 3 ชนิด คือ

2.1 Endo-1,4-β-D-xylan xylanohydrolase (EC. 3.2.1.8) หรือ endo-xylanase ซึ่งทำหน้าที่ย่อยพันธะ β-(1,4) ที่อยู่ภายในสายหลักแบบสุ่มได้ xylo-oligosaccharides มีขนาดต่างกันหลายชนิด

2.2 Exo-1,4-β-D-xylanase หรือ exo-xylanase ย่อยสายไซแลน และไซโลโอลิโกแซคคาร์ไรด์ให้เป็นหน่วยย่อยจากด้านที่เป็น non-reducing end แล้วให้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลไซโลส

2.3 β-D-xyloside xylohydrolase (EC. 3.2.1.37) หรือ β-xylosidase มีหน้าที่ย่อยไดแซคคาร์ไรด์ซึ่งเป็นผลิตผลจากการทำงานของ endo-xylanase และ exo-xylanase ได้น้ำตาลไซโลส

การให้ความร้อนหรือการใช้ไอน้ำอุณหภูมิ 120 – 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาทีจนถึง 2 ชั่วโมง จะทำให้ไซแลนและไซโลสซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของเฮมิเซลลูโลสละลายน้ำเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 80 (จารุวรรณ มณีศรี, 2538)

9. ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสของเชื้อจุลินทรีย์

9.1 แหล่งคาร์บอน

Bacillus เป็นเซลล์รูปท่อนขนาด 0.3-2.2 x 1.2-7.0 ไมโครเมตร ส่วนใหญ่สามารถเคลื่อนที่ได้ ติดสีแกรมบวก ต้องการอากาศในการเจริญ บางชนิดอาจใช้ไนเตรท มีการหมัก (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2539) มีรายงานการศึกษาการใช้เชื้อ *Bacillus* ในการบำบัดวัสดุเศษเหลือจากอุตสาหกรรมดังเช่น Kulkarni และ Rao (1996) ทดลองเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ NCIM59 เพื่อบำบัดกากชานอ้อย พบว่าที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เชื้อผลิตเอนไซม์มาบำบัดได้กว่าร้อยละ 50 ส่วน Shah และคณะ (1999) ทดลองเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ Sam-3 โดยใช้ wheat straw, wheat bran และ rice straw ในปริมาณร้อยละ 3 เลี้ยงเชื้อ พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อไปได้ 48 ชั่วโมง *Bacillus* sp. สายพันธุ์ Sam-3 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดเท่ากับ 132 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในอาหารจาก wheat bran ส่วน Gessesse และ Mamo (1999) เลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ AR-009 พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อในกลูโคสและซูโครส จะให้ปริมาณเอนไซม์ไซลาเนสมากถึงร้อยละ 78 และ 74 ตามลำดับ

จิตรลดา กาญจนสาวิตรี และ ชญานุตม์ ศรีพิทักษ์ (2547) ทดลองใช้เชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ A2 ในการแยกน้ำมันออกจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มพบว่าเชื้อสามารถลดสาร

สำนักหอสมุดกลาง มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

แขวนลอยและน้ำมันในตะกอนได้ถึงร้อยละ 38.28 และ 40.67 ตามลำดับ เช่นเดียวกับ ซีหยี๊ะ จันทอง และฮาราตี รอนิง (2548) ทดลองใช้เชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ A2 ในการแยกน้ำมันออกจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม พบว่าสามารถแยกน้ำมันออกจากตะกอนได้สูงสุดร้อยละ 32.83

มีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยใช้เซลลูโลสในธรรมชาติ เช่น ฟางข้าวสาลี (Doppelbauer, *et al.*, 1987) กากชานอ้อย (Kawamori, *et al.*, 1986) เศษกระดาษหนังสือพิมพ์ (Chen and Wayman, 1991) และน้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อโรงงานปาล์มน้ำมัน (เบญจวรรณ ชิตมณี, 2534) ซึ่งชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนก็มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ของเชื้อจุลินทรีย์ด้วย โดย Pham และคณะ (1998) พบว่าแหล่งคาร์บอนที่ทำให้เชื้อ *Bacillus polymyxa* สายพันธุ์ CTET153 ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้มากที่สุดคือ corn-cobs ส่วน xylan brich wood, wheat straw และ xylan:mannose (1:1) ให้ผลในการผลิตเอนไซม์ได้ไม่ต่างกัน

Shah และคณะ (1999) ทดลองใช้แหล่งคาร์บอนจาก wheat straw, wheat bran และ rice straw ในปริมาณร้อยละ 3 เพื่อผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ Sam-3 พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อไปได้ 48 ชั่วโมง *Bacillus* sp. สายพันธุ์ Sam-3 วัดกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสด้วยวิธี DNS method (Bernfeld, 1955) ซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดเท่ากับ 132 IU/ml (International units per milliliter) ในแหล่งคาร์บอนจาก wheat bran จากนั้นทดลองเลี้ยงเชื้อโดยใช้ปริมาณของไซแลนต่าง ๆ กันคือร้อยละ 0.05, 1.00 และ 1.50 ตามลำดับ พบว่าเชื้อมีกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุด 117 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่ร้อยละ 1.50 ไซแลน ส่วน Gessesse และ Mamo (1999) ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ AR-009 พบว่าเมื่อใช้กลูโคส และซูโครสร้อยละ 5 (ปริมาตรต่อน้ำหนัก) เป็นแหล่งคาร์บอน จะผลิตเอนไซม์ไซลาเนสมากถึงร้อยละ 78 และ 74 ตามลำดับ ต่างจากการใช้ไซโลสและแลกโตสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ให้ปริมาณเอนไซม์ไซลาเนสเพียงร้อยละ 16-23 แต่ Virupakshi และคณะ (2005) รายงานว่าการใช้ไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ JB-99 จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดเท่ากับ 1045 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ต่างจากการใช้กลูโคส และซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสเพียง 800 และ 865 ยูนิตต่อมิลลิลิตรตามลำดับ

9.2 แหล่งไนโตรเจน

Joglekar และ Karanth (1984) กล่าวว่าการเพิ่มความเข้มข้นไนโตรเจนอินทรีย์จะทำให้ค่ากิจกรรมของเซลลูเลสเพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นสูงขึ้นถึง 1.0-1.2 กรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตามการเพิ่มไนโตรเจนเป็นการเพิ่มต้นทุน และไนโตรเจนมากกว่า 2 กรัมต่อลิตร จะเพิ่มปัญหาคือ ทำให้ค่าพีเอชของอาหารเพิ่มขึ้นค่อนข้างสูงซึ่งไม่เหมาะในการผลิตเอนไซม์ ซึ่ง Pham

และคณะ (1998) รายงานการศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อ *Bacillus polymyxa* สายพันธุ์ CTET153 พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะแก่การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ไซลาเนส คือ ยีสต์สกัด

Gessesse และ Mamo (1999) ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจน (peptone, yeast extract และ tryptone) ต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส ในเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ AR-009 พบว่ามีการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติม yeast extract, tryptone และ peptone ตามลำดับ แต่ Shah และคณะ (1999) พบว่าการใช้ soy bean milk เป็นแหล่งไนโตรเจนจะให้การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ดีกว่าการเติม yeast extract แต่ Virupakshi และคณะ (2005) รายงานว่าการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ JB-99 ในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนจาก yeast extract และ beef extract จะทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสเพิ่มขึ้น

9.3 อุณหภูมิ

ระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างเอนไซม์ของจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะต่างกัน ในระหว่างการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์จะมีความร้อนเกิดขึ้นและถ่ายเทลงสู่อาหารทำให้อุณหภูมิสูงขึ้นจนถึงระดับหนึ่งที่จุลินทรีย์ไม่สามารถดำเนินกิจกรรมต่อไปได้ และการสร้างโปรตีนของเซลล์จะทำให้อุณหภูมิสูงขึ้น ซึ่งเกิดจากเมทาบอลิซึมของจุลินทรีย์ ดังนั้นในกระบวนการหมักต่าง ๆ จึงต้องควบคุมอุณหภูมิให้เหมาะสม

Gomes และคณะ (1992) รายงานถึงระดับความเหมาะสมของอุณหภูมิต่อการผลิต filter paper cellulase (FPase), ไซลาเนส และ β-glucosidase โดยใช้เชื้อ *Trichoderma viride* สายพันธุ์ BT2169 พบว่าจะมีการสังเคราะห์ FPase, ไซลาเนส และ β-glucosidase สูงสุดที่อุณหภูมิ 32.40, 34.70 และ 31.10 องศาเซลเซียสตามลำดับ แต่ Krishna (1999) ทดลองผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ CBTK106 พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์คือ 35 องศาเซลเซียส

Kulkarni และ Rao (1996) ทดลองเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ NCIM59 เพื่อให้ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากกากชานอ้อย พบว่าที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เชื้อผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้มากกว่าร้อยละ 50 ส่วน Archana และ Satyarayana (1997) รายงานการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus licheniformis* สายพันธุ์ A99 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ คือ 20, 37, 45, 50 และ 55 องศาเซลเซียส เพื่อผลิตเอนไซม์ไซลาเนส พบว่าที่อุณหภูมิ 45 และ 50 องศาเซลเซียส เชื้อผลิตเอนไซม์ได้ไม่ต่างกัน แต่ Shah และคณะ (1999); Sa-Pereira และคณะ (2002); Heck และคณะ (2005) รายงานว่าอุณหภูมิที่เหมาะแก่การเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* คือ 60 องศาเซลเซียส และหากเพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้น การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจะลดลง

Pham และคณะ (1998) รายงานว่าเชื้อ *Bacillus polymyxa* สองสายพันธุ์คือ สายพันธุ์ CECT และ สายพันธุ์ 6319T มีการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ดีที่อุณหภูมิต่างกัน โดยสายพันธุ์ CECT ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสดีที่ 40 องศาเซลเซียส ส่วนสายพันธุ์ 6319T ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสดีที่ 50 องศาเซลเซียส

Mawadza และคณะ (2000) รายงานว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อ *Bacillus* sp. สองสายพันธุ์คือ สายพันธุ์ CH43 และ HR68 คือ อุณหภูมิเท่ากับ 65 และ 70 องศาเซลเซียสตามลำดับ ส่วน Virupakshi และคณะ (2005) ศึกษาผลของอุณหภูมิในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ JB-99 ที่อุณหภูมิ 20, 30, 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส พบว่า เชื้อผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกับ Poorna และ Prema (2006) ที่ทำการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus pumilus* เพื่อผลิตเอนไซม์ไซลาเนสที่อุณหภูมิ 40-65 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดที่ 50 องศาเซลเซียส

Sa-Pereira และคณะ (2002) เลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* เพื่อผลิตเอนไซม์ไซลาเนส พบว่าเชื้อมีการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกับ Heck และคณะ (2005) ที่เลี้ยงเชื้อ *Bacillus coagulans* สายพันธุ์ BL69 โดยพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส ของเชื้อคือ 60 องศาเซลเซียส ส่วน Virupakshi และคณะ (2005) ทำการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ JB-99 เพื่อผลิตเอนไซม์ไซลาเนส พบว่าเชื้อผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้สูงสุดจากการเลี้ยงในอาหารไซโลสโดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสเท่ากับ 1045 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

9.4 พีเอช

พีเอชมีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์และการทำงานของเอนไซม์ พีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกัน การหมักในระยะแรกพีเอชของการเลี้ยงเชื้อจะเหมาะต่อการเจริญของเชื้อ แต่ระหว่างการหมักค่าพีเอชอาจมีการเปลี่ยนแปลงซึ่งอาจเกิดจากการย่อยสลายโปรตีนและสารประกอบไนโตรเจนทำให้มีการปลดปล่อยแอมโมเนียหรือสารที่เป็นด่างอื่น ๆ ออกมาหรือมีการย่อยสลายสารประกอบคาร์โบไฮเดรตเกิดกรดอินทรีย์เป็นผลให้พีเอชไม่เหมาะสมต่อการเจริญ ดังนั้นการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์จึงต้องมีการเติมสารที่มีคุณสมบัติเป็นบัฟเฟอร์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อควบคุมให้พีเอชในอาหารเปลี่ยนแปลงอย่างช้า ๆ โดยบัฟเฟอร์จะไปรวมตัวกับกรดหรือด่างป้องกันไม่ให้ปล่อย H^+ หรือ OH^- ออกมา (อารี กังแฮ, 2536) แต่สำหรับการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อรานั้น ค่าพีเอชที่เป็นกรดจะทำให้มีการผลิตเอนไซม์ได้มากยิ่งขึ้น (Mandels and Weber, 1969) การควบคุมพีเอชสามารถทำได้ทั้งในอาหารเหลวและอาหารแข็งแต่ไม่

เป็นที่นิยมทำในอาหารแข็งมากนัก (Lonsane *et al.*, 1985) การควบคุมพีเอชในช่วงของการหมักมักใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนมากกว่าเกลือแอมโมเนีย (Lonsane *et al.*, 1992)

Pham และคณะ (1998) ทำการหาค่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมที่สุดในการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus polymyxa* สองสายพันธุ์คือ สายพันธุ์ CECT และ สายพันธุ์ 6319T เพื่อผลิตเอนไซม์ไซลาเนส พบว่าพีเอชที่เหมาะสมพีเอชเท่ากับ 7 และ 5 ตามลำดับ แต่ Mawadza และคณะ (2000) พบว่าเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ CH43 และสายพันธุ์ HR68 จะมีการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ดีที่พีเอชช่วง 6-8

Nath และ Rao (2001) ศึกษาผลของพีเอชต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อ *Bacillus* sp สายพันธุ์ NCIM59 โดยเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีช่วงของพีเอช 5-10 พบว่าเชื้อเจริญได้ดีที่พีเอชเท่ากับ 6 เช่นเดียวกันกับ Sa-Pereira และคณะ (2002) พบว่าเชื้อ *Bacillus subtilis* มีการเจริญได้ที่พีเอช 5-8 แต่เชื้อมีการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้สูงสุดที่พีเอชเท่ากับ 6 ต่างจาก Shah และคณะ (1999) ซึ่งรายงานว่าพีเอชที่เหมาะในการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ SAM-3 คือพีเอชเท่ากับ 8

Heck และคณะ (2005) รายงานว่าเชื้อ *Bacillus coagulans* สายพันธุ์ BL69 จะผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้สูงสุดที่พีเอชเท่ากับ 7 เช่นเดียวกันกับ Krishna (1999) ที่รายงานว่าเชื้อ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ CBTK106 ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีที่สุดที่พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7

Salvador และคณะ (2002) ศึกษาการผลิตเอนไซม์เพื่อย่อยสลายซากเปลือกผลไม้จากเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ M4 พบว่าที่พีเอชเท่ากับ 7 เชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ M4 ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสเท่ากับ 0.3 และ 11 ยูนิตต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ส่น Poorna และ Prema (2006) รายงานว่าเชื้อ *Bacillus pumilus* ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อจากรำข้าวสาลี โดยผลิตเอนไซม์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชเท่ากับ 8 และผลิตเอนไซม์ได้เท่ากับ 430 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

9.5 การให้อากาศและการกวน

การเจริญของจุลินทรีย์และกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่มีการเปลี่ยนวัตถุดิบหรือสารอาหารไปเป็นผลิตภัณฑ์อาจขึ้นอยู่กับสภาวะมีอากาศหรือไร้อากาศ โดยทั่วไปการหมักเพื่อผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสเป็นกระบวนการหมักที่ต้องการอากาศ วิธีการที่จะทำให้จุลินทรีย์ได้รับอากาศเพียงพอ ทำได้โดยการให้อากาศระหว่างการหมัก ซึ่งต้องควบคุมให้พอเหมาะกับการเจริญของจุลินทรีย์ จะมากน้อยเพียงใดขึ้นกับชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ จำนวนรอบของการเขย่าหรือกวน และปริมาตรของสารอาหารต่อปริมาตรของถังหมัก

Pham และคณะ (1998) ศึกษาผลของการกวนและการให้อากาศต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส จากเชื้อ *Bacillus* sp. I-1018 พบว่าการให้อากาศเป็นปัจจัยที่สำคัญมากต่ออัตรา

การเจริญและการผลิตเอนไซม์ การที่มีสภาวะของปริมาณออกซิเจนที่จำกัดจะต้องไม่ต่ำกว่า 1.5 V.V.M และการเพิ่มอัตราการกวนและให้อากาศจะสามารถส่งเสริมการผลิตเอนไซม์ได้

Bin Amwarali Khan และ Husaini (2006) ศึกษาการเพิ่มการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะไมเลสและเซลลูเลสบน Sago Pith Residue โดยใช้ *Bacillus amyloliquefaciens* UMAS 1002 พบว่าการผลิตเอนไซม์โดยมีการเขย่าเพิ่มการให้อากาศสามารถเพิ่มการผลิตเอนไซม์ได้ โดยสามารถผลิตเอนไซม์ได้ 2.97 IU/ml เปรียบเทียบกับการไม่เขย่าให้อากาศเท่ากับ 1.38 IU/ml และสามารถผลิตเอนไซม์ที่มีกิจกรรมสูงสุด 2.97 และ 2.89 IU/ml ในสภาวะที่มีการกวน 100 และ 200 รอบต่อนาที ตามลำดับ

Taleb และคณะ (2009) ศึกษาปัจจัยของอาหารและสภาวะแวดล้อมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Bacillus alcalophilus* S39 and *Bacillus amyloliquefaciens* C23 พบว่าเชื้อทั้งสองสามารถผลิตเอนไซม์เพิ่มขึ้นตามการเขย่าให้อากาศที่มากขึ้น ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่มีกิจกรรมสูงที่สุด 3.5 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่เวลา 72 ชั่วโมง

9.6 ปริมาณเชื้อเริ่มต้น

ปริมาณเชื้อที่เหมาะสมจะทำให้จุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เพราะมีความสมดุลระหว่างปริมาณสารตั้งต้นและเอนไซม์ที่ผลิตได้ การบ่มเชื้อให้มีปริมาณที่เหมาะสมจะทำให้สามารถลดต้นทุนที่จะใช้ในการผลิตเชื้อเริ่มต้นลงได้อย่างมาก

Archana และ Satyanarayana (1997) ทำการหาปริมาณเชื้อเริ่มต้นของ *Bacillus licheniformis* ในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส โดยใช้เชื้อเริ่มต้นร้อยละ 5, 10, 15 และ 20 พบว่าที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 15 จะมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด เช่นเดียวกับ Krishna (1999) ที่หาปริมาณเชื้อเริ่มต้นของ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ CBTK106 ในปริมาณร้อยละ 5, 10, 15 และ 20 ตามลำดับ เพื่อผลิตเอนไซม์เซลลูเลส พบว่าปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 15 เหมาะแก่การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสมากที่สุด

Virupakshi และคณะ (2005) ศึกษาผลของปริมาณเชื้อเริ่มต้นของ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ JB-99 ในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส โดยใช้เชื้อเริ่มต้นร้อยละ 5, 10, 15 และ 20 และบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าปริมาณเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ JB-99 เริ่มต้นร้อยละ 10 จะสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด เช่นเดียวกันกับ Poorna และ Prema (2006) ทำการหาปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมของเชื้อ *Bacillus pumilus* ในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสให้ได้สูงที่สุด โดยเตรียมเชื้อเริ่มต้นที่ร้อยละ 2.5, 5, 7.5 และ 10 พบว่าเชื้อมีการผลิตเอนไซม์ได้ดีเมื่อเตรียมเชื้อเริ่มต้นที่ร้อยละ 10

วัตถุประสงค์การทดลอง

1) เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดย *Bacillus subtilis* A2 ในอาหารสังเคราะห์

2) เพื่อศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์เซลลูเลส ที่ผลิตโดย *Bacillus subtilis* A2 ในสภาวะที่เป็นเอนไซม์หยาบ (crude enzyme)

3) เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการใช้เอนไซม์หยาบในการแยกน้ำมันจากน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

4) เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการใช้ *Bacillus subtilis* A2 ในการแยกน้ำมันจากน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* A2

2. สามารถแยกสารแขวนลอยและน้ำมันออกจากน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มได้อย่างมีประสิทธิภาพ

3. สามารถทำการศึกษาการขยายขนาดการทดลองเพื่อแยกสารแขวนลอยและน้ำมันออกจากน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ได้

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์

1. วัสดุ

1. แบคทีเรียที่แยกได้จากดินคือ *Bacillus subtilis* A2 เป็นเชื้อที่คัดเลือกจากตัวอย่างดินข้างบ่อบำบัดน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันพืชบริสุทธิ์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ CMC broth ซึ่งประกอบด้วย $CaCl_2$ 0.3 กรัม, $MgSO_4.7H_2O$ 0.3 กรัม, KH_2PO_4 1.0 กรัม, K_2HPO_4 1.0 กรัม, พอลิเปปโตน 2.0 กรัม, ยีสต์สกัด 1.0 กรัม, NH_4NO_3 4.4 กรัม และ CMC 10 กรัม ในน้ำปริมาตร 1 ลิตร
3. สารละลายไซแลนเข้มข้นร้อยละ 1.0 ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์
4. สารละลายคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสเข้มข้นร้อยละ 1.0 ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์
5. ฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 7.0
6. สารละลาย Dinitrosalicylic acid (DNS)
7. แหล่งคาร์บอนประกอบด้วย โมลาส, น้ำตาลกลูโคส และ CMC
8. แหล่งไนโตรเจนประกอบด้วย NH_4NO_3, $NH_4H_2PO_4$, $(NH_4)_2SO_4$, พอลิเปปโตน(polypeptone) และยีสต์สกัด (yeast extract)

2. อุปกรณ์

1. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ ยี่ห้อ Tomy รุ่น SS-325
2. ตู้อบลมร้อน ยี่ห้อ Sanyo รุ่น MOV 212
3. เครื่องชั่งละเอียด 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ A&D รุ่น HF-1200
4. เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Sartorius รุ่น BP210s
5. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) ยี่ห้อ Orion รุ่น 420A
6. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ Memmert รุ่น W350
7. เครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ Hitachi รุ่น SCR20B
8. เครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิแบบตั้งโต๊ะ ยี่ห้อ Eppendorf Centrifuge รุ่น 5415R
9. ตู้ปลอดเชื้อ ยี่ห้อ Hotpack รุ่น 527044

10. เครื่องเขย่า eppendrof ยี่ห้อ TAITEC รุ่น MBR-022UP

วิธีการวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนส

1.1 วิธีวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

โดยทำการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีการ Dinitrosalicylic acid ของ Miller (1959) (Robertson *et al.*, 2001)

ดูดส่วนใสที่ได้จากการหมุนเหวี่ยงเอาเซลล์ออก ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรผสมกับสารละลาย CMC 1.0 เปอร์เซ็นต์ หรือ Xylan 1.0 เปอร์เซ็นต์ ที่ละลายใน PBS พีเอช 7.5 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรใส่ใน microcentrifuge tube จากนั้นนำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 850 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเพื่อยับยั้งปฏิกิริยาเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นดูดตัวอย่างที่ได้จากการทำปฏิกิริยาปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาดเล็ก จากนั้นเติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (DNS) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าผสมให้เข้ากัน นำไปต้มที่น้ำเดือด เป็นเวลา 30 นาที แล้วทำให้เย็นทันที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตรแล้วนำค่าที่ได้มาแทนค่าในสมการมาตรฐานเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์นำค่าที่ได้ไปวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและและเอนไซม์ไซลาเนส

1.2 การคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเป็นหน่วยของเอนไซม์

กำหนดให้ 1 ยูนิต หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาย่อยสลายสับสเตรทให้เป็นกลูโคสหรือไซโลส 1 ไมโครโมลในเวลา 1 นาที โดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์ (Units/ml)} = \frac{CD}{MtV}$$

C คือ ปริมาณน้ำตาลกลูโคสหรือไซโลสโดยเทียบจากกราฟมาตรฐาน

D คือ ค่าการเจือจางตัวอย่างของเอนไซม์

M คือ น้ำหนักโมเลกุลของกลูโคสและไซโลส เท่ากับ 180.16 และ 150.13 กรัมต่อโมล

t คือ ระยะเวลาบ่ม (30 นาที)

V คือ ปริมาตรของเอนไซม์

2. การวัดการเจริญของเชื้อ

ตรวจวัดการเจริญของเชื้อโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร สำหรับตัวอย่างที่มีสีเข้มจะใช้การเก็บตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสเก็บไว้วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ ล้างตะกอนเซลล์ 2 ครั้ง ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ละลายตะกอนก่อนนำไปวัดค่าดูดกลืนแสง โดยใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์เป็นแบลงค์

3. การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของเอนไซม์ใช้วิธี Lowry และคณะ (1951) โดยใช้ bovine serum albumin (BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐาน

4. การหาปริมาณน้ำมันและกรีสในน้ำทิ้ง (ดัดแปลงจาก กรรณิการ์ สิริหิงห์, 2522)

นำกระดาษกรองวางใน buchner funnel แล้วเทสาร Diatomaceous-silica filter ที่เตรียมไว้ 100 มิลลิลิตร ใช้เครื่องดูดสุญญากาศดูด ล้างด้วยน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร จนกระทั่งแห้ง กรองตัวอย่างที่เตรียมไว้ แล้วดูดให้แห้ง ใช้ปากคีบกระดาษกรองออกมา ม้วนกระดาษกรองเข้าด้วยกัน แล้วห่อด้วยผ้าขาวบาง นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ใส่ตัวอย่างลงในซอคเลต เติมสารตัวทำละลายปิโตรเลียมอีเทอร์ ลงในขวดสกัดไขมัน 150 มิลลิลิตร แล้ววางบนเตาประกอบอุปกรณ์สกัด พร้อมทั้งน้ำหล่ออุปกรณ์ควบแน่น แล้วเปิดสวิทซ์ให้ความร้อน ใช้เวลาในการสกัด 4 ชั่วโมง เมื่อครบแล้ว กลั่นเก็บสารละลายจนเหลือสารละลายในขวดสกัดเพียงเล็กน้อย นำตัวอย่างที่ใส่ในหลอดใส่ตัวอย่างออกจากซอคเลต นำขวดสกัดนั้นไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส จนแห้งใช้เวลาประมาณ 30 นาที ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนัก

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณของกรีสหรือน้ำมัน (มิลลิกรัม/ลิตร)} = \frac{\text{น้ำหนักของสารที่สกัดได้} \times 1000}{\text{มิลลิกรัมของตัวอย่าง}}$$

วิธีการวิจัย

1. การหาสภาวะการเจริญและการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดย *Bacillus subtilis* A2 ในอาหารสังเคราะห์

1.1 การเตรียมเชื้อเริ่มต้น

นำเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 จากกลีเซอรอล 200 ไมโครลิตร มา streak บนอาหารแข็ง CMC และเลือกโคโลนีเดี่ยวๆ มาเลี้ยงในอาหาร CMC broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างเพื่อนำมาวัดการเจริญโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

1.2 การศึกษาการเจริญและการผลิตเซลลูเลสโดย *Bacillus subtilis* A2

นำเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 มาเลี้ยงใน CMC broth 50 มิลลิลิตร โดยมีเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่ 0, 6, 12, 24 และ 36 ชั่วโมง วัดการเจริญโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสโดยใช้ CMC เป็นสับสเตรท

1.3 ผลของแหล่งคาร์บอน

ใช้แหล่งคาร์บอน คือ CMC โมลาสและน้ำตาลกลูโคส 1.0 เปอร์เซ็นต์แทน CMC ในอาหาร CMC broth แล้วเพาะเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 ในอาหารดังกล่าวปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใน ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น จากนั้นถ่ายเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 ลงในอาหารที่มี CMC โมลาสและน้ำตาลกลูโคส 1.0 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตรในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 6, 12, 24, และ36 ชั่วโมง แล้ววัดการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร นำตัวอย่างที่เวลาต่างๆ ไปเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วเก็บส่วนใสไปวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส

1.4 ผลของแหล่งไนโตรเจน

ใช้แหล่งคาร์บอนจากข้อ 1.3 และใช้แหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้นรวมปริมาณ 0.1 เปอร์เซ็นต์ คือ NH_4NO_3, $NH_4H_2PO_4$, $(NH_4)_2SO_4$, พอลิเปปโตน, ยีสต์สกัด, ยีสต์สกัด+NH_4NO_3,

ยีสต์สกัด+$NH_4H_2PO_4$, ยีสต์สกัด+$(NH_4)_2SO_4$ และยีสต์สกัด+พอลิเปปโตน+NH_4NO_3 ในอาหาร CMC broth แล้วเพาะเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 แล้วเพาะเลี้ยง และติดตามการเจริญ และเก็บตัวอย่างวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสเช่นเดียวกับข้อ 1.3

1.5 ผลของพีเอช

ใช้อาหารที่เลือกจากข้อ 1.4 เลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 ในอาหารดังกล่าวปริมาตร 50 มิลลิลิตรในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น จากนั้นถ่ายเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในอาหารที่ปรับพีเอชเป็น 4.5, 5.5, 7.5 และอาหารที่ไม่ปรับพีเอช (พีเอช 6) แล้วติดตามการเจริญ และเก็บตัวอย่างวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสเช่นเดียวกับข้อ 1.3

1.6 ผลของอุณหภูมิ

ใช้อาหารที่เลือกจากข้อ 1.5 เลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในอาหารที่คัดเลือกจากได้ข้อ 1.5 ปริมาตร 45 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30, 45 และ 55 องศาเซลเซียส แล้วติดตามการเจริญ และเก็บตัวอย่างวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสเช่นเดียวกับข้อ 1.3

2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานและความคงตัวของเอนไซม์หยาบ

2.1 การทำบริสุทธิ์ขั้นต้นของเอนไซม์เซลลูเลสหยาบ

การตกตะกอนน้ำหมักที่เป็นส่วนใสจากการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต, อะซิโตน และเอทานอล แล้วเก็บตะกอนไปวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส เลือกสารตกตะกอนที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดไปตกตะกอนเอนไซม์ได้เป็นเอนไซม์หยาบ (crude enzyme) เพื่อใช้ในการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์

การตกตะกอนน้ำหมักโดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 80 เปอร์เซ็นต์ โดยนำน้ำหมักที่ได้ไปตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเติมแอมโมเนียมซัลเฟตที่ละน้อยจนหมดและมีการกวน จากนั้นวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การตกตะกอนน้ำหมักโดยใช้อะซิโตนและเอทานอลโดยใช้น้ำหมักต่ออะซิโตนหรือเอทานอลในอัตราส่วน 1:3 นำอะซิโตนหรือเอทานอลไปวางไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนน้ำหมักนำไปวางไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำน้ำหมักและอะซิ

โตนหรือเอทานอลมาผสมให้เข้ากันโดยทำที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

นำตะกอนที่ได้จากตัวตกตะกอนทั้ง 3 วิธี ไปเหวี่ยงแยกที่ความเร็วรอบ 9000 รอบต่อนาที 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ตะกอนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยอะซิโตนหรือเอทานอล วางทิ้งไว้เพื่อระเหยอะซิโตนหรือเอทานอลออกโดยวางที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ชะตะกอนที่ได้ด้วยฟอสเฟตบัพเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ โดยเจือจางเอนไซม์หยาบที่ได้ด้วยฟอสเฟตบัพเฟอร์ในอัตราส่วนที่เหมาะสม นำเอนไซม์หยาบที่เจือจางแล้วนำไปวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเพื่อยับยั้งปฏิกิริยาเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นดูดตัวอย่างที่ได้จากการทำปฏิกิริยาปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรใสในหลอดทดลองขนาดเล็ก เติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (DNS) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าผสมให้เข้ากัน นำไปต้มที่น้ำเดือดเป็นเวลา 30 นาที แล้วทำให้เย็นทันที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร

2.2 ศึกษาผลของพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสหยาบ

โดยวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมธิลเซลลูเลสในสารละลายบัฟเฟอร์ต่างชนิดกัน ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ที่มีพีเอชต่างๆ คือ พีเอช 4.0, 5.0 และ 6.0 โดยใช้ซิเตรตบัฟเฟอร์ และพีเอช 7.0 และ 8.0 โดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ นำเอนไซม์หยาบที่ได้จากการตกตะกอนด้วยตัวตกตะกอนที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.1 มาเจือจางด้วยบัฟเฟอร์ที่พีเอชต่างๆ ในอัตราส่วนที่เหมาะสม จากนั้นนำไปวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส

2.3 ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสหยาบ

โดยวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ที่ย่อยคาร์บอกซีเมธิลเซลลูโลส ที่อุณหภูมิ 37, 45, 55 และ 60 องศาเซลเซียส นำเอนไซม์หยาบที่มีค่ากิจกรรมสูงสุดที่พีเอชที่เหมาะสมจากข้อ 2.2 มาเจือจางด้วยบัฟเฟอร์ที่พีเอชที่เหมาะสมจากข้อ 2.2 ในอัตราส่วนที่เหมาะสม จากนั้นนำไปวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส

2.4 ศึกษาผลของความคงตัวต่อพีเอชของเอนไซม์เซลลูเลสหยาบ

โดยบ่มเอนไซม์เซลลูเลสในสารละลายบัฟเฟอร์ต่างชนิดกัน ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ที่มีพีเอชต่างๆ คือ 4.0, 5.0 และ 6.0 โดยใช้ซิเตรตบัฟเฟอร์ และพีเอช 7.0 และ 8.0 โดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ นำเอนไซม์หยาบที่ได้จากการตกตะกอนด้วยตัวตกตะกอนที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.1 มาเจือจางด้วยบัฟเฟอร์ที่พีเอชต่างๆ ในอัตราส่วนที่เหมาะสม นำเอนไซม์หยาบที่เจือจางแล้วไปบ่มที่

อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 1, 3 และ 6 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส

2.5 ศึกษาผลของความคงตัวต่ออุณหภูมิของเอนไซม์เซลลูเลสหยาบ

โดยบ่มเอนไซม์คาร์บอกซีเมธิลเซลลูเลสที่อุณหภูมิ 37, 45, 55, และ 60 องศาเซลเซียส นำเอนไซม์หยาบที่ได้จากการตกตะกอนด้วยตัวตกตะกอนที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.1 มาเจือจางด้วยบัฟเฟอร์ที่พีเอช 5.0 ในอัตราส่วนที่เหมาะสม นำเอนไซม์หยาบที่เจือจางแล้วไปบ่มที่อุณหภูมิ 37, 45, 55 และ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 1, 3 และ 6 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส

3. การแยกน้ำมันจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* A2

3.1 การแยกน้ำมันจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสจากส่วนใส

นำน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม 35 มิลลิลิตร เติมด้วยเอนไซม์เซลลูเลสจากส่วนใสของการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 ซึ่งส่วนใสมีกิจกรรมเซลลูเลส 0.32 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 15 มิลลิตร (ชุดควบคุมเติมน้ำกลั่น 15 มิลลิลิตร) ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37, 45 และ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการณ์การแยกชั้นและการเกิดตะกอน แล้วเก็บตัวอย่างไปวิเคราะห์หาน้ำหนักตะกอนและปริมาณน้ำมันในตะกอน โดยนำส่วนผสมที่ได้ไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาทีอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสออก นำตะกอนที่ได้ไปอบที่ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักตะกอนแห้ง จากนั้นนำตะกอนแห้งไปหาปริมาณน้ำมันด้วยวิธีการสกัดโดยซอคเลต (ดัดแปลงจาก กรรณิการ์ สิริหิงห์, 2522)

3.2 การแยกน้ำมันจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสหยาบ

นำน้ำทิ้งดีแคนเตอร์จากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม 5 มิลลิลิตร เติมด้วยเอนไซม์เซลลูเลสหยาบจากเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 ซึ่งผ่านการตกตะกอนด้วยสารตกตะกอนที่เหมาะสมโดยเอนไซม์ที่มีกิจกรรม 15 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิตร (ชุดควบคุมเติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร) ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เก็บที่เวลา 0, 1 และ 2 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ชั่งน้ำหนักตะกอนแห้ง จากนั้นนำตะกอนแห้งไปหาปริมาณน้ำมันด้วยวิธีการสกัดโดยซอคเลต (ดัดแปลงจาก กรรณิการ์ สิริหิงห์, 2522) นำไปชั่งหาน้ำหนักหาปริมาณน้ำมันในตะกอน

3.3 การแยกน้ำมันจากน้ำทิ้งดีแคนเตอร์จากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* A2

นำน้ำทิ้งดีแคนเตอร์จากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม 45 มิลลิลิตร โดยทำการทดลอง 3 ชุด ดังนี้ ชุดแรกเป็นชุดควบคุมโดยเติมอาหารที่ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ ชุดที่สองเติมส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 และชุดที่สามเติมอาหารที่มีเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในกระบอกตวงปริมาตร 50 มิลลิลิตร ทำชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อเชื้อจุลินทรีย์ (45 องศาเซลเซียส) บ่มเป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง สังเกตการแยกชั้นและการเกิดตะกอน แล้วเก็บตัวอย่างไปวิเคราะห์หาน้ำหนักตะกอนและปริมาณน้ำมันในตะกอน โดยนำส่วนผสมที่ได้ไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาทีอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสออก นำตะกอนที่ได้ไปอบที่ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักตะกอนแห้ง จากนั้นนำตะกอนที่แห้งแล้วมาใส่ในผ้าขาวบางเพื่อหาปริมาณน้ำมันด้วยวิธีการสกัดโดยซอคเลต(ดัดแปลงจาก กรรณิการ์ สิริหิงห์, 2522)

4. ศึกษาการใช้เชื้อ *Bacillus subtilis* A2 ในการเจริญและแยกน้ำทิ้ง

4.1 ผลของเวลา

โดยเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อตามสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสตามวิธีวิจัยข้อ 1 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น จากนั้นถ่ายเชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์ ลงในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเท่ากับ 6.0 ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง นำไปวัดค่าพีเอช น้ำมันในน้ำทิ้ง น้ำหนักตะกอน และปริมาณน้ำมันในตะกอน โดยชุดควบคุมจะไม่เติมเชื้อ

4.2 ผลของการเจือจางน้ำต่อการแยกน้ำมันในน้ำทิ้ง ศึกษาการเลี้ยง *Bacillus subtilis* A2ในน้ำทิ้งที่ทำการเจือจางน้ำทิ้งต่อน้ำกลั่นอัตราส่วน 1:0, 1:1, 1:2 และ 1:3

4.3 ผลของแหล่งคาร์บอน โดยเลี้ยงเชื้อในน้ำทิ้งที่ได้จากสภาวะในข้อที่ 4.2 โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดจากข้อ 1.3 ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

4.4 ผลของแหล่งไนโตรเจน เลี้ยงเชื้อในน้ำทิ้งโดยใส่แหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดตามข้อ 1.4 ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

4.5 ผลการฆ่าเชื้อ โดยเปรียบเทียบการเลี้ยงเชื้อในน้ำทิ้งจากข้อ 4.4 โดยใช้น้ำทิ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อและไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ

5. ศึกษาการแยกน้ำมันจากน้ำทิ้งที่โรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

เลือกสภาวะที่เหมาะสมที่ดีสุดในการแยกน้ำมันจากน้ำทิ้งโดยใช้เอนไซม์ตามข้อ 3.2 หรือการใช้เชื้อ *Bacillus subtilis* A2 ข้อ 4.5 นำไปทดลองที่โรงงานในขนาด 20 ลิตร และ 100 ลิตร

บทที่ 3

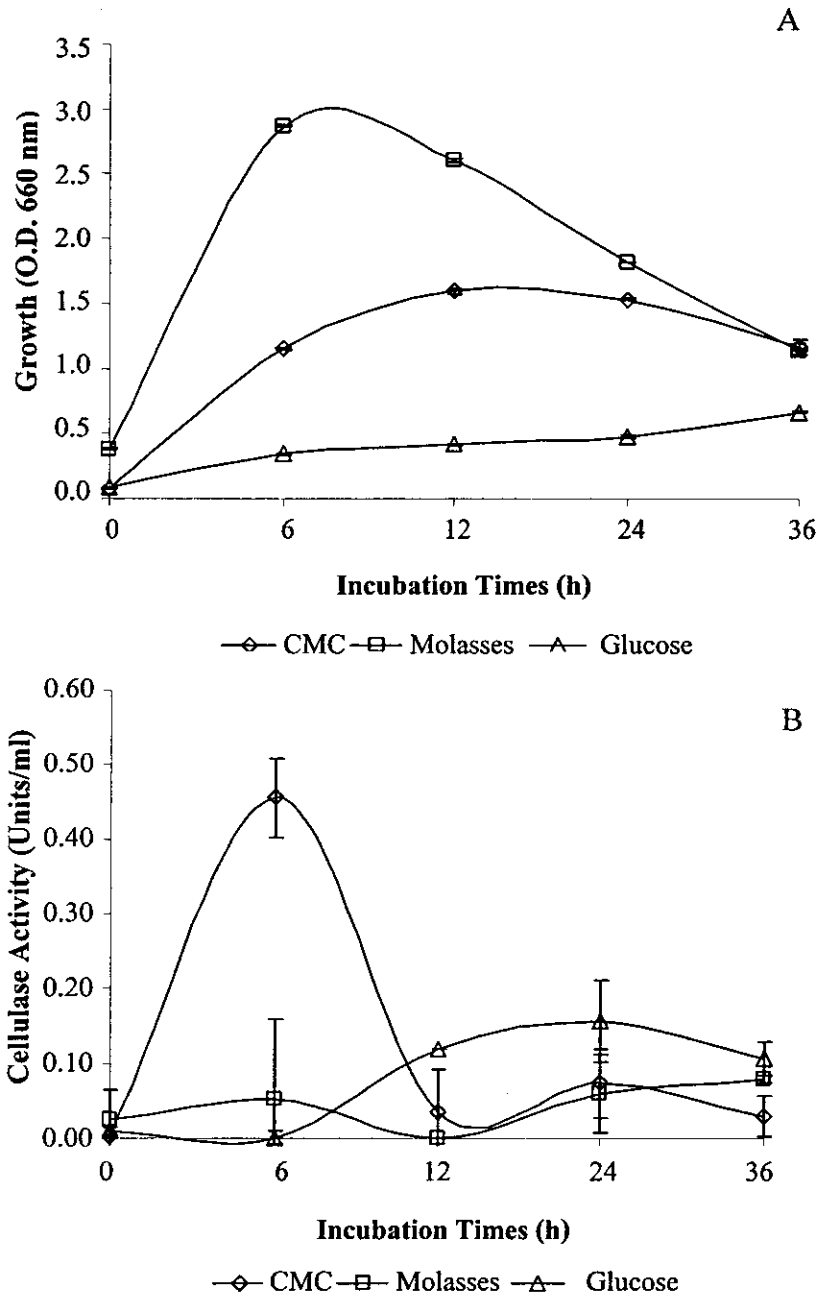
ผลการทดลองและวิจารณ์

1. สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Bacillus subtilis* A2

1.1 ผลของแหล่งคาร์บอน

จากการศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 โดยใช้แหล่งคาร์บอน 3 ชนิด คือ CMC โมลาส และกลูโคส ปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 มีการเจริญได้ดีที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานที่มีโมลาส 1 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน รองลงมา คือ อาหารพื้นฐานที่มี CMC และ กลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอน ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 8A โดยในอาหารพื้นฐานที่มีโมลาสมีค่าการเจริญของเชื้อ เมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เจริญได้ดีที่สุดเวลา 6 ชั่วโมง มีค่าความขุ่น 2.7 และเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นการเจริญของเชื้อจะลดลงที่เวลา 36 ชั่วโมง ซึ่งสามารถวัดความขุ่นได้ 1.2 ส่วนในอาหารพื้นฐานที่มี CMC เป็นแหล่งคาร์บอน มีการเจริญของเชื้อรองลงมา โดยพบว่าเชื้อสามารถเจริญสูงสุดที่เวลา 12 ชั่วโมง วัดความขุ่นได้ 1.5 และเมื่อเวลาผ่านไปมีการเจริญลดลงเล็กน้อย และในอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ามีการเจริญของเชื้อต่ำที่สุด โดยเจริญสูงสุดที่เวลา 36 ชั่วโมง และสามารถวัดค่าความขุ่นได้ 0.6

การผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ผลดังภาพที่ 8 B พบว่าเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีในอาหารพื้นฐานที่มี 1 เปอร์เซ็นต์ CMC เป็นแหล่งคาร์บอน โดยสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงที่สุดที่เวลา 6 ชั่วโมง มีกิจกรรมเท่ากับ 0.45 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รองลงมา คือ อาหารพื้นฐานที่มีกลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงสุดที่ 24 ชั่วโมง โดยมีกิจกรรม 0.15 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และอาหารพื้นฐานที่มีโมลาส 1 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน มีกิจกรรมสูงสุดที่ 36 ชั่วโมง โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 0.10 ยูนิตต่อมิลลิลิตร จะเห็นได้ว่าเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีในอาหารที่มีสับสเตรทที่เป็นเซลลูโลส แต่ก็สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้เองในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสหรือโมลาสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ในปริมาณที่น้อยกว่า ทั้งนี้ในโมลาสประกอบไปด้วยน้ำตาลหลายชนิด ได้แก่ น้ำตาลซูโครส 40 เปอร์เซ็นต์ กลูโคส 9 เปอร์เซ็นต์ ฟรุกโตส 12 เปอร์เซ็นต์ (Teclu *et al.*, 2009) ซึ่งเป็นอาหารที่มีความสมบูรณ์มากทำให้เชื้อมีการเจริญดีแต่ก็ผลิตเอนไซม์ได้น้อย ทั้งนี้เชื้ออาจไม่มีความจำเป็นต้องผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและการที่มีน้ำตาลปริมาณมากเกินไปส่งผลต่อกระบวนการ



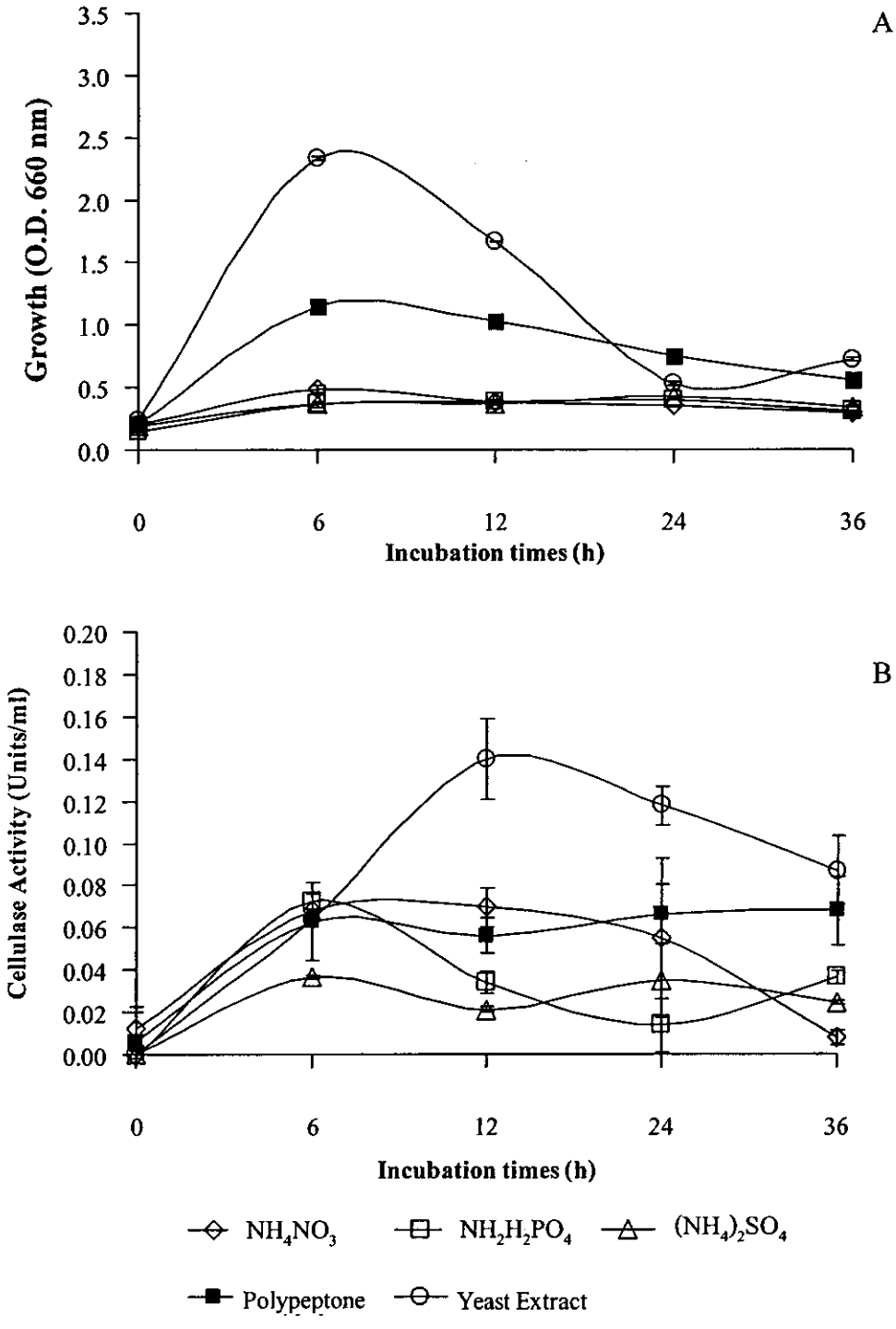
ภาพที่ 8 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญ (A) และการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (B) ของเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 (ในอาหารพื้นฐานที่มีแหล่งคาร์บอนปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่ 45 องศาเซลเซียส เขย่า 200 รอบต่อนาที)

ผลิตเอนไซม์ของเซลล์ เชื้ออาจต้องอาศัยการเหนี่ยวนำจากสับสเตรทในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส อีกทั้งการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 อยู่ในช่วง log phase ดังการศึกษาของ Taleb และคณะ (2009) ได้ศึกษาปัจจัยของแหล่งอาหารและสภาวะที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Bacillus alcalophilus* และ *Bacillus amyloliquefaciens* พบว่าเชื้อผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดในอาหารที่มี CMC เป็นแหล่งคาร์บอนโดยมีกิจกรรม 1.88 และ 1.81 ยูนิตต่อมิลลิลิตร แต่ให้การเจริญที่น้อยกว่าอาหารที่มีน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน เนื่องจากน้ำตาลเป็นแหล่งอาหารที่ใช้ง่าย จึงทำให้เชื้อเจริญได้ดี และปริมาณของ CMC ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสอยู่ที่ 1 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับ Narasimha (2006); Niranjane (2007) ได้ให้ความเห็นว่าการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสสามารถถูกเหนี่ยวนำได้ดีในอาหารที่มี CMC เป็นแหล่งคาร์บอน

1.2 ผลของแหล่งไนโตรเจน

การศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 โดยใช้อาหารพื้นฐานที่มี CMC 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนและมีแหล่งไนโตรเจน ดังนี้ NH_4NO_3, $NH_4H_2PO_4$, $(NH_4)_2SO_4$, พอลิเปปโตน และยีสต์สกัด ปริมาณ 0.1 เปอร์เซ็นต์ (% Total N) ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 9A พบว่าเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 สามารถเจริญได้ดีที่สุดในอาหารพื้นฐานที่มียีสต์สกัด ปริมาณ 0.1 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งเมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร มีค่าความขุ่นเท่ากับ 2.34 ที่เวลา 6 ชั่วโมง รองลงมาเป็นอาหารพื้นฐานที่มีพอลิเปปโตน, NH_4NO_3, $(NH_4)_2SO_4$ และ $NH_4H_2PO_4$เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยมีค่าความขุ่นเท่ากับ 1.16, 0.49, 0.37 และ 0.36 ที่เวลา 6 ชั่วโมง และทุกชุดการทดลองมีการเจริญของเชื้อลดลงเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น จากผลการเจริญของเชื้อเห็นได้ว่าเชื้อสามารถใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ได้ดีกว่าไนโตรเจนอนินทรีย์ ซึ่งแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์จะมีอะมิโนหรือเปปไทด์ผสมที่สกัดได้จากแหล่งต่างๆ และการที่ยีสต์สกัดสามารถทำให้เชื้อ *Bacillus subtilis* A2 เจริญได้ดีที่สุด เนื่องจากยีสต์สกัดมีองค์ประกอบเป็นอินทรีย์ไนโตรเจนที่สกัดได้จากเซลล์ยีสต์ แล้วยังมีวิตามินต่างๆ ที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของเชื้ออีกด้วย

ส่วนการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากอาหารพื้นฐานที่มีแหล่งไนโตรเจนต่างๆ กันของเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 9B พบว่าเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงที่สุดในอาหารพื้นฐานที่มียีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนเท่ากับ 0.14 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 12 ชั่วโมง รองลงมาเป็นอาหารพื้นฐานที่มี $NH_4H_2PO_4$ และ NH_4NO_3 สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่มีกิจกรรม 0.07 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่ 6 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง ในอาหารพื้นฐานมีพอลิเปปโตน ตามลำดับ ส่วนอาหารพื้นฐานที่มี $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจนผลิตเอนไซม์

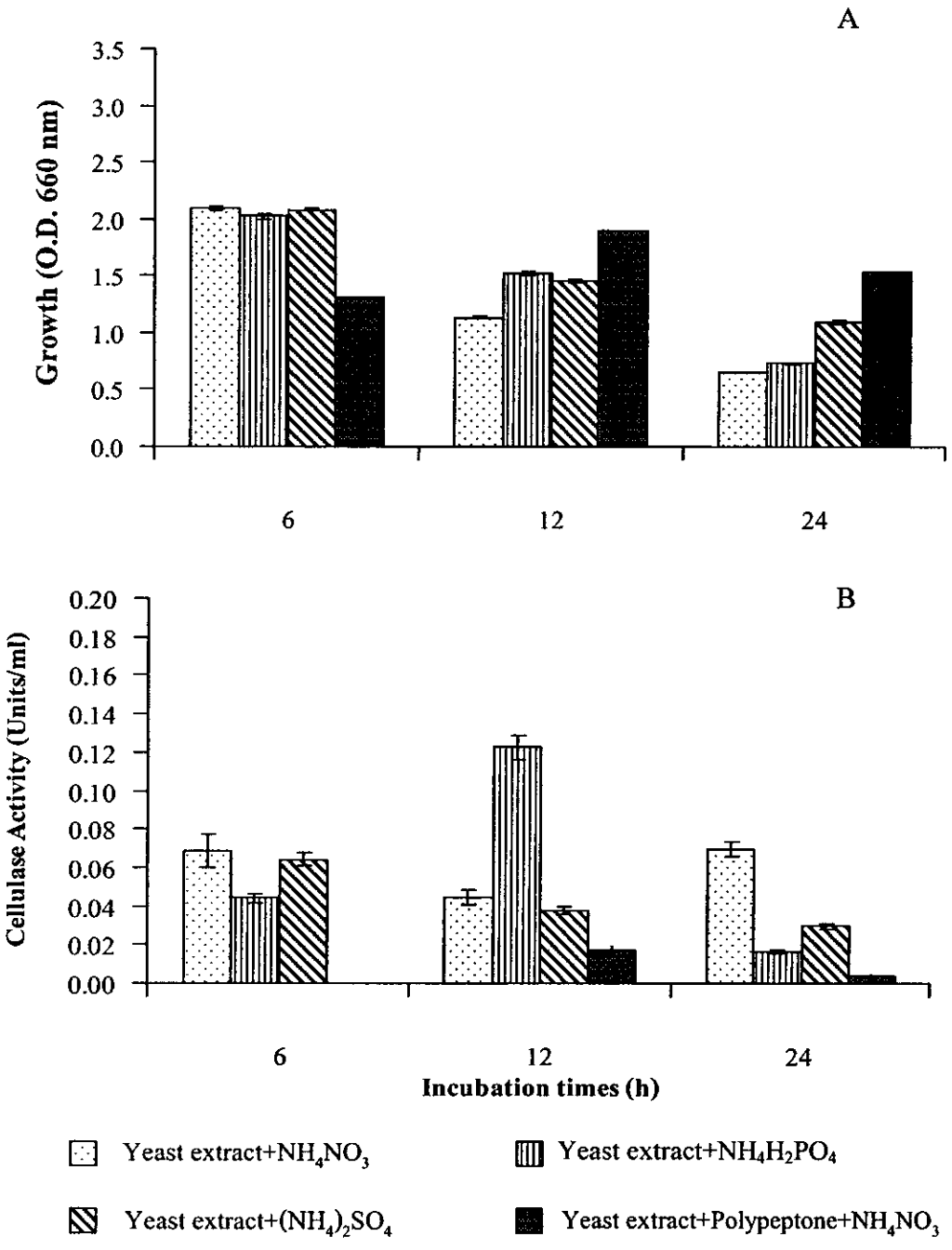


ภาพที่ 9 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญ (A) และการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (B) ของเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 (ในอาหารพื้นฐานที่มี CMC 1 เปอร์เซ็นต์ และแหล่งไนโตรเจนต่างๆ (0.1 เปอร์เซ็นต์) บ่มที่ 45 องศาเซลเซียส เขย่า 200 รอบต่อนาที)

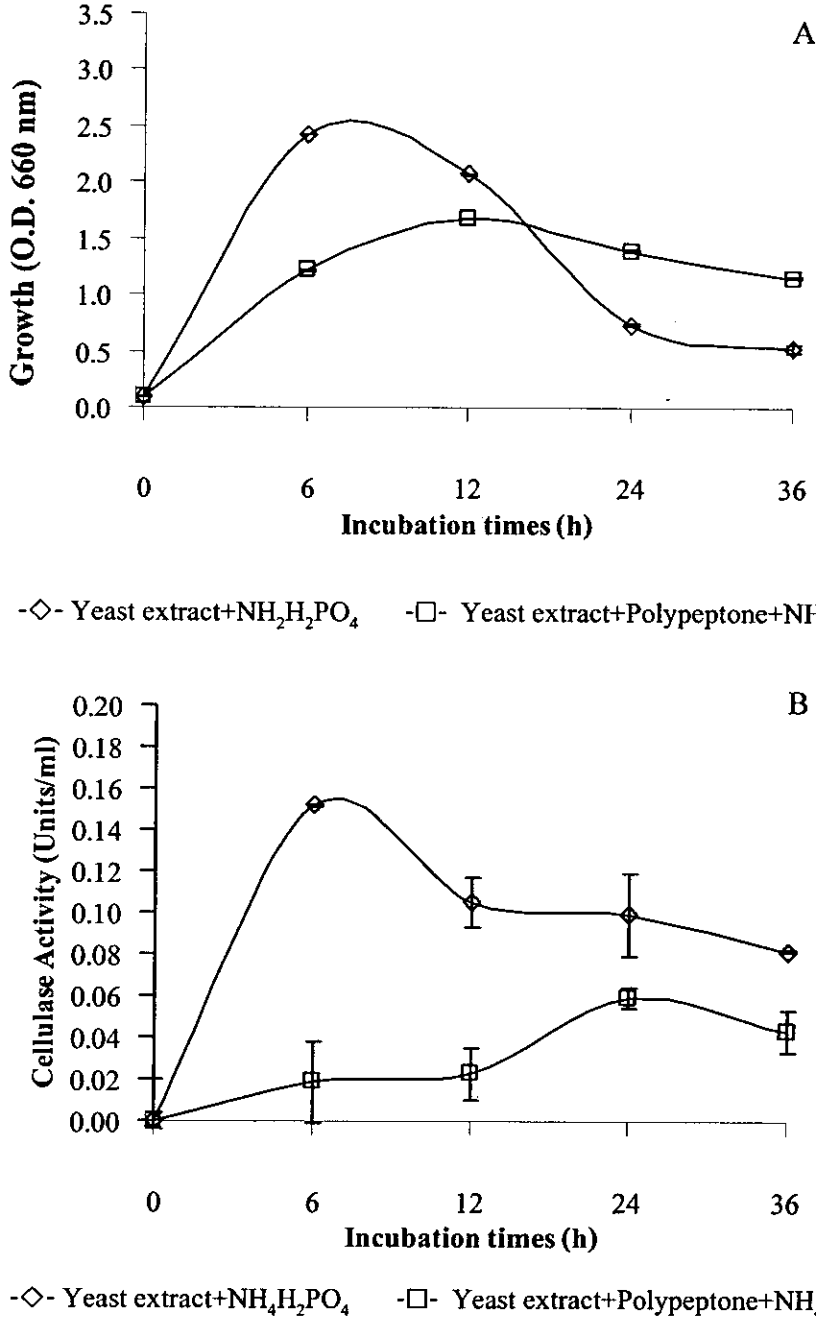
เซลลูเลสได้น้อยที่สุด ดังการศึกษาของ Taleb และคณะ (2009) ได้ศึกษาปัจจัยของแหล่งอาหารที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Bacillus alcalophilus* และ *Bacillus amyloliquefaciens* พบว่าสามารถใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ได้ดีกว่าแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ อย่างเช่น ยีสต์สกัด เปปโตน และเนื้อสกัด เป็นต้น และสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงที่สุดในอาหารที่มียีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน ส่วน Ariffin และคณะ (2008) ศึกษาการผลิตเอนไซม์เอนโดกลูแคนเนสจากน้ำมันปาล์มดิบโดย *Bacillus pumilus* EB3 พบว่าเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงที่สุดในอาหารที่มียีสต์สกัดได้ 1.44 ยู นิตต่อลิตรต่อชั่วโมง โดยยีสต์สกัดจะช่วยส่งเสริมให้เชื้อเจริญได้อย่างรวดเร็วกว่าอาหารที่มีไนโตรเจนอนินทรีย์ เนื่องจากมีวิตามินและสารตั้งต้น (precursors) ที่จำเป็นต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์ ส่วน Ray และคณะ (2007) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* และ *Bacillus circulans* ที่แยกได้จากทางเดินอาหารของปลา พบว่าเชื้อ *Bacillus circulans* สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดเมื่อมีเนื้อสกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน

จากการศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์เซลลูเลส พบว่าเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 สามารถเจริญและสามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีในอาหารพื้นฐานที่มี CMC 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน และมียีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนนั้น ในหลายงานวิจัยได้มีความเห็นว่าการใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ร่วมกับไนโตรเจนอนินทรีย์จะช่วยเพิ่มการเจริญและการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส จากการศึกษาผลของยีสต์สกัดร่วมกับไนโตรเจนอนินทรีย์ คือ NH_4NO_3, $(NH_4)_2SO_4$ และ $NH_4H_2PO_4$ ต่อการเจริญ ผลแสดงดังภาพที่ 10A พบว่าการใช้ไนโตรเจนอินทรีย์และอนินทรีย์ร่วมกันส่งผลให้เชื้อเจริญได้รวดเร็วกว่าชุดควบคุม ซึ่งพบว่าชุดอาหารพื้นฐานที่มียีสต์สกัดร่วมกับ NH_4NO_3, $(NH_4)_2SO_4$ และ $NH_4H_2PO_4$ มีค่าการเจริญของเชื้อสูงสุดที่ 6 ชั่วโมง จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตรได้ 2.10, 2.02 และ 2.08 ส่วนชุดควบคุมเป็นอาหารพื้นฐานที่มียีสต์สกัด, พอลิเปปโตนและ NH_4NO_3 มีค่าการเจริญ 1.31 ที่เวลา 6 ชั่วโมง และเจริญสูงที่สุด 1.90 ที่เวลา 12 ชั่วโมง ส่วนการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ผลแสดงดังภาพที่ 10B พบว่าเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 สามารถใช้อาหารที่มียีสต์สกัดและ $NH_4H_2PO_4$ ได้ดีที่สุด มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส 0.12 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 12 ชั่วโมง รองลงมาเป็นอาหารที่มียีสต์สกัดและ NH_4NO_3 สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสมีกิจกรรมเซลลูเลส 0.07 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และอาหารที่มียีสต์สกัดและ $(NH_4)_2SO_4$ สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสมีกิจกรรม 0.06 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 6 ชั่วโมง ส่วน Ariffin และคณะ (2008) ศึกษาการผลิตเอนไซม์เอนโดกลูแคนเนสจากน้ำมันปาล์มดิบโดย *Bacillus pumilus* EB3 พบว่าเชื้อเจริญได้ดีในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจน 2 ชนิด คือ ยีสต์สกัด และ $(NH_4)_2SO_4$ มีกิจกรรม 2.2 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสามารถสรุปส่วนประกอบของอาหารและสภาวะในการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 ปริมาตร 1 ลิตร ดังนี้ CMC 10.0 กรัม, KH_2PO_4 1.0 กรัม, K_2HPO_4 1.0 กรัม, ยีสต์สกัด 4.5 กรัม, $NH_4H_2PO_4$ 4.1 กรัม, $MgSO_4.7H_2O$ 0.3 กรัม และ $CaCl_2$ 0.3 กรัม ผลการทดลองดังภาพที่ 11A พบว่าการเจริญของชุดการทดลองในสภาวะที่มียีสต์สกัดและ $NH_4H_2PO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน เจริญได้สูงสุด โดยมีค่าความขุ่นจากการวัดการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร ได้เท่ากับ 2.42 ที่เวลา 6 ชั่วโมง และการเจริญของชุดควบคุมที่มียีสต์สกัด, พอลิเปบโตน และ NH_4NO_3 เป็นแหล่งไนโตรเจน มีค่าความขุ่นเท่ากับ 1.21 ที่เวลา 6 ชั่วโมงและเจริญสูงที่สุดที่เวลา 12 ชั่วโมง มีค่าความขุ่นเท่ากับ 1.68 ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 ผลการทดลองดังภาพที่ 11B พบว่าชุดการทดลองตามสภาวะที่เหมาะสมสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสมีกิจกรรมสูงกว่าชุดควบคุม โดยชุดการทดลองตามสภาวะที่เหมาะสมมีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุดเท่ากับ 0.15 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 6 ชั่วโมง และชุดควบคุม พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ 0.02 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 6 ชั่วโมง และมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด 0.06 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 24 ชั่วโมง



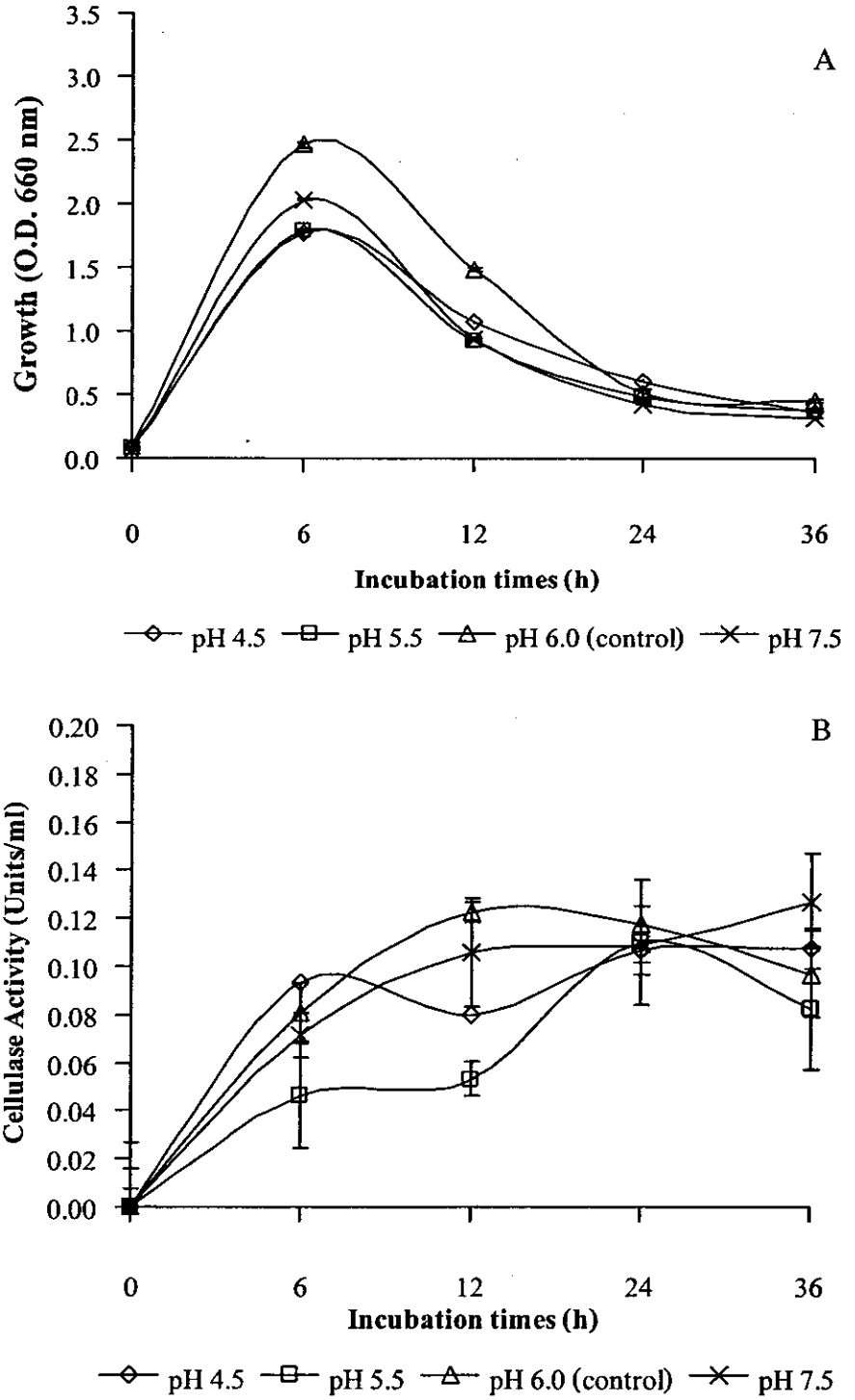
ภาพที่ 10 ผลของแหล่งไนโตรเจนผสมต่อการเจริญ (A) และการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (B) ของเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 (ในอาหารพื้นฐานที่มี CMC 1 เปอร์เซ็นต์ และแหล่งไนโตรเจนต่างๆ ความเข้มข้นรวม 0.1 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่ 45 องศาเซลเซียส เขย่า 200 รอบต่อนาที)



ภาพที่ 11 ผลของแหล่งไนโตรเจนผสมต่อการเจริญ (A) และการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (B) ของเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 (ในอาหารพื้นฐานที่มี CMC 1 เปอร์เซ็นต์ และแหล่งไนโตรเจนความเข้มข้นรวม 0.1 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่ 45 องศาเซลเซียส เขย่า 200 รอบต่อนาที)

1.3 ผลของพีเอช

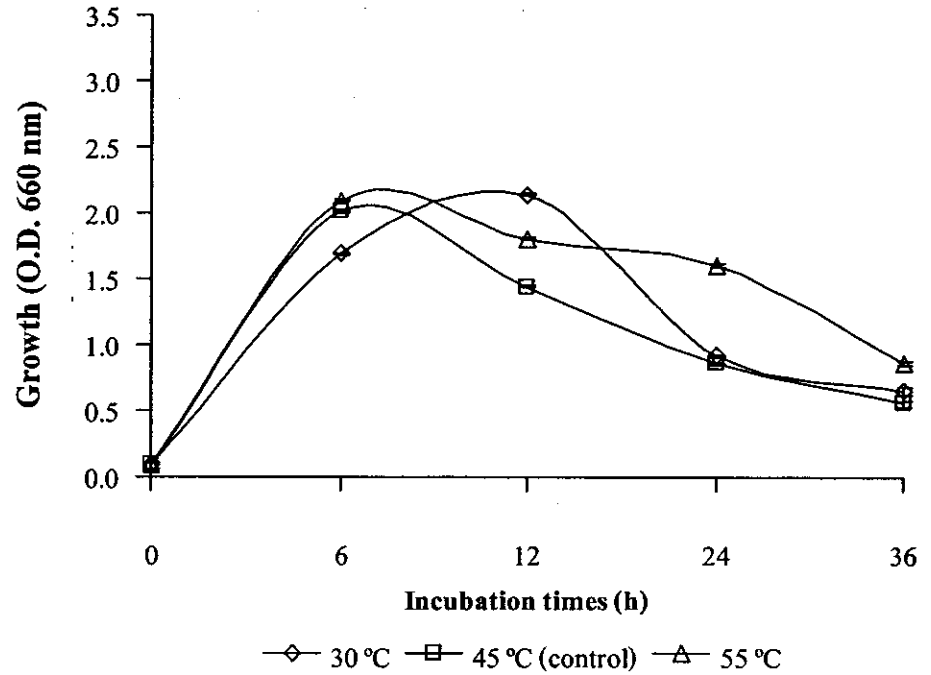
จากการศึกษาผลของพีเอชต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารพื้นฐานที่มี CMC 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน และมียีสต์สกัด และ $NH_4H_2PO_4$ ความเข้มข้นรวม 0.1 เปอร์เซ็นต์ (% Total N) เป็นแหล่งไนโตรเจน ปรับพีเอชเป็น 4.5, 5.5, 7.5 และอาหารที่ไม่ปรับพีเอช (พีเอช 6) ทำการเขย่า 200 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง ผลการทดลองการศึกษาการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 ดังภาพที่ 12A พบว่าทุกชุดการทดลองมีการเจริญสูงสุดที่เวลา 6 ชั่วโมง โดยอาหารที่ไม่ปรับพีเอชมีพีเอช 6.0 มีการเจริญของเชื้อสูงที่สุด เมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ได้ค่าความขุ่นเท่ากับ 2.45 รองลงมาเป็นชุดการทดลองในอาหารที่ปรับพีเอชเป็น 7.5, 5.5 และ 4.5 โดยวัดค่าความขุ่นได้ 2.0, 1.75 และ 1.7 ตามลำดับ และเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น พบว่าทุกชุดการทดลองมีการเจริญของเชื้อลดลงตามลำดับ ส่วนการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 ผลการทดลองดังภาพที่ 12B พบว่าในอาหารพื้นฐานที่มีพีเอช 4.5 และพีเอช 5.5 เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงสุด 0.11 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 24 ชั่วโมง ส่วนอาหารพื้นฐานที่มีพีเอช 6.0 และพีเอช 7.5 สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุด 0.12 และ 0.11 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 12 ชั่วโมง ดังนั้นพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 คือ อาหารที่มีพีเอช 6.0 การศึกษาของ Taleb และคณะ (2009) พบว่า *Bacillus alcalophilus* และ *Bacillus amyloliquefaciens* มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงสุดอยู่ที่พีเอช 6.5-7.7 โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์ 2.4 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสจะลดลงในอาหารที่มีพีเอชเป็นด่าง ส่วน Immanuel และคณะ (2006) ได้อธิบายว่าการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Cellulomonas*, *Bacillus* และ *Micrococcus* spp. สามารถย่อยสับสเตรทอยู่ในช่วงพีเอช 4.0-9.0 ส่วนการศึกษาของ Shanmughapriya และคณะ (2009) พบว่า *Marinobacter* sp. MSI032 มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสอยู่ที่พีเอช 9.0 ส่วน Jaradat และคณะ (2008) ศึกษาผลของสภาวะของอาหารเลี้ยงเชื้อในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อ *Streptomyces* sp. J2 พบว่าพีเอชของอาหารเริ่มต้นที่พีเอชในช่วง 6.0-8.0 สามารถผลิตกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส โดยมีกิจกรรมสัมพัทธ์มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์

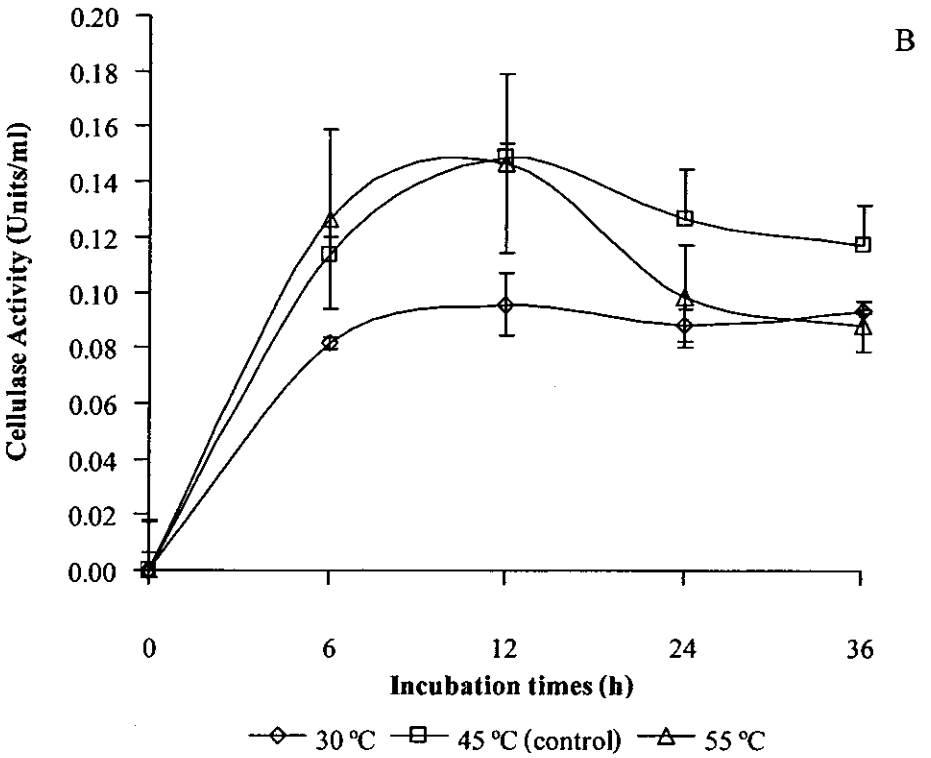


ภาพที่ 12 ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการเจริญ (A) และการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (B) ของเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 (ในอาหารพื้นฐานที่มี CMC 1 เปอร์เซ็นต์ และยีสต์สกัด+$NH_4H_2PO_4$ ความเข้มข้นรวม 0.1 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เขย่า 200 รอบต่อนาที)

1.4 ผลของอุณหภูมิ

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารพื้นฐานที่มี CMC 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน และมียีสต์สกัดและ $NH_4H_2PO_4$ ความเข้มข้นรวม 0.1 เปอร์เซ็นต์ (% Total N) ทำการเขย่า 200 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิต่างๆ ดังนี้ คือ 30, 45 และ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง ผลการทดลองดังภาพที่ 13A พบว่าเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 มีการเจริญสูงสุดที่ 6 ชั่วโมงเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 45 และ 55 องศาเซลเซียส และที่ 12 ชั่วโมงเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรได้เท่ากับ 2.2, 2.0, 2.2 ที่อุณหภูมิ 30, 45, 55 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ซึ่งการเลี้ยง *Bacillus subtilis* A2 ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส สามารถเจริญได้เร็วและมีการเจริญสูงที่สุด ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส ผลการทดลองดังภาพที่ 13B พบว่าการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสแปรผันตามอุณหภูมิที่สูงขึ้นเช่นเดียวกับการเจริญ โดยการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่มีกิจกรรมน้อยที่สุด 0.95 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 12 ชั่วโมง การบ่มที่อุณหภูมิ 45 และ 55 องศาเซลเซียส มีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดใกล้เคียงกันคือ 0.15 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 12 ชั่วโมง จึงเลือกอุณหภูมิที่ 45 องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส จากการทดลองแสดงว่าเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 เป็นเชื้อแบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิสูง (Thermophile) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากตัวอย่างที่ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียเป็นตัวอย่างจากกากตะกอนดีแคนเตอร์และน้ำทิ้งจากโรงงานน้ำมันปาล์ม ซึ่งมีอุณหภูมิของตัวอย่างที่สูงจึงทำให้แบคทีเรียที่แยกได้ชอบอุณหภูมิสูงด้วย ดังการศึกษาของ Taleb และคณะ (2009) ศึกษาปัจจัยของแหล่งอาหารและสภาวะที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Bacillus alcalophilus* และ *Bacillus amyloliquefaciens* พบว่าอุณหภูมิที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงสุดอยู่ในช่วง 30-45 องศาเซลเซียส และได้ให้ความเห็นว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างกันก็จะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ต่างกัน เช่นเดียวกับ Ray และคณะ (2007) พบว่า *Bacillus subtilis* และ *Bacillus circulans* สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสส่วน Jaradat และคณะ (2008) พบว่า *Streptomyces* sp. J2 สามารถเจริญและผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส





ภาพที่ 13 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญ (A) และการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (B) ของเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 (ในอาหารพื้นฐานที่มี CMC 1 เปอร์เซ็นต์ และยีสต์สกัด+$NH_4H_2PO_4$ ความเข้มข้นรวม 0.1 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 6.0 เขย่า 200 รอบต่อนาที)

2. สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานและความคงตัวของเอนไซม์หยาบจาก *Bacillus subtilis* A2

2.1 การทำบริสุทธิ์ขั้นต้นของเอนไซม์เซลลูเลส

จากการทำบริสุทธิ์ขั้นต้นด้วยการตกตะกอนส่วนใสจากการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 80 เปอร์เซ็นต์, อะซิโตน และเอทานอลที่แช่เย็น -20 องศาเซลเซียส ในอัตราส่วน 1:3 ทำการตกตะกอนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำตะกอนที่ได้ไปเหวี่ยงแยกที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำตะกอนที่ได้ ไปละลายด้วยซิเตรทบัฟเฟอร์พีเอช 5.0 และนำไปวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส ผลการทดลองดังตารางที่ 4 พบว่าการใช้อะซิโตนสามารถตกตะกอนได้เอนไซม์เซลลูเลสมากที่สุด 44.05 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ แอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 80 เปอร์เซ็นต์ สามารถตกตะกอนได้เอนไซม์เซลลูเลส 34.20 เปอร์เซ็นต์ และการตกตะกอนด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ได้ 19.18 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งการตกตะกอนด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่เป็นอะซิโตนและเอทานอลจะไปมีผลต่อค่าคงที่ไดอิเลคตริค (dielectric constant) ซึ่งเป็นค่าที่บ่งบอกถึงความมีขั้ว (polarity) ของโมเลกุลของตัวทำละลายที่อุณหภูมิใดๆ โดยความสัมพันธ์ระหว่างค่าค่าคงที่ไดอิเลคตริค และความมีขั้วคือ เป็นขั้วสูงจะมีค่าคงที่ไดอิเลคตริคที่สูง ทำให้สารละลายที่มีน้ำเป็นตัวทำละลายลดลง ทำให้ความสามารถในการเป็นตัวทำละลายของน้ำลดลง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของตัวทำละลายอินทรีย์มากขึ้น จนถึงจุดที่แรงกระทำระหว่างโมเลกุลของโปรตีนในส่วนของพลังงานไฟฟ้าสถิตย์บนโมเลกุลโปรตีนมีแรงกระทำที่สูงกว่าแรงกระทำระหว่างโปรตีนกับน้ำ จะเกิดการเข้ามารวมตัวกันของโมเลกุลโปรตีน ทำให้โปรตีนตกตะกอนลงมาได้ (ชรินทร์ เตชะพันธุ์, 2542) และการตกตะกอนจะถูกเหนี่ยวนำให้เกิดขึ้นเมื่อค่าคงที่ไดอิเลคตริคลดลง อะซิโตนมีค่าคงที่ไดอิเลคตริคเท่ากับ 21 ส่วนเอทานอลมีค่าเท่ากับ 30 ดังนั้นอะซิโตนจึงสามารถตกตะกอนเอนไซม์ได้ดีกว่าเอทานอล Mawadza และคณะ (2000) ศึกษาการทำบริสุทธิ์และสมบัติของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus* 2 สายพันธุ์ ทำการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยอะซิโตน ได้ผลได้ของเอนไซม์ 59 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวเป็นการตกตะกอนอาศัยหลักการเพิ่มค่าความแรงของอิออนโดยใช้เกลือ ซึ่งเป็นการเติมเกลือลงไปในสารละลายโปรตีนผสม เพื่อเพิ่มความแรงอิออนของสารละลายให้สูงขึ้น จนกระทั่งอิออนของเกลือไปแย่งโมเลกุลของน้ำที่ล้อมรอบโมเลกุลของโปรตีนออกมาล้อมรอบโมเลกุลของเกลือเอง ทำให้โปรตีนจับตัวกันตกตะกอนลงมา แต่การตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอาจจะไม่เหมาะสมในกรณีนี้ เนื่องจากการทำบริสุทธิ์ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตจะต้องใช้ปริมาณเกลือจำนวนมาก อีกทั้งอาจทำให้เอนไซม์เสียสภาพจากไอออนของโลหะหนักที่ปนเปื้อนอยู่ในเกลือ อีกทั้งการตกตะกอนด้วย

เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอาจตกตะกอนไม่สมบูรณ์ในกรณีที่สารละลายมีโปรตีนน้อยกว่า 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Bonner, 2007) ดังการศึกษาของ Shanmughapriya และคณะ (2009) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสม การทำบริสุทธิ์และคุณสมบัติของเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Marinobacter* sp. MSI032 พบว่าการทำบริสุทธิ์ขั้นต้นโดยการใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวที่ 60-80 เปอร์เซ็นต์ สามารถตกตะกอนเอนไซม์ได้ผลได้ 52 เปอร์เซ็นต์ ส่วน Bajaj และคณะ (2009) ศึกษาการทำบริสุทธิ์บางส่วนและคุณสมบัติในการทนอุณหภูมิสูงและพีเอชของเอนไซม์เอนโดกลูแคเนสจาก *Bacillus* strain M-9 พบว่าการทำบริสุทธิ์ขั้นต้นโดยการใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวที่ 20-50 เปอร์เซ็นต์ สามารถตกตะกอนเอนไซม์ได้ผลได้ 40 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4 การตกตะกอนเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* A2

Precipitants	Volume (ml)	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Purity (fold)	Yield (%)
Supernatant	80	119.00	29.63	0.25	1	100.00
Ammonium sulfate 80%	4.0	6.67	10.14	1.52	6.10	34.20
Ethyl alcohol 1:3	7.5	3.16	5.68	1.79	7.21	19.18
Acetone 1:3	7.8	15.48	13.05	0.84	3.39	44.05

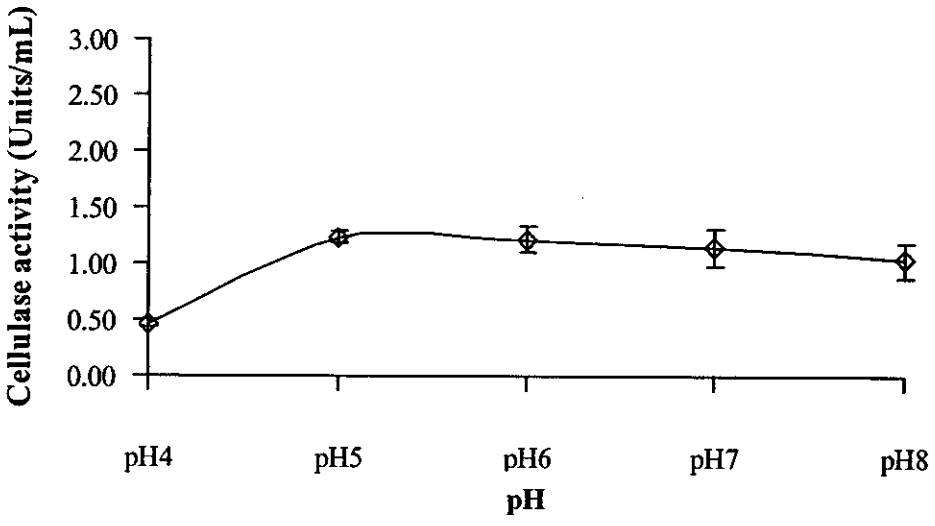
2.2 ผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส

จากการศึกษาผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสของ *Bacillus subtilis* A2 โดยการนำเอนไซม์เซลลูเลสอย่างหยาบที่ได้จากการตกตะกอนด้วยอะซิโตนอัตราส่วน 1:3 ไปวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในสารละลายบัฟเฟอร์ต่างชนิดกัน ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ที่พีเอชต่างๆ คือ 4.0, 5.0 และ 6.0 โดยใช้ซิเตรตบัฟเฟอร์ และพีเอช 7.0 และ 8.0 โดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 14 พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสทำปฏิกิริยาได้ดีที่สุดในบัฟเฟอร์ที่มีพีเอช 5.0 โดยมีกิจกรรม 1.27 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และเมื่อบัฟเฟอร์ที่มีพีเอชในการทำปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสจะค่อยๆ ลดลง โดยที่บัฟเฟอร์ที่พีเอช 6.0 เอนไซม์เซลลูเลสมีกิจกรรม 1.16 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ส่วนบัฟเฟอร์ที่มีพีเอช 7.0 เอนไซม์เซลลูเลสมีกิจกรรม 1.13 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และบัฟเฟอร์ที่มีพีเอช 8.0 เอนไซม์เซลลูเลสมีกิจกรรม 1.09 ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยบัฟเฟอร์ที่พีเอช 4.0 เอนไซม์เซลลูเลสมีกิจกรรมน้อยที่สุดอยู่ที่ 0.50 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ดังนั้นพี

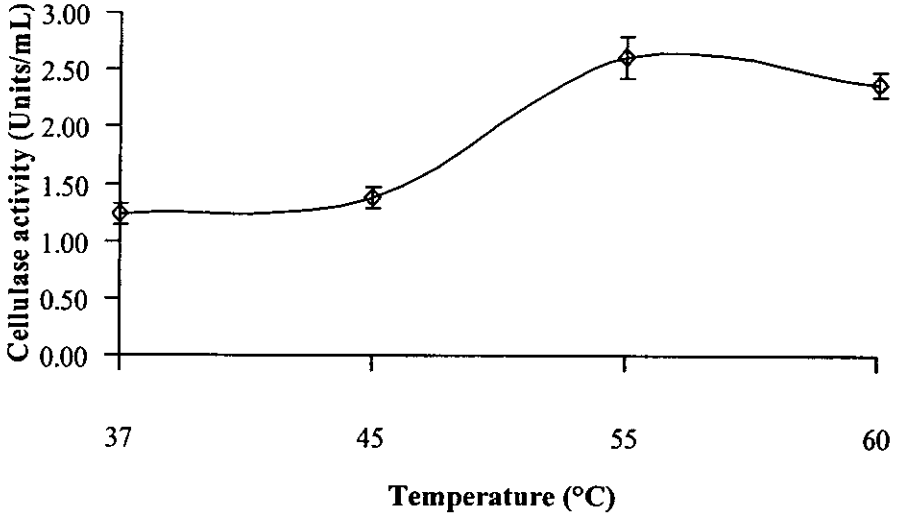
เอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Baciillus subtilis* A2 อยู่ที่พีเอช 5.0 เช่นเดียวกับการศึกษาของ Robson และ Chambliss (1984) ศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์เซลลูโลไลติกที่ผลิตจากเชื้อสายพันธุ์ *Bacillus* พบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ได้ดีที่สุดที่พีเอช 4.8 และกิจกรรมของเอนไซม์จะลดลง 10 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำปฏิกิริยาที่พีเอชมากกว่าช่วง 4.8-6.0 ส่วน Bajaj และคณะ (2009a) ศึกษาการทำบริสุทธิ์บางส่วนและคุณสมบัติในการทนอุณหภูมิสูงและพีเอชของเอนไซม์เอนโดกลูแคเนสจาก *Bacillus* strain M-9 พบว่าเอนไซม์สามารถทำปฏิกิริยาได้ดีในบัฟเฟอร์พีเอชเป็นกรด โดยมีกิจกรรมสูงที่สุดที่พีเอช 5.0 มีกิจกรรม 2600 IU/l และกิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเมื่อพีเอชของบัฟเฟอร์เพิ่มขึ้น Bajaj และคณะ (2009b) ศึกษาคุณสมบัติในการทนอุณหภูมิสูงและพีเอชที่เป็นกรดและด่างของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสจาก *Bacillus* strain M+ พบว่าเอนไซม์สามารถทำปฏิกิริยาได้ดีในบัฟเฟอร์พีเอชเป็นกรด โดยมีกิจกรรมสูงที่สุดที่พีเอช 6.0 มีกิจกรรม 2200 IU/l และกิจกรรมของเอนไซม์จะค่อยๆ ลดลงเมื่อพีเอชของบัฟเฟอร์เป็นกรดหรือด่างมากขึ้น การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ส่วนใหญ่ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออน ซึ่งเอนไซม์ส่วนใหญ่จะเร่งปฏิกิริยาได้ที่พีเอชในช่วง 4-10 ถ้าพีเอชต่ำกว่า 4 และสูงกว่า 10 จะทำให้เอนไซม์ถูกยับยั้งถาวรเพราะเอนไซม์เสียสภาพธรรมชาติไปเนื่องจากโครงสร้างตติยภูมิของโปรตีนถูกทำลาย (พัชรา วีระกะลัส, 2543)

2.3 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสของ *Baciillus subtilis* A2 โดยการนำเอนไซม์เซลลูเลสอย่างหยาบที่ได้จากการตกตะกอนด้วยอะซิโตนอัตราส่วน 1:3 ไปทำการวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในสารละลายซิเตรทบัฟเฟอร์พีเอช 5.0 ที่อุณหภูมิต่างๆ ดังนี้ อุณหภูมิ 37, 45, 55 และ 60 องศาเซลเซียส ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 15 พบว่าเอนไซม์เซลลูเลส สามารถทำปฏิกิริยาได้ในช่วงอุณหภูมิสูง โดยกิจกรรมของเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น และเอนไซม์มีกิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส โดยมีกิจกรรมเท่ากับ 2.61 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และกิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเล็กน้อยเมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นเป็น 60 องศาเซลเซียส โดยมีกิจกรรม 2.38 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสมีกิจกรรมของเอนไซม์ต่ำที่สุด ดังนั้นจากการทดลองอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาที่ 55 องศาเซลเซียส จากการศึกษาของ Robson และ Chambliss (1984) ศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์เซลลูโลไลติกที่ผลิตจากเชื้อสายพันธุ์ *Bacillus* พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 55-60 องศาเซลเซียส และสามารถทำปฏิกิริยาได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส ส่วนการศึกษาของ Shanmughapriya และคณะ (2009) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสม การ



ภาพที่ 14 ผลของพีเอชต่อการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 (CMC 1% เป็นสับสเตรท บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที)

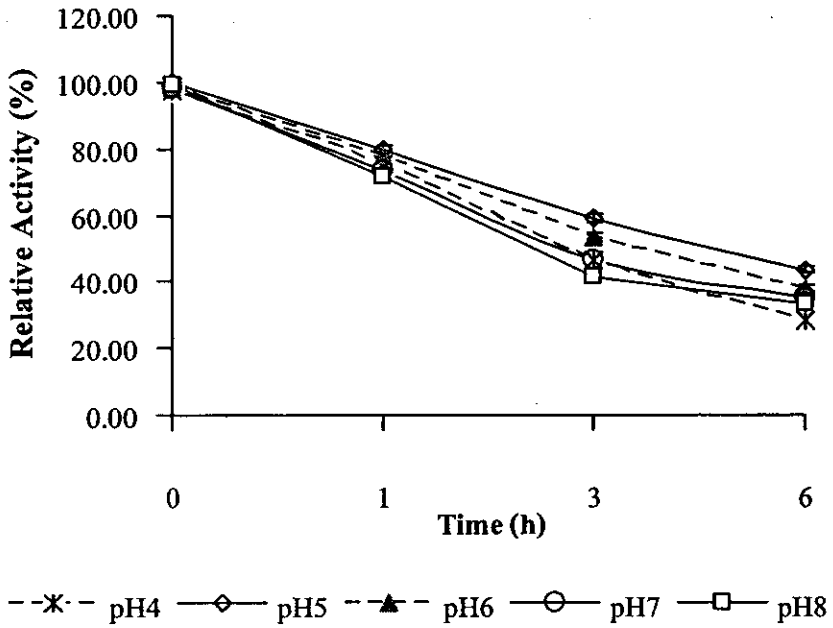


ภาพที่ 15 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 (CMC 1% เป็นสับสเตรท ในซิเตรตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 มิลลิโมลาร์ พีเอช 5.0 เขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที)

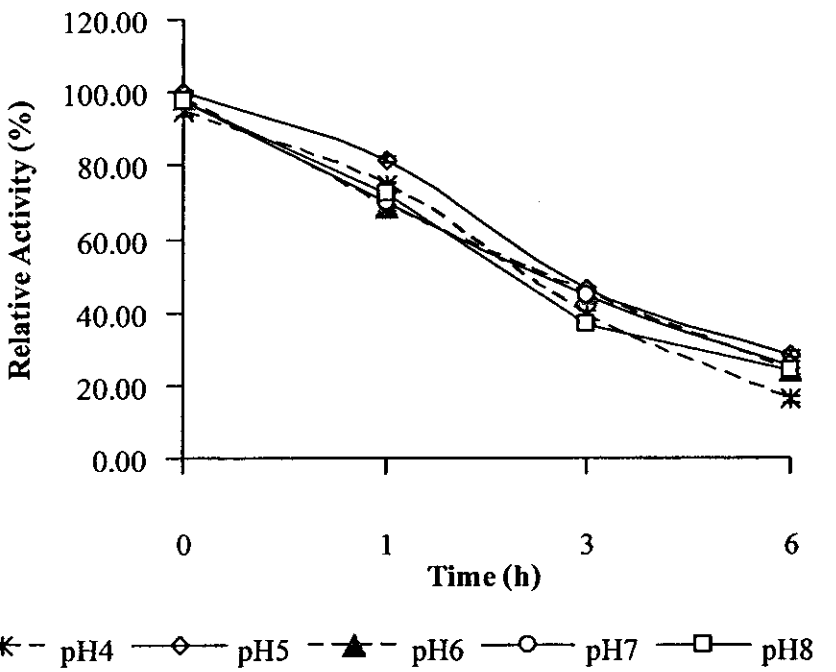
ทำบริสุทธิ์และคุณสมบัติของเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Marinobacter* sp. MSI032 พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้มีกิจกรรมสัมพัทธ์สูงที่สุดที่อุณหภูมิ 27-30 องศาเซลเซียส และเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นกิจกรรมของเอนไซม์ก็จะลดลง ส่วน Bajaj และคณะ (2009a) ศึกษาการทำบริสุทธิ์บางส่วนของเอนไซม์เอนโดกลูแคเนสจาก *Bacillus* strain M-9 พบว่าเอนไซม์สามารถทำปฏิกิริยาได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิสูง 60 องศาเซลเซียส เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นเอนไซม์มีกิจกรรมลดลง ซึ่งเอนไซม์เป็นโปรตีนที่มีโมเลกุลบอบบางทำให้อาจเสียสภาพได้ที่อุณหภูมิสูง และความสามารถของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิสูงขึ้นอยู่กับสภาวะของแหล่งตัวอย่างที่ได้ทำการแยกเชื้ออีกด้วย การศึกษาของ Bajaj และคณะ (2009b) ศึกษาผลของอุณหภูมิสูงต่อการทำงานของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสจาก *Bacillus* strain M+ พบว่าเอนไซม์สามารถทำปฏิกิริยาได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (2200 IU/l) และยังมีกิจกรรมที่อุณหภูมิ 60-80 องศาเซลเซียส (1600-1900 IU/l) ที่เวลา 30 นาที

2.4 ผลของพีเอชต่อความคงตัวของเอนไซม์เซลลูเลส

จากผลการทดสอบความคงตัวต่อพีเอชของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 โดยบ่มสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสหยาบในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 4-8 ที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 1, 3 และ 6 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ตามสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา คือ ที่พีเอช 5.0 และอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ผลการทดลองดังภาพที่ 16 พบว่า ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่พีเอช 5.0 เอนไซม์เซลลูเลสมีความคงตัวสูงสุด อย่างไรก็ตามเอนไซม์ยังมีความคงตัวสูงในช่วงพีเอช 4-8 เมื่อบ่มเอนไซม์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยมีกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์เหลือสูงกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อบ่มเอนไซม์เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เอนไซม์มีกิจกรรมสัมพัทธ์ลดลงเหลือ 28-33 เปอร์เซ็นต์ ส่วนผลความคงตัวของเอนไซม์เซลลูเลสที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ผลแสดงดังภาพที่ 17 พบว่าเอนไซม์มีความคงตัวสูงสุดที่พีเอช 5.0 เมื่อบ่มเอนไซม์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยมีกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ที่เหลือสูงกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นเอนไซม์เซลลูเลสมีความคงตัวสูงที่สุดที่พีเอช 5.0 ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส โดย Bajaj และคณะ (2009a) ศึกษาการทำบริสุทธิ์บางส่วนและคุณสมบัติในการทนอุณหภูมิสูงและพีเอชของเอนไซม์เอนโดกลูแคเนสจาก *Bacillus* strain M-9 พบว่าเอนไซม์มีความคงตัวได้ดีในสภาวะเป็นกรด โดยมีกิจกรรมสัมพัทธ์สูงที่สุดที่พีเอช 5.0 รองลงมา คือ พีเอช 4.0 หลังจากบ่มเอนไซม์เป็นเวลา 30 นาที และความคงตัวของเอนไซม์ลดลงเมื่อพีเอชเพิ่มขึ้น แต่การศึกษาของ Shanmughapriya และคณะ (2009) พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Marinobacter* sp. MSI032 คงตัวอยู่ในบัฟเฟอร์ในช่วงด่างที่พีเอช 9.0-10.0 ส่วน Bajaj และคณะ (2009b) ศึกษาคุณสมบัติในการทนอุณหภูมิสูงและพีเอชที่เป็นกรดและด่างของเอนไซม์เบต้ากลูโค



ภาพที่ 16 ผลของพีเอชต่อความคงตัวของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 (บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส)

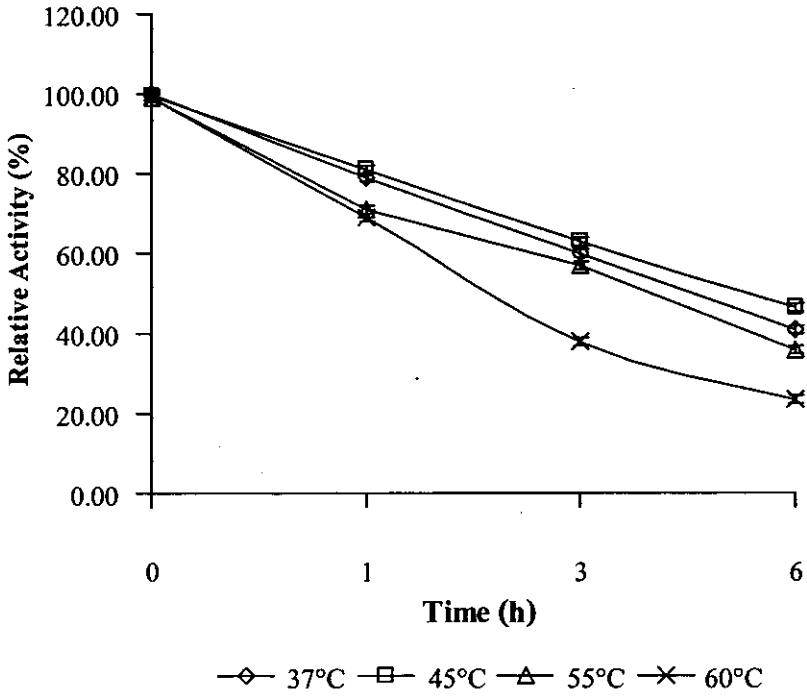


ภาพที่ 17 ผลของพีเอชต่อความคงตัวของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 (บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส)

ซิเดสจาก *Bacillus* strain M+ พบว่าเอนไซม์มีความคงตัวได้ดีในสภาวะเป็นกรด-ด่าง ที่พีเอช 5-9 เป็นเวลา 30 นาที โดยยังคงกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์เหลือ 77-100 เปอร์เซ็นต์ โดยมีกิจกรรมสัมพัทธ์สูงที่สุดที่พีเอช 6.0 หลังจากบ่มเอนไซม์เป็นเวลา 30 นาที Okoshi และคณะ (1990) ศึกษาการทำบริสุทธิ์และสมบัติของเอนไซม์เซลลูเลสหลายชนิดจาก *Bacillus* sp. KSM-522 พบว่าเอนไซม์เซลลูเลส IE-1 มีความคงตัวสูงที่สุดที่พีเอช 6.0 IE-2 มีความคงตัวสูงที่สุดที่พีเอช 9.0 และ IE- 3 มีความคงตัวสูงที่สุดที่พีเอช 7-10

2.5 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์เซลลูเลส

การศึกษาความคงตัวของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 โดยทำการบ่มเอนไซม์ในช่วงอุณหภูมิ 37-60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 1, 3 และ 6 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ตามสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา คือ พีเอช 5.0 และอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 18 พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสมีความคงตัวในช่วงอุณหภูมิ 37-55 องศาเซลเซียส เมื่อบ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยมีกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์คงเหลืออยู่มากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสมีกิจกรรมสัมพัทธ์ลดลงเหลือในช่วง 23-46 เปอร์เซ็นต์ จากการทดลองสามารถสรุปได้ว่าเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 มีความคงตัวสูงที่สุดที่ 45 องศาเซลเซียส จากการศึกษาของ Robson และ Chambliss (1984) ศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์เซลลูโลไลติกที่ผลิตจากเชื้อสายพันธุ์ *Bacillus* พบว่าเอนไซม์สามารถคงตัวต่ออุณหภูมิได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 37-50 องศาเซลเซียส และสามารถคงตัวได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 37-45 องศาเซลเซียส โดยสามารถคงกิจกรรมเอนไซม์ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ หลังจากบ่มเอนไซม์ 2 ชั่วโมง ส่วนการศึกษาของ Shanmughapriya และคณะ (2009) พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Marinobacter* sp. MSI032 คงตัวที่อุณหภูมิ 27-30 องศาเซลเซียส ส่วน Bajaj และคณะ (2009) พบว่าเอนไซม์เอนโดกลูแคเนสจาก *Bacillus* strain M-9 มีความคงตัวสูงสุดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และการศึกษาของ Bajaj และคณะ (2009b) พบว่าเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสจาก *Bacillus* strain M+ มีการคงตัวดีที่สุดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ส่วน Kim และคณะ (2005) พบว่าเอนไซม์อัลคาไลน์เซลลูเลสจาก *Bacillus* sp. HSH-810 มีความคงตัวสูงที่สุดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส หลังจากบ่มเอนไซม์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ลดลงเหลือ 80 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 18 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 (บ่มที่พีเอช 5.0)

3. การแยกน้ำมันจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* A2

3. 1 การแยกน้ำมันจากน้ำทิ้งโดยใช้ส่วนใสที่มีเอนไซม์เซลลูเลส

จากการศึกษาการแยกน้ำมันออกจากตะกอนในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ที่อุณหภูมิ 37 45 และ 55 องศาเซลเซียส โดยใช้ส่วนใสของการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 ที่เวลา 12 ชั่วโมง ซึ่งมีเอนไซม์เซลลูเลส 0.32 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 15 มิลลิตร (ชุดควบคุมเติมน้ำกลั่น 15 มิลลิลิตร) เติมในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ 35 มิลลิลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ เวลา 24 ชั่วโมง แล้วหมุนเหวี่ยงแยกส่วนใสและตะกอน จากนั้นนำส่วนน้ำมาสกัดด้วยเฮกเซน ส่วนตะกอนนำไปอบและบดแล้วจึงนำไปสกัด ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 5 พบว่า ผลที่ได้ไม่แตกต่างกันระหว่างชุดการทดลองที่เติมเอนไซม์เซลลูเลสกับชุดควบคุม น้ำทิ้งที่เติมเอนไซม์เซลลูเลสจากในส่วนใสหลังจากการเลี้ยงเชื้อ โดยในชุดการทดลองที่อุณหภูมิ 37, 45 และ 55 องศาเซลเซียส มีปริมาณตะกอนแห้งเท่ากับ 19.37, 19.67 และ 19.99 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และมีปริมาณน้ำมันเท่ากับ 2.21, 2.58 และ 2.35 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งจะ

เห็นได้ว่าอุณหภูมิก็มีผลต่อการแยกน้ำมันออกจากตะกอน เนื่องจากน้ำมันสามารถแตกตัวและลอยตัวเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น โดยจากผลการทดลองมีการแยกน้ำมันออกจากน้ำทิ้งในปริมาณยังน้อย ทั้งนี้สารละลายเอนไซม์เมื่ออยู่ในน้ำทิ้งอาจมีกิจกรรมสุดท้ายน้อยมาก อีกทั้งในสารละลายเอนไซม์ยังมีโปรตีนและสารอาหารอื่นๆ ที่อาจส่งผลต่อการแยกน้ำมันได้น้อย ทำให้เห็นความแตกต่างไม่ค่อยชัดเจน จึงต้องศึกษาการแยกน้ำมันในน้ำทิ้งและตะกอนจากเครื่องดีแคนเตอร์โดยใช้เอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอนให้เข้มข้นขึ้นด้วยอะซิโตนและนำไปทำให้แห้งด้วยการทำแห้งเยือกแข็งก่อนนำมาใช้ในการทดลองต่อไป

ตารางที่ 5 ผลของอุณหภูมิต่อการแยกน้ำมันในตะกอนของน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ที่เติมส่วนใสของเอนไซม์เซลลูเลสหยาบจากการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* A2

Temperature	Control		With supernatant	
	Sludge (g/l)	Oil in sludge (g/l)	Sludge (g/l)	Oil in sludge (g/l)
37°C	19.98	2.44	19.37	2.21
45°C	20.44	2.41	19.67	2.58
55°C	20.73	2.20	19.99	2.35

3.2 การแยกน้ำมันจากน้ำทิ้งโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสที่ผ่านการตกตะกอน

จากการศึกษาการแยกน้ำมันออกจากตะกอนในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ โดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสหยาบที่ได้จากการตกตะกอนส่วนใสของเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 เมื่อเติมเอนไซม์เซลลูเลสหยาบที่มีกิจกรรม 15 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ลงในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 6 และ 12 ชั่วโมง ผลแสดงดังตารางที่ 6 พบว่าที่เวลาที่ 0 ชุดควบคุมคือชุดที่ไม่มีการเติมเอนไซม์เซลลูเลส มีปริมาณตะกอน 27.40 กรัมต่อลิตร และเมื่อเวลาผ่านไปตะกอนก็ยังมีค่าใกล้เคียงกับเริ่มต้น เป็น 23.77 และ 24.00 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 6 และ 12 ชั่วโมง ตามลำดับ และมีปริมาณน้ำมันในตะกอนอยู่ในช่วง 2.35-2.45 กรัมต่อลิตร ภายในเวลา 12 ชั่วโมง ส่วนชุดตัวอย่างซึ่งมีการเติมเอนไซม์เซลลูเลสที่เวลาต่างๆ พบว่าที่ชั่วโมงที่ 0 มีปริมาณตะกอน 26.17 กรัมต่อลิตร และเมื่อเวลาผ่านไปปริมาณตะกอนจะค่อยๆ ลดลงเป็น 21.43 และ 20.33 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 6 และ 12 ชั่วโมง ตามลำดับ ทั้งนี้การที่ปริมาณตะกอนมีปริมาณลดลงอาจจะเกิดจากการที่เอนไซม์เซลลูเลสไปย่อยตะกอนในน้ำทิ้งซึ่งมีเส้นใยจากการกระบวนการผลิต

น้ำมันปาล์มเป็นองค์ประกอบ ส่วนปริมาณน้ำมันในตะกอนที่เวลาที่ 0 มีค่า 2.45 กรัมต่อลิตร และปริมาณน้ำมันค่อยๆ ลดลง เมื่อเวลาผ่านไปมีปริมาณน้ำมันเป็น 1.9 และ 1.8 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 6 และ 12 ชั่วโมง ตามลำดับ ทั้งนี้ปริมาณน้ำมันในตะกอนที่ลดลงนั้นอาจจะเกิดจากการที่เอนไซม์เซลลูเลสไปย่อยเซลลูโลสในตะกอนทำให้น้ำมันที่ถูกขังอยู่เกิดการปลดปล่อยออกมาและลอยอยู่ในส่วนใสด้านบน แต่ประสิทธิภาพของการใช้เอนไซม์ยังไม่ค่อยดีหรือแยกได้ปริมาณที่น้อยมาก เพราะว่าเอนไซม์อาจจะไม่ทนต่ออุณหภูมิและการทำปฏิกิริยาที่เวลานาน

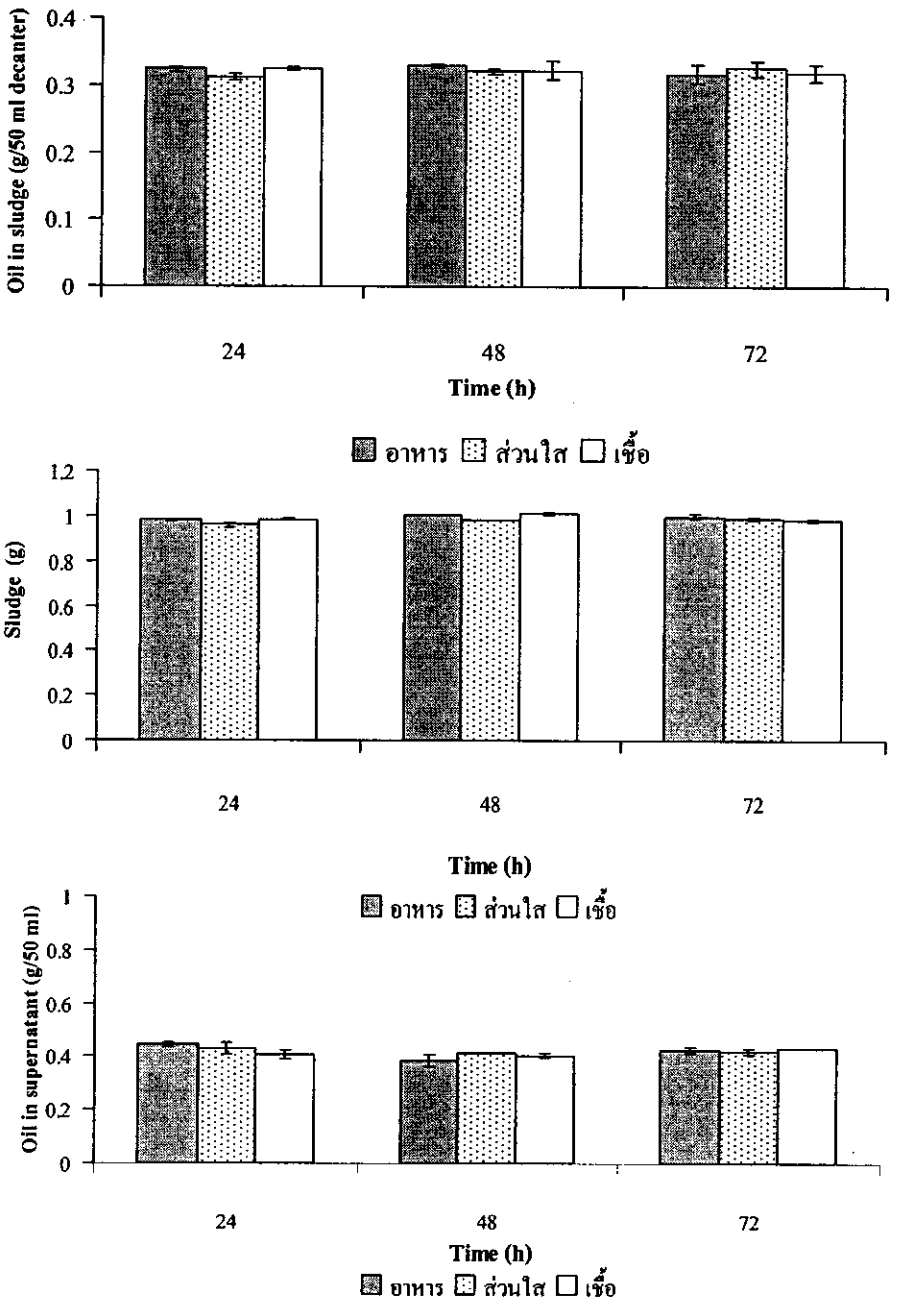
ตารางที่ 6 ผลของเวลาต่อการแยกน้ำมันของตะกอนน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ที่เติมเอนไซม์เซลลูเลสหยาบจากเชื้อ *Bacillus subtilis* A2

Time (h)	Control		With enzyme	
	Sludge (g/l)	Oil in sludge (g/l)	Sludge (g/l)	Oil in sludge (g/l)
0	27.40	2.40	26.17	2.45
6	23.77	2.45	21.43	1.90
12	24.00	2.35	20.33	1.80

3.3 การแยกน้ำมันจากน้ำทิ้งโดยใช้เชื้อ *Bacillus subtilis* A2

จากการศึกษาการแยกน้ำมันออกจากตะกอนในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ โดยใช้เชื้อ *Bacillus subtilis* A2 ซึ่งเลี้ยงในอาหารพื้นฐานที่มี CMC 1 เปอร์เซ็นต์ เขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และส่วนใสจากการเลี้ยงเชื้อ ปริมาตร 5 มิลลิลิตรลงในน้ำทิ้งปริมาตร 45 มิลลิลิตร ในกระบอกตวง 50 มิลลิลิตร โดยบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง นำไปวัดค่าพีเอช น้ำมันในน้ำทิ้ง น้ำหนักตะกอน และปริมาณน้ำมันในตะกอน โดยชุดควบคุมที่มีการเติมอาหารที่ปราศจากเชื้อลงในตัวอย่างที่ทำการทดลอง ผลการทดลองดังภาพที่ 19 พบว่าเมื่อเวลาเพิ่มผ่านไป 72 ชั่วโมง ชุดการทดลองมีปริมาณตะกอนที่ไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก โดยจะอยู่ที่ 0.98-1.00 กรัม มีปริมาณน้ำมันในตะกอนคงที่มี 0.32 กรัม และปริมาณน้ำมันในส่วนใสที่ผ่านการหมุนเหวี่ยงแยกตะกอน 0.44-0.43 กรัม ค่าพีเอชของชุดการทดลองนี้ลดลงเพียงเล็กน้อยจาก 4.55 เป็น 4.12 ที่เวลา 72 ชั่วโมง ส่วนชุดควบคุมที่มีการเติมส่วนใสที่ทำการหมุนเหวี่ยงเอาเซลล์ออก พบว่าชุดการทดลองจะมีปริมาณตะกอนไม่เปลี่ยนแปลงเช่นกัน โดยจะอยู่ที่ 0.97-0.99 กรัม มีปริมาณน้ำมันในตะกอนคงที่และเพิ่มขึ้นน้อยมาก จากปริมาณน้ำมันที่ 0.31 เป็น 0.33 กรัม ที่เวลา 72 ชั่วโมง และปริมาณน้ำมันในส่วนใสที่ผ่านการ

หมุนเหวี่ยงแยกตะกอนจะลดลงเล็กน้อยเมื่อเวลาเพิ่มมากขึ้น จาก 0.43 เป็น 0.42 กรัม ค่าพีเอช ของชุดการทดลองนี้ลดลงเพียงเล็กน้อยจาก 4.55 เป็น 4.15 ที่เวลา 72 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับ ชุดทดสอบที่เติมอาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 พบว่ามีปริมาณตะกอนไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อ เวลาผ่านไป 72 ชั่วโมงเมื่อเทียบกับชุดควบคุมจาก 1.00 เป็น 0.98 กรัม ปริมาณน้ำมันในตะกอน ลดลงในปริมาณน้อย จากเริ่มต้น 0.32 เป็น 0.31 กรัม ที่เวลา 72 ชั่วโมง และปริมาณน้ำมันในส่วน ใสที่ผ่านการหมุนเหวี่ยงแยกตะกอนเมื่อเทียบกับชุดควบคุมจะลดลงก่อนที่เวลา 24 ชั่วโมง โดยมี ค่า 0.41 และเพิ่มขึ้นที่เวลา 72 ชั่วโมงจาก 0.43 กรัม ค่าพีเอชของชุดการทดลองนี้ลดลงเพียง เล็กน้อยเริ่มต้นจาก 4.30 เป็น 4.00 ที่เวลา 72 ชั่วโมง ทั้งนี้การแยกของน้ำมันในตะกอนดีแคน เตอร์ในการทดลองนี้ยังไม่ชัดเจนและไม่สามารถสรุปได้ว่าการใช้เชื้อ *Bacillus subtilis* A2 สามารถแยกน้ำมันจากกากตะกอนดีแคนเตอร์ได้ ทั้งนี้จุลินทรีย์อาจจะต้องการการเจริญเพื่อผลิต เอนไซม์เซลลูเลสมาย่อยเซลลูโลสในกากตะกอนและอาจจะสามารถแยกน้ำมันออกได้ Dickey และคณะ (2008) กล่าวว่าหากหารเลี้ยงเชื้อในน้ำทิ้งสภาวะที่มีการเขย่าก็ยิ่งส่งผลให้น้ำมันหลุด ออกจากตะกอนได้เพิ่มขึ้นอีกด้วย และมีหลายงานวิจัยที่ศึกษาในสภาวะการเขย่า จากการทดลอง นี้จึงได้ทำการศึกษาการใช้เชื้อ *Bacillus subtilis* A2 ในการเจริญและแยกน้ำมันน้ำทิ้งภายใต้ สภาวะการเขย่าในการศึกษาต่อไป

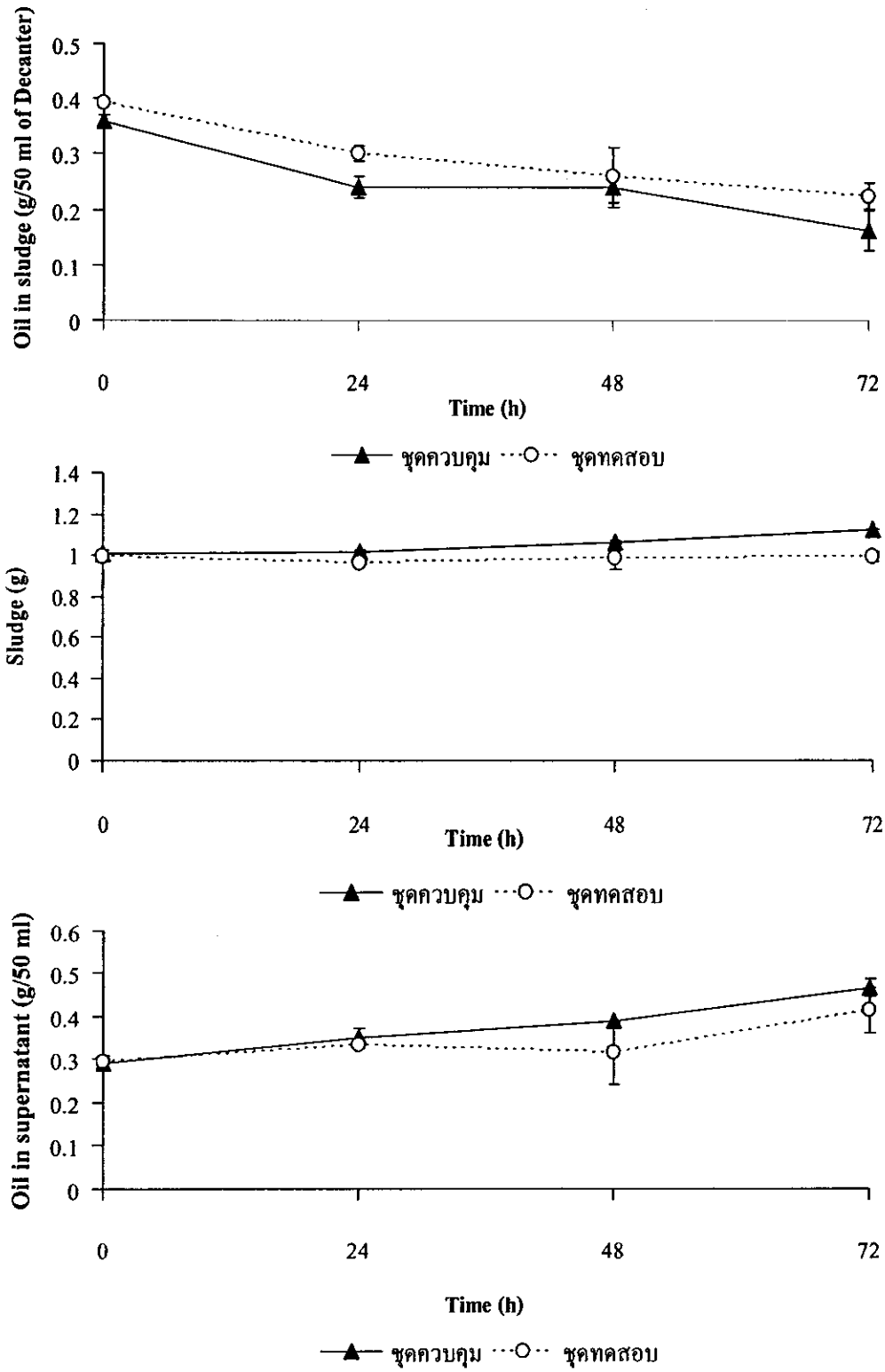


ภาพที่ 19 ผลของการแยกน้ำมันจากน้ำทิ้งดีแคนเตอร์ที่สภาวะต่างๆ (■; เติมอาหารที่ปราศจากเชื้อ, □; อาหารที่มีเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 และ ⊡ ; ส่วนใสที่แยกเซลล์ออก ใช้ 15 มิลลิลิตร เติมในน้ำทิ้งดีแคนเตอร์ 45 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส)

4. ศึกษาการใช้เชื้อ *Bacillus subtilis* A2 ในการเจริญและแยกน้ำมันในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์

4.1 ผลของเวลาต่อการแยกน้ำมันในน้ำทิ้ง

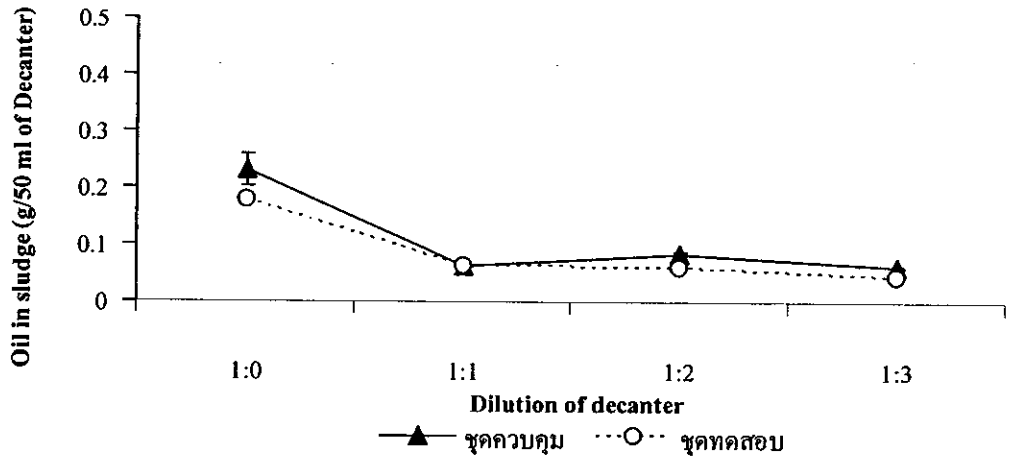
จากการศึกษาการแยกน้ำมันออกจากตะกอนในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ โดยใช้เชื้อ *Bacillus subtilis* A2 ซึ่งเลี้ยงในอาหารพื้นฐานที่มี CMC 1 เปอร์เซ็นต์ เขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ปริมาตรร้อยละ 10 เติมลงในน้ำทิ้งดีแคนเตอร์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 45 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส โดยการเขย่า 200 รอบต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง นำไปวัดค่าพีเอช น้ำมันในน้ำทิ้ง น้ำหนักตะกอน และปริมาณน้ำมันในตะกอน โดยชุดควบคุมจะไม่เติมเชื้อลงในตัวอย่างที่ทำการทดลอง ผลการทดลองดังภาพที่ 20 พบว่าเมื่อเวลาเพิ่มมากขึ้นในชุดควบคุมจะมีปริมาณน้ำมันในส่วนใสเพิ่มขึ้นจากชั่วโมงที่ 0 มีปริมาณน้ำมัน 0.29 กรัม เพิ่มขึ้นจนถึงชั่วโมงที่ 72 มีปริมาณน้ำมัน 0.46 กรัม แสดงว่าอุณหภูมิที่ค่อนข้างสูงอาจทำให้น้ำมันหลุดออกจากตะกอนได้ และเมื่อมีการเขย่าก็ยิ่งส่งผลให้น้ำมันหลุดออกจากตะกอนได้เพิ่มขึ้นอีกด้วย (Dickey *et al.*, 2008) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดทดสอบที่เติมเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 พบว่ามีแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของน้ำมันตามเวลาที่เพิ่มขึ้นเช่นกัน ซึ่งปริมาณน้ำมันในส่วนใสของชุดทดสอบมีปริมาณน้ำมันน้อยกว่าชุดควบคุม โดยที่ชั่วโมงที่ 0 มีปริมาณน้ำมันเท่ากับ 0.29 กรัม และเพิ่มขึ้นจนถึงชั่วโมงที่ 72 มีปริมาณน้ำมัน 0.41 กรัม ทั้งนี้การแยกของน้ำมันในตะกอนดีแคนเตอร์นอกจากจะเกิดจากปัจจัยทางกายภาพแล้ว เชื้อจุลินทรีย์ก็มีส่วนในการแยกน้ำมันด้วย เนื่องจากการทดลองนี้ได้มีการวัดค่าพีเอชเพื่อติดตามการเจริญของเชื้อ (ไม่แสดงข้อมูล) พบว่าค่าพีเอชเปลี่ยนแปลงลดลงจากชั่วโมงที่ 0 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 6.0 เป็น 5.34 ที่ชั่วโมงที่ 24 ซึ่งสอดคล้องกับผลน้ำหนักตะกอนที่เริ่มลดลง ปริมาณน้ำมันในตะกอนที่ลดลง และปริมาณน้ำมันในส่วนใสหลังจากปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนนั้นมีค่าเพิ่มสูงขึ้นด้วย ทั้งนี้จุลินทรีย์อาจจะเจริญเติบโตสูงและมีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสมาย่อยเซลลูโลสในกากตะกอนเพื่อแยกน้ำมันออกมา หลังจากนั้นพีเอชจะเพิ่มขึ้นเป็น 6.94 ที่เวลา 48 ชั่วโมง และลดลงเล็กน้อยเป็นพีเอช 6.79 ที่เวลา 72 ชั่วโมง โดยที่เวลา 72 ชั่วโมงชุดทดสอบมีปริมาณของตะกอนลดลงมากที่สุด และมีปริมาณน้ำมันในส่วนใสหลังจากปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนออกมามากที่สุด

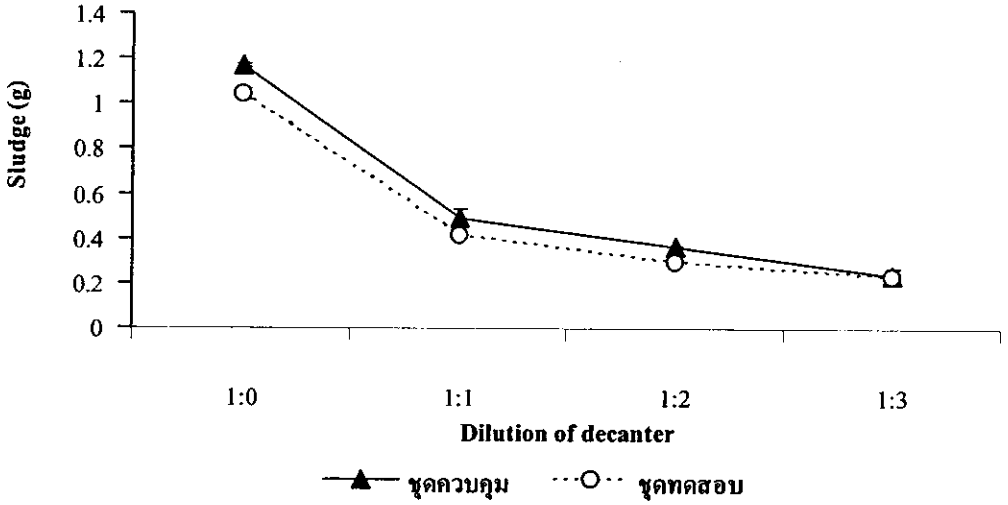


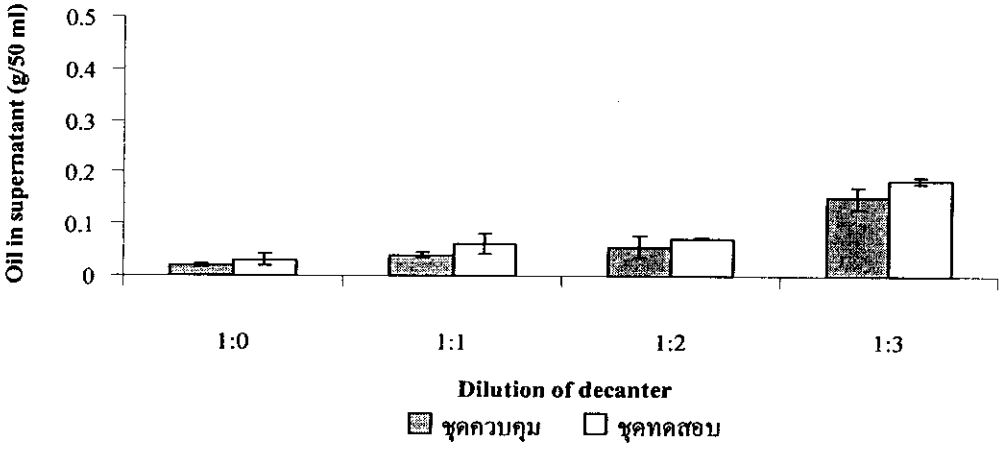
ภาพที่ 20 ผลของการแยกน้ำมันจากตะกอนน้ำทิ้งดีแคนเตอร์ โดยการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 (▲: ไม่เติม *Bacillus subtilis* A2; ○: เติม *Bacillus subtilis* A2 โดยบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เขย่า 200 รอบต่อนาที)

4.2 ผลของการเจือจางน้ำทิ้งต่อการแยกน้ำมันในน้ำทิ้ง

จากการศึกษาการแยกน้ำมันออกจากตะกอนในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ โดยใช้เชื้อ *Bacillus subtilis* A2 ซึ่งเลี้ยงในอาหารพื้นฐานที่มี CMC 1 เปอร์เซ็นต์ เขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ปริมาตรร้อยละ 10 เติมลงในน้ำทิ้งดีแคนเตอร์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 45 มิลลิลิตร โดยใช้น้ำทิ้งดีแคนเตอร์ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็น ไม่เจือจาง เจือจาง 1:1 1:2 และ 1:3 บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และเขย่า 200 รอบต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา 72 ชั่วโมง นำไปวัดค่าพีเอช น้ำมันในน้ำทิ้ง น้ำหนักตะกอน และปริมาณน้ำมันในตะกอน โดยชุดควบคุมจะไม่เติมเชื้อลงในตัวอย่างที่ทำการทดลอง ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 21 พบว่าปริมาณน้ำมันในตะกอนน้ำทิ้งดีแคนเตอร์ น้ำหนักตะกอนหลังจากปั่นเหวี่ยงน้ำทิ้งแล้วมีค่าลดลงตามความเจือจางของน้ำทิ้ง โดยที่น้ำทิ้งไม่เจือจางชุดควบคุมมีปริมาณตะกอน 1.17 กรัม และชุดทดสอบมีปริมาณตะกอนลดลง 1.04 กรัม น้ำทิ้งเจือจางระดับ 1:1 ชุดควบคุมและชุดทดสอบมีปริมาณตะกอน 0.49 และลดลงเป็น 0.41 กรัม น้ำทิ้งเจือจางระดับ 1:2 ชุดควบคุมและชุดทดสอบมีปริมาณตะกอน 0.36 และลดลงเป็น 0.29 กรัม และน้ำทิ้งเจือจางระดับ 1:3 ชุดควบคุมและชุดทดสอบมีปริมาณตะกอน 0.24 และลดลงเป็น 0.23 กรัม ทั้งนี้เมื่อปริมาณน้ำทิ้งถูกเจือจางปริมาณน้ำมันในตะกอนและส่วนใสย่อมเจือจางตามอัตราส่วนที่เท่ากันด้วย พบว่าปริมาณตะกอนหลังจากปั่นเหวี่ยงแยกน้ำทิ้งที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งเป็นชุดที่ไม่มีการเติมเชื้อจุลินทรีย์ ชุดทดสอบมีปริมาณตะกอนลดลง แสดงว่าเชื้อผลิตเอนไซม์เซลลูเลสมาย่อยเซลลูโลสที่มีอยู่ในตะกอนบางส่วน ส่วนปริมาณน้ำมันในตะกอนของชุดทดสอบมีปริมาณน้ำมันในตะกอนลดลงกว่าชุดควบคุมเล็กน้อย ส่วนผลของปริมาณน้ำมันในส่วนใสที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนแล้ว พบว่าในการทดลองน้ำทิ้งที่ไม่เจือจางชุดทดสอบมีปริมาณน้ำมันเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเท่านั้น ส่วนที่ระดับความเจือจาง 1:1 ชุดควบคุมและชุดทดสอบมีปริมาณน้ำมันในส่วนใส 0.04 และเพิ่มขึ้นเป็น 0.06 กรัม น้ำทิ้งเจือจางระดับ 1:2 ชุดควบคุมและชุดทดสอบมีปริมาณน้ำมัน 0.05 และเพิ่มขึ้นเป็น 0.07 กรัม และน้ำทิ้งเจือจางระดับ 1:3 ชุดควบคุมและชุดทดสอบมีปริมาณตะกอน 0.15 และเพิ่มขึ้นเป็น 0.18 กรัม ซึ่งการเจือจางน้ำทิ้งด้วยน้ำกลั่นจะเป็นการเพิ่มความสามารถในการละลายของสารต่างๆ ที่อยู่ในน้ำทิ้งได้ดียิ่งขึ้นและยังช่วยลดความหนืดอีกด้วย เพื่อให้เชื้อสามารถเจริญและผลิตเอนไซม์ได้ดี แต่ทั้งนี้การที่มีปริมาณน้ำมากเกินไปหรือเจือจางมาก ในสภาวะที่มีการเขย่าก็จะเกิดการแยกของน้ำมันได้ด้วย ดังนั้นในการทดลองนี้เลือกความเข้มข้นของน้ำทิ้งที่ระดับ 1:1 ไปศึกษาปัจจัยอื่นต่อไป



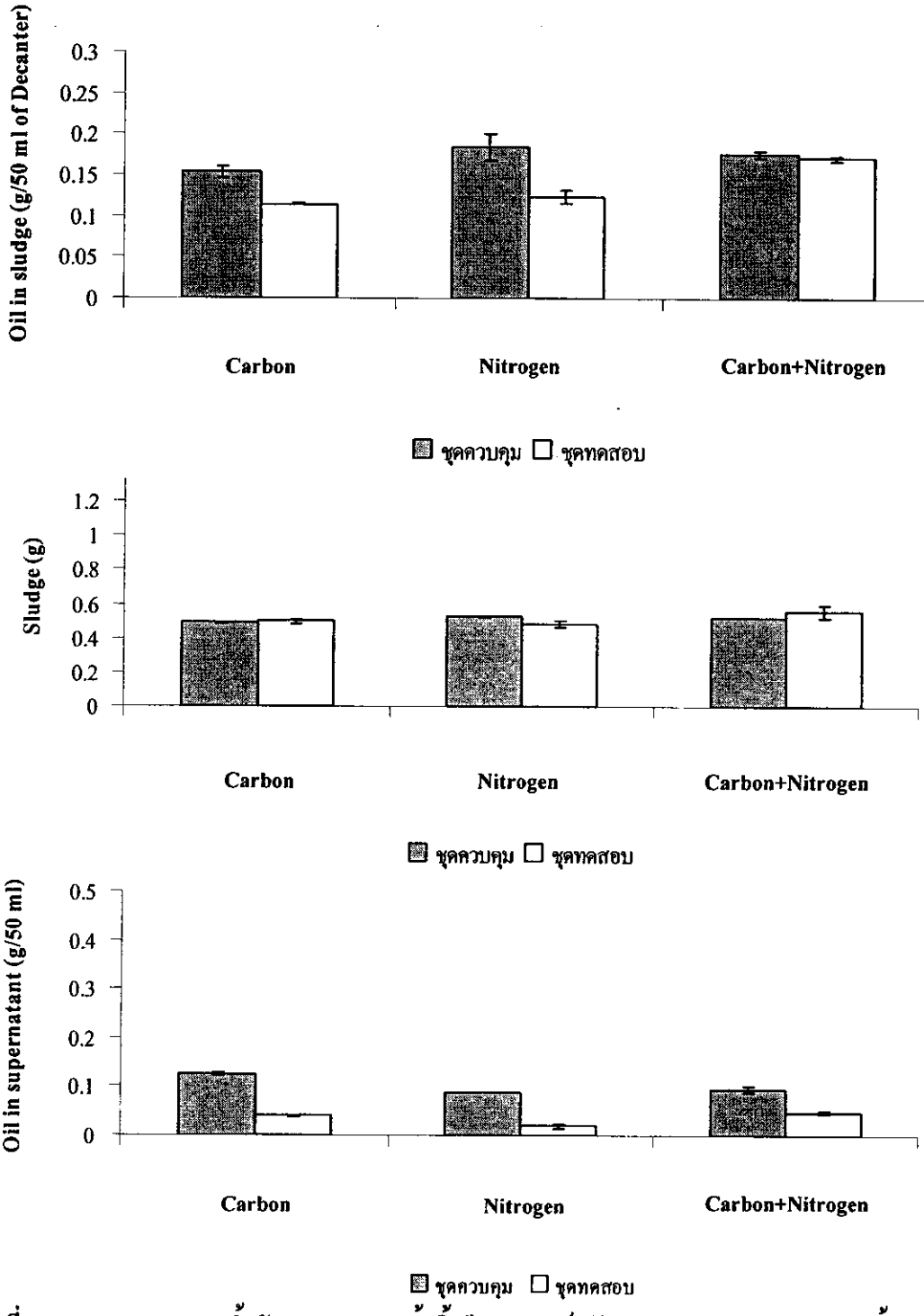




ภาพที่ 21 ผลของการแยกน้ำมันจากตะกอนน้ำทิ้งดีแคนเตอร์ ปริมาณตะกอน และปริมาณน้ำมันในส่วนใสหลังจากแยกตะกอนออก (▲,■: ไม่เติมเชื้อ *Bacillus subtilis* A2; ○, □: เติมเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 ใช้น้ำทิ้งปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เขย่า 200 รอบต่อนาที ที่เวลา 72 ชั่วโมง)

4.3 ผลของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญและแยกน้ำมันในน้ำทิ้ง

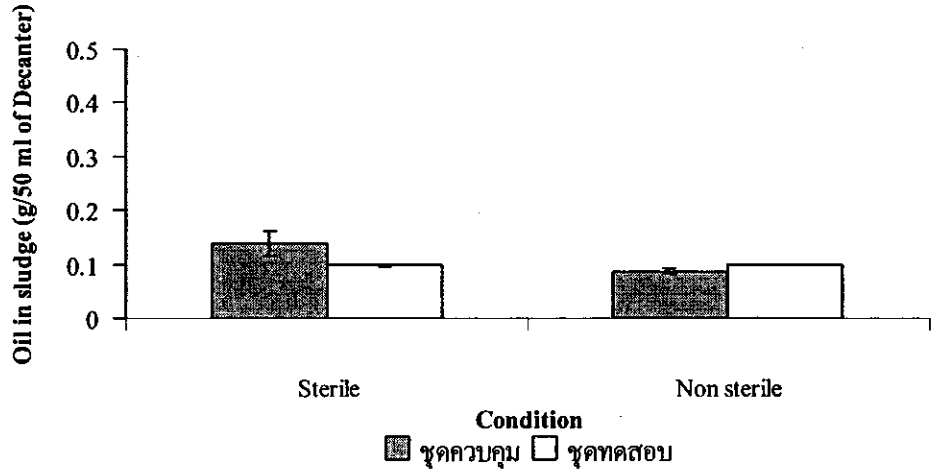
จากการศึกษาการแยกน้ำมันออกจากตะกอนในน้ำทิ้งดีแคนเตอร์ โดยใช้เชื้อ *Bacillus subtilis* A2 ซึ่งเลี้ยงในอาหารพื้นฐานที่มี CMC 1 เปอร์เซ็นต์ เขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ปริมาตรร้อยละ 10 เติมลงในน้ำทิ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปริมาตร 45 มิลลิลิตร ซึ่งได้ทำการเจือจางน้ำทิ้งเป็น 1:1 ที่มีการเติม CMC 1% และแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม คือ ยีสต์สกัด และ $NH_4H_2PO_4$ ความเข้มข้นรวม 0.1% โดยบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และเขย่า 200 รอบต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา 72 ชั่วโมง นำไปวัดค่าพีเอช น้ำมันในน้ำทิ้ง น้ำหนักตะกอน และปริมาณน้ำมันในตะกอน โดยชุดควบคุมไม่มีการเติมเชื้อลงในตัวอย่างที่ทำการทดลอง ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 22 พบว่าชุดการทดลองที่เติมแหล่งคาร์บอนหรือแหล่งไนโตรเจน หรือเติมทั้งแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน ในชุดทดสอบที่มีการเติมเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 ทั้ง 3 ชุด เมื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันในตะกอนแล้ว พบว่ามีปริมาณน้ำมันในตะกอนและปริมาณน้ำมันที่อยู่ในส่วนใสที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนมีปริมาณน้อยกว่าชุดควบคุม ซึ่งเป็นชุดที่ไม่มีการเติมเชื้อ ส่วนน้ำหนักของตะกอนพบว่าไม่มีความแตกต่างกัน ทั้งนี้เชื้อจุลินทรีย์น่าจะเลือกใช้แหล่งคาร์บอนที่เติมลงไปได้ง่ายกว่าเส้นใยที่อยู่ในตะกอน อีกทั้งแหล่งไนโตรเจนที่เติมลงไปมีส่วนไปช่วยในการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดีกว่าที่จะผลิตเอนไซม์เพื่อมาย่อยเส้นใยแล้วสามารถแยกน้ำมันออกได้ และยังพบว่าชุดการทดลองทั้ง 3 นั้นตะกอนมีลักษณะที่เหนียวมาก และน้ำส่วนใสที่มีการปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนแล้วมีสีที่คล้ำ ทั้งนี้เมื่อมีการเติมแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนอาจจะทำให้โมเลกุลของน้ำตาลซึ่งมีอยู่แล้วในน้ำทิ้งดีแคนเตอร์มีการเกาะกันหรือทำให้ตะกอนดีแคนเตอร์มีการเกาะกันเองทำให้น้ำมันยังอยู่ในกากตะกอนในปริมาณมาก อีกทั้งปริมาณน้ำมันที่หายไปบางส่วนเชื้อจุลินทรีย์อาจจะมีการนำไปใช้ในการเจริญในสภาวะดังกล่าวด้วย เนื่องจากเมื่อเวลาผ่านไป 72 ชั่วโมง ค่าพีเอชของชุดการทดลองทั้ง 3 ที่เป็นชุดควบคุมมีค่าพีเอชอยู่ระหว่าง 4.17-4.30 และค่าพีเอชของชุดทดสอบที่มีการเติมเชื้อพบว่ามีพีเอชอยู่ระหว่าง 6.40-6.87 แสดงว่าเชื้อมีการเจริญได้ในสภาวะดังกล่าว แต่สภาวะนั้นไม่เหมาะสมต่อการแยกน้ำมันออกจากตะกอนดีแคนเตอร์ และแสดงให้เห็นว่าการเติมแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนไม่ได้มีส่วนช่วยในการแยกน้ำมันจากกากตะกอนอีกด้วย

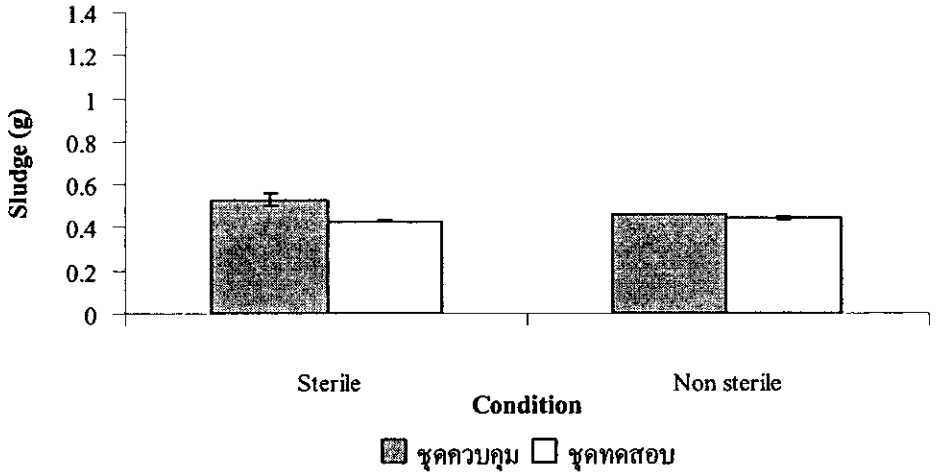


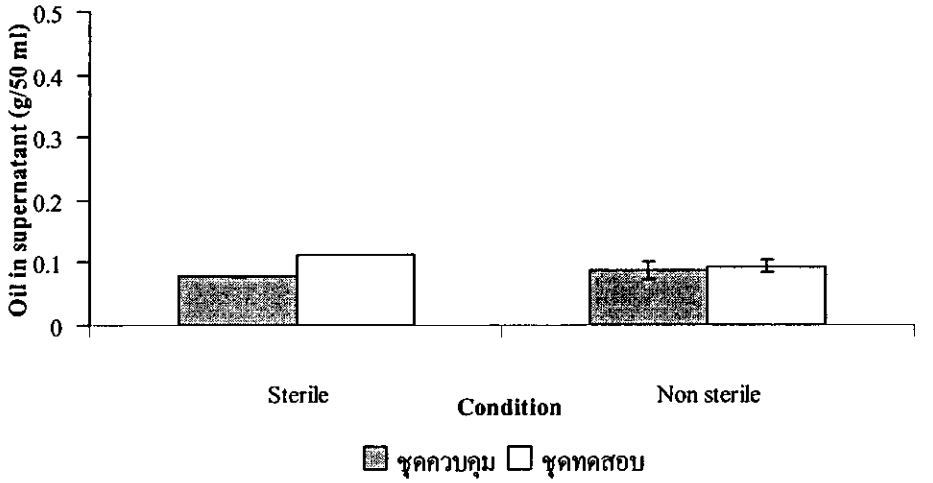
ภาพที่ 22 ผลของการแยกน้ำมันจากตะกอนน้ำทิ้งดีแคนเตอร์ ปริมาณตะกอน และปริมาณน้ำมันในส่วนใสหลังจากแยกตะกอนออก (เติมแหล่งคาร์บอน (1% CMC) ไนโตรเจน (ยีสต์สกัด และ $NH_4H_2PO_4$ ความเข้มข้นรวม 0.1%) และแหล่งคาร์บอนกับแหล่งไนโตรเจน (CMC, ยีสต์สกัด และ $NH_4H_2PO_4$) โดย ■ : ไม่เติมเชื้อ *Bacillus subtilis* A2; □: เติมเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เขย่า 200 รอบต่อนาที ที่เวลา 72 ชั่วโมง)

4.4 ผลของการฆ่าเชื้อน้ำทิ้งต่อการแยกน้ำมัน

จากการศึกษาการแยกน้ำมันออกจากตะกอนในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ โดยใช้เชื้อ *Bacillus subtilis* A2 ซึ่งเลี้ยงในอาหารพื้นฐานที่มี CMC 1 เปอร์เซ็นต์ เขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ปริมาตรร้อยละ 10 เติมลงในน้ำทิ้งที่เจือจาง 1:1 ปริมาตร 45 มิลลิลิตร โดยใช้น้ำทิ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อเปรียบเทียบกับไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และเขย่า 200 รอบต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา 72 ชั่วโมง นำไปวัดค่าพีเอช น้ำมันในน้ำทิ้ง น้ำหนักตะกอน และปริมาณน้ำมันในตะกอน โดยชุดควบคุมจะไม่เติมเชื้อลงในตัวอย่างที่ทำการทดลอง ผลการทดลองแสดงดังในภาพที่ 23 พบว่า ชุดทดสอบที่ใช้น้ำทิ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อและเติมเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 ลงไปมีปริมาณน้ำมันในตะกอน 0.098 กรัม ส่วนชุดควบคุมนั้นมีปริมาณมากกว่าเป็น 0.14 กรัม อีกทั้งปริมาณของตะกอนของชุดทดสอบลดลงมากกว่าชุดควบคุมและปริมาณน้ำมันของส่วนใสที่ปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนออกแล้วในชุดทดสอบ (0.11 กรัม) ที่เวลาดังกล่าวมีปริมาณมากกว่าชุดควบคุม (0.08 กรัม) แสดงให้เห็นว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่เติมลงไปมีการย่อยตะกอนและมีการปลดปล่อยน้ำมันออกมา ส่วนชุดการทดลองที่ใช้น้ำทิ้งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อและเติมเชื้อลงไปมีปริมาณน้ำมันในตะกอน 0.098 กรัม ส่วนชุดควบคุมนั้นมีปริมาณน้ำมันในตะกอนเป็น 0.086 กรัม และปริมาณของตะกอนของชุดทดสอบก็ไม่แตกต่างกันกับชุดควบคุมและปริมาณน้ำมันของส่วนใสที่ปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนออกแล้วในชุดทดสอบ (0.093 กรัม) ที่เวลาดังกล่าวมีปริมาณมากกว่าชุดควบคุมเล็กน้อย (0.086 กรัม) แสดงว่าน้ำทิ้งดีแคนเตอร์ที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้ออาจจะมีเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มอื่นที่อยู่ในน้ำทิ้งอยู่แล้วเจริญร่วมด้วยทำให้เชื้อที่ใส่ในชุดการทดลองนั้นต้องเจริญแข่งขันกันและไม่สามารถแยกน้ำมันจากกากตะกอนดีแคนเตอร์ได้ ผลการทดลองสอดคล้องกับปรีชา มุณีศรี (2538) ทำการศึกษาการบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ พบว่าน้ำทิ้งดีแคนเตอร์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้ผลของการกำจัดน้ำมันได้ดีกว่าน้ำทิ้งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ เช่นเดียวกันกับ Laohaprapanon และคณะ (2007) ได้ทำการทดลองการฆ่าเชื้อน้ำทิ้งดีแคนเตอร์ในการเลี้ยงเชื้อ SO1 และ SO2 เพื่อแยกน้ำมัน พบว่าเชื้อสามารถเจริญและแยกน้ำมันได้ดีในน้ำทิ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ดังนั้นหากจะแยกน้ำมันจากกากตะกอนดีแคนเตอร์โดยใช้การเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 ควรจะต้องมีการฆ่าเชื้อน้ำทิ้งดีแคนเตอร์ก่อน ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์ที่มีการปนเปื้อนในน้ำทิ้งดีแคนเตอร์ได้ถูกทำลายทำให้ไม่ไปรบกวนการเจริญไม่ว่าจะเป็นการใช้สารอาหารและการทำงานของเอนไซม์ที่เชื้อผลิตขึ้นส่งผลให้เชื้อสามารถย่อยและแยกน้ำมันจากกากตะกอนได้ดีกว่า แต่ทั้งนี้การฆ่าเชื้อน้ำทิ้งทำให้เกิดการสิ้นเปลืองพลังงานและไม่เหมาะสมที่จะนำไปใช้จริง







ภาพที่ 23 ผลของการแยกน้ำมันจากตะกอนน้ำทิ้งดีแคนเตอร์ ปริมาณตะกอน และปริมาณน้ำมันในส่วนใสหลังจากแยกตะกอนออก โดยใช้น้ำทิ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อและไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ (■: ไม่เติมเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 ; □:เติมเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 ใช้น้ำทิ้งปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส โดยการเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่เวลา 72 ชั่วโมง)

5. ศึกษาการแยกน้ำมันจากน้ำทิ้งที่โรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

จากการศึกษาสภาวะต่างๆ จะเลือกสภาวะที่เหมาะสมที่ดีสุดในการแยกน้ำมันจากน้ำทิ้งโดยใช้เอนไซม์ หรือการใช้เชื้อ *Bacillus subtilis* A2 นำไปทดลองที่โรงงานในขนาด 20 ลิตรนั้น พบว่าการแยกน้ำมันจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยใช้ส่วนใสของอาหารที่มีการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 เวลา 12 ชั่งโมง และเอนไซม์เซลลูเลสหยาบ ซึ่งได้ควบคุมปริมาณกิจกรรมเอนไซม์ที่เท่ากัน และทำการทดลองในสภาวะที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ โดยทำในกระบอกตวง 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมทั้งสามชุดการทดลองมีการแยกน้ำมันออกจากน้ำทิ้งน้อยมาก เห็นความแตกต่างไม่ชัดเจน แสดงว่าประสิทธิภาพของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* A2 ยังไม่ค่อยดีและไม่สามารถสรุปได้ว่าสามารถแยกน้ำมันจากกากตะกอนดีแคนเตอร์ได้ ทั้งนี้จุลินทรีย์อาจจะต้องการการเจริญเพื่อผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในปริมาณที่มากขึ้นมาย่อยเซลลูโลสในกากตะกอน อีกทั้งอาจจะต้องเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ จากการศึกษาลักษณะของเอนไซม์ที่ผลิตได้ พบว่าสามารถทนต่ออุณหภูมิและพีเอชได้ไม่ดี ซึ่งก็เป็นอีกสาเหตุที่ไม่สามารถนำเอนไซม์ไปประยุกต์ใช้ในการแยกน้ำมันจากน้ำทิ้งที่โรงงานสกัดน้ำมันปาล์มได้ อีกทั้งยังไม่คุ้มทุนและเวลาในการทำ และจากการศึกษาในส่วนการใช้เชื้อ *Bacillus subtilis* A2 ในการเจริญและแยกน้ำมันในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ โดยการเขย่า พบว่าที่เวลา 72 ชั่วโมง สามารถแยกน้ำมันออกจากตะกอนได้ในปริมาณหนึ่ง แต่ชุดการทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อสามารถให้การแยกน้ำมันออกจากตะกอนในน้ำทิ้งได้ดีกว่าชุดการทดลองที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ ถึงแม้การฆ่าเชื้อสามารถให้การแยกน้ำมันออกจากตะกอนในน้ำทิ้งได้ดีกว่านั้นก็ยังคงเป็นไปได้ยากที่จะใช้ในโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มเพราะมีปริมาณน้ำทิ้งมากและสิ้นปลืองพลังงาน

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* โดยแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญ คือ อาหารพื้นฐานที่มีโมลาส รองลงมา คือ CMC และน้ำตาลกลูโคส ส่วนแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ คือ อาหารพื้นฐานที่มี CMC เป็นแหล่งคาร์บอน ผลของแหล่งไนโตรเจน พบว่าเชื้อสามารถเจริญ และผลิตเอนไซม์ได้ดีในอาหารพื้นฐานที่มียีสต์สกัดและ $NH_4H_2PO_4$ ผลของค่าพีเอช พบว่าอาหารพื้นฐานที่มีพีเอช 6.0 มีการเจริญของเชื้อสูงที่สุด ผลิตเอนไซม์ได้ 0.12 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 12 ชั่วโมง และอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 45 องศาเซลเซียส ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่มีกิจกรรม 0.15 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 12 ชั่วโมง

จากการทำบริสุทธิ์ขั้นต้นด้วยการตกตะกอนส่วนใสจากการเลี้ยงเชื้อ *Baciillus subtilis* A2 พบว่าการตกตะกอนด้วยอะซิโตนสามารถตกตะกอนได้เอนไซม์เซลลูเลสมากที่สุด 44.05 เปอร์เซ็นต์ กิจกรรมจำเพาะ 0.84 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ความบริสุทธิ์ 3.39 เท่า จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานและความคงตัวของเอนไซม์หยาบ ผลของพีเอช พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสสามารถทำปฏิกิริยาได้ดีที่สุดในบัพเฟอร์ที่มีพีเอช 5.0 ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ผลของความคงตัวต่อพีเอชของเอนไซม์เซลลูเลสมีความคงตัวสูงในช่วงพีเอช 4-5 และมีความคงตัวสูงที่สุดที่ 45 องศาเซลเซียส

การแยกน้ำมันจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้จากเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 พบว่ามีการแยกน้ำมันออกจากน้ำทิ้งในปริมาณยังน้อย ทำให้เห็นความแตกต่างไม่ค่อยชัดเจน ส่วนการทดลองที่ใช้เอนไซม์เซลลูเลสที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนที่เวลา 12 ชั่วโมง ปริมาณตะกอนจะลดลงจาก 24.00 เป็น 20.33 กรัมต่อลิตร และปริมาณน้ำมันในตะกอนลดลง เป็น 1.9 กรัมต่อลิตร แต่ประสิทธิภาพของการใช้เอนไซม์ยังไม่ค่อยดีหรือแยกได้ปริมาณที่น้อยมากจึงได้ศึกษาการแยกน้ำมันจากน้ำทิ้งโดยใช้เชื้อ *Bacillus subtilis* A2 ในกระบอกตวง 50 มิลลิลิตร โดยไม่มีการเขย่า พบว่าไม่สามารถสรุปได้ว่าสามารถแยกน้ำมันจากกากตะกอนดีแคนเตอร์ได้ ทั้งนี้จุลินทรีย์อาจจะต้องการการเจริญเพื่อผลิตเอนไซม์เซลลูเลสมาย่อยเซลลูโลสในกากตะกอนและอาจจะสามารถแยกน้ำมันออกได้

การใช้เชื้อ *Bacillus subtilis* A2 ในการเจริญและแยกน้ำมันในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ โดยการเขย่า พบว่าที่เวลา 72 ชั่วโมง ทำให้มีปริมาณของตะกอนของน้ำทิ้งลดลงมากที่สุด

และมีปริมาณน้ำมันในส่วนใสหลังจากปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนออกมามากที่สุด และการเจือจางของน้ำทิ้งที่ความเข้มข้นระดับ 1:1 ให้ผลการแยกน้ำมันออกจากตะกอนดีที่สุด แต่พบว่าการเติมแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนทำให้การแยกน้ำมันในน้ำทิ้งลดลง และการใช้น้ำทิ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้การแยกน้ำมันออกจากตะกอนในน้ำทิ้งได้ดีกว่าชุดการทดลองที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ

จากการศึกษาสภาวะต่างๆ จะเลือกสภาวะที่เหมาะสมที่ดีสุดในการแยกน้ำมันจากน้ำทิ้งโดยใช้เอนไซม์ หรือการใช้เชื้อ *Bacillus subtilis* A2 นำไปทดลองที่โรงงานในขนาด 20 ลิตร พบว่ามีการแยกน้ำมันออกจากน้ำทิ้งน้อยมาก เห็นความแตกต่างไม่ชัดเจน แสดงว่าประสิทธิภาพของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* A2 ยังไม่ค่อยดีหรือแยกได้ปริมาณที่น้อยมากและไม่สามารถสรุปได้ว่าสามารถแยกน้ำมันจากกากตะกอนดีแคนเตอร์ได้ อีกทั้งจากการศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์ที่ผลิตได้ พบว่าไม่สามารถคงทนต่ออุณหภูมิและพีเอชได้ ยากต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในการแยกน้ำมันจากน้ำทิ้งที่โรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ถึงแม้การฆ่าเชื้อสามารถให้การแยกน้ำมันออกจากตะกอนในน้ำทิ้งได้ดีกว่านั้นก็ยังคงเป็นไปได้ยากในโรงงานอุตสาหกรรมโดยทั่วไปที่มีบ่อขนาดใหญ่ สิ้นเปลืองพลังงาน

เอกสารอ้างอิง

กรรณิการ์ สิริสิงห์. 2522. น้ำมันและกรีส ใน เคมีของน้ำ น้ำโสโครก และการวิเคราะห์. คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

จิตรลดา กาญจนสาวิตรี และ ชญานุตม์ ศรีพิทักษ์. 2547. การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสเพื่อแยกน้ำมันจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม. โครงงานนักศึกษา คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

จารุวรรณ มณีศรี. 2538. การผลิตและการประยุกต์ใช้ไซลาเนสและเซลลูเลสจากการปาล์มและกากสลัดจ์โดยเชื้อ *Aspergillus niger* ATCC 6275. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ชรินทร์ เตชะพันธุ์. 2542. การผลิตมอลท์วิสกี้จากธัญพืชที่ปลูกในประเทศไทย รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์เสนอต่อมหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ซีหยัะ จันทอง และฮาราตี รอนิง. 2548. การบำบัดเบื้องต้นของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดย *Bacillus* sp. A2.โครงงานนักศึกษา คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

นัยทัศน์ ภู่ศรัณย์, ไพบูลย์ ธรรมรัตน์วาสิก, เสาวลักษณ์ จิตรบรรเจิดกุล และวรรณาวงศ์กรเชาวลิต. 2529. การศึกษาและวิเคราะห์สถานภาพปริมาณของเสียจากโรงงานแปรรูปผลิตผลการเกษตรในภาคใต้ของประเทศไทยเน้นอุตสาหกรรมยางพารา. ว. สงขลานครินทร์. 8, 197-203.

ธีระ เอกสมทราเมษฐ์, ชัยรัตน์ นิลนนท์, ธีระพงศ์ จันทรนิยม, ประกิจ ทองคำ และหะสัน กือมะ. 2543. การจัดการสวนปาล์มน้ำมัน : โครงการจัดตั้งศูนย์วิจัยและพัฒนาการผลิตปาล์มน้ำมัน. คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ธีระ เอกสมทราเมษฐ์, ชัยรัตน์ นิลนนท์, ธีระพงศ์ จันทรนิยม, ประกิจ ทองคำ และสมเกียรติ สีสนอง. 2548. เส้นทางสู่ความสำเร็จ การผลิตปาล์มน้ำมัน. ศูนย์วิจัยและพัฒนาการผลิตปาล์มน้ำมัน. คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

นฤชิต มณีโชติ. 2549. ปัจจัยที่มีผลต่อการยอมรับโครงการปลูกปาล์มน้ำมันทดแทนพลังงาน ปี 2549 ของเกษตรกรจังหวัดสงขลา. สารนิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาธุรกิจเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

เบญจวรรณ ชิตมณี. 2534. การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในน้ำทิ้งของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยเชื้อราที่แยกได้. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ปรีชา มุณีศรี. 2539. การบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยใช้จุลินทรีย์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ผาสุข กุลละวณิชย์, สัณห์ชัย กลิ่นพิกุล, สุมณฑา กุลละวณิชย์ และสุรเชษฐ์ ชิระมณี. 2531. โครงการแปรรูปผลิตภัณฑ์และพัฒนาด้านการตลาดของโรงงานหีบน้ำมันปาล์มขนาดเล็กตามพระราชดำริ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

พัชรา วีระกะลัส. 2543. เอนไซม์. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 344 หน้า

พูนสุข ประเสริฐสรรพ์, เสาวลักษณ์ จิตรบรรเจิดกุล และอรัญ หันพงศ์กิตติกูล. 2533. กระบวนการผลิตและการใช้ประโยชน์วัสดุเศษเหลือทิ้งและคุณลักษณะน้ำทิ้งจากโรงงานน้ำมัน. ว. สงขลานครินทร์ 12 : 203-211.

รณชัย ไชยศรี. 2550. กระบวนการหมักแบบไร้อากาศสองขั้นตอนของน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในถังปฏิกรณ์ UASB และ UFAF. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สุรพล สายพานิช. 2537. ระบบการบำบัดน้ำเสียแบบ Activated การควบคุมและดูแลระบบบำบัดน้ำเสีย. ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

โสภา จันทภาโส. 2542. ปัจจัยที่มีผลต่อการแยกสารแขวนลอยและน้ำมันจากน้ำทิ้งโรงงานน้ำมันปาล์มโดยใช้เอนไซม์และการลดความเข้มของสี. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

หัสลินดา บินมะแอ. 2548. การบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มด้วยเชื้อราทนร้อนที่ผลิตพอลิเมอร์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล. 2539. จุลินทรีย์ที่มีความสำคัญทางด้านอาหาร. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อรัญ หันพงศ์กิตติกุล, พูนสุข ประเสริฐสรรพ์, เสาวลักษณ์ จิตรบรรเจิดกุล และวีรศักดิ์ ทองลิมปี. 2537. การศึกษาการแยกน้ำมันจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม: เอกสารประกอบการประชุมสัมมนาการลดการสูญเสียน้ำมันในอุตสาหกรรมน้ำมันปาล์ม ณ ห้องเทพธานี โรงแรมสยามธานี สุราษฎร์ธานี. 7 เมษายน 2537.

อารี กังแฮ. 2536. การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสจากวัสดุเศษเหลือจากโรงงานน้ำมัน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

A.O.A.C. 1990. Official Method of Analysis of the Association of Officiatical Chemists. 15th ed. The Association of Official Analytical Chemists. Inc. Virginia.

Ariffin, H., Abdullah, N., Umikalsom, M. S., Shirai, Y. and Hassan, M. A. 2008. Production of bacterial endoglucanase from pretreated oil palm empty fruit bunch by *Bacillus pumilus* EB3. J. Biosci. Bioeng. 106: 231-236.

Ahmad, A.L., Ismail, S. and Bhatia, S. 2003. Water recycling from palm oil mill effluent (POME) using membrane technology. Desalination. 157: 87-95.

Archana, A. and Satyanarayana, T. 1997. Xylanase production by thermophilic *Bacillus licheniformis* A99 in solid-state fermentation. Enzyme Microb. Tech. 21: 12–7.

APHA, AWWA and WPCF. 1992. Standard Method for Examination of Water and Wastewater. 17th ed. AmericanPubilc Health Association Washington D.C.

Bajaj, B. K., Pangotra, H., Wani, M. A., Sharma, P. and Sharma, A. 2009a. Partial purification and characterization of a highly thermostable and pH stable endoglucanase from a newly isolated *Bacillus* strain M-9. Indian J. Chem. Technol. 16: 382-387.

Bajaj, B. K., Pangotra, H., Wani, M. A., Sharma, A. and Sharma, P. 2009b. Characterization of thermo-tolerant and acid/alkali tolerant B-glucosidase from bacterial isolated M+. J. Sci. Ind. Res. 68:242-247.

Bastawde, K.B. 1992. Xylan structure : Microbial xylanase and their mode of action. World J. Microb. Biot. 8: 353-368.

Beker, P., Koster, D., Popov, M.N., Markossian, S., Antranikian, G. And Markl, H. 1999. The biodegradation of olive oil and the treatment of lipid-rich wool scouring wastewater under aerobic thermophilic condition. Water Res. 33: 653-660.

Bentham, R., Mccluure, N. and Catchetrid, D. 1997. Biotreatment of an industrial waste oil condensate. Water Sci Technol. 36: 125-129.

Bin-Amwarali-Khan, F.A. and Hus-Aini, A. A. S. A. 2006. Enhancing á amylase and cellulase in vivo enzyme expressions on sago pith residue using *Bacillus amyloliquefaciens* UMAS 1002. J. Biotechnol. 5: 391-403.

Bonner, P. L. R. 2007. Protein purification. *In* Protein Purification (The Basics). (Bonner, P. L. R., ed.). p. 26. Taylor & Francis. New York.

Chahal, D. S. 1983. Foundation of biochemical engineering, kinetics and thermodynamic *In* Biological System ACS Symp. Ser. 207. (Blanch, H.W., Papautsakis, E.T. and Stephanopoulos, G., ed.). pp. 421-442. American ChemicalSociety, Washington D.C.

Chen, S. and Wayman, M. 1991. Cellulase production induced by carbon sources derived from waste newspaper. Process Biochem. 26: 93-100.

Dickey, L., Kurantz, M. and Parris, N. 2008. Oil separation from wet milled corn germ dispersions by aqueous extraction and aqueous enzymatic extraction. Industrial Crops and Products. 27: 303–307.

Doppelbauer, R., Esterbauer, H., Steiner, W., Lafferty, R. and Steinmuller, H. 1987. The use of cellulosic wastes for production of cellulases by *Trichoderma reesei*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 26: 485–494.

Gessesse, A. and Mamo, G. 1999. High-level xylanase production by an alkaliphilic *Bacillus* sp. by using solid-state fermentation. Enzyme Microb. Tech. 25: 68-72.

Gomes, I., Gome, J., Steiner, W. and Esterbauer, H. 1992. Production of cellulose and xylanase by a wide strain of *Trichoderma viride*. Appl. Microbiol. Biot. 36: 701-707.

Hans-Walter, H. 2005. Plant Biochemistry. 3rd ed. Elsevier Academic Press. Oxford.

Heck, J. X., Flores, S. H., Hertz, P. F. and Ayub, M. A. Z. 2005. Optimization of cellulase-free xylanase activity produced by *Bacillus coagulans* BL69 in solid-state cultivation. Process Biochem. 40: 107–112.

Ho, C. C. and Tan, Y. K. 1983. Centrifugal fractionation studies on the particulates of palm oil mill effluent. Water Res. 17: 613-618.

Hurst, C. J., Crawford, R. L., Knudsen, G. R., Mcinerney, M. J. and Stetzenbach, L. D. 2002. Modeling the fate of microorganisms in water, wastewater, and soil. *In* Manual of Environmental Microbiology. 2nd ed. p. 300-308. ASM Press. Washington DC.

Hwang, T. K., Ong, S. M., Seow, C. C. and Tan, H. K. 1978. Chemical composition of palm oil mill effluent. Planter. 54: 749-756.

Ibrahim, A., Yeoh, B. G., Cheah, S. C., Ma, A. N., Ahmad, S., Chew, T. Y., Raj, R. and Wahid, M. J. A. 1984. Thermophilic anaerobic contact digestion of palm oil effluent. Water Sci. Technol. 17: 155-166.

Immanuel, G., Dhanusa, R., Prema, P. and Palavesam, A. 2006. Effect of different growth parameters on endoglucanase enzyme activity by bacteria isolated from coir retting effluents of estuarine environment. Int. J. Environ. Sci. Technol. 3: 25-34.

Jaradat, Z., Dawagreh, A. Ababneh, Q. and Saadoun, I. 2008. Influence of culture conditions on cellulase production by *Streptomyces* sp. (Strain J2). Jordan J. Biol. Sci. 1: 141-146.

Joglekar, A.V. and Karanth, N.G. 1984. Studies on cellulose production by mutant *Penicilium funiculosum* UV-49. Biotechnol. Bioeng. 26: 1079-1084.

Kaewchai, S. and Prasertsan, P. 2002. Screening and application of thermotolerlant microorganisms and their flocculants for treatment of palm oil mill effluent. Songklanakarin. J. Sci. Technol. 24: 413-420.

Kawamori, M., Morikawa, Y., Ado, Y. and Takasawa, S. 1986. Production of cellulose from alkaline-treated bagasse in *Trichoderma reesei.* Appl. Microbiol. Biot. 24 : 454- 458.

Kim, J. Y., Hur, S. H. and Hong, J. H. 2005. Purification and characterization of an alkaline cellulase from a newly isolated alkalophilic *Bacillus* sp. HSH-810. Biotechnol. Lett. 27: 313–316.

Klemm, D., Heublein B., Fink, H. and Bohn, A. 2005. Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. Chem In form. 36: 3358-3393.

Krishna, C. 1999. Production of bacterial cellulase by solid state bioprocessing of banana waste. Bioresour. Technol. 69: 231-239.

Kulkarni, N. and Rao, M. 1996. Application of xylanase from alkaliphilic thermophilic *Bacillus* sp. NCIM 59 in biobleaching of bagasse pulp. J. Biotechnol. 51 : 167-173.

Laohaprapanon, T. 2001. Comparison of physical, chemical and biological methods for oil separation from palm oil mill effluent. Master of Philosophy in Environment Technology, King Momgkut's University of Technology Thonburi.

Laohaprapanon, T., Prasertsan, P. and H-Kittikun, A. 2005. Physical and chemical separation of oil and suspended solid from POME. Asain J. Energy Environ. 6: 39-55.

Laohaprapanon, T., Prasertsan, P. and H-Kittikun, A. 2007. Screening of thermotolerant microorganisms and application for oil separation from palm oil mill wastewater. Songklanakarin J. Sci. Technol. 29: 801-808.

Lin, C.Y. and Lay, C.H. 2004. Carbon/nitrogen-ratio effect on fermentative hydrogen production by mixed microflora. Int. J. Hydrogen Energ. 29 : 41 – 45.

Lonsane, B. K., Ghildyal, N. P., Budiatwan, S. and Ramakrishna, S. V. 1985. Engineering aspects of solid state fermentation. Enzyme Microb. Technol. 7 : 258-265.

Lonsane, B. K., Saucedo-Castanedo, G., Raimbault, M., Roussos, S., Viniegra-Gonzalez, G., Ghildyal, N. P., Ramakrishna, M. and Krishnaiah, M. M. 1992. Scale up strategies for solid state fermentation system. Process Biochem. 27: 259-273.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin-phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 256-275.

Maheva, E., Djelveh, G., Larroche. C. and Gros, J.B. 1984. Sporulation of *penicillium roqueforti* in solid substrate fermentation. Biotechnol. Lett. 6: 97-102.

Mandels, M. and Weber, J. 1969. The production of cellulase. *In.* Cellulase and their Applications (Gould, R.E. ed.). pp. 391-398. Adv. Chem. Ser. 95, American Chemistry Society, Washington D. C.

Mawadza, C., Hatti-Kaul, R., Zvauya, R. and Mattiasson, B. 2000. Purification and characterization of cellulases produced by two *Bacillus* strains. J. Biotechnol. 83 : 177–187.

Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicyclic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31 : 426-426.

Mohr, H. 1995. Plant Physiology. Vol. 1 . Springer. Verlag Berlin Heidelberg. New York.

Najafpour, G., Yieng, H.A., Younesi, H. and Zinatizadeh, A. 2005. Effect of organic loading on performance of rotating biological contactors using palm oil mill effluents. Process Biochem. 40 : 2879–2884.

Narasimha, G., Sridevi, A., Viswanath, B., Chandra, S. M. and Reddy, R.B. 2006. Nutrient effects on production of cellulolytic enzymes by *Aspergillus niger*. African J. Biotechnol. 5: 472-476.

Nath, D. and Rao, M. 2001. pH dependent conformational and structural changes of xylanase from an alkalophilic thermophilic *Bacillus* sp (NCIM 59). Enzyme Microb. Tech. 28 : 397–403.

Ng, W. J., Wong, K. K. and Chin, K. K. 1985. Two-phase anaerobic treatment kinetic of palm oil wastes. Water Res. 19: 667-669.

Niranjane, A. P., Madhou, P. and Stevenson, T. W. 2007. The effect of carbohydrate carbon sources on the production of cellulase by *Phlebia gigantea*. Enzym. Microb. Technol. 40: 1464-1468.

O-Thong, S. 2007. Optimization and microbial community analysis for production of biohydrogen from palm oil mill effluent by thermophilic fermentative process. Degree of Doctor of Philosophy in Biotechnology, Prince of Songkla University.

Okoshi, H., Ozaki, K., Shikata, S., Oshino, K., Kawai, S. and Ito, S. 1990. Purification and characterization of multiple carboxymethyl cellulase from *Bacillus* sp. KSM-522. Agric. Biol. Chem. 54:83-89.

Okuda, S.I., Ito, K., Ozawa, H. and Izaki, K. 1991. Treatment of lipid-containing waste-water using bacteria which assimilate lipids. J. Ferment. Bioeng. 71 : 424-429.

Oswal, N., Sar, P.M., Zinjarde, S.S. and Pant, A. 2002. Palm oil mill effluent treatment by a tropical marine yeast. Bioresour. Technol. 85 : 35–37.

Panda, T. 1989. Stimulation of shake condition in bioreactor for the biosynthesis of cellulase and xylanase by a mix culture of *Trichoderma reesei* D 1- 6 and *Aspergillus wentii* PT2804. Process Biochem. 104-108.

Pechsuth, M., Prasertsan, P. and Ukita, M. 2001. Biopretreatment of palm oil mill effluent by thermotolerlant polymer-producing fungi. Songklanakarin J. Sci. Technol. 23 : 711-777.

Pham, P.L., Taillandier, P., Delma, P. and Strehaiano, M. 1998. Production of xylanases by *Bacillus polymyxa* using lignocellulosic wastes. Ind. Crop Prod. 7 : 195–203.

Pham, P.L., Strehaiano, P., Taillandier, P. 1998. Effect of aeration on xylanase production by Bacillus sp. I-1018. Bioprocess Eng. 18: 41-43.

Poorna, C.A. and Prema, P. 2006. Production and partial characterization of endoxylanase by *Bacillus pumilus* using agro industrial residues. Biochem. Eng. J. 32 : 106–112.

Ray, A. K., Bairagi, A., Sarkarghosh, K. and Sen, S. K. 2007. Optimization of fermentation conditions for cellulase production by *Bacillus subtilis* CY5 and *Bacillus circulans* TP3 isolated from fish gut. AIEP. 37:47–53.

Robertson, J. A., Ryden, P., Botham, R. L., Reading, L., Gibson, G. and Ring, S. G. 2001. Structure properties of diet-derived polysaccharides and their influence on butyrate production during fermentation. Brit. J. Nutr. 81: S219-S223.

Robson, L. and Chambliss, G. H. 1984. Characterization of the cellulolytic activity of a *Bacillus* isolate. Appl. Environ. Microbiol. 47:1039-1046.

Salvador, L.D., Suganuma, T., Kitahara, K., Fukushige, Y. and Tanoue, H. 2002. Degradation of cell wall materials from sweetpotato, cassava, aid potato by a bacterial protopectinase and terminal sugar analysis of the resulting solubilized products. J. Biosci. Bioeng. 93 : 64-72.

Sa-Pereira, P., Ferreira, M.C. and Barros, M.R.A. 2002. Enzymatic properties of a neutral endo-1,3(4)-*B*-xylanase Xyl II from *Bacillus subtilis*. J. Biotechnol. 94 : 265–275.

Setiadi, I., Husaini. And Djajadiningrat, A. 1996. Palm oil mill effluent treatment by anaerobic baffled reactors: recycle effects and biokinetic parameters. Water Sci. Technol. 34 : 59-66.

Shah, A. K., Sidid, S. S., Ahmad, A. and Rele, M. V. 1999. Treatment of bagasse pulp with cellulase-free xylanases from an alkalophilic *Bacillus* sp. *Sam-3*. Bioresour. Technol. 68 : 133-140.

Shanmughapriya, S., Kiran, G. S., Selvin, J., Thomas, T. A. and Rani, C. 2009. Optimization, Purification, and characterization of extracellular mesophilic alkaline cellulase from sponge-associated *Marinobacter* sp. MSI032. Appl. Biochem. Biotechnol. DOI 10.1007/s12010-009-8747-0.

Suto, M., Takebayashi, M., Saito, K., Tanaka, M., Yokota, A. and Tomita, F. 2002. Purification and properties of acid stable xylanase from *Aspergillus kawachii*. J. Biosci. Bioeng. 93: 88-90.

Taleb, A. K. A. A., Mashhoor, W. A., Nasr, S. A., Sharaf, M. S. and Abdel-Azeem, H. H. M. 2009. Nutritional and Environmental Factors Affecting Cellulase Production by Two Strains of Cellulolytic Bacilli. Aust. J. Basic Appl. Sci. 3: 2429-2436.

Teclu, D., Tivchev, G., Laing, M. and Wallis, M. 2009. Determination of the elemental composition of molasses and its suitability as carbon source for growth of sulphate-reducing bacteria. J. Hazard. Mater. 161: 1157–1165.

Tsao, G.T. and Chaing, L. 1983. Cellulose and hemicellulose technology. *In* The Filamentous Fungi. (Smith, J.E., Berry, D.R. and Kristiansen, B., ed.). pp. 296-326. New York: John Wiley & Son Inc.

Vijayaraghavan, K. and Ahmad, D. 2006. Biohydrogen generation from palm oil mill effluent using anaerobic contact filter. Int. J. Hydrogen Energ. 31: 1284–1291.

Vijayaraghavan. K., Ahmad, D. and Aziz, M. E. B. A. 2007. Aerobic treatment of palm oil mill effluent. J. Environ. Manage. 82: 24–31.

Virupakshi, S., Babu, K.G., Galkwad, S.R. and Naik, G.R. 2005. Production of a xylanolytic enzyme by a thermoalkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 in solid state fermentation. Process Biochem. 40 : 431-435.

Wong, P. W., Nik, M. S., Meenakshisundaram, N. and Balaraman, V. 2002. Pre-treatment and membrane ultrafiltration using treated palm oil mill effluent (POME). Songklana-karin J. Sci. Technol. 24: 891-898.

Zinatizadeh, A. A. L., Mohamed, A. R., Mashitah, M. D., Abdullah, A. Z. and Hasnain-Isa, M. 2007. Optimization of pre-treated palm oil mill effluent digestion in an up-flow anaerobic sludge fixed film bioreactor: A comparative study. J. Biochem. Eng. 30: 226-237.

ภาคผนวก

1. การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีการ Dinitrosalicylic acid ของ Miller (1959) (Robertson *et al.*, 2001)

ดูดส่วนใสที่ได้จากข้อ 14.2.3 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรผสมกับสารละลาย CMC 1.0 เปอร์เซ็นต์ หรือ Xylan 1.0 เปอร์เซ็นต์ ที่ละลายใน PBS พีเอช 7.5 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรใส่ใน microcentrifuge tube จากนั้นนำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 850 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้มาเจือจางด้วย PBS พีเอช 7.5 ในอัตราส่วนที่เหมาะสมจากนั้นดูดส่วนใสที่ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตรใสในหลอดทดลองขนาดเล็ก จากนั้นเติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (DNS) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าผสมให้เข้ากัน นำไปต้มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วทำให้เย็นทันที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตรแล้วนำค่าที่ได้มาแทนค่าในสมการมาตรฐานเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์นำค่าที่ได้ไปวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและและเอนไซม์ไซลาเนส

1 ยูนิต หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาย่อยสลายสับสเตรทให้เป็นกลูโคสหรือไซโลส 1 ไมโครโมลในเวลา 1 นาที โดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์ (Units/ml)} = \frac{CD}{MtV}$$

C คือ ปริมาณน้ำตาลกลูโคสหรือไซโลสโดยเทียบจากกราฟมาตรฐาน

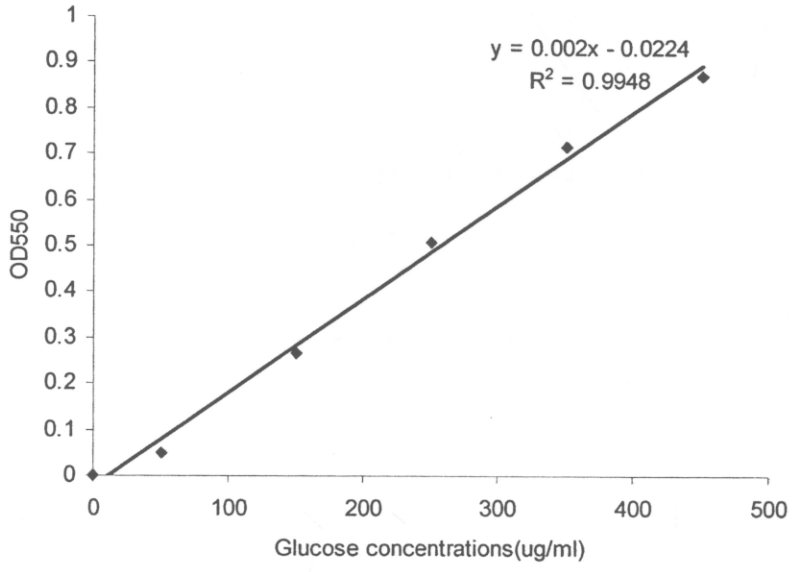
D คือ ค่าการเจือจางตัวอย่างของเอนไซม์

M คือ น้ำหนักโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคส เท่ากับ 180.16 กรัมต่อโมล และน้ำหนักโมเลกุลของน้ำตาลไซโลสเท่ากับ 150.13 กรัมต่อโมล

t คือ ระยะเวลาบ่ม (30 นาที)

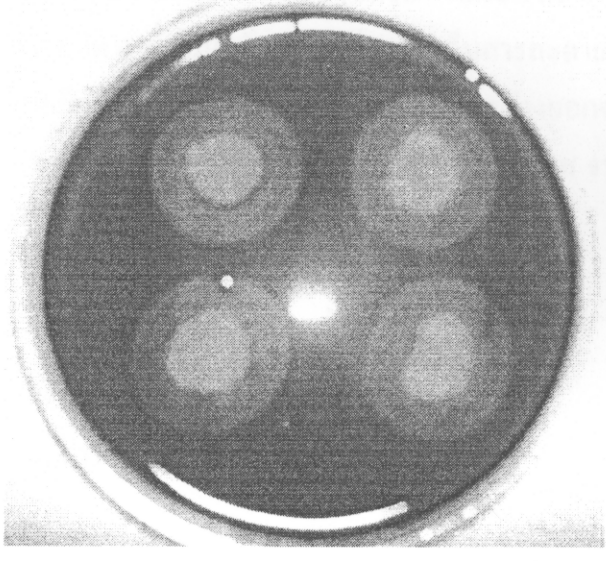
V คือ ปริมาตรของเอนไซม์

2. กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส



ภาพที่ 24 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส ที่ OD_{550}

3. กิจกรรมการย่อยสลาย CMC



ภาพที่ 25 การเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 บนอาหารพื้นฐานที่มี CMC 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4. การหาปริมาณน้ำมันและกรีสในน้ำทิ้ง (ดัดแปลงจาก กรรณิการ์ สิริหิงห์, 2522)

สารเคมี

1. ปิโตรเลียม อีเทอร์ (Petroleum ether)
2. กระดาษกรองเบอร์ 40
3. Diatomaceous-silica filter and suspension 10 กรัมต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร
4. ผ้าขาวบาง

วิธีการวิเคราะห์

1. นำกระดาษกรองวางใน buchner funnel แล้วเทสาร Diatomaceous-silica filter ที่เตรียมไว้ 100 มิลลิลิตร ใช้เครื่องดูดสุญญากาศดูด ล้างด้วยน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร จนกระทั่งแห้ง
2. กรองตัวอย่างที่เตรียมไว้ แล้วดูดให้แห้ง
3. ใช้ปากคีบกระดาษกรองออกมา ม้วนกระดาษกรองเข้าด้วยกัน แล้วห่อด้วยผ้าขาวบาง นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
4. ใส่ลงในซอคเลต
5. เติมสารตัวทำละลายปิโตรเลียมอีเทอร์ ลงในขวดสกัดไขมัน 150 มิลลิลิตร แล้ววางบนเตา
6. ประกอบอุปกรณ์สกัด พร้อมทั้งน้ำหล่ออุปกรณ์ควบแน่น แล้วเปิดสวิทซ์ให้ความร้อน
7. ใช้เวลาในการสกัด 4 ชั่วโมง เมื่อครบแล้ว กลั่นเก็บสารละลายจนเหลือสารละลายในขวดสกัดเพียงเล็กน้อย นำตัวอย่างที่ใส่ในหลอดใส่ตัวอย่างออกจากซอคเลต
8. นำขวดสกัดนั้นไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส จนแห้งใช้เวลาประมาณ 30 นาที ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น
9. ชั่งน้ำหนัก

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณของกรีสหรือน้ำมัน (มิลลิกรัม/ลิตร)} = \frac{\text{น้ำหนักของสารที่สกัดได้} \times 1000}{\text{มิลลิกรัมของตัวอย่าง}}$$