บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของการวิจัย

สีย้อมเอโซ (Azo dye) มีการนำมาใช้อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น สิ่งทอ อาหาร เครื่องสำอาง พลาสติก และสิ่งพิมพ์ (Padamavathy *et al*., 2003) จึงทำให้น้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมเหล่านี้ มีสีย้อมเอโซหลายชนิดปนเปื้อนอยู่ เมื่อสีย้อมเอโซเหล่านี้ถูกปล่อยทิ้งและปนเปื้อนลงสู่สิ่งแวดล้อม เช่นในดินและแหล่งน้ำ จึงก่อให้เกิดปัญหาภาวะมลพิษและทัศนียภาพทางสิ่งแวดล้อม เนื่องจากสีที่อยู่ในน้ำทิ้งแม้จะมีปริมาณเพียงเล็กน้อย ก็สามารถมองเห็นได้ชัดเจน นอกจากนี้สีย้อมเอโซยังเป็นสารประกอบอะโรมาติกเอมีน ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง อีกทั้งยังย่อยสลายตามธรรมชาติได้ยาก (Frijter *et al*., 2006)

ปัจจุบันจึงได้มีการคิดค้นเทคโนโลยีและวิธีที่ใช้ในการย่อยสลายสีย้อมเอโซและบำบัดน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมฟอกย้อมควบคู่กันไป ซึ่งมีทั้งการบำบัดสีย้อมด้วยวิธีทางกายภาพและวิธีการบำบัดทางเคมี เช่น การตกตะกอนด้วยสารเคมี การแลกเปลี่ยนไอออน การใช้โอโซน แต่วิธีบำบัดดังกล่าว มีข้อจำกัดหลายประการ เช่น ค่าใช้จ่ายในการบำบัดค่อนข้างสูง ตะกอนที่ได้จากการบำบัดก็มีเป็นจำนวนมาก และมีสารพิษตกค้าง ยากต่อการกำจัดต่อไป (Sen and Demirer, 2003) ดังนั้น วิธีการบำบัดทางชีวภาพ จึงเป็นทางเลือกที่ดีทางหนึ่ง ที่สามารถบำบัดสีย้อมได้สูง และค่าใช้จ่ายน้อยกว่า (Yang *et al*., 2003)

การบำบัดสีย้อมด้วยวิธีทางชีววิทยาเป็นวิธีการที่อาศัยความสามารถของจุลินทรีย์ประเภทต่าง ๆ เช่น แบคทีเรีย สาหร่าย และเห็ดรา ซึ่งแบคทีเรียถูกนำมาศึกษาอย่างกว้างขวางและสามารถบำบัดสีย้อมได้อย่างมีประสิทธิภาพ อันเนื่องมาจากกลไกการทำงานของเอนไซม์เอโซรีดักเทสในการย่อยสลายพันธะเอโซ จากโมเลกุลใหญ่ให้เป็นโมเลกุลที่เล็กลง (Forgacs *et al.,* 2004)

จากงานวิจัยที่เคยมีการศึกษา พบว่า จุลินทรีย์เหล่านี้สามารถสร้างเอนไซม์เอโซรีดักเทสที่สามารถย่อยสลายพันธะเอโซได้ (Bin *et al.,* 2004; Deng *et al*., 2008) จุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์เอโซรีดักเทสในการย่อยสลายหรือลดสีย้อมเอโซได้นั้นมีหลายชนิด เช่น *Xenophilus azovorans* (Blumel *et al.,* 2002) *Rhodobacter sphaeroides* (Bin *et al.,* 2004) *Staphylococcus aureus* (Chen *et al.,* 2005) *Bacillus velezensis* (Bafana *et al.,* 2008) และ *Pseudomonas aeruginosa*

(Dafale *et al*., 2008) ด้วยเหตุนี้จึงทำให้งานวิจัยหลาย ๆ เรื่องมุ่งเน้นในการศึกษาและหาชนิดของจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสีย้อมเอโซ เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ต่อไป

จากงานวิจัยของ Leelakriangsak *et al.* (2008) และ Töwe *et al.* (2007) ได้ศึกษาแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* และพบว่า *B. subtilis* มียีน *azoR1* และ *azoR2* ซึ่งถูกควบคุมการแสดงออกโดยโปรตีน YodB และ MhqR จาก Swiss-Prot database ยีน *azoR1* และ *azoR2* สังเคราะห์โปรตีนที่มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับ FMN-dependent NADH-azoreductase ในการสร้างเอนไซม์เอโซรีดักเทสที่สามารถย่อยสลายพันธะของสีย้อมเอโซได้ นอกจากนี้ Nishiya และ Yamamoto (2007) ได้ศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์เอโซรีดักเทสจากยีน *azoR2* โดยการสกัดและทำให้บริสุทธิ์ จากการศึกษาพบว่า เอนไซม์เอโซรีดักเทส จากยีน *azoR2* มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสีย้อมเอโซชนิด Methyl red แต่ยังไม่มีรายงานการศึกษาความสามารถของเอนไซม์เอโซรีดักเทสจาก ยีน *azoR1* ในการย่อยสลายสีย้อมเอโซ จึงทำให้มีความสนใจศึกษาแบคทีเรียแกรมบวก ชนิด *B. subtilis* ที่มียีน *azoR1* ในการย่อยสลายสีย้อมเอโซ โดยสายพันธุ์ที่นำมาศึกษาเป็น *B. subtilis* สายพันธุ์ ORB7106 ที่มีการกลายของยีน *yodB* ทำให้มีการแสดงออกของยีน *azoR1* มากถึง 70 เท่า เมื่อเทียบกับ *B. subtilis* สายพันธุ์ JH642 (Wild type) (Leelakriangsak *et al.,* 2008)

ในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาเพื่อทดสอบความสามารถของ *B. subtilis* ORB7106 ที่มีการสร้างเอนไซม์เอโซรีดักเทส (AzoR1) ในการย่อยสลายสีย้อมเอโซชนิด Azobenzene, Methyl red, Orange G และ Congo red ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน คือ 10, 50, 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยศึกษาการย่อยสลายสีย้อมในสภาวะที่แตกต่างกันของอุณหภูมิ ตั้งแต่ 25, 30, 37, 40 และ45 องศาเซลเซียส และ ที่พีเอช 5, 7 และ 9 โดยทำการเปรียบเทียบกับ *B. subtilis* JH642 (Wild type)

Prince of Songkla University Pattani Campus

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 เพื่อศึกษาระยะการเจริญของแบคทีเรีย *B. subtilis* ORB7106 ที่มีการสร้างเอนไซม์เอโซรีดักเทส (AzoR1) ในการย่อยสลายสีย้อมเอโซ

1.2.2 เพื่อศึกษาอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายสีย้อมเอโซ โดยแบคทีเรีย *B. subtilis* ORB7106 ที่มีการสร้างเอนไซม์เอโซรีดักเทส (AzoR1)

1.2.3 เพื่อศึกษาชนิดของเอนไซม์เอโซรีดักเทส (AzoR1) ที่สร้างจาก *B. subtilis* ORB7106

1.2.4 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสีย้อมเอโซในการชักนำการสร้างเอนไซม์เอโซรีดักเทส (AzoR1)

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1.3.1 ศึกษาระยะการเจริญของ *B. subtilis* ORB7106 ในการย่อยสลายสีย้อมเอโซ

1.3.2 ศึกษาอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมในการย่อยสลายสีย้อมเอโซชนิด Azobenzene, Methyl red, Orange G และ Congo red ที่อุณหภูมิ 25, 30, 37, 40 และ 45 องศาเซลเซียส และที่พีเอช 5, 7 และ 9 โดย *B. subtilis* ORB7106 ที่สร้างเอนไซม์เอโซรีดักเทส (AzoR1) และ *B. subtilis* JH642 ในอาหารแข็งและอาหารเหลว

1.3.3 ศึกษาชนิดของเอนไซม์เอโซรีดักเทส (AzoR1) จาก *B. subtilis* ORB7106 ในการย่อยสลายสีย้อมเอโซ ชนิด Methyl Red

1.3.4 ศึกษาประสิทธิภาพของสีย้อมเอโซชนิด Methyl red ในการชักนำการสร้างเอนไซม์จาก *B. subtilis* JH642

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทราบประสิทธิภาพการย่อยสลายสีย้อมเอโซ โดยแบคทีเรีย *B. subtilis* ORB7106 ที่สร้างเอนไซม์เอโซรีดักเทส (AzoR1)

1.4.2 ทราบค่าของอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายสีย้อมเอโซ โดยแบคทีเรีย *B. subtilis* ORB7106 ที่สร้างเอนไซม์เอโซรีดักเทส (AzoR1)

1.4.3 ทราบชนิดของเอนไซม์เอโซรีดักเทส (AzoR1)

1.4.4 ทราบถึงผลของสีย้อมเอโซในการชักนำการสร้างเอนไซม์เอโซรีดักเทส (AzoR1)

1.4.5 เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์บริสุทธิ์ต่อไป

Prince of Songkla University Pattani Campus