การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* และการใช้ประโยชน์ในการแยกน้ำมันจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

Production of Cellulase and Xylanase by *Bacillus subtilis* and Application for Oil Separation from Palm Oil Mill Effluent

สัญทัศน์ สินจรูญศักดิ์

Santat Sinjaroonsak

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

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

Prince of Songkla University

2554

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* และการใช้ประโยชน์ในการแยกน้ำมันจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

ผู้เขียน นายสัญทัศน์ สินจรูญศักดิ์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

……..

(รองศาสตราจารย์ ดร.อรัญ หันพงศ์กิตติกูล)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

……..

(รองศาสตราจารย์ ดร.พูนสุข ประเสริฐสรรพ์)

คณะกรรมการสอบ

……...ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะรัตน์ บุญแสวง)

…….....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.อรัญ หันพงศ์กิตติกูล)

…….....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.พูนสุข ประเสริฐสรรพ์)

…….....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.วิเชียร กิจปรีชาวนิช)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

……..……

(ศาสตราจารย์ ดร.อมรรัตน์ พงศ์ดารา)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* และการใช้ประโยชน์ในการแยกน้ำมันจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

ผู้เขียน นายสัญทัศน์ สินจรูญศักดิ์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2553

บทคัดย่อ

การวิเคราะห์ลักษณะน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม พบว่ามีอุณหภูมิสูง (63.73 ± 0.78 องศาเซลเซียส) มีพีเอชเป็นกรด (4.32 ± 0.06) มีค่าซีโอดี 157.06 ± 2.25 กรัมต่อลิตร ปริมาณของแข็งทั้งหมด 40.29 ± 0.73 กรัมต่อลิตร ของแข็งแขวนลอย 29.85 ± 2.72 กรัมต่อลิตร น้ำมันและกรีส 15.96 ± 1.12 กรัมต่อลิตร น้ำตาลทั้งหมด 4.74 ± 0.18 กรัมต่อลิตร ปริมาณไนโตรเจน 1.30 ± 0.00 กรัมต่อลิตร ตะกอนน้ำทิ้งดีแคนเตอร์ 35.97 ± 1.86 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร เถ้า 1.05 ± 0.33 กรัมต่อลิตร ตะกอนน้ำทิ้งดีแคนเตอร์มีน้ำมัน 0.41 ± 0.01 กรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของตะกอนและมีปริมาณเซลลูโลสร้อยละ 27.02 ± 1.25

เมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย 84 ไอโซเลทที่คัดแยกจากตัวอย่างดินรอบบ่อรวบรวมน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม จำนวน 12 ตัวอย่าง โดยเลี้ยงบนอาหารแข็งซีเอ็มซี พีเอช 7.0 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีแบคทีเรียเพียง 66 ไอโซเลทที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยสังเกตการเกิดบริเวณใสบนอาหารแข็งซีเอ็มซีด้วยวิธีการคองโกเรด และได้คัดเลือกเชื้อ 13 ไอโซเลทที่มีวงใสกว้างที่สุดมาเลี้ยงบนอาหารเหลวซีเอ็มซี พีเอช 7.0 บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ AH14, AH64 และ AH73 มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (0.73, 0.71 และ 0.73 ยูนิตต่อมิลลิลิตรตามลำดับ) และเอนไซม์ไซลาเนส (1.24, 1.18 และ 1.21 ยูนิตต่อมิลลิลิตรตามลำดับ) ดีที่สุดที่ 12 ชั่วโมงของการเลี้ยง เมื่อนำแบคทีเรียทั้งสามสายพันธุ์มาเลี้ยงเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสในอาหารที่เตรียมจากสารละลายส่วนใสของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นอัตราส่วน 1 ต่อ 4 ที่เติมแคลเซียมคลอไรด์, แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต, โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต, ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต, พอลีเปปโตน, ยีสต์สกัด, แอมโมเนียมไนเตรทและซีเอ็มซีปริมาณ 0.3, 0.3, 1.0, 1.0, 2.0, 1.0, 4.4 และ 10 กรัมต่อลิตรตามลำดับ พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 บ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ AH73 มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (0.55 ยูนิตต่อ

มิลลิลิตร) และเอนไซม์ไซลาเนส (0.37 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ดีที่สุดที่ 12 ชั่วโมงของการเลี้ยง และเมื่อทำการเทียบเคียงสายพันธุ์ด้วยวิธี 16S rDNA พบว่าเป็น *Bacillus subtilis*

สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร คือ เลี้ยงในอาหารที่มีส่วนใสของน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ไม่ทำการเจือจางและไม่เติมแหล่งไนโตรเจน (เติมแคลเซียมคลอไรด์, แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปปะไฮเดรต, โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต, ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตและซีเอ็มซีปริมาณ 0.3, 0.3, 1.0, 1.0 และ 15 กรัมต่อลิตรตามลำดับ) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ปรับพีเอชของอาหารเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 บ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 ให้กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุดที่ 36 ชั่วโมง (1.02 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) และเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดที่ 12 ชั่วโมง (0.99 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) เมื่อทำการเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่มีอาหารที่เป็นส่วนใสของน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม พีเอช 5.0 ปริมาตร 1 ลิตร ทำการกวนที่ 100 รอบต่อนาทีและให้อากาศ 3 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที เชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 ให้กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (1.72 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) และเอนไซม์ไซลาเนส (1.09 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ดีที่สุดที่ 24 ชั่วโมงของการทดลอง ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

เมื่อทำการแยกน้ำมันออกจากน้ำทิ้งดีแคนเตอร์โดยใช้อาหารที่มีการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 12 ชั่วโมงและใช้ส่วนใสหลังจากปั่นเหวี่ยงอาหารที่มีการเลี้ยงเชื้อ 12 ชั่วโมง (มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสเท่ากับ 0.98 และ 0.99 ยูนิตต่อมิลลิลิตรตามลำดับ) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติมลงในน้ำทิ้งดีแคนเตอร์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ พีเอช 5.0 ปริมาตร 45 มิลลิลิตร พบว่าทั้งสองสภาวะให้ผลการทดลองแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ρ<0.05) โดยสามารถลดน้ำมันออกจากตะกอนน้ำทิ้งได้ร้อยละ 43.33 และ 37.18 ตามลำดับ และลดน้ำหนักแห้งของตะกอนได้ร้อยละ 17.88 และ 18.70 ตามลำดับ และพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการแยกน้ำมันออกจากน้ำทิ้งโดยใช้อาหารที่มีการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 คือ ที่พีเอชเริ่มต้นของน้ำทิ้งเท่ากับ 7.0 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง เชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 สามารถลดน้ำมันในตะกอนร้อยละ 62.79 และลดน้ำหนักแห้งของตะกอนร้อยละ 35.53

Thesis Title Production of Cellulase and Xylanase by *Bacillus subtilis* and Application for Oil Separation from Palm Oil Mill Effluent

Author Mr. Santat Sinjaroonsak

Major Program Biotechnology

Academic Year 2010

ABSTRACT

The characteristics of palm oil mill effluent (POME) from decanter were high temperature (63.73 ± 0.78^{o}C), acidic pH (4.32 ± 0.06), COD 157.06 ± 2.25 g/l, total solids 40.29 ± 0.73 g/l, suspended solids 29.85 ± 2.72 g/l, oil and grease 15.96 ± 1.12 g/l, total sugar 4.74 ± 0.18 g/l, nitrogen content 1.3 ± 0.00 g/l, sludge dry weight 35.97 ± 1.86 g/l, ash 1.05 ± 0.33 g/l. The dry sludge contained 0.41 ± 0.01 g oil/g sludge and 27.02 ± 1.25% cellulose.

Eighty four bacterial strains were isolated from 12 soil samples around the wastewater ponds of the palm oil mill and cultivated on CMC agar pH 7.0 at 45^{o}C for 24 h. All of these isolates were examined for cellulase production by observing clear zone staining with Congo red on CMC agar. The results showed that 66 isolates could produce cellulase. Thirteen isolates with big clear zone were selected for production of cellulase and xylanase in CMC broth, pH 7.0 at 45^{o}C and shaking 200 rpm. Three isolates, AH14, AH64 and AH73 showed high cellulase and xylanase activities (0.73, 0.71 and 0.73 U/ml for cellulase and 1.24, 1.18 and 1.21 U/ml for xylanase) at 12 h cultivation. These three isolates were compared for cellulase and xylanase productions in the palm oil mill effluent (POME) medium ($CaCl_2$ 0.3, $MgSO_4.7H_2O$ 0.3, KH_2PO_4 1.0, K_2HPO_4 1.0 polypeptone 2.0, yeast extract 1.0, NH_4NO_3 4.4 and CMC 10 (g/l) in the supernatant of POME : distilled water 1:4). The initial pH was 7.0 and the incubation was at 45^{o}C on a shaker (200 rpm). The isolate AH73 gave the highest cellulase and xylanase activities (0.55 and 0.37 U/ml, respectively) at 12 h and was identified as *Bacillus subtilis* by 16S rDNA analysis.

The optimal conditions for cellulase and xylanase production by *Bacillus subtilis* AH73 in Erlenmeyer flasks (250 ml) were as follow. The supernatant of undiluted POME (50 ml) without addition of nitrogen source was supplemented with $CaCl_2$ 0.3, $MgSO_4.7H_2O$ 0.3, KH_2PO_4 1.0, K_2HPO_4 1.0 and CMC 15 g/l. The initial pH was 5.0 with shaking at 200 rpm at 45^{o}C. At these conditions, *Bacillus subtilis* AH73 gave the maximum cellulase activity at 36 h (1.02 U/ml) and the maximum xylanase activity at 12 h (0.99 U/ml). In the 2 L fermentor with 1 L working volume, *Bacillus subtilis* AH73 gave the highest cellulase (1.72 U/ml) and xylanase (1.09 U/ml) activities in the supernatant of POME medium pH 5.0 with 100 rpm agitation speed and 3 vvm aeration rate at 45^{o}C for 24 h.

The oil separation from an aseptic decanter effluent was done by adding 5 ml each of the 12 h cell culture and the 12 h cell free supernatant of *Bacillus subtilis* AH73 (with cellulase and xylanase activities of 0.98 and 0.99 U/ml, respectively) into 45 ml of decanter effluent pH 5.0. Both conditions showed significant difference (ρ<0.05) on the oil reduction from sludge by 43.33% and 37.18%, respectively and the sludge dry weight decreased by 17.88% and 18.70%, respectively. The optimized conditions for oil separation from POME by cell culture of *Bacillus subtilis* AH73 were the initial POME pH at 7.0, incubated at 45^{o}C on a shaker with 200 rpm for 96 h. At these conditions *Bacillus subtilis* AH73 could reduce oil in the sludge by 62.79% and reduce sludge dry weight by 35.53%.

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาตราจารย์ ดร.อรัญ หันพงศ์กิตติกูล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้คำแนะนำ ให้คำปรึกษาและชี้แนะแนวทางการทำวิจัย การค้นคว้าข้อมูลและการเขียนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ รวมทั้งการให้โอกาสข้าพเจ้าได้ทำหน้าที่เป็นผู้ช่วยวิจัย อันเป็นการฝึกประสบการณ์การทำวิจัยแก่ข้าพเจ้าเป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.พูนสุข ประเสริฐสรรพ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะรัตน์ บุญแสวง ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์ ดร.วิเชียร กิจปรีชาวนิช กรรมการผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่สละเวลาอันมีค่ายิ่งในการให้ข้อคิดเห็น เสนอแนะแนวทางการวิจัยและตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ทุนอุดหนุนการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณ คุณพ่อประเคียง สินจรูญศักดิ์ และครอบครัวด้วยความเคารพยิ่งที่ให้โอกาสในการศึกษาและคอยให้กำลังใจในการดำเนินชีวิตรวมทั้งคอยดูแลเอาใจใส่ข้าพเจ้าอย่างใกล้ชิดโดยตลอดมา ขอขอบคุณเพื่อน ๆ พี่ ๆ น้อง ๆ และเจ้าหน้าที่ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ อุตสาหกรรมทุกท่านสำหรับความช่วยเหลือ กำลังใจและความอบอุ่นในการทำวิจัยเรื่อยมาตลอดจนทุกท่านที่ไม่ได้กล่าวนาม ณ ที่นี้ ที่มีส่วนช่วยให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขออุทิศผลความสำเร็จของการศึกษาในครั้งนี้แก่คุณแม่ยุพา สินจรูญศักดิ์ แม่ผู้เป็นที่รักของข้าพเจ้า แม่ผู้รอคอยความสำเร็จในการศึกษาของข้าพเจ้าและแม่ผู้ให้อภัยในความผิดพลาดของลูกอย่างข้าพเจ้าเสมอมา ขออุทิศความสำเร็จแก่คุณปู่ซุ่นฮะ สินจรูญศักดิ์ ปู่ผู้ที่สอนให้ข้าพเจ้าไม่ย่อท้อในความยากลำบากรวมทั้งอุทิศผลความสำเร็จแก่คุณย่า คุณตา คุณยาย และพี่ชายผู้ล่วงลับ

สัญทัศน์ สินจรูญศักดิ์

สารบัญ

		หน้า
สารบัญ		(8)
รายการตาราง		(9)
รายการภาพ		(10)
บทที่		
1.	บทนำ	1
	บทนำต้นเรื่อง	1
	การตรวจเอกสาร	2
	วัตถุประสงค์	30
2.	วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการวิจัย	31
	วัสดุ	31
	อุปกรณ์	32
	วิธีการวิเคราะห์	33
	วิธีการทดลอง	35
3.	ผลและวิจารณ์การทดลอง	40
	1. องค์ประกอบน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	40
	2. ผลของการแยกและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนส	41
	3. ผลการเจริญและการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 ในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	54
	4. ผลการแยกน้ำมันออกจากน้ำทิ้งของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยแบคทีเรียที่คัดเลือกและเอนไซม์ที่ผลิตได้	74
4.	บทสรุปและข้อเสนอแนะ	83
เอกสารอ้างอิง		86
ภาคผนวก		99
ประวัติผู้เขียน		120

LIST OF TABLES

Table		Page
1.	Characteristic of palm oil mill effluent from different sources.....	12
2.	Characteristic of palm oil mill effluent.....	13
3.	Chemical composition of palm oil mill effluent.....	14
4.	The comparison of palm oil mill effluent from 4 palm oil industries.....	14
5.	Cellulase and xylanase production from *Bacillus* strains.....	29
6.	Characteristics of palm oil mill effluent (POME) from decanter.....	41
7.	Characteristics of microoganism isolated from soil samples around the wastewater ponds of the palm oil mill.....	42
8.	The morphology of microorganism separated from soil samples around palm oil mill pond.....	44
9.	Comparison of cellulase and xylanase producing strains from natural sources.....	50
10.	Oil separation from palm oil mill effluent in various conditions at 200 rpm and 45^{o}C…….....	75
11.	Effect of pH on oil separation from palm oil mill effluent by *Bacillus subtilis* AH73 at 200 rpm and 45^{o}C.....	78
12.	Effect of temperature on oil separation from palm oil mill effluent by *Bacillus subtilis* AH73 at 200 rpm.....	80
13.	Comparison of POME pretreatment from various methods.....	82

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1.	The composition of fresh fruit bunch.....	3
2.	Structure of plant cell.....	5
3.	Structure of cellulose.....	5
4.	Structure of xylan.....	8
5.	Structure of pectin.....	8
6.	Structure of lignin.....	9
7.	Screening for cellulase producing bacteria using a congo-red plate assay.....	48
8.	The clear zone diameter of 84 isolated microorganisms on CMC agar plate with 0.1% aqueous solution of congo red.....	49
9.	Cellulase and xylanase activities of isolated *Bacillus* strains in CMC broth after 12 h cultivation at 200 rpm and 45^{o}C.....	51
10	Time courses of cellulase and xylanase productions by *Bacillus* sp. AH14, AH64 and AH73 in the POME medium at 200 rpm and 45^{o}C	53
11.	Effect of dilution of decanter effluent to water on cellulase and xylanase productions by *Bacillus subtilis* AH73 after cultivation at 200 rpm and 45^{o}C for 12 h.....	55
12.	Effect of CMC on cellulase and xylanase productions by *Bacillus subtilis* AH73 after cultivation at 200 rpm and 45^{o}C for 12 h.....	57
13.	Effect of nitrogen on cellulase and xylanase productions by *Bacillus subtilis* AH73 cultivation at 200 rpm and 45^{o}C for 12 h	59
14.	Effect of inorganic nitrogen on cellulase and xylanase productions by *Bacillus subtilis* AH73 after cultivation at 200 rpm and 45^{o}C for 12 h.....	60
15.	Effect of NH_4NO_3 concentration on cellulase and xylanase productions by *Bacillus subtilis* AH73 after cultivation at 200 rpm and 45^{o}C for 12 h.....	62
16.	Effect of temperature on cellulase and xylanase productions by *Bacillus subtilis* AH73 after cultivation at 200 rpm for 12 h.....	64

LIST OF FIGURES (Cont.)

Figure		Page
17.	Effect of initial pH on cellulase and xylanase productions by *Bacillus subtilis* AH73 after cultivation at 200 rpm and 45°C for 12 h.....	67
18.	Time course of cellulase and xylanase productions by *Bacillus subtilis* AH73 in POME medium adjust medium initial at pH 5.0 at 200 rpm and 45°C.....	68
19.	Effect of agitation on and cellulase and xylanase productions by *Bacillus subtilis* AH73 in fermenter with an initial medium pH at 5.0, at aeration rate 1 vvm and 45°C.....	70
20.	Effect of agitation on growth of *Bacillus subtilis* AH73 in fermentor with an initial medium pH at 5.0, at aeration rate 1 vvm and 45°C.....	71
21.	Effect of aeration on cellulase and xylanase productions by *Bacillus subtilis* AH73 in fermentor with an initial medium pH 5.0, agitation rate at 100 rpm and 45°C.....	73
22.	Effect of aeration on growth of *Bacillus subtilis* AH73 in fermentor with an initial medium pH 5.0, agitation rate at 100 rpm and 45°C.....	73
23.	Oil increasing after separated oil from palm oil mill effluent in various conditions.....	76
24.	Effect of pH on oil increasing from palm oil mill effluent by *Bacillus subtilis* AH73.....	79
25.	Effect of temperature on oil increasing from palm oil mill effluent by *Bacillus subtilis* AH73.....	81
26.	Standard curve of glucose for total sugar.....	100
27.	Standard curve of bovine serum albumin (ug/ml).....	101
28.	Standard curve of glucose (ug/ml).....	102
29.	Standard curve of xylose (ug/ml).....	102
30.	The reaction of dinitrosalicylic acid method.....	113

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

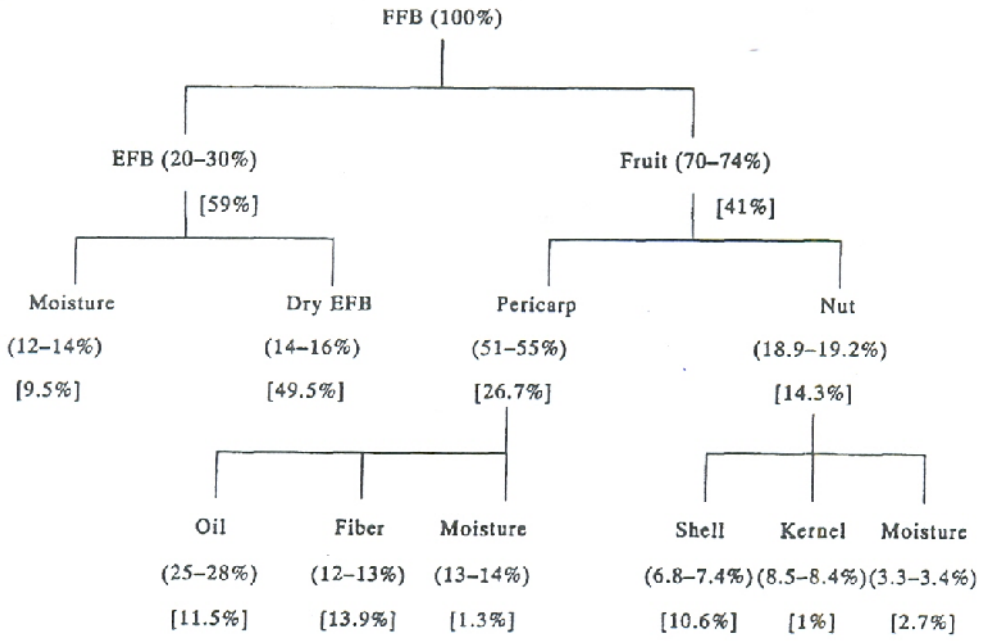
ในปัจจุบันปาล์มน้ำมันจัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญอย่างหนึ่งของภาคใต้ นิยมปลูกกันอย่างมากในหลายจังหวัดได้แก่ จังหวัดกระบี่ ตรัง สุราษฎร์ธานี ชุมพร สตูลและสงขลาเป็นต้น อันเนื่องมาจากสภาพภูมิอากาศที่เหมาะสม มีการนำน้ำมันปาล์มไปใช้ในระดับอุตสาหกรรมต่าง ๆ อย่างกว้างขวาง เพราะสามารถนำไปใช้ในการทดแทนน้ำมันพืชอื่นได้ เช่น น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันถั่วลิสง น้ำมันมะพร้าว น้ำมันเมล็ดฝ้ายและอื่น ๆ ตลอดจนใช้แทนไขสัตว์ได้เป็นอย่างดี อีกทั้งทางภาคใต้ยังมีสภาพของพื้นที่ ที่เหมาะสมต่อการเพาะปลูกปาล์มน้ำมันและยังได้รับการส่งเสริมจากทางภาครัฐบาล ทำให้มีอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับปาล์มน้ำมันเพิ่มมากขึ้น เช่น สบู่ ผงซักฟอก อาหารสัตว์และเนยเทียมเป็นต้น ซึ่งพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันมีการขยายตัวอย่างต่อเนื่อง ส่งผลให้พื้นที่ให้ผลและผลผลิตปาล์มน้ำมันในช่วง 5 ปีที่ผ่านมา (ปีพ.ศ. 2548 – พ.ศ. 2552) เพิ่มขึ้นเฉลี่ยในอัตราร้อยละ 11.65 และร้อยละ 15.12 ต่อปี ตามลำดับโดยในปี พ.ศ. 2552 มีพื้นที่ให้ผล 3.20 ล้านไร่ ผลผลิต 8.61 ล้านตัน ผลผลิตต่อไร่ 2,694 กิโลกรัม (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2552) โดยในปี พ.ศ. 2552 จังหวัดที่มีพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันมากที่สุดในประเทศไทยได้แก่กระบี่ สุราษฎร์ธานี ชุมพร ประจวบคีรีขันธ์และนครศรีธรรมราชตามลำดับ รวมเนื้อที่เพาะปลูกปาล์มน้ำมันของทั้ง 5 จังหวัดรวมกันเป็นร้อยละ 79.48 ของเนื้อที่ปลูกปาล์มน้ำมันทั้งประเทศ โดยในปี พ.ศ. 2552 ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันรวมกันทั้งสิ้น 3,888,403 ไร่ เพิ่มขึ้นจากปี พ.ศ. 2551 เท่ากับ 212,307 ไร่ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2552) จากการขยายการกำลังผลิตของอุตสาหกรรมน้ำมันปาล์มส่งผลให้เกิดของเสีย เช่น ทะลายปาล์มเปล่า เปลือกผลปาล์ม กะลาปาล์ม น้ำเสีย และสลัดจ์ (Kunghae, 1993; Chantaphaso, 1999) โดยเฉพาะน้ำทิ้งซึ่งเป็นวัสดุเศษเหลือที่ได้จากกระบวนการผลิต โดยน้ำทิ้งส่วนใหญ่จะมาจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มแบบมาตรฐาน (แบบอบไอน้ำ) ในสองขั้นตอนคือ น้ำนึ่งปาล์มหรือน้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อ และน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์หรือเครื่องเซพาเรเตอร์ซึ่งก่อให้เกิดปัญหาทางด้านสิ่งแวดล้อมหลายด้าน โดยน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มนั้น พบว่ามีค่าบีโอดีที่สูง เนื่องจากในน้ำทิ้งที่ถูกปล่อยออกมายังคงมีองค์ประกอบของน้ำมันอยู่จำนวนหนึ่งแทรกอยู่ในเซลล์ เช่น ผนังเซลล์ เยื่อหุ้มเซลล์ ในรูปของอิมัลชันซึ่งจะแยกออกได้ยากด้วยวิธีการทางเคมี การใช้วิธีทางกายภาพ เช่น การใช้ความร้อน หรือการหมุนเหวี่ยงแยกน้ำมันก็ไม่สามารถแยกน้ำมันที่แทรกอยู่ในระหว่างชั้นของผนังเซลล์ปาล์มออกมาได้ เพราะ

น้ำมันส่วนใหญ่จับกับของแข็งอย่างซับซ้อน วิธีที่น่าจะเป็นไปได้ในการกำจัดน้ำมันออกจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มคือ วิธีการทางชีวภาพซึ่งทำได้โดยการใช้แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนส เพื่อให้เอนไซม์ทั้งสองย่อยสารแขวนลอยที่น้ำมันไปเกาะหรือแทรก ซึ่งสารแขวนลอยเหล่านั้นมีเซลลูโลสและไซแลนเป็นองค์ประกอบ และเมื่อสารแขวนลอยถูกย่อยโดยเอนไซม์ทั้งสอง จะทำให้น้ำมันที่แทรกอยู่นั้นถูกปล่อยออกมาและลอยขึ้นสู่ด้านบน เมื่อทำการเก็บเกี่ยวน้ำมันส่วนนี้ออก ก็จะทำให้ได้น้ำมันเพิ่มขึ้นและยังเป็นการลดค่าบีโอดีและค่าซีโอดีของน้ำทิ้ง ทำให้การบำบัดน้ำเสียในขั้นต่อไปทำได้ง่ายขึ้น ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะศึกษาการคัดเลือกแบคทีเรียทีมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสจากดินบริเวณบ่อรวบรวมน้ำทิ้งของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มเพื่อนำมาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสทั้งในระดับฟลาสก์และระดับถังหมักรวมถึงการทดลองนำเอนไซม์ที่ผลิตได้โดยแบคทีเรียที่สนใจไปประยุกต์ใช้ในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกน้ำมันออกจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

การตรวจเอกสาร

1. ส่วนประกอบของทะลายปาล์มสด

ทะลายปาล์มสด (Fresh fruit bunch, FFB) ของปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* jacq.) ซึ่งเป็นผลผลิตจากต้นปาล์มจะประกอบด้วยทะลายเปล่า (bunch) และผลปาล์ม (fruit) ภายในผลจะประกอบด้วยส่วนของชั้นเปลือก (mesocarp) ในชั้นนี้จะมีน้ำมันเรียกว่าน้ำมันปาล์ม (palm oil, PO) จากชั้นเปลือกจะมีกะลา (shell) หุ้มเมล็ดในอยู่ ภายในเมล็ดในจะมีน้ำมันอีกชนิดหนึ่งเรียกว่าน้ำมันเมล็ดใน (palm kernel oil, PKO) ซึ่งจะมีส่วนประกอบทางเคมีแตกต่างไปจากน้ำมันปาล์ม สำหรับปาล์มเทเนอร่าที่มีอายุเกิน 8 ปีขึ้นไปจะมีส่วนประกอบโดยประมาณดัง Figure 1 (Prasertsan and Prasertsan, 1996)



FFB = Fresh fruit bunch and EEB = Empty fruit bunch

Figure 1. Composition of fresh fruit bunch. Figure in brackets are the percentage of FFB. () = high-quality FFB [] = low-quality FFB.

Source : Prasertsan and Prasertsan (1996)

สำหรับเมล็ดในปาล์มซึ่งมีอยู่ประมาณร้อยละ 5.5 ของน้ำหนักทะลายนั้น จะมีส่วนประกอบโดยประมาณดังนี้ (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

2. ลักษณะและส่วนประกอบของน้ำมันปาล์มและน้ำมันเมล็ดในปาล์ม

น้ำมันปาล์มและน้ำมันเมล็ดในปาล์มก็เหมือนกับน้ำมันพืชและไขมันสัตว์ที่รับประทานได้ชนิดอื่น ๆ เช่น น้ำมันมะพร้าว น้ำมันหมู น้ำมันถั่วเหลือง ซึ่งเป็นสารอินทรีย์ที่เป็น

สารประกอบเอสเทอร์ (ester) โมเลกุลประกอบด้วยสารสองชนิดคือ กลีเซอรอล (glycerol) หรือ กลีเซอรีน (glycerin) และกรดอินทรีย์หรือกรดคาร์บอกซีลิก (carboxylic acid) เชื่อมต่อเข้าด้วยกันด้วยพันธะเอสเทอร์ที่แข็งแรงกลายเป็นโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์หรือไตรเอซิลกลีเซอรอล น้ำมันสามารถละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น ปิโตรเลียมอีเทอร์ เฮกเซน คลอโรฟอร์มและเมทานอล

กรดไขมันที่มีหมู่อัลคิลเป็นองค์ประกอบ หากหมู่อัลคิลเป็นหมู่ไฮโดรคาร์บอนอิ่มตัวเรียกว่ากรดไขมันอิ่มตัว ส่วนที่มีหมู่ไฮโดรคาร์บอนไม่อิ่มตัวเป็นองค์ประกอบอยู่เรียกว่ากรดไขมันไม่อิ่มตัว และหากมีพันธะคู่ยิ่งมากก็ยิ่งเป็นกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวมากขึ้น

3. โมเลกุลของน้ำมัน

ไตรกลีเซอไรด์หรือน้ำมันในเซลล์พืชจะถูกสะสมอยู่ในส่วนที่เรียกว่า oil bodies (Figure 2) ซึ่งจะมีชื่อเรียกที่ต่างกันเช่น spherosome, oleosome และ lipid containing มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางระหว่าง 0.2 - 0.6 ไมครอน แล้วแต่ชนิดของพืช โดยเมื่อพืชมีการเติบโตก็จะเพิ่มจำนวนของ oil bodies มากขึ้น การสะสมน้ำมันจะมากจะน้อยก็ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช โดยส่วนใหญ่จะอยู่ระหว่างร้อยละ 1 - 2 จนถึงร้อยละ 60

4. ผนังเซลล์พืช (cell wall)

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

4.1 เซลลูโลส

เป็นสารประกอบโพลีแซคคาไรด์ ($[C_6H_{12}O_6]_n$) ประกอบด้วยหน่วยย่อยคือ D-glucose หรือ anhydroglucopyranose (Figure 3) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-1,4-glucosidic linkage มีจำนวนกลูโคส 2,000 - 14,000 หน่วย โครงสร้างของเซลลูโลสเรียกว่า ไฟบริล (fibril) แบ่งได้เป็นสองส่วน คือ

4.1.1 ส่วนของ crystalline โครงสร้างจัดเรียงกันอย่างเป็นระเบียบ มีเซลลูโลสเป็นจำนวนมากคิดเป็นร้อยละ 30 - 40 ของลิกโนเซลลูโลส

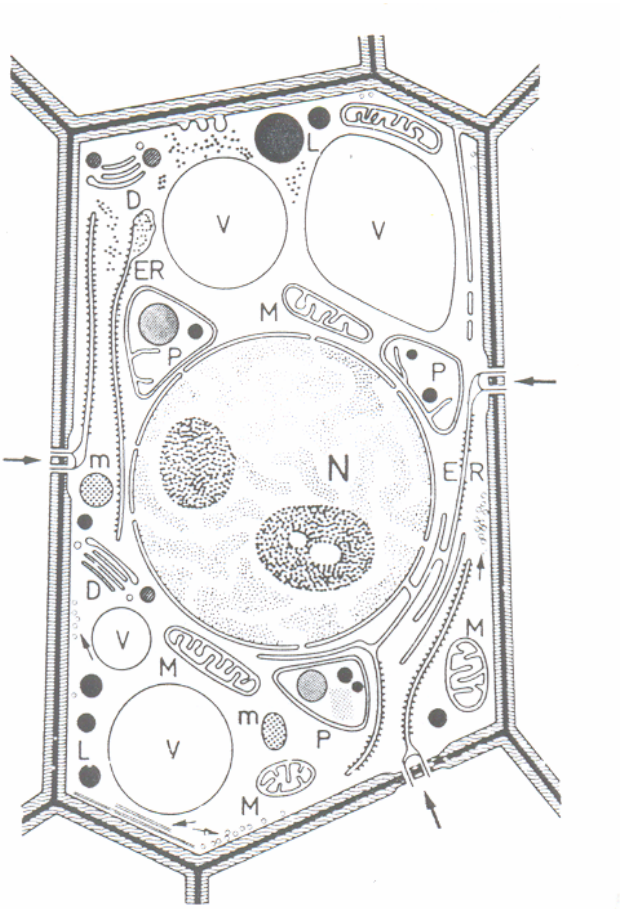
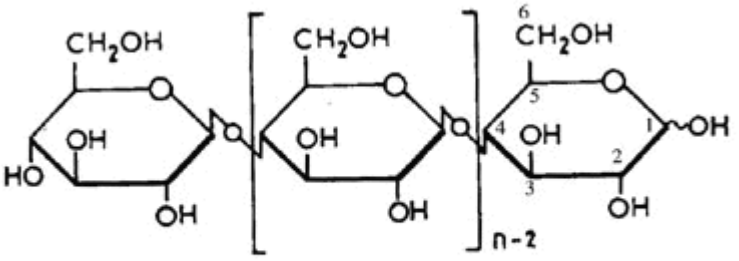


Figure 2. Structure of plant cell. (N = nucleus, ER = endoplasmic reticulum, V = vacuole, M = mitochondria, P = plasmid, m = microbodies and L = lipid bodies)

Source : Mohr (1995)



Cellulose

Figure 3. Structure of cellulose.

Source : Hans-Walter (2005)

4.1.2 ส่วนของ amorphous โครงสร้างจัดเรียงกันอย่างไม่เป็นระเบียบ เป็นส่วนที่ดูดซับน้ำได้ดีสามารถย่อยสลายได้ง่ายกว่า

4.2 เฮมิเซลลูโลส

เป็นสารประกอบโพลีแซคคาไรด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ องค์ประกอบของผนังเซลล์พืช มีเฮมิเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบประมาณร้อยละ 20 - 40 การแบ่งเฮมิเซลลูโลสขึ้นอยู่กับชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบหลัก คือ D-xylose, D-mannose, D-galactose และ L-arabinose เฮมิเซลลูโลสจึงมีชื่อเรียกแตกต่างกันตามกลุ่มของน้ำตาล เช่น ไซแลน (xylan), แมนแนน (mannan), กาแลกแทน (galactan) และอะราบิแนน (arabinan) ซึ่งในเซลล์พืชบก เฮมิเซลลูโลสที่พบมักเป็นกลุ่มของน้ำตาลไซโลส (Bastawde, 1992)

4.2.1 ลักษณะโครงสร้างของไซแลน

ไซแลนเป็น heterogeneous polysaccharides พบในเซลล์ของพืชบก เป็นเฮมิเซลลูโลสที่เป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์พืช ไซแลนประกอบด้วยน้ำตาล D-xylose ร้อยละ 85 - 93 ส่วนที่เหลือเป็นน้ำตาล L-arabinose และ glucuronic acid ไซแลนที่แยกได้จากพืชและหญ้าต่าง ๆ ล้วนแต่มีสายหลักของไซแลนที่เหมือนกันคือ polymer ของน้ำตาล xylose ซึ่งเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-1,4-D-xylopyranose (Figure 4) ความแตกต่างขึ้นอยู่กับประเภทและปริมาณของหน่วยย่อยที่มาต่อเป็นกิ่งก้าน เช่น glucuronic acid น้ำตาล L-arabinose และ methylester ของ D-glucuronic acid

ในการแยกสกัดเฮมิเซลลูโลสออกจากลิกนิน ทั้งในหญ้าและพืชสามารถทำได้โดยทำปฏิกิริยากับด่าง เฮมิเซลลูโลสเพียงบางส่วนจากพืชถูกแยกสกัดได้โดยใช้ความร้อน หรือน้ำเย็นหรือด่างอ่อน โดยทั่วไปใช้ KOH หรือ NaOH ความเข้มข้นร้อยละ 4-10 จะมีประสิทธิภาพสูงสุดในการสกัด (Binmaeil, 2005) คุณสมบัติของไซแลนโดยทั่วไปมีดังนี้

4.2.1.1. ไซแลนที่ไม่มีหมู่ acetyl จะไม่ละลายน้ำแต่ละลายในสารละลายด่าง และสลายด้วยกรดได้ง่าย

4.2.1.2. ไซแลนที่มีหมู่ acetyl สามารถถูกสกัดด้วยน้ำร้อน และละลายน้ำได้มาก

4.2.1.3. ไซแลนที่มีหมู่ acetyl ถูกย่อยสลายได้ง่ายโดย เอนไซม์จากแบคทีเรีย

4.3 เพคติน

โดยทั่วไปส่วนที่เป็นผลของพืชจะมีสารประกอบประเภทเพคตินอยู่เป็นจำนวนมาก ซึ่งพบทั่วไปในผนังเซลล์พืชชั้นสูง ซึ่งจะช่วยเพิ่มลักษณะคงตัวของเนื้อสัมผัส โดยในน้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม พบว่ามีปริมาณเพคติน 5.7 กรัมต่อลิตร (Binmaeil, 2005) โดย

ในผนังเซลล์พืชจะมีเพคติเนสอยู่แล้ว แต่อยู่คนละชั้นของเซลล์ เมื่อเซลล์พืชฉีกขาดหรือได้รับการกระทบกระเทือน เอนไซม์และเพคตินจะเคลื่อนเข้าใกล้กันทำให้เกิดการย่อยสลาย

เพคตินเป็นกลุ่มสารพวก complex colloidal carbohydrates ในโมเลกุลประกอบด้วยกรดกาแลกทูโรนิก (galacturonic acid) ที่ต่อกันด้วยพันธะ α-1,4-glucosidic linkage (Figure 5) โดยที่ carboxyl group บางตัวของกรดกาแลกทูโรนิกถูก esterified ด้วย methyl groups เพคตินมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 40,000-50,000 ดาลตัล เพคตินเป็นสารพอลิเมอร์ของกรดกาแลกทูโรนิกโดย 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 กับสารคาร์โบไฮเดรตกับตัวอื่น ๆ หรืออยู่เป็นอิสระก็ได้ ส่วน side chains ของเพคตินอาจเกิด ester linkages ระหว่าง carboxyl groups กับ hydroxyl groups ที่อยู่ปลาย polysaccharides กับ hydroxyl groups ของ polygalacturonides (Binmaeil, 2005)

4.4 ลิกนิน

เป็นสารประกอบโพลีฟีนอลิก (polyphenolic compound) ที่มีโครงสร้างซับซ้อนเป็น polymer ของ p-hydroxy phenyl propane ที่มาจากการเชื่อมโยงขององค์ประกอบ 3 กลุ่มคือ coniferyl alcohol, sinapyl alcohol และ p-coumaryl alcohol พันธะที่พบภายในโครงสร้างหลักนั้นมีมากกว่า 10 ชนิด และพันธะที่ สำคัญคือ พันธะเอสเตอร์ (C-O-C) ซึ่งจะทนต่อการถูกย่อยสลายด้วยกรด นอกจากนี้ยังพบพันธะคาร์บอน (C-C) ซึ่งทนต่อการย่อยสลายด้วยกรดหรือด่างเป็นเหตุให้ลิกนินมีโครงสร้างที่แข็งแรง (Figure 6) ในเนื้อเยื่อไม้มีลิกนินเป็นองค์ประกอบร้อยละ 17 - 33

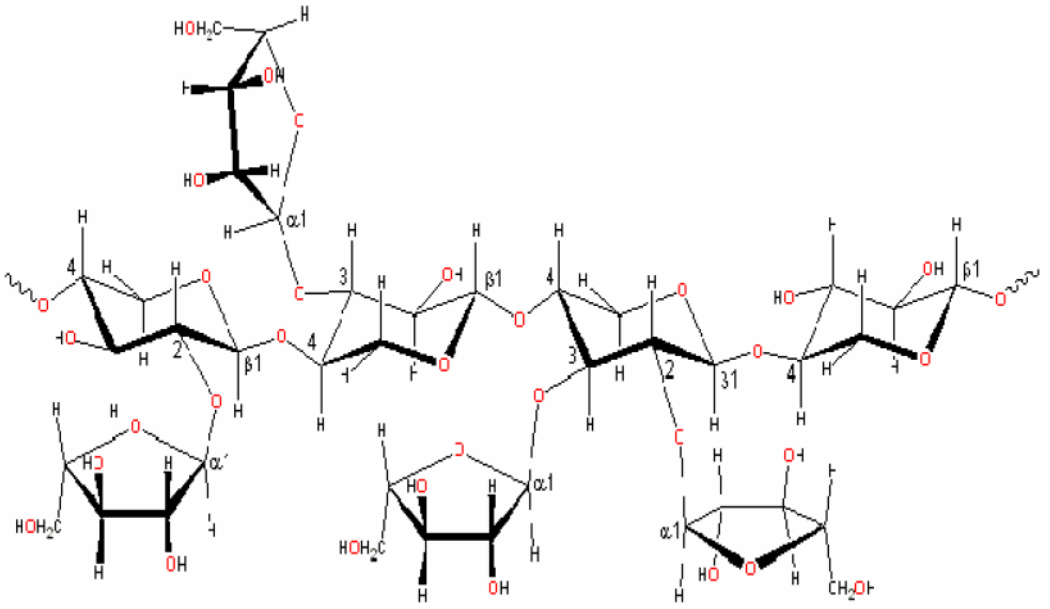


Figure 4. Structure of xylan.

Source : Hans-Walter (2005)

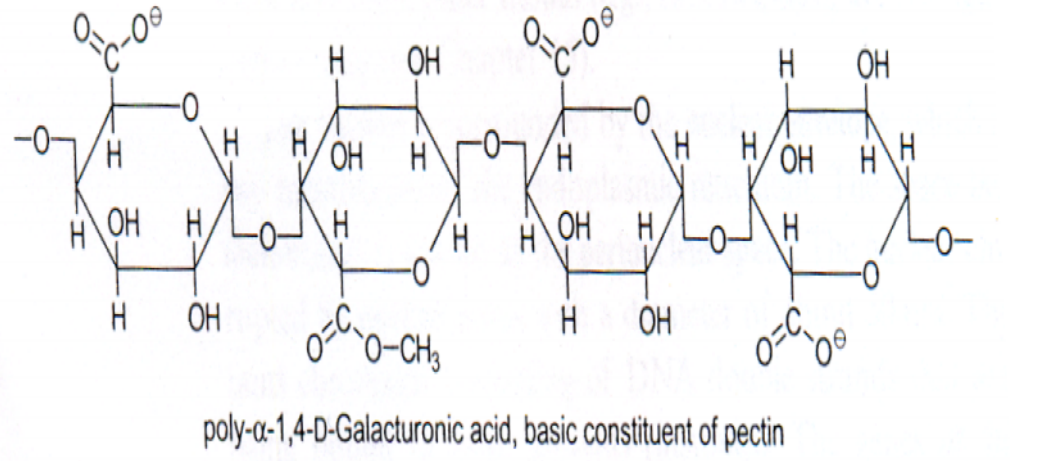


Figure 5. Structure of pectin.

Source : Hans-Walter (2005)

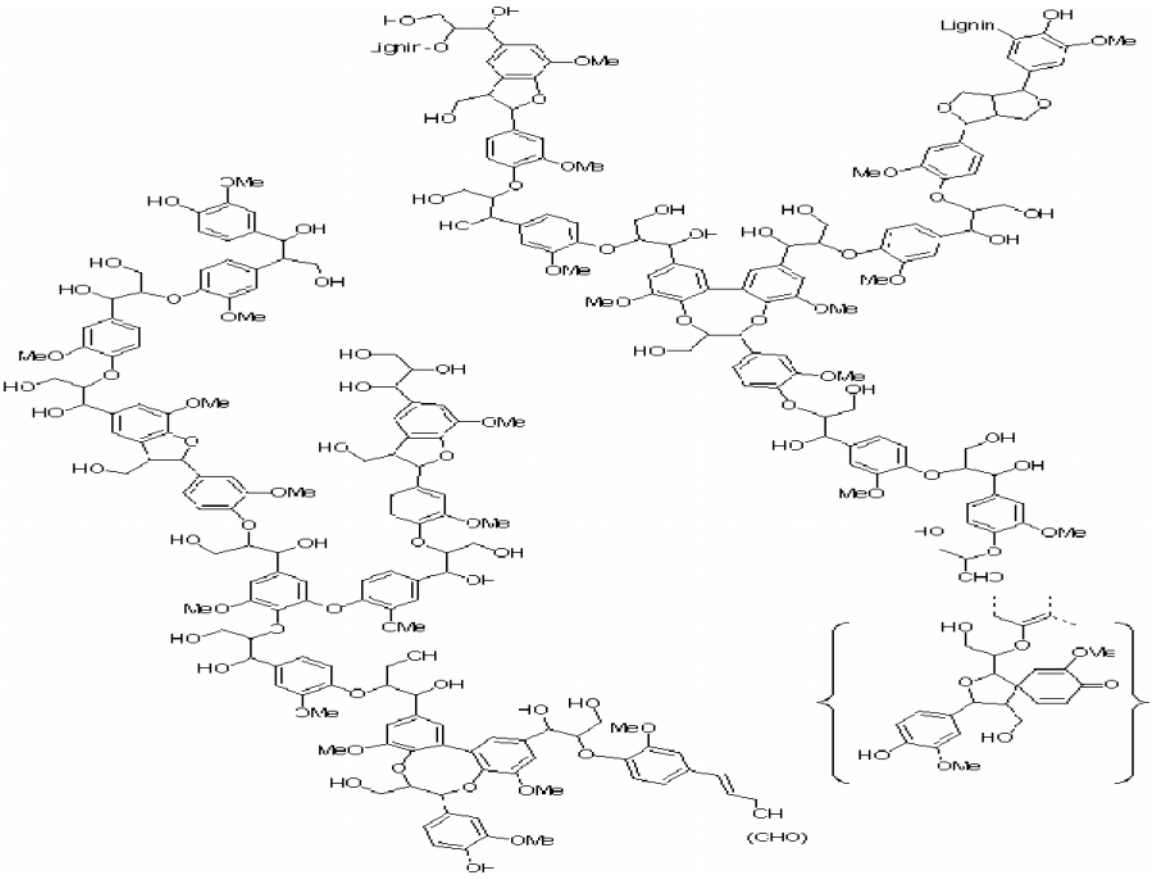


Figure 6. Structure of lignin.

Source : Mohr (1995)

5. กระบวนการผลิตน้ำมันปาล์ม

อุตสาหกรรมสกัดน้ำมันปาล์มในประเทศไทยมีกระบวนการผลิต 3 แบบ (ผาสุข กุลละวณิชย์ และคณะ, 2531; Prasertsan and Prasertsan, 1996)

5.1 กระบวนการผลิตแบบอบไอน้ำ

ซึ่งเป็นแบบมาตรฐานมี 2 ลักษณะคือ แบบที่ใช้เครื่องแยกน้ำมันแบบ 3 เฟส ที่เรียกว่าดีแคนเตอร์และแบบที่ใช้เครื่องแยกน้ำมันแบบ 2 เฟส ที่เรียกว่าเซพาเรเตอร์ใช้ในโรงงานขนาดใหญ่และขนาดกลาง กระบวนการผลิตเริ่มจากการนำทะลายปาล์มสดมาอบด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิระหว่าง 120-130 องศาเซลเซียส ความดันประมาณ 40 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลาประมาณ 45 นาที มีน้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อเกิดขึ้น (เรียกว่า น้ำนึ่งปาล์ม) ทะลายปาล์มที่อบแล้วจะถูกนำไปป้อนเข้าเครื่องแยกผลปาล์ม ผลปาล์มที่ได้จะถูกนำไปย่อยด้วยเครื่องย่อยผลปาล์มซึ่งภายในมี

ใบพัดกวนผลปาล์ม ให้เส้นใยฉีกย่อยออกจากเมล็ดและเซลล์น้ำมันแตกตัวออกมา จากนั้นป้อนเข้าเครื่องหีบแบบเกลียวอัด (screw press) น้ำมันที่ได้จะถูกนำเข้าเครื่องดีแคนเตอร์ซึ่งจะแยกน้ำมันออกจากน้ำ เศษเส้นใยและสิ่งเจือปน (กากสลัดจ์) บางโรงงานใช้เครื่องแยกเหวี่ยง (centrifuge) แทนการใช้เครื่องสกัดแยกน้ำมัน น้ำมันที่ได้จะนำเข้าเครื่องเหวี่ยงเพื่อแยกน้ำมันให้ใสสะอาดขึ้น จากนั้นนำไปไล่ความชื้นด้วยเครื่องดูดสุญญากาศ แล้วนำไปเก็บในถังเก็บน้ำมันขนาดใหญ่เพื่อเตรียมส่งจำหน่ายโรงงานสกัดน้ำมันบริสุทธิ์ต่อไป (พูนสุข ประเสริฐสรรพ์ และคณะ, 2533)

ส่วนกากผลปาล์มที่ออกจากเครื่องหีบแบบเกลียวอัดจะถูกนำมาแยกเอาเส้นใยออกจากเมล็ดด้วยเครื่องแยก โดยใช้แรงลมเป่าให้เส้นใยลอยไปตามท่อและใช้เป็นเชื้อเพลิงในเตาของหม้อกำเนิดไอน้ำ ส่วนเมล็ดที่แยกเส้นใยแล้วจะตกลงด้านล่างและถูกนำมาอบให้แห้ง จากนั้นนำไปคัดขนาดและกะเทาะเมล็ดด้วยเครื่องกะเทาะซึ่งใช้แรงเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง (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 น้ำมันปาล์มดิบที่ได้เป็นน้ำมันผสมจากเปลือกและเมล็ดในซึ่งคุณภาพจะด้อยกว่าน้ำมันจากส่วนเปลือกเพียง อย่างเดียว (พูนสุข ประเสริฐสรรพ์ และคณะ, 2533)

5.3 กระบวนการผลิตแบบทอดผลปาล์ม

เป็นเทคโนโลยีที่พัฒนาขึ้นที่ประเทศไทยประมาณปี พ.ศ. 2522 ปัจจุบันมีโรงงานประเภทนี้ 2 โรงงาน กระบวนการผลิตสามารถใช้วัตถุดิบทั้งในรูปทะลายปาล์มสดและผลปาล์มร่วง วัตถุดิบพวกทะลายสดจะนำมาเข้าเครื่องอบทะลาย จากนั้นนำไปแยกผลปาล์มออกจากทะลายและถูกนำไปทอดในเกลียวลำเลียงด้วยน้ำมันปาล์มโดยใช้อุณหภูมิไม่เกิน 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-20 นาที โดยให้ความร้อนด้วยไอน้ำโดยรอบรางลำเลียงนี้ วัตถุดิบจำพวกผลปาล์มร่วงจะนำมาทอดตรงจุดนี้เช่นกัน จากนั้นผลปาล์มที่สุกแล้วจะถูกนำไปเข้าเครื่องหีบแบบเกลียวอัดคู่

เช่นเดียวกับโรงงานประเภทแรก และนำน้ำมันที่หีบได้เอาไปไล่ความชื้นในสุญญากาศที่อุณหภูมิ 80-90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-60 นาที จากนั้นกรองผ่านเครื่องกรองแบบอัดหลายชั้น เพื่อแยกสิ่งสกปรกก่อนบรรจุลงถังเก็บ ส่วนกากผลปาล์มจะนำไปอบแห้งและหีบรวมกันเป็นน้ำมันผสม และได้กากปาล์มเป็นอาหารสัตว์

การผลิตน้ำมันจากผลปาล์มจะต้องนำผลปาล์มสดเข้าโรงงานเพื่อสกัดน้ำมันภายใน 24 ชั่วโมงหลังการเก็บเกี่ยว มิฉะนั้นจะเกิดกรดไขมันอิสระ (free fatty acid) ซึ่งสูงเกินค่ามาตรฐานคือร้อยละ 5 ทำให้น้ำมันมีคุณภาพต่ำไม่เหมาะที่จะนำไปใช้ในอุตสาหกรรมบางประเภท

6. ปริมาณและคุณลักษณะน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

องค์ประกอบของวัสดุเศษเหลือจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มมีหลายชนิด เช่น ทะลายเปล่า เส้นใยปาล์ม กากเนื้อเมล็ดในปาล์ม กากเมล็ดปาล์มน้ำมัน และกากสลัดจ์ สำหรับน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มก็จะมีคุณสมบัติแตกต่างกันขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของน้ำทิ้งและวิธีการสกัดน้ำมันปาล์ม สำหรับน้ำทิ้งจากการสกัดน้ำมันปาล์มโดยการนึ่งผลปาล์มจะประกอบด้วย น้ำทิ้งจากบ่อรวบรวมน้ำเสีย น้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อ และน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์หรือเครื่องเซพาเรเตอร์ Noparat (2009) รายงานคุณลักษณะโดยรวมของน้ำทิ้งจากแหล่งต่าง ๆ เหล่านี้ไว้ใน Table 1 ซึ่งจะเห็นว่าน้ำทิ้งจากบ่อรวบรวมน้ำเสีย น้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อและน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์จะมีค่าบีโอดี ซีโอดี ของแข็งทั้งหมด ของแข็งแขวนลอยและกรีส ที่มีค่าเฉลี่ยแตกต่างกัน เปรียบเทียบลักษณะโดยรวมของน้ำทิ้งในบ่อรวบรวมน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มดัง Table 2 และองค์ประกอบทางเคมีของน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มใน Table 3

เมื่อศึกษาน้ำทิ้งของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มจาก 5 โรงงานจาก 4 จังหวัดทางภาคใต้ของประเทศไทยคือ กระบี่ ตรัง สงขลา และสตูล พบว่าลักษณะของน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดปาล์มน้ำมันทั้ง 5 โรงงานมีค่าพีเอชโดยเฉลี่ยเท่ากับ 4.20 อุณหภูมิ 72.30 องศาเซลเซียส มีค่าซีโอดีของแข็งทั้งหมด ของแข็งแขวนลอยและค่าน้ำมันและกรีสเท่ากับ 120.10, 71.60, 47.30 และ 28.40 กรัมต่อลิตรตามลำดับ (Table 4) (Laohaprapanon *et al.*, 2005) แต่ Kunghae (1993) รายงานว่าลักษณะน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ใช้ดีแคนเตอร์ในการแยกน้ำมันมีพีเอช 4.65 และมีค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ เฉลี่ยดังนี้คือ ซีโอดี บีโอดี สารแขวนลอย และน้ำมันเท่ากับ 113.96, 59.39, 26.30 และ 14.70 กรัมต่อลิตรตามลำดับ

Table 1. Characteristic of palm oil mill effluent from different sources.

Parameter	**Sterilizer condensate**	**Decanter effluent**	**Mixed effluent**
Color	Dark Brown	Brown	Brown-Blackish Brown
pH	4.05-4.62	4.84-5.35	4.61-4.89
BOD	54.75-60.00	22.80-41.98	21.00-45.38
COD	80.52-115.93	45.36-80.15	38.25-67.57
Volatile acid	3.13-5.87	0.99-7.13	1.84-2.27
Alkalinity (as $CaCO_3$)	0.07-0.20	0.04-1.58	0.09-0.48
Grease	0.02-2.45	0.02-1.17	0.00
Total solids (TS)	49.06-88.51	26.38-76.73	25.63-47.24
Volatile solids (VS)	46.03	31.34	61.97
Suspended solids (SS)	18.50-52.00	2.60-6.10	2.90-20.30
Nitrogen - ammonia	0.03-0.06	0.01-0.07	0.02
- organic	0.55-1.17	0.02-1.29	0.52

Except for color and pH all other parameter are in g/l

Source : Noparat (2009)

Table 2. Characteristic of palm oil mill effluent.

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
4.11	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 *et al.* (2001)
4.35	54.56	90.40	65.36	45.92	34.31	0.83	Kaewchai and Prasertsan (2002)
4.70	25.00	50.00	40.50	18.00	4.00	0.75	Ahmad *et al.* (2003)
4.10	25.00	53.63	43.64	19.02	8.37	0.77	Ahmad *et al.* (2005)
4.70	25.00	50.00	40.05	18.00	4.00	0.75	Ahmad *et al.* (2005)
4.20	-	120.10	71.60	47.30	28.40	-	Laohaprapanon *et al.* (2005)
4.40	6.42	46.95	21.50	8.30	4.80	0.45	Najafpour *et al.* (2005)
4.50	71.95	143.90	71.50	34.20	10.00	1.20	Binmaeil (2005)
3.50	24.71	59.30	-	17.26	-	0.69	Vijayaraghavan and Ahmad (2006)
4.50	-	40.20	39.47	17.92	2.66	0.80	Bhatia *et al.* (2007)
4.18	-	120.08	71.55	47.27	28.41	-	Laohaprapanon *et al.* (2007)
3.50	25.55	55.78	-	18.48	8.02	0.71	Vijayaraghavan *et al.* (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 *et al.* (2007)
4.35	22.00	95.00	35.00	12.00	10.60	1.08	Chaisri *et al.* (2007)
4.30	25.00	55.25	35.52	19.61	3.82	0.36	Wong *et al.* (2009)
4.30	93.00	95.00	64.60	27.33	1.09	1.10	Noparat (2009)
4.50	-	94.40	-	27.80	10.10	0.80	Ismail *et al.* (2010)
4.26	38.42	81.12	51.94	26.70	12.25	0.80	**Average ± sd**
±0.34	±23.60	±33.06	±17.58	±14.44	±10.48	±0.22	

TS = Total solids, SS = Suspended solids, O&G = Oil and grease and TN = Total nitrogen

Table 3. Chemical composition of palm oil mill effluent.

Compositions	Sources		
	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

All parameters in % dry weigh

Source 1. Maneesri (1994), 2. Kunghae (1993), 3. Hwang *et al.* (1987)

Table 4. The comparison of palm oil mill effluent from 5 palm oil industries.

Factory	A	B	C	D	E	Average	SD
pH	4.20	4.40	3.90	4.20	4.20	4.20	0.20
Temp (^{o}C)	60.00	75.00	-	82.00	-	72.30	11.20
COD (g/l)	160.70	30.70	99.80	46.50	262.70	120.10	94.00
Total solids (g/l)	82.10	64.60	75.90	72.20	62.90	71.60	8.00
Suspended solids (g/l)	65.50	32.70	57.42	36.30	44.60	47.30	14.00
Oil & grease (g/l)	25.10	12.90	17.20	8.70	78.20	28.40	28.50

Note : A : Pure Palm Oil Co., Ltd., B : Siam Modern Palm Oil Co., Ltd., C : Satoon Palm Oil Industry Co., Ltd., D : Trang Palm Oil Co., Ltd. and E : Univanich Palm Oil Co., Ltd.

Source : Laohaprapanon *et al.* (2005)

7. การบำบัดน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

7.1 การบำบัดด้วยวิธีทางกายภาพและเคมี

การใช้วิธีการทางกายภาพและเคมีในการบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มนั้นมีได้หลายวิธี เช่น การใช้วิธีการตกตะกอนด้วยสารเคมี การใช้ความร้อน การกรองผ่านเยื่อกรอง (membrane ultrafiltration) (Wah *et al.*, 2002; Ahmad *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2007; Wong *et al.*, 2009) การเติมอากาศ (Tajuddin *et al.*, 2002; Vijayaraghavan *et al*, 2007) การโอโซน (กูนูรหายาม ยามิรูเด็ง, 2551) การใช้กรดและด่างในการย่อยสลาย (Rahman *et al*, 2006) เป็นต้น โดยอรัญ หันพงศ์กิตติกูล และคณะ (2537) ทดลองแยกน้ำมันจาก น้ำทิ้งแหล่งต่าง ๆ ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ด้วยวิธีการต่าง ๆ พบว่าน้ำมันที่มีอยู่ในน้ำทิ้งจากหม้อนึ่งสามารถแยกได้ง่าย โดยตั้งทิ้งไว้ก็เกิดการแยกชั้น สำหรับตัวอย่างน้ำทิ้งจากเครื่องแยกหรือน้ำทิ้งจากบ่อพักน้ำทิ้งรวมไม่สามารถแยกน้ำมันออกได้ด้วยวิธีการตกจม (normal settling) การใช้ความร้อนพร้อมกับการกวนอย่างช้า ๆ (1.5 รอบต่อนาที) การใช้สารช่วยตกตะกอนเช่น เฟอริกคลอไรด์ ($FeCL_3$), แคลเซียมไฮดรอกไซด์ ($Ca(OH)_2$) หรือ อะลูมิเนียมซัลเฟต ($Al_2(SO_4)_3$) การใช้วิธีเติมอากาศ (dissolved air flotation) ก็ไม่สามารถแยกน้ำมันออกจากน้ำทิ้งได้ ส่วนการหมุนเหวี่ยงสามารถแยกน้ำทิ้งออกเป็น 3 ชั้น โดยน้ำทิ้งจากเครื่องเซพาเรเตอร์มีปริมาตรน้ำทิ้งชั้นบนร้อยละ 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 และทำให้น้ำทิ้งสุดท้ายมีค่า ซีโอดีลดลงร้อยละ 50 และน้ำมันลดลงร้อยละ 85 นอกจากนี้วิธีการทางเคมีโดยการใช้สารช่วยตกตะกอน (โพลีเฟอริกซัลเฟตและแคลเซียมออกไซด์) ยังสามารถลดความเข้มสีได้ถึงร้อยละ 84.5 และยังช่วยลดปริมาณของสารอินทรีย์ในรูปของซีโอดีได้ร้อยละ 86.5 (พูนสุข ประเสริฐสรรพ์และคณะ, 2544) พบว่าวิธีนี้มีประสิทธิภาพในการลดความเข้มของสีได้สูงกว่าวิธีการทางชีวภาพ

Laohaprapanon และคณะ (2005) รายงานการเปรียบเทียบการใช้วิธีการทางกายภาพและเคมีในการแยกน้ำมันและกากน้ำมันปาล์มออกจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยวิธีต่าง 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 ส่วน Bhatia และคณะ

(2007) ทดลองใช้เมล็ดพืช (*Moringa oleifera*) ในการบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม พบว่าสามารถลดของแข็งแขวนลอยได้ถึงร้อยละ 99.3 ลดค่าซีโอดีและค่าน้ำหนักแห้งของตะกอนได้ร้อยละ 52.5 และ 87.25 ตามลำดับ

วิธีการทางกายภาพและเคมีเหล่านี้มีค่าใช้จ่ายที่ค่อนข้างสูงและการใช้แยกน้ำมันออกจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มได้ยากและยังอาจส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมตามมากรณีที่ใช้สารเคมี

7.2 การบำบัดด้วยวิธีทางชีวภาพโดยใช้แบคทีเรีย

การแยกน้ำมันด้วยวิธีการทางชีวภาพสามารถใช้แบคทีเรีย ย่อยสลายสารอินทรีย์ต่าง ๆ ในน้ำเสีย มีรายงานการแยกหรือกำจัดน้ำมันในน้ำทิ้งโดยใช้วิธีการทางกายภาพร่วมกับวิธีทางชีวภาพ เช่น Okuda และคณะ (1991) บำบัดไลปิดที่มีอยู่ในน้ำเสียของโรงงานแปรรูปเนื้อโดยวิธี 2 ขั้นตอนคือบำบัดขั้นต้นโดยแยกไลปิดในน้ำทิ้งที่อยู่บริเวณผิวหน้าโดยอาศัยแรงดันอากาศจากปั๊มทำให้ไลปิดลอยตัว และทำให้เกิดการหมุนเวียนของน้ำทิ้งภายในถังบำบัด วิธีนี้สามารถกำจัดไลปิดได้ร้อยละ 76 (จากเดิม 252 พีพีเอ็มเหลือ 60 พีพีเอ็ม) จากนั้นนำมาบำบัดในขั้นที่ 2 โดยวิธีตะกอนเร่ง (activated sludge) ซึ่งมีการเติมเชื้อ *Bacillus* sp. 351 พบว่าหลังให้อากาศ 24 ชั่วโมง ไลปิดลดลงเหลือ 9 พีพีเอ็ม หรือลดลงร้อยละ 96 ส่วน Ho และ Tan (1983) เปรียบเทียบการบำบัดน้ำทิ้งโรงงานน้ำมันปาล์มโดยใช้เครื่องหมุนเหวี่ยงและการบำบัดในถังหมักไร้อากาศ จากการใช้เครื่องหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกน้ำมันและอนุภาคต่าง ๆ ในน้ำทิ้งพบว่า การใช้ความเร็วในการหมุนเหวี่ยง 10,000xg อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที สามารถลดค่าบีโอดี ของแข็งทั้งหมด ของแข็งแขวนลอยและน้ำมันร้อยละ 46, 40, 46 และ 50 ตามลำดับและยังพบว่าอนุภาคต่าง 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 สายพันธุ์เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก 1 สายพันธุ์และแบคทีเรียแกรมลบ 7 สายพันธุ์ เพื่อบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อไปได้ 10 วัน สามารถบำบัดไขมันในน้ำทิ้งได้ร้อยละ 40-50 แต่ Oswal และคณะ (2002) รายงานว่าการใช้เชื้อ *Barrowia lipolytica* NCIM 3589 เพื่อบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมสามารถลดค่าซีโอดีได้มากถึงร้อยละ 95 ในเวลา 2 วัน ส่วน Becker และคณะ (1999) บำบัดน้ำมันมะกอกในน้ำทิ้งโดยใช้เชื้อ *Bacillus thermoleovorans* IHI-91 ภายใต้สภาวะที่มีอากาศ

และอุณหภูมิสูง (65 องศาเซลเซียส) พบว่า สามารถบำบัดน้ำมันมะกอกในน้ำทิ้งได้มากกว่าร้อยละ 90 มีอัตราการย่อยสลาย 900 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

Pechsuth และคณะ (2001)รายงานการใช้ *Rhizopus* sp. ST4 และ ST29 เพื่อแยกน้ำมันออกจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มพบว่าภายใต้สภาวะปลอดเชื้อสายพันธุ์ ST29 ให้ค่าการกำจัดน้ำมันได้สูงกว่าแตกต่างจากการแยกน้ำมันในสภาวะไม่ปลอดเชื้อที่เชื้อสายพันธุ์ ST4 จะให้การกำจัดน้ำมันและกรีสได้ดีกว่า ส่วน Najafpour และคณะ (2005) รายงานว่าการใช้ *Saccharomyces cerevisiae* ในการบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม พบว่าเชื้อสามารถลดค่าซีโอดีได้ถึงร้อยละ 88 ที่เวลาบ่ม 55 ชั่วโมง และลดค่าของแข็งแขวนลอยในน้ำทิ้งได้ร้อยละ 75-88 ส่วน Laohaprapanon และคณะ (2007) รายงานการเลี้ยงเชื้อเพื่อบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มสองสายพันธุ์คือ SO1 และ SO2 โดยทำการเลี้ยงเชื้อในน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ผ่านการฆ่าเชื้อเป็นเวลา 7 วัน พบว่า เชื้อ SO1 ให้ค่าการลดลงของไขมันและน้ำมันได้มากที่สุดร้อยละ 85.32 และเชื้อสามารถลดน้ำหนักแห้งของตะกอนได้ร้อยละ 64.66 ส่วน Udomsil และ Prasertsan (2009) ทดลองการแยกน้ำมันออกจากน้ำทิ้งจากเครื่อง ดีแคนเตอร์โดยใช้เชื้อแบคทีเรีย 6 สายพันธุ์คือ SU5, SU6, SU9, WD7, WD79 และ WD90 พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ SU5 และ SU9 ให้การแยกน้ำมันได้ดีที่สุดเท่ากับร้อยละ 44.4 และ 49.5 ตามลำดับ และเมื่อทำการเพิ่มปริมาณน้ำทิ้งเป็น 100 ลิตรพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ SU9 สามารถแยกน้ำมันออกจากน้ำทิ้งได้ดีที่สุดร้อยละ 58.1

สำหรับเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการแยกหรือกำจัดน้ำมันและสารแขวนลอยได้แก่ เอนไซม์ไซลาเนสและเอนไซม์เซลลูเลส (Maneesri, 1994) ซึ่งการที่เอนไซม์สามารถแยกสารแขวนลอยออกจากน้ำทิ้งได้เนื่องจากองค์ประกอบของน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์มีเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสหรือไซแลนเป็นองค์ประกอบ โดยไซแลนจะมีทั้งส่วนที่ละลายน้ำและไม่ละลายน้ำ ไซแลนที่สามารถละลายน้ำได้เกิดจากการอบทะลายปาล์มด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 120–130 องศาเซลเซียสและอาจเกาะกับสายเซลลูโลสในลักษณะสารแขวนลอย ส่วนไซแลนที่ไม่ละลายน้ำซึ่งเกิดจากการตัดโครงสร้างด้านข้าง (side chain) ออกไปจากโครงสร้างหลัก (back bone) ของไซแลน เอนไซม์ไซลาเนสจะย่อยไซแลนที่ละลายน้ำและไซแลนที่เกาะอยู่ที่เส้นใย ส่วนเอนไซม์เซลลูเลสจะทำการย่อยโมเลกุลของเซลลูโลส ส่งผลให้สารแขวนลอยในน้ำทิ้งที่มีโมเลกุลของน้ำมันจับอยู่ถูกย่อยสลาย ส่วนของน้ำมันจึงถูกแยกออกจากสารแขวนลอยในน้ำทิ้ง สารแขวนลอยที่เหลือจากการย่อยด้วยเอนไซม์และส่วนของน้ำมันจะลอยเป็นตะกอนอยู่ด้านบน

Maneesri (1994) รายงานว่าการใช้เอนไซม์ไซลาเนสและเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากเชื้อ *Aspergillus nigrr* ATCC6275 สามารถกำจัดน้ำมันและกรีสออกจากน้ำทิ้งได้มากถึงร้อยละ 99.00 ส่วน Muneesri (1996) รายงานว่าการบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยเชื้อราใน

สภาวะที่มีการเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน สามารถลดน้ำมันและกรีสที่มีอยู่ในน้ำทิ้งได้ร้อยละ 99.65 และค่าซีโอดีลดลงร้อยละ 65.54

Chantaphaso (1999) ศึกษาการใช้เอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจากเชื้อ *Aspergillus niger* ATCC6275 เพื่อแยกน้ำมันและสารแขวนลอยออกจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม พบว่าที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส พีเอชเท่ากับ 4.5 สามารถลดค่าซีโอดีและน้ำมันและกรีสในน้ำทิ้งได้ร้อยละ 35.00 และ 95.00 ตามลำดับ เช่นเดียวกับพูนสุข 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 ส่วน Prasertsan และ Oi (2001) กล่าวว่าเอนไซม์จาก *Aspergillus niger* ATCC 6275 และเอนไซม์ meicellase สามารถย่อยกากปาล์มได้ นอกจากนี้ Udomsil และ Prasertsan (2009) ทดลองการแยกน้ำมันออกจากน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์โดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสทางการค้าพบว่าเมื่อใช้เอนไซม์ที่ความเข้มข้น 10 ยูนิตต่อมิลลิลิตรจะสามารถแยกน้ำมันออกได้ร้อยละ 41.3 ส่วนการใช้เอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตได้จากเชื้อราที่ทนร้อนเพื่อบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มยังสามารถลดค่าของแข็งทั้งหมดได้ร้อยละ 52.97 และกำจัดน้ำมันและกรีสออกจากตะกอนได้ร้อยละ 98.66 (Binmaeil, 2005)

จิตรลดา กาญจนสาวิตรี และชญานุตม์ ศรีพิทักษ์ (2547) ศึกษาการใช้เอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตได้จากเชื้อ *Bacillus* sp. A2 ในการแยกน้ำมันออกจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม พบว่าสามารถลดน้ำมันในตะกอนและน้ำหนักแห้งของตะกอนได้มากขึ้นเมื่อใช้เวลาบ่มนานขึ้นส่วนซีหย๊ะ จันทองและฮาราตี รอนิง (2548) รายงานว่าเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสที่ได้จาก *Bacillus* sp. A2 สามารถลดน้ำหนักแห้งของตะกอนและน้ำมันในตะกอนได้สูงสุดร้อยละ 69.09 และ 32.83 ตามลำดับ

8. เอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนส

8.1 เอนไซม์เซลลูเลส

วัสดุเศษเหลือจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มเป็นสารพวกลิกโนเซลลูโลสมีองค์ประกอบหลัก 3 ส่วนคือ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนิน เซลลูโลสเป็นสารโพลีแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วยโมเลกุลของกลูโคสต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะ β-D-1,4 glucosidic การย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลสทำได้ 2 วิธีคือ วิธีทางเคมีโดยการย่อยด้วยกรดและวิธีการใช้เอนไซม์ (Tsao

and Chiang, 1983) การย่อยด้วยกรดเครื่องมือที่ใช้จะต้องทนทานต่อการกัดกร่อนนอกจากนี้ส่วนโมเลกุลของเซลลูโลสที่เป็นระเบียบ (crystalline) จะทนทานต่อกรดที่มีความเข้มข้นสูงและอุณหภูมิสูง และเนื่องจากปฏิกิริยาการใช้กรดไม่เฉพาะเจาะจง กลูโคสบางส่วนที่เกิดขึ้นและสารประกอบอื่นที่ติดมากับเซลลูโลสจะทำปฏิกิริยากับกรดต่อไปทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการ ส่วนการใช้เอนไซม์จะเป็นวิธีการทางชีวเคมีที่มีความจำเพาะเจาะจง ดังนั้นการใช้เอนไซม์ย่อยสลายจึงได้น้ำตาลกลูโคสที่ค่อนข้างบริสุทธิ์

เอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสได้แก่เอนไซม์เซลลูเลส (1,4-β-D-glucan glucanohydrolase (EC 3.2.1.4)) ซึ่งเป็นกลุ่มเอนไซม์ (multiple enzyme) ที่ประกอบด้วยเอนไซม์ 3 ชนิดได้แก่ (Maneesri, 1994)

8.1.1. Endo-1,4-β-D-glucanase (CMCase (EC. 3.2.1.4))

ทำหน้าที่ย่อยโมเลกุลของเซลลูโลสทั้งในรูปที่เป็นระเบียบและไม่เป็นระเบียบ (amorphous) รวมทั้งโมเลกุลของเซลโลโอลิโกเมอร์ (cellooligomer) ที่ตำแหน่ง β-1,4 แบบสุ่มทำให้ได้โอลิโกเมอร์ (oligomer) และเซลโลไบโอส

8.1.2. 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 ในการย่อยโมเลกุลของเซลลูโลสโดยย่อยจากปลายด้านที่ไม่มีหมู่น้ำตาลริดิวซ์ (non-reducing) ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายส่วนใหญ่คือน้ำตาลเซลโลไบโอส

8.1.3. β-D-Glucoside glucanohydrolase (cellobiase (EC. 3.2.21))

ทำหน้าที่ย่อยโมเลกุลของเซลโลไบโอสและเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ (cellooligosaccharide) ให้เป็นกลูโคส

8.2 เอนไซม์ไซลาเนส

เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลส ถูกเรียกรวมๆกันว่า เฮมิเซลลูเลส (hemicellulase) หรือกลูแคนไฮโดรเลส (glucanhydrolase) ซึ่งแบ่งย่อยออกเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ตัดอย่างจำเพาะตามชนิดของสารตั้งต้นคืออราบิเนส (L-arabinase) ย่อยสลายเฉพาะพันธะ (1,3) และพันธะ (1,5)-2-L-arabino-furanosyl แล้วให้น้ำตาลอราบิโนส (L-arabinose) ออกมา เอนไซม์กาแลกตาเนส (D-galactanase) ย่อยสลายเฉพาะกาแลกแทน (galactan) และน้ำตาลอราบิโนกาแลกแทน (L-arabino-D-galactan) เอนไซม์แมนนาเนส (D-mannanase) เป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายพันธะ β-(1,4)-D-

mannanopyranosyl ของน้ำตาลแมนแนน (D-mannan) และเอนไซม์ไซลาเนส (β-xylanase) ตัดพันธะ β-(1,4)-D-xylopyranosyl ของไซแลน (Bastawde , 1992)

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

8.2.1. เอนไซม์ย่อยกิ่งก้าน

Suto และคณะ (2002) กล่าวว่าไซแลนจากพืชจะเป็นแบบพอลิเมอร์ซึ่งประกอบไปด้วยโมเลกุลของไซโลสเชื่อมต่อด้วยพันธะ β-(1,4) และสามารถปรับเปลี่ยนโครงสร้างได้โดยจะมีหมู่อะซิติล (acetyl group) หมู่อราบิโนฟิวราโนซิล (arabinofuranosyl group) หรือหมู่กลูโคโรนิก (glucuronic group) เอนไซม์ที่มีหน้าที่ตัดหน่วยย่อยที่เป็นกิ่งก้าน จากการศึกษาพบว่าเอนไซม์ที่จะทำหน้าที่ย่อยสายหลักไม่สามารถทำงานได้หากไม่มีการตัดกิ่งก้านออก ดังนั้นการย่อยจึงเริ่มต้นด้วยการตัดหน่วยย่อยของกิ่งก้านออกโดยเอนไซม์อะซิทิล เอสเทอร์เรส (acetyl esterase) อราบิโนฟูราโนซิเดส (L-arabinofuranosidase) และกลูโคโรนิเดส (glucuronidase)

8.2.2. เอนไซม์ย่อยสายหลัก

เมื่อกิ่งก้านถูกกำจัดหมดสายหลักก็จะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ 3 ชนิด คือ

8.2.2.1 Endo-1,4-β-D-xylan xylanohydrolase (EC. 3.2.1.8) หรือ endoxylanase

ทำหน้าที่ย่อยพันธะ β-(1,4) ที่อยู่ภายในสายหลักแบบสุ่มได้ xylo-oligosaccharides มีขนาดต่างกันหลายชนิด

8.2.2.2 Exo-1,4-β-D-xylanase หรือ exo-xylanase

ย่อยสายไซแลน และไซโลโอลิโกแซคคาร์ไรด์ให้เป็นหน่วยย่อยจากด้านที่เป็น non-reducing end แล้วให้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลไซโลส

8.2.2.3 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 นาที จนถึง 2 ชั่วโมง จะทำให้ไซแลนและไซโลสซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของเฮมิเซลลูโลสละลายน้ำเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 80 (Maneesri, 1994)

9. ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสของแบคทีเรีย

9.1 แหล่งคาร์บอน

มีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสโดยใช้เซลลูโลสและไซแลนในธรรมชาติ เช่น ฟางข้าวสาลี กากชานอ้อย (Kawamori *et al*., 1986) เศษกระดาษหนังสือพิมพ์ (Chen and Wayman, 1991) ซังข้าวโพด รำข้าว (Saleem *et al*., 2009) และน้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อโรงงานปาล์มน้ำมัน (เบญจวรรณ ชิตมณี, 2534) รวมทั้งเซลลูโลส, ซีเอ็มซีและไซแลนทางการค้า (Kim *et al.,* 2009) ซึ่งชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนก็มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ของแบคทีเรียด้วย โดย Pham และคณะ (1998) พบว่าแหล่งคาร์บอนที่ทำให้เชื้อ *Bacillus polymyxa* CTET153 ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้มากที่สุดคือ corncobs 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. Sam-3 พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อไปได้ 48 ชั่วโมง *Bacillus* sp. Sam-3 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส สูงสุดเท่ากับ 132 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในแหล่งคาร์บอนจาก wheat bran จากนั้นทดลองเลี้ยงเชื้อโดยใช้ปริมาณของไซแลนต่าง ๆ กันคือร้อยละ 0.05, 1.00 และ 1.50 ตามลำดับ พบว่าเชื้อมีกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุด 117 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้ไซแลนร้อยละ 1.50 ส่วน Gessesse และ Mamo (1999) ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อ *Bacillus* sp. AR-009 พบว่าเมื่อใช้กลูโคสและซูโครสร้อยละ 5 (ปริมาตรต่อน้ำหนัก) เป็นแหล่งคาร์บอนจะผลิตเอนไซม์ไซลาเนสมากถึงร้อยละ 78 และ 74 ตามลำดับ ต่างจากการใช้ไซโลสและแลกโตสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ให้ปริมาณเอนไซม์ไซลาเนสเพียงร้อยละ 16-23 แต่ Virupakshi และคณะ (2005) รายงานว่าการใช้ไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Bacillus* sp. JB-99 จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดเท่ากับ 1045 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ต่างจากการใช้กลูโคสและซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสเพียง 800 และ 865 ยูนิตต่อมิลลิลิตรตามลำดับ

Leartslarus และคณะ (2002) ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของ *Bacillus firmus* K-1 ในอาหารที่เติมแหล่งคาร์บอนจากชานอ้อย, ซังข้าวโพด, เปลือกข้าวโพดและ รำข้าว พบว่าเชื้อแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไซลาเนสดีที่สุดเมื่อใช้เปลือกข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน ส่วน

Kapoor และคณะ (2008) ศึกษาผลของคาร์บอนจากแหล่งต่าง ๆ ต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส ของเชื้อ *Bacillus pumilus* MK001 พบว่าเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อใน brich wood xylan, wheat bran และ oat spelt xylan เชื้อจะให้กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสเท่ากับ 1,190, 1,220 และ 1,150 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* CTET153 พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะแก่การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ไซลาเนส คือยีสต์สกัด

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

Leartslarus และคณะ (2002) ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อ *Bacillus firmus* K-1 พบว่าความเข้มข้นของยูเรียร้อยละ 0.4, แอมโมเนียมไนเตรทร้อยละ 0.2, แอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 0.1, โซเดียมไนเตรทร้อยละ 0.4 และโพแทสเซียมไนเตรทร้อยละ 0.6 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ดีที่สุดมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสเท่ากับ 1.60, 1.44, 1.31, 0.89 และ 0.40 ยูนิตต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ส่วน Pang Pri Kheng และ Ibrahim (2005) พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Aspergillus niger* USM A1 คือโซเดียมไนเตรท รองลงมาคือยูเรีย, ยีสต์สกัด, เปบโตน, แอมโมเนียมซัลเฟตและแอมโมเนียมไนเตรทตามลำดับ พบว่าร้อยละ 0.075 ของโซเดียมไนเตรทให้ค่าการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อ *Aspergillus niger* USM A1 มากที่สุด (34 ยูนิตต่อกรัม) แต่ไม่ได้เพิ่มการเจริญของเชื้อแต่อย่างใด และเมื่อทำการเพิ่มปริมาณของโซเดียมไนเตรทพบว่าไม่ส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส ส่วน Kapoor และคณะ (2008) ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อ *Bacillus pumilus* MK001

พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อโดยใช้แหล่งไนโตรเจนจากยีสต์สกัดเชื้อจะให้กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงที่สุด (990 ยูนิตต่อมิลลิลิตร)

Ariffin และคณะ (2008) รายงานการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *Bacillus pumilus* EB3 พบว่าเมื่อใช้แอมโมเนียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน จะทำให้เชื้อมีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 0.83 ยูนิตต่อลิตร แต่เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนจะทำให้เชื้อมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสเพิ่มขึ้นเป็น 1.13 ยูนิตต่อลิตร

9.3 อุณหภูมิ

แบคทีเรียมีความต้องการอุณหภูมิเพื่อการเจริญเติบโตแตกต่างกัน อุณหภูมิที่แบคทีเรียเจริญได้จะอยู่ระหว่างอุณหภูมิสูงสุดและอุณหภูมิต่ำสุด ซึ่งถ้าระดับอุณหภูมิสูงหรือต่ำกว่านี้แบคทีเรียจะไม่เจริญเติบโต (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจและปรีชา สุวรรณพินิจ, 2552)ระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างเอนไซม์ของแบคทีเรียแต่ละชนิดจะต่างกัน โดยในระหว่างการเจริญเติบโตของแบคทีเรียจะมีความร้อนเกิดขึ้นและถ่ายเทลงสู่อาหารทำให้อุณหภูมิสูงขึ้นจนถึงระดับหนึ่งที่แบคทีเรียไม่สามารถดำเนินกิจกรรมต่อไปได้สำหรับการสร้างโปรตีนของเซลล์จะทำให้อุณหภูมิสูงขึ้นเช่นกัน เนื่องจากเมทาบอลิซึมของแบคทีเรีย ดังนั้นในกระบวนการหมักต่าง ๆ จึงต้องควบคุมอุณหภูมิให้เหมาะสม

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

Kulkarni และ Rao (1996) ทดลองเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. NCIM59 เพื่อให้ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากกากชานอ้อย พบว่าที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เชื้อผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้มากกว่าร้อยละ 50 ส่วน Archana และ Satyarayana (1997) รายงานการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus licheniformis* 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 และหากเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจะลดลง

Pham และคณะ (1998) รายงานว่าเชื้อ *Bacillus polymyxa* สองสายพันธุ์คือ สายพันธุ์ CECT153 และสายพันธุ์ 6319T มีการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ดีที่อุณหภูมิต่างกัน โดยสายพันธุ์ CECT ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสดีที่ 40 องศาเซลเซียส ส่วนสายพันธุ์ 6319T ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ดีที่ 50 องศาเซลเซียส

Mawadza และคณะ (2000) รายงานว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อ *Bacillus* sp. สองสายพันธุ์คือสายพันธุ์ CH43 และ HR68 คือ อุณหภูมิเท่ากับ 65 และ 70 องศาเซลเซียสตามลำดับ ส่วน Virupakshi และคณะ (2005) ศึกษาผลของอุณหภูมิในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Bacillus* sp. JB-99 ที่อุณหภูมิ 20, 30, 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส พบว่า เชื้อผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกับ Poorna และ Prema (2007) ที่ทำการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus pumilus* เพื่อผลิตเอนไซม์ไซลาเนสที่อุณหภูมิ 40-65 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ส่วน Ponpium และคณะ (2002) กล่าวว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อ *Bacteroides* sp. P-1 นั้นคือที่อุณหภูมิในช่วงระหว่าง 55-65 องศาเซลเซียสและ 45-55 องศาเซลเซียสตามลำดับ

9.4 พีเอช

พีเอชมีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียและการทำงานของเอนไซม์ พีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียแต่ละชนิดจะแตกต่างกัน การหมักในระยะแรกพีเอชของการเลี้ยงเชื้อจะเหมาะต่อการเจริญของเชื้อ แต่ระหว่างการหมักค่าพีเอชอาจมีการเปลี่ยนแปลงซึ่งอาจเกิดจากการย่อยสลายโปรตีนและสารประกอบไนโตรเจนทำให้มีการปลดปล่อยแอมโมเนียหรือสารที่เป็นด่างอื่น ๆ ออกมาหรือมีการย่อยสลายสารประกอบคาร์โบไฮเดรตเกิดกรดอินทรีย์เป็นผลให้พีเอชไม่เหมาะสมต่อการเจริญ ดังนั้นการผลิตเอนไซม์ของแบคทีเรียจึงต้องมีการเติมสารที่มีคุณสมบัติเป็นบัฟเฟอร์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อควบคุมให้พีเอชในอาหารเปลี่ยนแปลงอย่างช้า ๆ โดยบัฟเฟอร์จะไปรวมตัวกับกรดหรือด่างป้องกันไม่ให้ปล่อย H^+ หรือ OH^- ออกมา (Kunghae, 1993) แต่สำหรับการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อรานั้น ค่าพีเอชที่เป็นกรดจะทำให้มีการผลิตเอนไซม์ได้มากยิ่งขึ้น (Mandels and Weber, 1969) การควบคุมพีเอชสามารถทำได้ทั้งในอาหารเหลวและอาหารแข็งแต่ไม่เป็นที่นิยมทำในอาหารแข็งมากนัก (Lonsane *et al.*, 1985) การควบคุมพีเอชในช่วงของการหมักมักใช้อาจใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนมากกว่าเกลือแอมโมเนีย (Lonsane *et al.*, 1992)

Pham และคณะ (1998) ทำการหาค่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมที่สุดในการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus polymyxa* สองสายพันธุ์คือ สายพันธุ์ CECT และ สายพันธุ์ 6319T เพื่อผลิตเอนไซม์ไซลาเนส พบว่าพีเอชที่เหมาะสมพีเอชเท่ากับ 7.0 และ 5.0 ตามลำดับ แต่ Mawadza และคณะ

(2000) พบว่าเชื้อ *Bacillus* sp. CH43 และ *Bacillus* sp. HR68 จะมีการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ดีที่พีเอชช่วง 6.0-8.0

Nath และ Rao (2001) ศึกษาผลของพีเอชต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อ *Bacillus* sp. NCIM59 โดยเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีช่วงของพีเอช 5.0-10.0 พบว่าเชื้อเจริญได้ดีที่พีเอชเท่ากับ 6.0 เช่นเดียวกันกับ Sa-Pereira และคณะ (2002) พบว่าเชื้อ *Bacillus subtilis* มีการเจริญได้ที่พีเอช 5.0-8.0 แต่เชื้อมีการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้สูงสุดที่พีเอชเท่ากับ 6.0 ต่างจาก Shah และคณะ (1999) ซึ่งรายงานว่าพีเอชที่เหมาะในการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. SAM-3 คือพีเอชเท่ากับ 8.0

Heck และคณะ (2005) รายงานว่าเชื้อ *Bacillus coagulans* BL69 จะผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้สูงสุดที่พีเอชเท่ากับ 7.0 เช่นเดียวกันกับ Krishna (1999) ที่รายงานว่าเชื้อ *Bacillus subtilis* CBTK106 ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีที่สุดที่พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.0

Salvador และคณะ (2002) ศึกษาการผลิตเอนไซม์เพื่อย่อยสลายซากเปลือกผลไม้จากเชื้อ *Bacillus* sp. M4 พบว่าที่พีเอชเท่ากับ 7.0 เชื้อ *Bacillus* sp. M4 ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสเท่ากับ 0.3 และ 11.0 ยูนิตต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ส่วน Poorna และ Prema (2006) รายงานว่าเชื้อ *Bacillus pumilus* ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อจากรำข้าวสาลี โดยผลิตเอนไซม์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชเท่ากับ 8.0 และผลิตเอนไซม์ได้เท่ากับ 430 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

Kapoor และคณะ (2008) ศึกษาผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อ *Bacillus pumilus* MK001 พบว่าเมื่อปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้น เชื้อจะผลิตเอนไซม์ได้มากขึ้น โดยพีเอชที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของ *Bacillus pumilus* MK001 คือพีเอชเท่ากับ 9.0 เชื้อมีกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสเท่ากับ 610 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และเมื่อทำการเพิ่มพีเอชเท่ากับ 10.0 พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์มีค่าลดลง (101 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) แต่ Ponpium และคณะ (2002) รายงานว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อ *Bacteroides* sp. P-1 นั้นคือที่พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 และ 5.0 ตามลำดับ

9.5 การให้อากาศ

ออกซิเจนเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์ของแบคทีเรีย การเจริญและกิจกรรมของแบคทีเรียที่มีการเปลี่ยนวัตถุดิบหรือสารอาหารไปเป็นผลิตภัณฑ์อาจขึ้นอยู่กับสภาวะมีอากาศหรือไร้อากาศ โดยทั่วไปการหมักเพื่อผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสเป็นกระบวนการหมักที่ต้องการอากาศ วิธีการที่จะทำให้แบคทีเรียได้รับอากาศเพียงพอ ทำได้โดยการให้อากาศระหว่างการหมัก ซึ่งต้องควบคุมให้พอเหมาะกับการเจริญของแบคทีเรียจะมากน้อย

เพียงใดขึ้นกับชนิดและปริมาณของแบคทีเรีย จำนวนรอบของการเขย่าหรือกวนและปริมาตรของสารอาหารต่อปริมาตรของถังหมัก

การหมักแบบอาหารแข็ง การให้อากาศมีบทบาท 2 ประการ คือ เป็นแหล่งให้ออกซิเจนกับแบคทีเรีย และเพื่อกำจัดคาร์บอนไดออกไซด์, ไอน้ำและสารที่ระเหยได้อื่น ๆ (Chahal, 1983) อากาศที่ให้มักอิ่มตัวด้วยน้ำหรือปราศจากคาร์บอนไดออกไซด์ โดยการใช้สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) (Maheva *et al.*, 1984) และอัตราการให้อากาศขึ้นกับธรรมชาติของแบคทีเรีย, ความต้องการออกซิเจนเพื่อสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์, ปริมาณความร้อนที่เกิดจากเมตาบอลิซึม, ความหนาของชั้นของสับสเตรตที่ใช้, คาร์บอนไดออกไซด์และสารที่ระเหยได้ที่ปลดปล่อยออกมาและช่องอากาศในสับสเตรต อัตราการให้อากาศต่ำจะมีคาร์บอนไดออกไซด์ได้มากกว่าการให้อากาศสูง ซึ่งจะมีผลต่อบรรยากาศโดยรวมในถังหมัก ทำให้ไม่มีศักยภาพในการผลิต แต่อัตราการให้อากาศสูงจะทำให้ความชื้นของสับสเตรตและความชื้นสัมพัทธ์สูญเสียได้มาก อาจจะทำให้สับสเตรตแห้งหรือต้องใช้ตัวปรับความชื้นสัมพัทธ์ (humidifier) (Lonsane *et al.*,1985) สำหรับอัตราการให้อากาศต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสนั้น เบญจวรรณ ชิตมณี (2534) รายงานว่าการให้อากาศที่ระดับ 0.83 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสต่ำ แต่เมื่อเพิ่มการให้อากาศจนมีระดับ 1.00 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที จะทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้น และมีค่าคงที่เมื่อให้อากาศในช่วง 1.00-1.50 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาทีเช่น เดียวกับ Panda (1989) ที่รายงานว่าเชื้อผสมระหว่าง *Trichoderma reesei* D1-6 และ *Aspergillus wentii* Pt2804 เจริญและผลิตเอนไซม์เซลลูเลสมากขึ้นเมื่อมีการให้อากาศจนถึงระดับ 1.00 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที ทั้งนี้เนื่องจากค่าการละลายได้ของออกซิเจนที่เพิ่มขึ้นมีผลทำให้เชื้อแบคทีเรียเจริญได้ดีและผลิตเอนไซม์ได้มากขึ้น แต่ Syu และ Chen (1997) รายงานว่าการเพิ่มอัตราการให้อากาศจาก 0.3 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาทีไปเป็น 0.6 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาทีนั้นจะส่งผลให้เชื้อ *Bacillus amyloliquefaciens* ในถังหมักนั้นเจริญได้เร็วในช่วงชั่วโมงที่ 10 ถึงชั่วโมงที่ 25 ของการเลี้ยงเชื้อ แต่เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อต่อไปเป็น 40 ชั่วโมง พบว่าการเจริญของเชื้อที่อัตราการให้อากาศทั้งสองจะไม่แตกต่างกัน

9.6 การกวน

การกวนทำให้แบคทีเรีย อากาศ และสารอาหารผสมกันอย่างทั่วถึงและช่วยให้ฟองอากาศมีขนาดเล็ก ระบบการกวนที่มีประสิทธิภาพจะต้องทำให้การละลายของออกซิเจนในน้ำทิ้งมีปริมาณเท่า ๆ กันทุก ๆ จุดในถังหมัก (สุรพล สายพานิช, 2537) แต่อัตราการกวนสูงจะทำให้เกิดฟองอากาศมากและได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ต่ำ อาจเนื่องมาจากอัตราการกวนสูงทำให้เกิด

แรงเฉือนสูงซึ่งจะไปทำลายไมซีเลียมทำให้เชื้อมีการผลิตเอนไซม์ลดลงพบว่าอัตราการกวนที่เหมาะสมคือ 200 รอบต่อนาที (เบญจวรรณ ชิตมณี, 2534)

Syu และ Chen (1997) ทำการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus amyloliquefaciens* ในถังหมักขนาด 2.5 ลิตร พบว่าเมื่อเพิ่มอัตราการกวนในถังหมักจะส่งผลให้เชื้อเจริญได้มากขึ้นแต่ไม่ความแตกต่างกัน โดยที่อัตราการกวน 220, 300 และ 400 รอบต่อนาที เชื้อมีการเจริญเท่ากับ 0.72, 0.75 และ 0.77 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ส่วน Feng และคณะ (2003) กล่าวว่าเมื่อเพิ่มอัตราการกวนในถังหมักจาก 600 รอบต่อนาที ไปเป็น 750 รอบต่อนาที จะทำให้เกิดอันตรายต่อเชื้อ *Bacillus licheniformis* NK-27 ในถังหมัก ส่งผลให้เชื้อเจริญได้น้อยลง เช่นเดียวกับ Potumarthi และคณะ (2007) ที่กล่าวว่าการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus licheniformis* NCIM-2042 ในถังหมักนั้น การเพิ่มอัตราการกวนจาก 200 รอบต่อนาทีเป็น 400 รอบต่อนาทีนั้นจะเป็นการเพิ่มแรงเฉือนในถังหมักและเกิดความเสียหายให้แก่เซลล์ทำให้เชื้อเจริญได้น้อยลงเช่นกัน

Kapoor และคณะ (2008) ศึกษาผลของการเขย่าต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส ของเชื้อ *Bacillus pumilus* MK001 โดยทำการทดลองเขย่าที่ความเร็วระหว่าง 100 ถึง 300 รอบต่อนาที พบว่าเชื้อ *Bacillus pumilus* MK001 มีการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้เพิ่มขึ้นเมื่อทำการเพิ่มอัตราการเขย่าจาก 100 รอบต่อนาที (215 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) เป็น 200 รอบต่อนาที (859 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) และเชื้อจะผลิตเอนไซม์ได้ลดลงเมื่อเพิ่มอัตราการเขย่าเป็น 225 รอบต่อนาที (489 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) และผลิตเอนไซม์ได้น้อยที่สุดเมื่อเขย่าที่ความเร็ว 300 รอบต่อนาที (100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร)

9.7 ปริมาณเชื้อเริ่มต้น

ปริมาณเชื้อที่เหมาะสมจะทำให้แบคทีเรียสามารถผลิตเอนไซม์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เพราะมีความสมดุลระหว่างปริมาณสารตั้งต้นและเอนไซม์ที่ผลิตได้ การบ่มเชื้อให้มีปริมาณที่เหมาะสมจะทำให้สามารถลดต้นทุนที่จะใช้ในการผลิตเชื้อเริ่มต้นลงได้อย่างมาก

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

Virupakshi และคณะ (2005) ศึกษาผลของปริมาณเชื้อเริ่มต้นของ *Bacillus* sp. JB-99 ในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส โดยใช้เชื้อเริ่มต้นร้อยละ 5, 10, 15 และ 20 และบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าปริมาณเชื้อ *Bacillus* sp. JB-99 เริ่มต้นร้อยละ 10 จะ

สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด เช่นเดียวกันกับ Poorna และ Prema (2006) ทำการหาปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมของเชื้อ *Bacillus pumilus* ในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสให้ได้สูงที่สุด โดยเตรียมเชื้อเริ่มต้นที่ร้อยละ 2.5, 5, 7.5 และ 10 พบว่าเชื้อมีการผลิตเอนไซม์ได้ดีเมื่อเตรียมเชื้อเริ่มต้นที่ร้อยละ 10 แตกต่างจาก Kapoor และคณะ (2008) รายงานว่าปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดยเชื้อ *Bacillus pumilus* Mk001 คือเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 1.25

10. *Bacillus*

Bacillus เป็นเซลล์รูปท่อนขนาด 0.3-2.2 x 1.2-7.0 ไมโครเมตร ส่วนใหญ่สามารถเคลื่อนที่ได้ ติดสีแกรมบวก หรือแกรมบวกเฉพาะระยะแรกของการเจริญเติบโต กระบวนการสร้างและสลายเป็นการหายใจโดยใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย บางชนิดอาจใช้ไนเตรทในการหมัก (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2539) มีรายงานการศึกษาการใช้เชื้อ *Bacillus* ในการบำบัดวัสดุเศษเหลือจากอุตสาหกรรมดังเช่น Kulkarni และ Rao (1996) ทดลองเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. NCIM59 เพื่อบำบัดกากชานอ้อย พบว่าที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เชื้อผลิตเอนไซม์มาบำบัดได้กว่าร้อยละ 50 ส่วน Shah และคณะ (1999) ทดลองเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. Sam-3 โดยใช้ wheat straw, wheat bran และ rice straw ในปริมาณร้อยละ 3 เลี้ยงเชื้อ พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อไปได้ 48 ชั่วโมง *Bacillus* sp. Sam-3 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดเท่ากับ 132 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในอาหารจาก wheat bran ส่วน Kaewchai และ Prasertsan (2002) ทำการแยกเชื้อที่มีความสามารถในการรวมตะกอนน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม พบว่าเชื้อ 3 สายพันธ์คือ SM29, WD90 และ SM38 สามารถรวมตะกอนและบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มได้ดีที่สุดและเมื่อทำการจำแนกสายพันธุ์พบว่าเชื้อ SM29 และ WD90 เทียบเคียงเป็น *Bacillus subtilis* ส่วนสายพันธุ์ SM38 จำแนกเป็น *Enterobacter agglomerans*

Gessesse และ Mamo (1999) เลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. AR-009 พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อในกลูโคสและซูโครส จะให้ปริมาณเอนไซม์ไซลาเนสมากถึงร้อยละ 78 และ 74 ตามลำดับ Sa-Pereira และคณะ (2002) รายงานผลการคัดแยกเชื้อ *Bacillus subtilis* จากบ่อน้ำพุร้อนพบว่าแบคทีเรียดังกล่าวสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้สูงสุดที่เวลาเลี้ยง 12 ชั่วโมง ในอาหารที่มีไซแลนจาก oat-spelt xylan เป็นแหล่งคาร์บอน มีกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสเท่ากับ 1.6 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เช่นเดียวกับ Heck และคณะ (2005) ที่เลี้ยงเชื้อ *Bacillus coagulans* BL69 โดยพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส ของเชื้อคือ 60 องศาเซลเซียส ส่วน Virupakshi และคณะ (2005) ทำการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. JB-99 เพื่อผลิตเอนไซม์ไซลาเนส พบว่าเชื้อผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้สูงสุดจากการเลี้ยงในอาหารที่มีไซโลสโดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสเท่ากับ

1045 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ส่วน Lee และคณะ (2008) ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างดินพบว่าสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส เมื่อทำการจำแนกสายพันธุ์ พบว่าเป็นเชื้อ *Bacillus amyloliquefaciens* ATCC 23350T (99.63%)

จิตรลดา กาญจนสาวิตรี และ ชญานุตม์ ศรีพิทักษ์ (2547) ทดลองใช้เชื้อ *Bacillus* sp. A2 ในการแยกน้ำมันออกจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มพบว่าเชื้อสามารถลดสารแขวนลอยและน้ำมันในตะกอนได้ถึงร้อยละ 38.28 และ 40.67 ตามลำดับ เช่นเดียวกับ ซีหยัะ จันทองและฮาราตี รอนิง (2548) ทดลองใช้เชื้อ *Bacillus* sp. A2 ในการแยกน้ำมันออกจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม พบว่าสามารถแยกน้ำมันออกจากตะกอนได้สูงสุดร้อยละ 32.83

สำหรับรายงานการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสโดย *Bacillus* แสดงดัง Table 5.

Table 5. Cellulase and xylanase production from *Bacillus* strians

Strains	**Enzyme**	**References**
Bacillus amyloliquefaciens	Xylanase	Breccia *et al.* (1997)
Bacillus sp. XE	Xylanase	Samain *et al.* (1997)
Bacillus sp.	Xylanase	Pham *et al.* (1998)
Bacillus sp.AR-009	Cellulase, xylanase	Gessesse and Mamo (1999)
Bacillus sp.SPS-0	Xylanase	Bataillon *et al.* (2000)
Bacillus circulans AB16	Xylanase	Dhillon *et al.* (2000)
Bacillus subtilis	Xylanase	Sa-Pereira *et al.* (2002)
Bacillus coagulans BL69	Xylanase	Heck *et al.* (2005)
Bacillus spp.	Cellulase	Mayende *et al.* (2006)
Bacillus pumilus	Cellulase, xylanase	Poorna and Prema (2006)
Bacillus pumilus ASH	Xylanase	Battan *et al.* (2007)
Bacillus pumilus MK001	Hemicellulase, cellulase	Kapoor *et al.* (2008)
Bacillus stearothermophilus SDX	Xylanase	Dhiman *et al.* (2008)
Bacillus subtilis	Cellulase	Li *et al.* (2009)
Bacilus licheniformis SVD1	Cellulasae, xylanase	Van Dyk *et al.* (2010)

วัตถุประสงค์การทดลอง

1. เพื่อศึกษาลักษณะและวิเคราะห์หาองค์ประกอบของน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม
2. เพื่อศึกษาการแยกและการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสจากดินบริเวณรอบบ่อรวบรวมน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม
3. เพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยแบคทีเรียที่คัดเลือกได้
4. เพื่อศึกษาการแยกสารแขวนลอยและน้ำมันออกจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยใช้เอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

ขอบเขตการวิจัย

ทำการวิเคราะห์หาองค์ประกอบของน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม, ทำการแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากดินบริเวณรอบบ่อรวบรวมน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม จากนั้นทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสโดยใช้แบคทีเรียที่สนใจ โดยศึกษาในปัจจัยต่าง ๆ คือ ผลของการเจือจางน้ำทิ้ง, การเติมซีเอ็มซี, ผลของแหล่งไนโตรเจน, ผลของอุณหภูมิ, ค่าพีเอช, ผลของการกวนและการให้อากาศ และทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารแขวนลอยและน้ำมันที่มีอยู่ในน้ำทิ้งโดยใช้เอนไซม์ที่ผ่านการหมุนเหวี่ยงแยกตัวเซลล์เปรียบเทียบกับชุดที่ไม่ทำการหมุนเหวี่ยงแยกตัวเซลล์ออก

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงองค์ประกอบของน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม
2. สามารถคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนส จากดินบริเวณรอบ ๆ บ่อรวบรวมน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มได้
3. ทราบสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสโดยแบคทีเรียที่คัดเลือกได้
4. สามารถใช้แบคทีเรียที่คัดเลือกมาแยกสารแขวนลอยและน้ำมันออกจากน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มได้

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

วัสดุ

1. สารเคมี

1.1 สารเคมีวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์

1.2 สารเคมีวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนส

1.3 สารเคมีวิเคราะห์โปรตีนในเซลล์ทั้งหมดและโปรตีนในน้ำทิ้ง

1.4 สารเคมีวิเคราะห์หาค่าซีโอดีในน้ำทิ้ง

1.5 อาหารเลี้ยงเชื้อซีเอ็มซี (CMC medium)

1.6 สารเคมีวิเคราะห์หาน้ำตาลทั้งหมด

1.7 สารเคมีวิเคราะห์น้ำมันในน้ำทิ้งและน้ำมันในตะกอน

1.8 สารเคมีวิเคราะห์ปริมาณเซลลูโลส

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อซีเอ็มซี พีเอช 7 ดังนี้

แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$)	0.3 กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปปะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.3 กรัม
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	1.0 กรัม
ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	1.0 กรัม
พอลีเปปโตน (polypeptone)	2.0 กรัม
ยีสต์สกัด (yeast extract)	1.0 กรัม
แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3)	4.4 กรัม
ซีเอ็มซี (CMC)	10.0 กรัม

เตรียมโดยละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเป็นเท่ากับ 7 ด้วยสารละลาย 1 นอร์มอลโซเดียมไฮดรอกไซด์ สำหรับการเตรียมเป็นอาหารแข็งให้เติมวุ้น 15.0 กรัมต่อลิตร ลงในอาหาร นำไปฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. แบคทีเรีย

ทำการแยกแบคทีเรียที่สนใจจากดินบริเวณรอบ ๆ บ่อรวบรวมน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม (บริษัทน้ำมันพืชบริสุทธิ์ จำกัด ตำบลบ้านพรุ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา) โดยทำการแยกในห้องปฏิบัติการของภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เก็บรักษาเชื้อในหลอดอาหารวุ้นเอียงซีเอ็มซีโดยเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 วันแล้วเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

อุปกรณ์

อุปกรณ์	รุ่น	ผู้ผลิต
เครื่อง Larminar air flow	รุ่น5227044	บริษัท Hotpack จำกัด
เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์	U-2000	บริษัท Hitachi จำกัด
เครื่องหมุนเหวี่ยง	Universal 32R	บริษัท Eppendorf จำกัด
เครื่องหมุนเหวี่ยง	5203	บริษัท Hitachi จำกัด
เครื่องระเหย (rotary evaporator)	SB-XL 651	บริษัท Tokyo Rikakikai จำกัด
ตู้อบ (hot air oven)	MOV 212	บริษัท Sanyo Electric จำกัด
ตู้บ่ม (Incubator)	BE 500	บริษัท Memmert จำกัด
หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave)	SS-325	บริษัท Tomy Seiko จำกัด
กล้องจุลทรรศน์	YS100	บริษัท Nikon Corporation จำกัด
เครื่องเหวี่ยงผสม (vortex mixer)	MS 1	บริษัท IKA-Works จำกัด
เครื่องวัดพีเอช (pH meter)	420A	บริษัท Orion Research จำกัด
อุปกรณ์ชุดสกัดไขมัน (soxhlet apparatus)	-	บริษัท Electrotermal จำกัด
Thermomixer	MBR-022up	บริษัท Taitec จำกัด
ชุดอุปกรณ์ถังหมักแบบ batch ขนาด 2 ลิตร	Brostat B(884032/6)	บริษัท บี. บราวน์ จำกัด
เครื่องเขย่า (shaker)	3500	บริษัท Lab-Line จำกัด
เครื่องอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)	W350	บริษัท Memmert จำกัด
เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง	HF-1200	บริษัท A&D จำกัด
เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง	BP 210 S	บริษัท Scientific Promotion จำกัด
โถดูดความชื้น (Desiccator)	-	-
ตัวกรองอากาศขนาด 0.2 μm	Midisart®2000	-

วิธีการวิเคราะห์

1. วิเคราะห์หาองค์ประกอบน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

1.1 ซีโอดี (APHA, AWWA and WPCF, 1992)

1.2 พีเอช วัดค่าพีเอชโดยใช้พีเอชมิเตอร์

1.3 อุณหภูมิ วัดอุณหภูมิโดยใช้เทอร์โมมิเตอร์

1.4 ของแข็งทั้งหมด (Total Solids) (APHA, AWWA and WPCF, 1992)

1.5 ของแข็งแขวนลอย (Suspended Solids) (APHA, AWWA and WPCF, 1992)

1.6 น้ำมันในน้ำทิ้ง (ดัดแปลงจาก A.O.A.C., 1990)

1.7 ปริมาณเซลลูโลส (A.O.A.C., 1990)

1.8 น้ำตาลทั้งหมด (Chaplin, 1986)

1.9 ไนโตรเจน (Kjeldahal Method, A.O.A.C., 1990)

1.10 เถ้า (A.O.A.C., 1990)

1.11 น้ำหนักแห้งของตะกอน (ดัดแปลงจาก A.O.A.C., 1990)

1.12 น้ำมันในตะกอน (ดัดแปลงจาก A.O.A.C., 1990)

2. วัดการเจริญของแบคทีเรีย

เมื่อครบกำหนดเวลาเลี้ยง นำอาหารเลี้ยงเชื้อหรือน้ำทิ้งที่มีการเจริญของแบคทีเรียมาวัดค่าการเจริญโดยการวัดค่าโปรตีนของเซลล์ทั้งหมด (Lowry, 1951) โดยการปั่นเหวี่ยงอาหารเลี้ยงเชื้อที่ ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำตะกอนเซลล์ที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงมาเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทของเหลวส่วนใสทิ้ง ทำการล้างเซลล์ 2 ครั้ง จากนั้นเติม 0.1 นอร์มอลโซเดียมไฮดรอกไซด์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิเป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้องและนำสารละลายที่ได้ไปหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีการของ Lowry (1951) ในภาคผนวก ข

3. กิจกรรมของเอนไซม์

3.1 กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูเลส (Carboxymethylcellulase activity)

เตรียมตัวอย่างโดยนำตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูเลส ไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที 15 นาที จากนั้นนำสารละลายส่วนใสไปวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูเลสโดยดัดแปลงตามวิธีการของ Mandels และ Weber (1969) โดยนำสารละลายที่เจือจางอย่างเหมาะสม 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับ 0.5 มิลลิลิตรของสารละลายคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส เข้มข้นร้อยละ 1 (Laohaprapanon, 2001) ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการต้มในน้ำเดือด 10 นาที จากนั้นหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นโดยวิธีดีเอ็นเอส (DNS; dinitrosalicylic acid) (Miller, 1959) (ภาคผนวก ข) ในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์จะมีชุดควบคุมเติมสารลายต่าง ๆ และเอนไซม์เช่นเดียวกับที่กล่าวมาแล้วและนำไปต้มในน้ำเดือดทันที สำหรับแบลงค์จะใช้บัฟเฟอร์แทนปริมาตรของเอนไซม์ในตัวอย่าง

กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) = CD/MtV

เมื่อ C คือ ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเทียบจากกราฟมาตรฐาน (ไมโครกรัม)

D คือ ค่าการเจือจางตัวอย่างของเอนไซม์

M คือ น้ำหนักโมเลกุลกลูโคส เท่ากับ 180 ไมโครกรัมต่อไมโครโมล

t คือ ระยะเวลาการบ่ม (นาที)

V คือ ปริมาตรเอนไซม์ (มิลลิลิตร)

1 ยูนิต หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาย่อยสลายสับสเตรตให้เป็นกลูโคส 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ทดลอง

3.2 กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส (xylanase activity)

เตรียมตัวอย่างเหมือนกับการวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูเลส จากนั้นใช้สารละลายส่วนใสไปวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสโดยดัดแปลงวิธีการของ Mandels และ Weber (1969) โดยนำสารละลายที่เจือจางอย่างเหมาะสม 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับ 0.5 มิลลิลิตรของสารละลาย oat spelt xylan เข้มข้นร้อยละ 1 ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอชเท่ากับ 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการต้มในน้ำเดือด 10 นาที จากนั้นหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นโดยวิธีดีเอ็นเอส (DNS; dinitrosalicylic acid) (Miller, 1959) ในการวิเคราะห์เตรียมชุดควบคุมและแบลงค์เช่นเดียวกับการหากิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูเลส

กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) = XD/MtV

เมื่อ X คือ ปริมาณน้ำตาลไซโลสเทียบจากกราฟมาตรฐาน (ไมโครกรัม)

D คือ ค่าการเจือจางตัวอย่างของเอนไซม์

M คือ น้ำหนักโมเลกุลไซโลส เท่ากับ 150.13 ไมโครกรัมต่อไมโครโมล

t คือ ระยะเวลาการบ่ม (นาที)

V คือ ปริมาตรเอนไซม์ (มิลลิลิตร)

1 ยูนิต หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาย่อยสลายสับสเตรตให้เป็นไซโลส 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ทดลอง

4. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ในแต่ละชุดการทดลองจะทำ 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแตกต่างของข้อมูลโดยใช้ One Way analysis of variance (ANOVA) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของข้อมูลด้วยโปรแกรม Duncan's multiple rang test โดยใช้โปรแกรม SPSS version 11.0 for Windows

วิธีการทดลอง

1. วิเคราะห์องค์ประกอบน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

สุ่มเก็บตัวอย่างน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มวัดอุณหภูมิทันทีโดยเทอร์โมมิเตอร์, วัดพีเอช, วิเคราะห์หาค่าซีโอดี, ปริมาณของแข็งทั้งหมด, ของแข็งแขวนลอย (APHA, AWWA and WPCF, 1992), น้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี Phenol sulfuric method (Chaplin, 1986), ไนโตรเจน, น้ำมันและกรีสและเถ้า (A.O.A.C., 1990) จากนั้นนำน้ำทิ้งมาหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที วิเคราะห์หาน้ำหนักแห้งของตะกอน, ปริมาณน้ำมันในตะกอนและปริมาณเซลลูโลส (A.O.A.C., 1990)

2. ศึกษาการแยกและคัดเลือกแบคทีเรียจากดินบริเวณรอบ ๆ บ่อรวบรวมน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

2.1 การคัดแยกแบคทีเรียจากดินบนอาหารแข็งซีเอ็มซี (CMC agar)

สุ่มเก็บตัวอย่างดินบริเวณรอบ ๆ บ่อรวบรวมน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มมาจุดละ 1 กรัม ผสมลงในน้ำเกลือเข้มข้นร้อยละ 0.85 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จากนั้นทำการเจือจางที่ความเข้มข้น 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5} และทำการเกลี่ยตัวอย่างที่เจือจางแล้ว 0.1 มิลลิลิตร บนจานอาหาร

แข็งซีเอ็มซี เกลี่ยให้ทั่ว บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ทำการเขี่ยเชื้อที่มีลักษณะโคโลนีเดี่ยวลงบนอาหารเดิมซ้ำจนได้เชื้อที่บริสุทธิ์ ทำการทดสอบการติดสีแกรมภายใต้กล้องจุลทรรศน์, ทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลสและทำการคัดเลือกเชื้อที่สนใจโดยตรวจหากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่เชื้อผลิตโดยวิธีการคองโกเรด (Congo red method) ตามวิธีการของ Teather และ Wood (1982) ทำการวัดความกว้างของเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่แบคทีเรียสร้างขึ้นซึ่งไม่ติดสีของคองโกเรด (Teather and Wood, 1982; Trivedi *et al*., 2011) คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีความกว้างของเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส ดีที่สุดไปทำการทดลองต่อไป และทำการเก็บแบคทีเรียที่บริสุทธิ์ที่ได้ไว้บนอาหารแข็งเอียงซีเอ็มซีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.2 การคัดเลือกแบคทีเรีย

2.2.1 การเตรียมเชื้อเริ่มต้น

นำแบคทีเรียในข้อ 2.1 จากหลอดอาหารวุ้นเอียงซีเอ็มซีมาเลี้ยงในอาหารเหลวซีเอ็มซี ปริมาตรเลี้ยง 50 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมงเพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในการทดลองต่อไป

2.2.2 การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสในอาหารเหลวซีเอ็มซี

นำเชื้อเริ่มต้นจากข้อ 2.2.1 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติมลงในฟลาสก์ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวซีเอ็มซี พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างจากทุกชุดทดลองที่เวลา 0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง ทำการวัดพีเอช วิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนส คัดเลือกชุดการทดลองที่ดีที่สุดเพื่อทำการทดลองต่อไป

2.2.3 การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสในอาหารที่เตรียมจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

นำแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสดีที่สุดจากข้อ 2.2.2 มาเตรียมเชื้อเริ่มต้นเหมือนกับข้อ 2.2.1 จากนั้นนำเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติมลงในฟลาสก์ที่มีอาหารที่เตรียมจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มต่อน้ำกลั่นเท่ากับ 1 ต่อ 4 โดยทำการเติมซีเอ็มซี, แคลเซียมคลอไรด์, แมกนีเซียมซัลเฟตเฮบปะไฮเดรต, โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต, ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต, พอลีเปปโตน, ยีสต์สกัดและแอมโมเนียมไนเตรตปริมาณ 10.0, 0.3, 0.3, 1.0, 1.0, 2.0, 1.0 และ 4.4 กรัมต่อลิตร ที่ปรับพีเอชเท่ากับ 7.0 ปริมาตรเลี้ยง 50 มิลลิลิตร เขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ทำการเก็บตัวอย่างจากทุกชุดทดลองที่เวลา 0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง ทำการวัดพีเอช, วัดการเจริญโดยการวัดค่าโปรตีนของเซลล์ทั้งหมด, วิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนส คัดเลือกเชื้อที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสดีที่สุดเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสโดยแบคทีเรียที่คัดเลือก

3.1 การเลี้ยงเชื้อในฟลาสก์

3.1.1 ผลของการเจือจางน้ำทิ้ง

ศึกษาการเจริญ การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ได้จากข้อ 2.2.3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ต่อน้ำกลั่นเท่ากับ 1 ต่อ 0, 1 ต่อ 1, 1 ต่อ 2, 1 ต่อ 3 และ 1 ต่อ 4 ที่เติมแคลเซียมคลอไรด์, แม็กนีเซียมซัลเฟตเฮปปะไฮเดรต, โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต, ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต, พอลีเปปโตน, ยีสต์สกัด, แอมโมเนียมไนเตรทและซีเอ็มซีปริมาณ 0.3, 0.3, 1.0, 1.0, 2.0, 1.0, 4.4 และ 10 กรัมต่อลิตร พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 ปริมาตรน้ำทิ้ง 50 มิลลิลิตร ปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างและวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 2.2.3

3.1.2 ผลของปริมาณซีเอ็มซีเริ่มต้น

เลี้ยงแบคทีเรียในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ที่ที่ได้จากข้อ 3.1.1 โดยเติมซีเอ็มซีปริมาณ 0, 5, 10, 15 และ 20 กรัมต่อลิตรตามลำดับ เก็บตัวอย่างและวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 2.2.3

3.1.3 ผลของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์

เลี้ยงเชื้อในน้ำทิ้งที่ได้ในข้อ 3.1.2 ที่เติมแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์จากพอลีเปปโตนและยีสต์สกัด (เป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่มีอยู่แล้วในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อซีเอ็มซี) เปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่เติมแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์คือแอมโมเนียมไนเตรทเพียงอย่างเดียวในปริมาณของไนโตรเจนจากแหล่งต่าง ๆ เท่ากับ 4.4 กรัมต่อลิตร เก็บตัวอย่างและวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 2.2.3

3.1.4 ผลของแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์

เลี้ยงแบคทีเรียในน้ำทิ้งที่ได้ในข้อ 3.1.3 โดยเติมเฉพาะแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์จากแอมโมเนียมซัลเฟต, โซเดียมไนเตรท, แอมโมเนียมไบคาร์บอเนต, แอมโมเนียมไดไฮโดรเจน-

ฟอสเฟตและแอมโมเนียมไนเตรทปริมาณ 7.30, 9.40, 8.70, 12.00 และ 4.40 กรัมต่อลิตรตามลำดับ เก็บตัวอย่างและวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 2.2.3

3.1.5 ผลของปริมาณแอมโมเนียมไนเตรท

เลี้ยงเชื้อในน้ำทิ้งที่ได้ในข้อ 3.1.4 เพื่อศึกษาผลของการเติมปริมาณของแอมโมเนียมไนเตรตโดยทำการเติมแอมโมเนียมไนเตรตที่ปริมาณ 0, 1.4, 2.4, 3.4 และ 4.4 กรัมต่อลิตรตามลำดับ เก็บตัวอย่างและวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 2.2.3

3.1.6 ศึกษาผลของอุณหภูมิ

เลี้ยงเชื้อในน้ำทิ้งภายใต้สภาวะที่ได้ในข้อ 3.1.5 โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง, อุณหภูมิ 37, 45, 55 และ 65 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างและวิเคราะห์เช่นเดียวกันกับข้อ 2.2.3

3.1.7 ผลของพีเอชเริ่มต้น

เลี้ยงเชื้อในน้ำทิ้งภายใต้สภาวะที่ได้จากข้อ 3.1.6 โดยปรับค่าพีเอชเริ่มต้นเป็น 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 และ 7.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์หรือสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 3 นอร์มอล เก็บตัวอย่างและวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 2.2.3

3.1.8 ผลของระยะเวลาต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ในสภาวะที่เหมาะสม

ใช้สภาวะที่ดีที่สุดจากข้อ 3.1.7 เพื่อศึกษาการเจริญและการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ที่สนใจ โดยเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 6, 9, 12, 18, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง วิเคราะห์เช่นเดียวกันกับข้อ 2.2.3

3.2 การเลี้ยงเชื้อในถังหมัก

3.2.1 ศึกษาผลของการกวน

เลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกในอาหารที่เตรียมจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยใช้สภาวะที่ได้จากข้อ 3.1.7 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ปริมาตรอาหาร 1 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิของถังหมักที่ 45 องศาเซลเซียสโดยใช้อัตราการกวนที่ 50, 100, 150, 200 และ 250 รอบต่อนาที โดยเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 6, 9, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง วิเคราะห์เช่นเดียวกันกับข้อ 2.2.3

3.2.2 ศึกษาผลของการให้อากาศ

เลี้ยงเชื้อในน้ำทิ้งสภาวะที่ได้จากข้อ 3.2.1 โดยใช้อัตราการให้อากาศ 1, 2 และ 3 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที เก็บตัวอย่างเช่นเดียวกับข้อ 3.2.1 และวิเคราะห์เช่นเดียวกันกับข้อ 2.2.3

4. ศึกษาการแยกน้ำมันออกจากน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยใช้แบคทีเรียที่คัดเลือกและเอนไซม์ที่ผลิตได้

4.1 ศึกษาเปรียบเทียบการแยกน้ำมันออกจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยแบคทีเรียที่คัดเลือก

เก็บเกี่ยวเอนไซม์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียจากน้ำทิ้งในสภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 3.1.8 โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ส่วน คือส่วนของอาหารที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 12 ชั่วโมง (ชุดที่ 1) ส่วนของเอนไซม์หยาบซึ่งเป็นสารละลายส่วนใสที่ได้จากการนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 12 ชั่วโมง มาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที (ชุดที่ 2) จากนั้นนำชุดการทดลองทั้งหมดปริมาณ 5 มิลลิลิตร เติมลงในน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 และผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 45 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างที่ 0, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างน้ำทิ้งมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ส่วนของส่วนใสนำมากรองผ่านกระดาษกรองที่เคลือบซีไลท์ ส่วนของตะกอนนำมาใส่ในถ้วยกระเบื้อง จากนั้นนำทั้งสองส่วนไปอบที่ตู้อบควบคุมอุณหภูมิที่ 105 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 8 ชั่วโมง นำมาทำให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักแห้งของตะกอนในถ้วยกระเบื้องเพื่อหาน้ำหนักแห้งของตะกอน จากนั้นนำทั้งสองส่วนไปหาปริมาณน้ำมันและกรีส (APHA, AWWA and WPCF, 1992) เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เติมน้ำกลั่นลงในน้ำทิ้งในปริมาณที่เท่ากัน และทำการบ่มที่สภาวะเดียวกัน คัดเลือกชุดการทดลองที่สามารถลดปริมาณน้ำมันในตะกอนดีที่สุดไปทำการทดลองต่อไป

4.2 ผลของพีเอช

เตรียมน้ำทิ้งที่ปลอดเชื้อให้มีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4.0, 5.0, 6.0 และ 7.0 โดยคัดเลือกชุดการทดลองที่สามารถลดปริมาณน้ำมันในตะกอนดีที่สุดจากข้อ 4.1 เลี้ยงเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ทำการทดลองและเก็บตัวอย่างเช่นเดียวกับข้อ 4.1

4.3 ผลของอุณหภูมิ

เตรียมน้ำทิ้งที่ปลอดเชื้อโดยปรับค่าพีเอชเท่ากับชุดการทดลองที่สามารถลดปริมาณน้ำมันในตะกอนดีที่สุดจากข้อ 4.2 บ่มที่อุณหภูมิ 37, 45 และ 55 องศาเซลเซียส โดยเลี้ยงเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ทำการทดลองและเก็บตัวอย่างเช่นเดียวกับข้อ 4.1

บทที่ 3

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. องค์ประกอบน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

ผลจากการวิเคราะห์ลักษณะของน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ทำการสุ่มเก็บจากบริษัทน้ำมันพืชบริสุทธิ์จำกัด พบว่าน้ำทิ้งที่ทำการทดลองมีอุณหภูมิที่สูง (63.73 องศาเซลเซียส) มีพีเอชของน้ำทิ้งเท่ากับ 4.32 มีค่าซีโอดี, ปริมาณของแข็งทั้งหมด, ของแข็งแขวนลอย, น้ำมันและกรีส, น้ำตาลทั้งหมด, ปริมาณไนโตรเจนและน้ำหนักแห้งของตะกอนเท่ากับ 157.06, 40.29, 29.85, 15.96, 4.74, 1.30 และ 35.97 กรัมต่อลิตรตามลำดับ มีปริมาณน้ำมันในตะกอนเท่ากับ 0.41 กรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของตะกอน และปริมาณเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบร้อยละ 27.02 (Table 6) โดยลักษณะของน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มนั้นพบว่าโดยทั่ว ๆ ไปแล้วจะมีอุณหภูมิในระหว่าง 48.00 – 90.00 องศาเซลเซียส (Bhatia *et al*., 2007; Laohaprapanon *et al*., 2007; Vijayaraghavan *et al*., 2007), พีเอช 3.50 – 5.20 (Lam and Lee, 2011; Vijayaraghavan and Ahmad, 2006; Wu *et al*., 2007; Yejian *et al*., 2008), มีค่าซีโอดีเท่ากับ 30.70 – 262.70 กรัมต่อลิตร (Ismail *et al*., 2010; Kaewchai and Prasertsan, 2002; Najafpour *et al*., 2005; Laohaprapanon *et al*., 2005), ปริมาณของแข็งทั้งหมด 10.50 – 71.90 กรัมต่อลิตร (Ahmad *et al*., 2003; Laohaprapanon, 2001; O-Thong *et al*., 2008; Pechsuth *et al*., 2001), ของแข็งแขวนลอย 5.00 - 55.61 กรัมต่อลิตร (Lam and Lee, 2011; Laohaprapanon, 2001; Yejian *et al*., 2008; Zinatizadeh *et al*., 2007), น้ำมันและกรีส 1.09 – 28.41 กรัมต่อลิตร (Laohaprapanon *et al*., 2007; Noparat, 2009; Udomsil and Prasertsan, 2009), ไนโตรเจน 0.18 – 1.40 กรัมต่อลิตร (Ahmad *et al*., 2005; Lam and Lee, 2011; O-Thong *et al*., 2008), มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบร้อยละ 15.47 – 46.77 (Piarpuzán *et al*., 2011; Khalid *et al*., 2008) และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด 6.86 – 8.55 กรัมต่อลิตร (Noparat, 2009) จากข้อมูลดังกล่าวจะเห็นได้ว่าลักษณะต่าง ๆ ของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ทำการสุ่มมาทดลองนั้นมีความแตกต่างกันซึ่งเกิดจากความแตกต่างกันในเรื่องของคุณภาพของวัตถุดิบ กระบวนการการผลิตน้ำมันปาล์มและช่วงเวลาของการเก็บตัวอย่างน้ำทิ้งมาทำการทดลอง จึงส่งผลให้ลักษณะต่าง ๆ ของน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มแตกต่างกันออกไป (Binmaeil, 2005)

Table 6. Characteristics of palm oil mill effluent (POME) from decanter.

Characteristics	This study
Temperature	63.73 ± 0.78
pH	4.32 ± 0.06
COD	157.06 ± 2.25
Total solids	40.29 ± 0.73
Suspended solids	29.85 ± 2.72
Ash	1.05 ± 0.33
Total sugars	4.74 ± 0.18
Nitrogen	1.30 ± 0.00
Oil and greases	15.96 ± 1.12
Sludge dry weight	35.97± 1.86
Oil in sludge	14.72 ± 0.85
Cellulose	27.02 ± 1.25

Note: All parameters in g/l except temperature (^{o}C), pH, oil in sludge (g/gw) cellulose (%)

2. ผลของการแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนส

2.1 ผลการคัดแยกแบคทีเรียจากดินบนอาหารแข็งซีเอ็มซี (CMC agar)

จากการสุ่มเก็บตัวอย่างดินจากบริเวณรอบบ่อรวบรวมน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มจำนวน 12 จุด เพื่อทำการแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหารแข็งซีเอ็มซี จากการทดลองพบว่าแยกเชื้อที่มีลักษณะเป็นโคโลนีเดี่ยวได้ทั้งสิ้น 84 โคโลนี จึงทำการตั้งชื่อเป็นสายพันธุ์ AH1 ถึง AH84 โดยเชื้อสายพันธุ์ AH1, AH3, AH4, AH5, AH6, AH10, AH11, AH19, AH26, AH30, AH31, AH34, AH43 และ AH48 มีลักษณะขอบของโคโลนีที่เรียบ ส่วนสายพันธุ์ที่เหลือมีลักษณะของขอบโคโลนีที่หยัก (Table 7 และ Table 8) เมื่อทำการทดสอบปฏิกิริยาคะตะเลสพบว่าทุกสายพันธุ์ให้ผลการทดสอบปฏิกิริยาคะตะเลสเป็นบวก เมื่อนำเชื้อที่ได้มาส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าเป็นเชื้อรูปแท่งและติดสีแกรมบวก มีการสร้างสปอร์ภายในตัวเซลล์ของแบคทีเรีย ทำการเลี้ยงเชื้อใหม่บนอาหารแข็งซีเอ็มซีและบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทำการคัดเลือกเชื้อที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหารแข็งซีเอ็มซีโดยสังเกตได้จากการสร้างวงใสบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ (Figure 7) ซึ่งหากเชื้อมีการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส จะพบบริเวณวงใสที่ไม่มีการติดสีแดงจากการ

Table 7. Characteristics of microoganisms isolated from soil samples around the wastewater ponds of the palm oil mill

Strains	Smooth (+)/ curl (-)	Bulge (+)/flat (-)	Filmy (+)/hard (-)	Opaque(+)/transparent (-)	Color
AH1	+	+	-	+	White
AH 2	-	-	-	-	Brown
AH 3	+	+	+	-	White
AH 4	+	+	+	-	White
AH 5	+	+	-	+	White
AH 6	+	+	-	+	White
AH 7	-	+	-	+	White
AH 8	-	+	-	+	White
AH 9	-	+	-	-	White
AH 10	+	+	-	+	White
AH 11	+	+	-	+	White
AH 12	-	+	-	-	White
AH 13	-	+	-	+	White
AH 14	-	+	-	+	White
AH 15	-	+	-	+	White
AH 16	ND	ND	ND	ND	ND
AH 17	-	+	-	+	White
AH 18	-	+	-	-	White
AH 19	+	+	-	-	Brown
AH 20	-	+	-	+	White
AH 21	-	+	-	+	White
AH 22	-	+	-	+	White
AH 23	-	-	-	-	Brown
AH 24	-	+	-	+	White
AH 25	-	+	-	-	White
AH 26	+	+	-	-	Brown
AH 27	-	-	-	-	Brown
AH 28	-	+	-	+	White
AH 29	-	+	-	+	White
AH 30	+	+	-	-	Brown
AH 31	+	+	-	-	Brown
AH 32	-	+	-	-	White

ND = not grown after resteak

Table 7. (cont.)

No.	Smooth (+)/ curl (-)	Bulge (+)/flat (-)	Filmy (+)/hard (-)	Opaque(+)/transparent (-)	Color
AH 33	-	-	-	-	Brown
AH 34	+	+	-	+	White
AH 35	-	+	-	+	White
AH 36	-	+	-	+	White
AH 37	ND	ND	ND	ND	ND
AH 38	ND	ND	ND	ND	ND
AH 39	ND	ND	ND	ND	ND
AH 40	ND	ND	ND	ND	ND
AH 41	-	+	-	+	White
AH 42	-	+	-	+	White
AH 43	+	+	-	-	Brown
AH 44	-	+	-	+	White
AH 45	-	+	-	+	White
AH 46	-	+	-	-	White
AH 47	-	+	-	+	White
AH 48	+	+	-	+	White
AH 49	-	-	-	-	Brown
AH 50	ND	ND	ND	ND	ND
AH 51	-	+	-	+	White
AH 52	-	+	-	+	White
AH 53	-	+	-	+	White
AH 54	-	+	-	+	White
AH 55	-	+	-	-	White
AH 56	-	+	-	+	White
AH 57	ND	ND	ND	ND	ND
AH 58	ND	ND	ND	ND	ND
AH 59	ND	ND	ND	ND	ND
AH 60	ND	ND	ND	ND	ND
AH 61	-	+	-	+	White
AH 62	-	+	-	+	White
AH63	-	+	-	+	White
AH64	-	+	-	+	White
AH65	-	+	-	+	White

ND = not growth after resteak

Table 7. (cont.)

Strains	Smooth (+)/ curl (-)	Bulge (+)/flat (-)	Filmy (+)/hard (-)	Opaque(+)/transparent (-)	Color
AH 66	-	+	-	+	White
AH 67	-	+	-	+	White
AH 68	-	+	-	-	White
AH 69	-	+	-	+	White
AH 70	-	+	-	+	White
AH 71	-	+	-	+	White
AH 72	-	+	-	+	White
AH 73	-	+	-	-	White
AH 74	-	+	-	-	White
AH 75	-	+	-	+	White
AH 76	-	+	-	+	White
AH 77	-	+	-	+	White
AH 78	-	+	-	+	White
AH 79	-	+	-	+	White
AH 80	-	+	-	+	White
AH 81	-	+	-	+	White
AH 82	-	+	-	+	White
AH 83	-	+	-	+	White
AH 84	-	+	-	+	White

Table 8. The morphology of microorganism separated from soil samples around palm oil mill pond.

Strains	Gram	Shape	Spore	Catalase test	Clear zone diameter (cm)
AH 1	+	rod	+	3+	1.2
AH 2	+	rod	+	3+	1.3
AH 3	+	rod	+	2+	0.3
AH 4	+	rod	+	2+	0.3
AH 5	+	rod	+	3+	1.1
AH 6	+	rod	+	3+	1.4
AH 7	+	rod	+	3+	2.6
AH 8	+	rod	+	3+	1.2

Table 8. (cont.)

Strains	Gram	Shape	Spore	Catalase test	Clear zone diameter (cm)
AH 9	+	rod	+	2+	0.8
AH 10	+	rod	+	3+	1.1
AH 11	+	rod	+	3+	1.2
AH 12	+	rod	+	2+	2.9
AH 13	+	rod	+	3+	1.0
AH 14	+	rod	+	3+	3.9
AH 15	+	rod	+	1+	0.3
AH 16	ND	ND	ND	ND	ND
AH 17	+	rod	+	3+	1.2
AH 18	+	rod	+	2+	1.3
AH 19	+	rod	+	3+	1.3
AH 20	+	rod	+	3+	1.3
AH 21	+	rod	+	3+	1.2
AH 22	+	rod	+	2+	2.8
AH 23	+	rod	+	2+	2.8
AH 24	+	rod	+	3+	1.2
AH25	+	rod	+	2+	1.2
AH26	+	Rod	+	3+	1.1
AH27	+	rod	+	1+	1.0
AH 28	+	rod	+	2+	1.1
AH 29	+	rod	+	2+	1.1
AH 30	+	rod	+	3+	1.0
AH 31	+	rod	+	3+	0.6
AH 32	+	rod	+	3+	1.3
AH 33	+	rod	+	3+	1.2
AH 34	+	rod	+	3+	0.7
AH 35	+	rod	+	3+	3.5
AH 36	+	rod	+	3+	3.2
AH 37	ND	ND	ND	ND	ND
AH 38	ND	ND	ND	ND	ND

ND = not growth after resteak

Table 8. (cont.)

Strains	Gram	Shape	Spore	Catalase test	Clear zone diameter (cm)
AH 39	ND	ND	ND	ND	ND
AH 40	ND	ND	ND	ND	ND
AH 41	+	rod	+	3+	1.0
AH 42	+	rod	+	3+	1.1
AH 43	+	rod	+	3+	1.1
AH 44	+	rod	+	3+	1.2
AH 45	+	rod	+	3+	1.5
AH 46	+	rod	+	3+	1.3
AH 47	+	rod	+	3+	1.3
AH 48	+	rod	+	3+	0.9
AH 49	+	rod	+	3+	2.9
AH 50	ND	ND	ND	ND	ND
AH 51	+	rod	+	3+	1.4
AH 52	+	rod	+	3+	1.2
AH 53	+	rod	+	2+	1.0
AH 54	+	rod	+	3+	1.2
AH 55	+	rod	+	2+	1.1
AH 56	+	rod	+	3+	2.9
AH 57	ND	ND	ND	ND	ND
AH 58	ND	ND	ND	ND	ND
AH 59	ND	ND	ND	ND	ND
AH 60	ND	ND	ND	ND	ND
AH 61	+	rod	+	2+	0.7
AH 62	+	rod	+	3+	1.7
AH 63	+	rod	+	1+	1.4

ND = not growth after resteak

Table 8.(cont.)

Strains	Gram	Shape	Spore	Catalase test	Clear zone diameter (cm)
AH 64	+	rod	+	3+	3.0
AH 65	+	rod	+	3+	0.7
AH 66	+	rod	+	3+	0.4
AH 67	+	rod	+	3+	1.1
AH 68	+	rod	+	3+	1.2
AH 69	+	rod	+	2+	0.6
AH 70	+	rod	+	2+	0.7
AH 71	+	rod	+	3+	1.3
AH 72	+	rod	+	3+	1.4
AH 73	+	rod	+	2+	3.2
AH 74	+	rod	+	3+	1.0
AH 75	+	rod	+	3+	1.2
AH 76	+	rod	+	2+	1.1
AH 77	+	rod	+	3+	1.3
AH 78	+	rod	+	3+	2.9
AH 79	+	rod	+	3+	1.0
AH 80	+	rod	+	3+	1.3
AH 81	+	rod	+	3+	1.2
AH 82	+	rod	+	1+	1.1
AH 83	+	rod	+	1+	1.2
AH 84	+	rod	+	3+	3.2

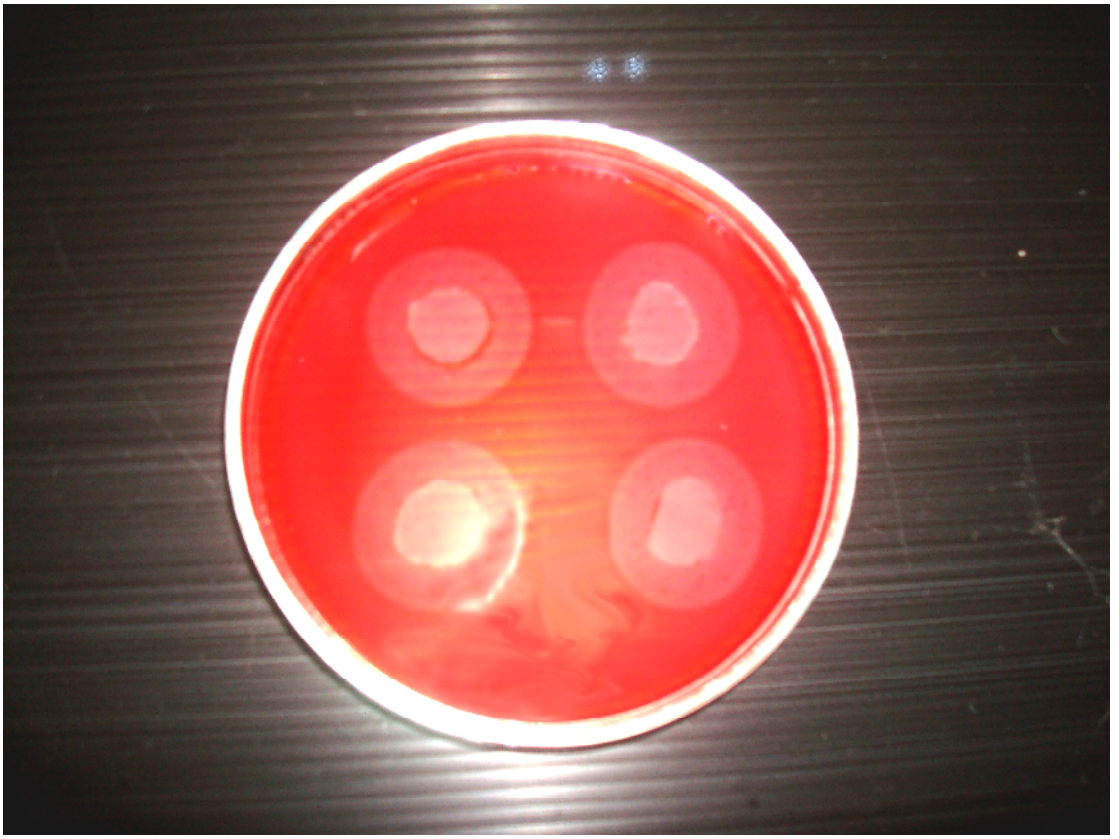


Figure 7. Screening for cellulase producing bacteria using a congo-red plate assay

ทดสอบโดยวิธีการคองโก้เรด (Congo red method) พบว่ามีแบคทีเรียเพียง 66 สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ (Figure 8) จึงทำการคัดเลือกเฉพาะเชื้อที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางความกว้างของเคลียร์โซนที่เชื้อสร้างบนอาหารแข็งซีเอ็มซีมากกว่า 2.5 เซนติเมตร เมื่อทำการศึกษาต่อพบว่ามีแบคทีเรีย 13 สายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติดังกล่าว คือ สายพันธุ์ AH7, AH12, AH14, AH22, AH23, AH35, AH36, AH49, AH56, AH64, AH73, AH78 และ AH84 ซึ่งแบคทีเรียทั้ง 13 สายพันธุ์มีลักษณะของโคโลนีที่แห้งและนูนยกเว้นสายพันธุ์ AH23 และ AH49 ที่มีลักษณะของโคโลนีที่แห้งและแบน จากการศึกษารูปร่าง, การติดสีแกรมบวก, การสร้างสปอร์และการผลิตเอนไซม์คะตะเลส สามารถกล่าวได้ว่าเชื้อที่สนใจทั้ง 13 สายพันธุ์เป็นเชื้อในสกุล *Bacillus* จึงนำเชื้อทั้ง 13 สายพันธุ์ที่ได้มาเลี้ยงในอาหารเหลวซีเอ็มซีเพื่อคัดเลือกเชื้อที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสดีที่สุดในอาหารดังกล่าวไปทดลองต่อไป

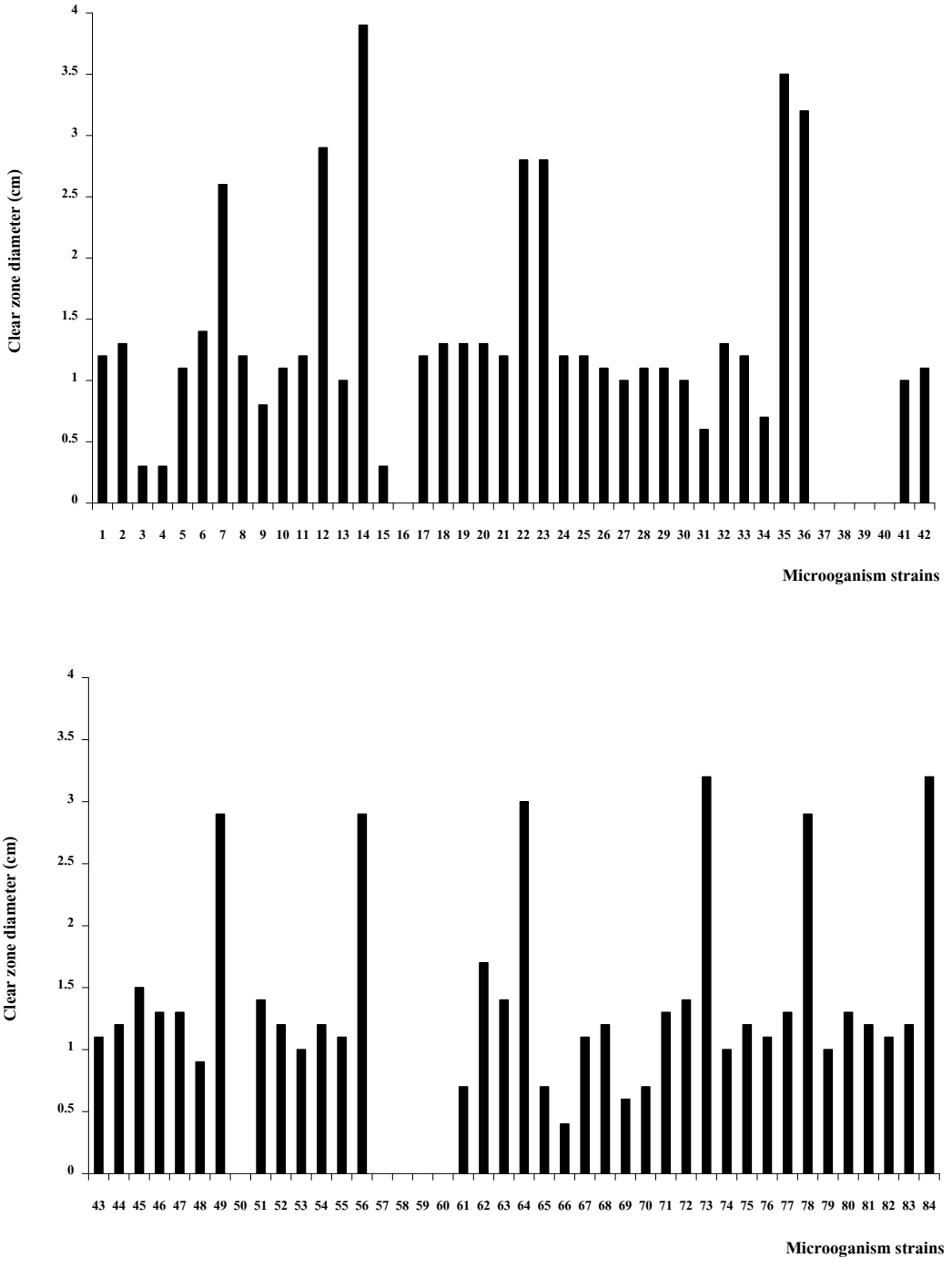


Figure 8. The clear zone diameter of 84 isolated microorganisms on CMC agar plate with 0.1% aqueous solution of congo red.

จากการทดลองวัดพีเอชของดินบริเวณที่เก็บตัวอย่างพบว่ามีค่าเท่ากับ 4.4 – 7.3 ซึ่งค่าที่ได้มีความแตกต่างกันเนื่องจากได้ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างดินจากหลากหลายบริเวณ โดยมี

ความห่างจากบ่อรวบรวมน้ำทิ้งโดยประมาณตั้งแต่ 0.50 – 5.00 เมตร ซึ่งอาจส่งผลต่อความสามารถในการเจริญของแบคทีเรียแต่ละชนิดที่แตกต่างกัน อีกทั้งการใช้ค่าพีเอชของอาหารแข็งซีเอ็มซีในการคัดแยกเท่ากับ 6.73 (ไม่ปรับพีเอช) จะส่งผลให้ได้แบคทีเรียสายพันธุ์ที่เจริญได้เฉพาะในสภาวะที่ใช้คัดแยกเท่านั้นที่มีความสามารถในการเจริญ นอกจากนี้เมื่อทำการวัดอุณหภูมิของดินบริเวณที่เก็บตัวอย่างพบว่ามีอุณหภูมิประมาณ 50 – 60 องศาเซลเซียส อุณหภูมิดังกล่าวนี้อาจส่งผลต่อการอยู่รอดของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในดินอีกทั้งอุณหภูมิที่ใช้คัดแยก (45 องศาเซลเซียส) นั้นอาจไม่เหมาะสมแก่การเจริญของแบคทีเรียบางสายพันธุ์ ทำให้คัดแยกปริมาณแบคทีเรียเพื่อใช้ในการทดลองในครั้งนี้ได้น้อย (84 ตัวอย่าง) สำหรับรายงานการคัดแยกเชื้อสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสนั้นแสดงใน Table 9

Table 9. Comparison of cellulase and xylanase producing strains from natural sources.

Organism	Sources	Enzyme	References
Aspergillus foetidus	Agricultural waste	Cellulase, xylanase	Shah and Madamwa (2005)
Bacillus sp. Sam-3	Soil	Xylanase	Shah *et al.* (1999)
Bacillus circulans AB16	Garbage dump	Xylanase	Dhillon *et al.* (2000)
Bacillus subtilis	Hot spring	Xylanase	Sa-Pereira *et al.* (2002)
Bacillus pumilus ASH	Soil	Xylanase	Battan *et al.* (2007)
Bacillus subtilis A-53	Seawater	Cellulase	Kim *et al.* (2009)
Bacillus pumilus AJK	Soil	Xylanase	Kaur *et al.* (2010)
Clostridium absonum CFR-702	Decomposed plant	Xylanase	Rani and Nand (2000)
Salinivibrio sp. NTU-05	Soil	Cellulase	Wang *et al.* (2009)
Streptomyces sp. AB106	Soil	Cellulase, xylanase	Techapun *et al.* (2002)
The isolate SO1, SO2 and SO3	Soil	Cellulase, xylanase	Laohaprapanon *et al.* (2007)

2.2 ผลของการคัดเลือกแบคทีเรีย

2.2.1 ผลของการคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสในอาหารเหลวซีเอ็มซี

ทำการเลี้ยงเชื้อทั้ง 13 สายพันธุ์ (AH7, AH12, AH14, AH22, AH23, AH35, AH36, AH49, AH56, AH64, AH73, AH78 และ AH84) ในอาหารเลี้ยงเชื้อซีเอ็มซีเหลวที่มีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็น

เวลา 12 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนส พบว่าเชื้อแบคทีเรียให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 0.17, 0.05, 0.73, 0.20, 0.27, 0.26, 0.43, 0.05, 0.14, 0.71, 0.73, 0.55 และ 0.34 ยูนิตต่อมิลลิลิตรตามลำดับและมีกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสเท่ากับ 0.45, 0.12, 1.24, 0.48, 0.57, 0.37, 0.73, 0.23, 0.41, 1.18, 1.21, 0.93 และ 0.68 ยูนิตต่อมิลลิลิตรตามลำดับ (Figure 9) โดยสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสมากที่สุดในอาหารที่ใช้ทดลองคือ สายพันธุ์ AH14, AH64 และ AH73 โดยทั้งสามสายพันธุ์มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสในอาหารเหลวซีเอ็มซีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ρ>0.05)

จากการทดลองพบว่าแบคทีเรียที่สนใจทั้ง 13 สายพันธุ์มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้แม้ว่าเลี้ยงในอาหารที่มีซีเอ็มซีเป็นสารตั้งต้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสเป็นเอนไซม์ที่มักจะสร้างออกมาพร้อมกัน เมื่อแบคทีเรียมีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสออกมาย่อยสับสเตรตจึงทำให้มีการสร้างเอนไซม์ไซลาเนสออกมาด้วย โดยแบคทีเรียที่คัดเลือกได้เป็น *Bacillus* ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสในอาหารเหลวซีเอ็มซีเช่นเดียวกับ *Bacillus* sp., *Bacillus circulans*, *Bacillus stearothermophilus* T-6 และเชื้อ *Bacillus* SSS-34 (Subramaniyan and Prema, 2000)

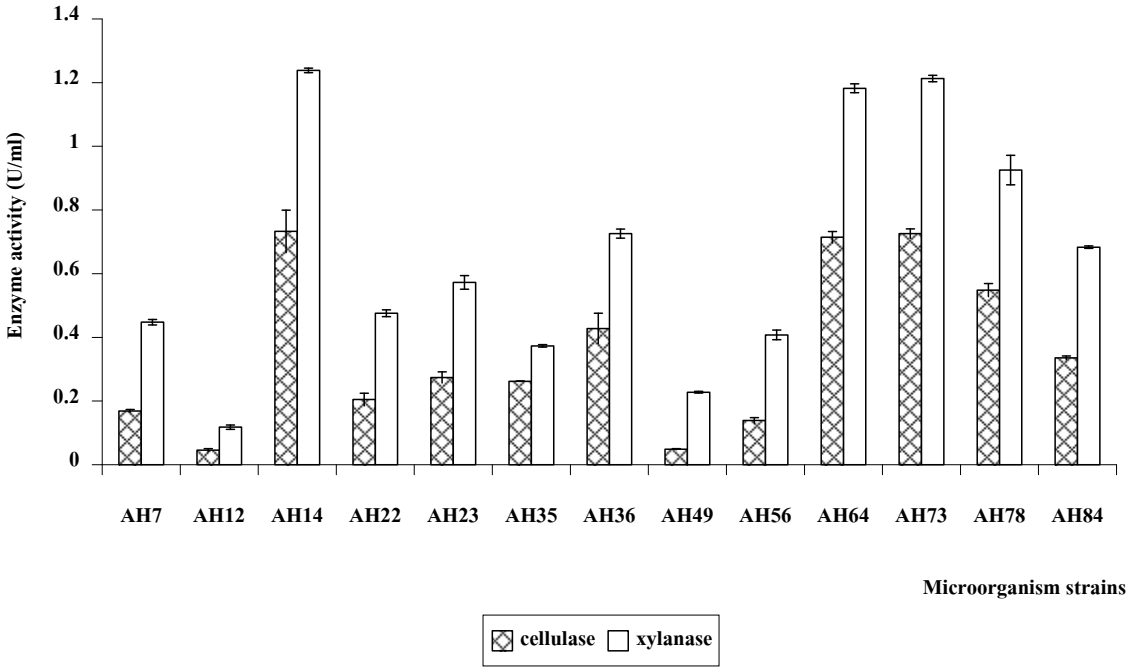


Figure 9. Cellulase and xylanase activities of isolated *Bacillus* strains in CMC broth after 12 h cultivation at 200 rpm and 45^{o}C.

2.2.2 ผลของการคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

จากการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ AH14, AH64 และ AH73 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มต่อน้ำกลั่นเท่ากับ 1 ต่อ 4 พบว่ามีค่าการเจริญ (ค่าโปรตีนในเซลล์ทั้งหมด) และโปรตีนในส่วนใสสูงสุดเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อที่ 12 ชั่วโมง มีค่าโปรตีนในเซลล์ของเชื้อสายพันธุ์ AH14, AH64 และ AH73 เท่ากับ 0.08, 0.12 และ 0.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับและมีปริมาณโปรตีนในส่วนใสของอาหารเลี้ยงเท่ากับ 1.38, 1.66 และ 1.65 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ (Figure 10a) จากการวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสในส่วนใสพบว่าเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุดในชั่วโมงที่ 12 และลดลงเมื่อทำการเลี้ยงต่อไป โดยเชื้อสายพันธุ์ AH14, AH64 และ AH73 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 0.44, 0.47 และ 0.55 ยูนิตต่อมิลลิลิตรตามลำดับและมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสเท่ากับ 0.25, 0.32 และ 0.37 ยูนิตต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ซึ่งพบว่าสายพันธ์ AH73 เป็นสายพันธุ์ที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสดีกว่าสายพันธุ์ AH14 และสายพันธุ์ AH64 อย่างมีนัยสำคัญ (Figure 10b) จากการทดลองเมื่อทำการเปรียบเทียบชุดการทดลองที่ทำการเลี้ยงเชื้อทั้งสามสายพันธุ์ในอาหารเหลวซีเอ็มซี (Figure 9) กับชุดการทดลองที่เลี้ยงเชื้อในอาหารที่เตรียมจากน้ำทิ้ง (Figure 10) พบว่าการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสนั้นแตกต่างกัน โดยเชื้อทั้งสามสายพันธุ์ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสได้ดีในอาหารเหลวซีเอ็มซีทั้งนี้เพราะอาหารซีเอ็มซีเป็นอาหารสังเคราะห์สูตรมาตรฐานที่มีความเหมาะสมต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์ของแบคทีเรียอยู่แล้ว แตกต่างจากอาหารที่ทำการเตรียมจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มซึ่งในน้ำทิ้งอาจจะมีสารประกอบบางอย่างที่อาจส่งผลยับยั้งต่อการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสที่แบคทีเรียทั้งสามผลิต

อย่างไรก็ตามพบว่าเชื้อสายพันธุ์ AH73 ให้กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสดีที่สุดและจากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยสังเกตลักษณะของสีผิวหน้าและขอบของโคโลนีบนอาหารแข็งซีเอ็มซี หลังจากบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และสังเกตรูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า พบว่าแบคทีเรียดังกล่าวมีลักษณะโคโลนีสีขาวขุ่น กลม นูน ขอบหยัก หน้าด้าน มีขนาดใหญ่ ลักษณะเซลล์เป็นรูปแท่ง ย้อมแกรมติดน้ำเงินซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีสปอร์ ทดสอบแคตาเลสให้ผลบวก จากการเทียบเคียงสายพันธุ์ด้วยวิธี 16S rDNA โดยส่งวิเคราะห์ผลที่คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ AH73 นี้เทียบเคียงสายพันธุ์เป็น *Bacillus subtilis* ร้อยละ 100 (ภาคผนวก ค) จึงคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์ AH73 เพื่อใช้ในการทดลองต่อไปและเรียกแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ว่า *Bacillus subtilis* AH73

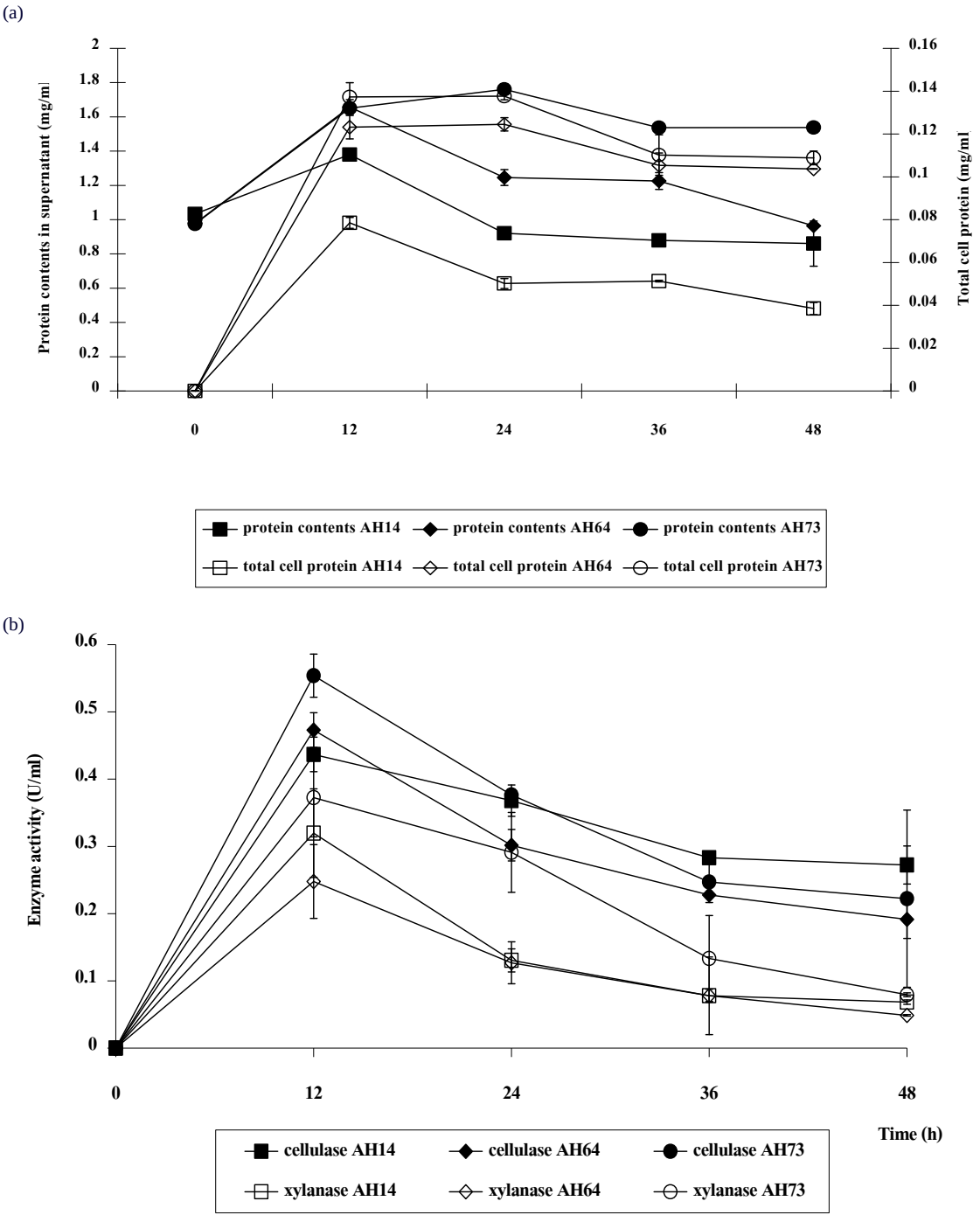


Figure 10. Time courses of cellulase and xylanase productions by *Bacillus* sp. AH14, AH64 and AH73 in the POME medium at 200 rpm. and 45^{o}C (a: supernatant protein and total cell protein and b: cellulase and xylanase activities)

สำหรับการคัดแยกเชื้อที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสนั้น นอกจากการคัดแยกจากตัวอย่างดินแล้ว ยังสามารถแยกได้จากตัวอย่างน้ำ, กองขยะ และซากพืช (Dhillon *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2009; Rani and Nand, 2000) พบว่านอกจากแบคทีเรีย *Bacillus* แล้วยังพบการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสใน *Streptomyces* sp. AB106 (Techapun *et al*., 2002), *Aspergillus foetidus* (Shah and Madamwa, 2005), *Salinivibrio* sp. NTU-05 (Wang *et al*., 2009), *Clostridium absonum* CFR-702 (Rani and Nand, 2000) อีกด้วย

3. ผลการเจริญและการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 ในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

3.1 การเลี้ยงเชื้อในฟลาสก์

3.1.1 ผลของการเจือจางน้ำทิ้ง

จากการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 ในอาหารที่เตรียมจากน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ต่อน้ำกลั่นเท่ากับ 1 ต่อ 0, 1 ต่อ 1, 1 ต่อ 2, 1 ต่อ 3 และ 1 ต่อ 4 โดยเติมแคลเซียมคลอไรด์, แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต, โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต, ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต, พอลีเปปโตน, ยีสต์สกัด, แอมโมเนียมไนเตรทและซีเอ็มซีปริมาณ 0.3, 0.3, 1.0, 1.0, 2.0, 1.0, 4.4 และ 10 กรัมต่อลิตร พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 ปริมาตรน้ำทิ้ง 50 มิลลิลิตร ปริมาณเชื้อเริ่มต้น ร้อยละ 10 เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสที่เชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 ผลิตนั้นมีค่าลดลงเมื่อทำการเจือจางน้ำทิ้งกับน้ำกลั่นมากขึ้น เชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 เจริญและผลิตเอนไซม์ได้มากที่สุดในอาหารที่เตรียมจากน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ที่ไม่ทำการเจือจาง โดยมีการเจริญของเซลล์เป็น 0.22 มิลลิกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร และมีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสเท่ากับ 0.69 และ 0.69 ยูนิตต่อมิลลิลิตรตามลำดับ (Figure 11) จากการทดลองพบว่าเมื่อทำการเจือจางน้ำทิ้งกับน้ำกลั่น การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสจะมีค่าลดลงโดยเอนไซม์เซลลูเลสมีกิจกรรม 0.67, 0.63, 0.59 และ 0.54 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และเอนไซม์ไซลาเนสมีกิจกรรมเท่ากับ 0.62, 0.55, 0.45, 0.36 ยูนิตต่อมิลลิลิตรเมื่อทำการเจือจางน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ต่อน้ำกลั่นเป็น 1 ต่อ 1, 1 ต่อ 2, 1 ต่อ 3 และ 1 ต่อ 4 ตามลำดับ ทั้งนี้ในน้ำทิ้งที่ไม่ทำการเจือจางอาจจะมีความเข้มข้นของสารอินทรีย์และสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของแบคทีเรีย ซึ่งมีอยู่ในน้ำทิ้งในปริมาณที่มากกว่าซึ่งสารเหล่านั้นอาจจะส่งเสริมให้การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 มีมากขึ้น

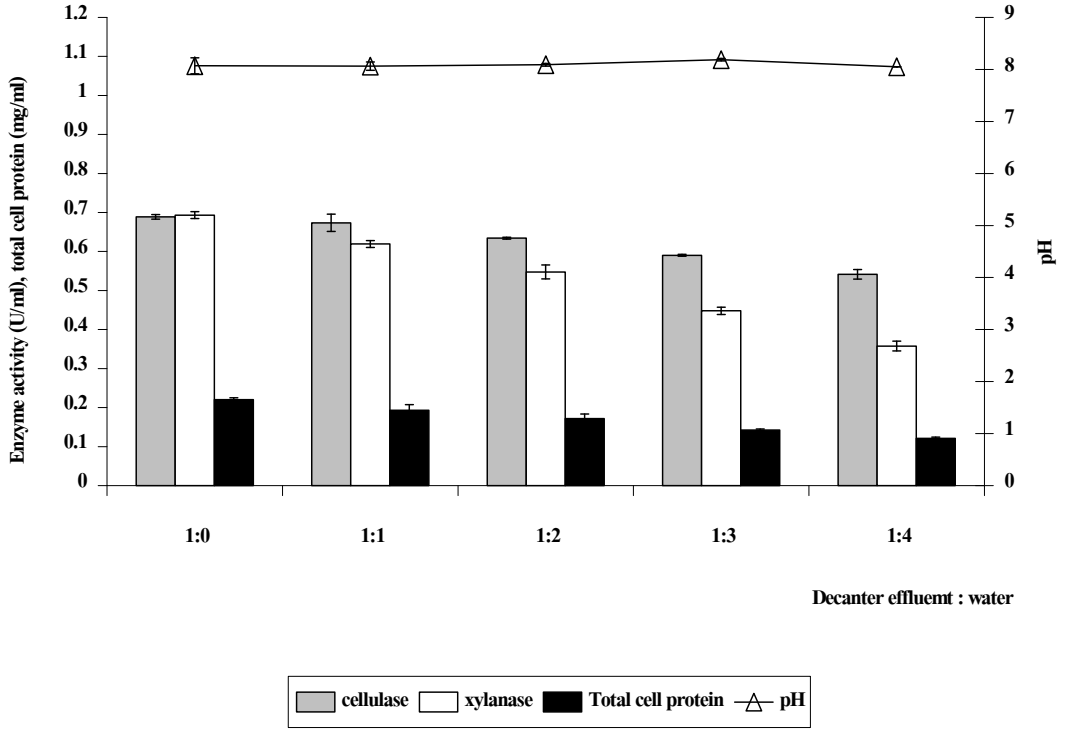


Figure 11. Effect of dilution of decanter effluent to water on cellulase and xylanase productions by *Bacillus subtilis* AH73 after cultivation at 200 rpm and 45°C for 12 h.

3.1.2 ผลของปริมาณซีเอ็มซีเริ่มต้น

จากการนำเชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 มาเลี้ยงในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ที่ไม่เจือจางปริมาตร 50 มิลลิลิตร ทำการเติมซีเอ็มซีปริมาณ 0, 5, 10, 15 และ 20 กรัมต่อลิตรตามลำดับ โดยเติมธาตุอาหารต่าง ๆ และใช้สภาพการเลี้ยงเช่นเดียวกับข้อ 3.1.1 เป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบว่าเชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 มีการเจริญและผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสได้เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณซีเอ็มซีมากขึ้น จากการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์พบว่ามีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 0.55, 0.62, 0.69, 0.75 และ 0.76 ยูนิตต่อมิลลิลิตรตามลำดับ มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสเท่ากับ 0.52, 0.63, 0.70, 0.75 และ 0.69 ยูนิตต่อมิลลิลิตรตามลำดับ (Figure 12) พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสที่เชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 ผลิตนั้นมีค่าสูงสุดเมื่อเติมซีเอ็มซี 15 กรัมต่อลิตร จากการทดลองพบว่า *Bacillus subtilis* AH73 สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสได้ทั้งชุดการทดลองที่เติมและไม่เติมซีเอ็มซี ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในน้ำทิ้งมีสารประกอบประเภทเฮมิเซลลูโลสจากปาล์มน้ำมันอยู่แล้วจึงทำให้เชื้อแบคทีเรียสามารถผลิตเอนไซม์ทั้งสองออกมาได้ แต่ทั้งนี้กิจกรรมของเอนไซม์ที่

เชื้อผลิตนั้นมีกิจกรรมที่น้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่มีการเติมซีเอ็มซี พบว่าการเติมซีเอ็มซีลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อจะเป็นการกระตุ้นให้เชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสได้มากกว่าชุดการทดลองที่ไม่ทำการเติมซีเอ็มซี มีรายงานการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยใช้ซีเอ็มซีเป็นสารตั้งต้นในเชื้อ *Bacillus circulans* (Kim and Kim, 1995), *Bacillus polymyxa* (Pham *et al.*, 1998), *Bacillus hadodurans* S7 (Mamo *et al.*, 2006), *Bacillus* spp. (Mayende *et al.*, 2006), *Bacillus pumilus* MK001 (Kapoor *et al.*, 2008), *Bacillus subtilis* (Li *et al.*, 2009), *Bacillus subtilis* A-53 (Kim *et al.*, 2009) และ *Bacilus licheniformis* SVD1 (Van Dyk *et al.*, 2009) เป็นต้น

จากการทดลองพบว่าการเติมซีเอ็มซีร้อยละ 1.5 นั้น เชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับชุดการทดลองอื่น (ρ<0.05) สำหรับเอนไซม์เซลลูเลสนั้นเชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 ให้กิจกรรมไม่แตกต่างกับชุดการทดลองที่เติมซีเอ็มซีร้อยละ 2.0 แต่แตกต่างกับชุดการทดลองอื่น ซึ่งการเติมปริมาณซีเอ็มซีร้อยละ 2 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นไม่ส่งผลให้การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสมีค่าเพิ่มขึ้น อาจเนื่องมาจากปริมาณของซีเอ็มซีที่เพิ่มขึ้นนี้จะไปลดการละลายได้ของออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Leartslarus *et al*., 2002) ซึ่งส่งผลให้แบคทีเรียเจริญได้ช้าลงและมีการผลิตเอนไซม์ออกมาได้ไม่ดีและน้อยลง (Lee *et at*., 2008) เช่นเดียวกับรายงานของ Prasertsan และคณะ (1992) ที่ว่าการเพิ่มปริมาณซีเอ็มซีมากเกินไปจะส่งผลให้เชื้อสายพันธุ์ F11 ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสลดลง

แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ แต่ละชนิดนั้นแตกต่างกัน โดยแหล่งคาร์บอนจากแหล่งหนึ่งอาจจะให้การเจริญของเชื้อดีแต่อาจจะให้กิจกรรมของเอนไซม์ที่ไม่ดี Kim และคณะ (2009) กล่าวว่าซีเอ็มซีจะเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* A-53 สำหรับเชื้อ *Bacillus pumilus* EB3 นั้นซีเอ็มซีจะส่งเสริมการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีกว่าผงเซลลูโลสและทะลายปาล์มเปล่า (Ariffin *et al*., 2008) ส่วน Leartslarus และคณะ (2002) กล่าวว่าการเพิ่มแหล่งคาร์บอนจะส่งผลให้การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อ *Bacillus firmus* K-1 ในอาหารเหลวเพิ่มขึ้น โดยเปลือกข้าวโพดร้อยละ 1 จะเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส ต่างจากผลการทดลอง Shah และคณะ (1999) ที่พบว่าแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อ *Bacillus* sp. *Sam-3* คือ wheat bran ร้อยละ 3 และการเพิ่มแหล่งคาร์บอนจะทำให้เชื้อผลิตเอนไซม์ได้มากขึ้น ส่วน Battan และคณะ (2007) กล่าวว่า *Bacillus pumilus* ASH จะผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ดีเมื่อเลี้ยงในแหล่งคาร์บอนจาก wheat bran ร้อยละ 2

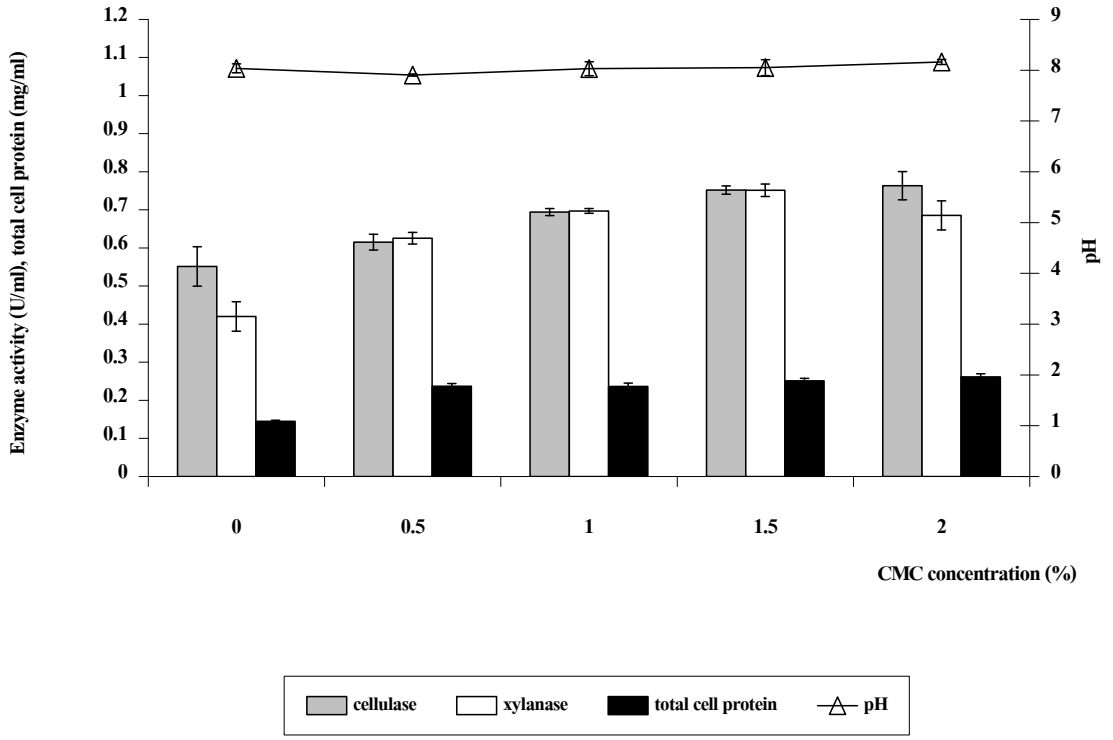


Figure 12. Effect of CMC on cellulase and xylanase productions by *Bacillus subtilis* AH73 after cultivation at 200 rpm and 45°C for 12 h.

3.1.3 ผลของการเติมพอลีเปปโตน ยีสต์สกัดและแอมโมเนียมไนเตรท

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 ในอาหารที่เตรียมจากน้ำทิ้งดีแคนเตอร์ที่ไม่เจือจาง โดยเติมพอลีเปปโตน, ยีสต์สกัดหรือแอมโมเนียมไนเตรทปริมาณ 4.4 กรัมต่อลิตรและเลี้ยงเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เติมแหล่งไนโตรเจนเหมือนชุดอาหารเลี้ยงเชื้อซีเอ็มซี (พอลีเปปโตน ยีสต์สกัดและแอมโมเนียมไนเตรทปริมาณ 2.0, 1.0 และ 4.4 กรัมต่อลิตรตามลำดับ) พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากการทดลองพบว่าในชุดการทดลองที่เติมพอลีเปปโตน, ยีสต์สกัดหรือแอมโมเนียมไนเตรทนั้นเชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 มีการเจริญไม่แตกต่างกันกับชุดควบคุม (ρ>0.05) (Figure 13) จากการทดลองพบว่าเชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 สามารถเจริญได้โดยใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์และแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ แต่พบว่าแบคทีเรียเจริญเติบโตได้ดีในแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์จากพอลีเปปโตน

สำหรับการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 นั้นพบว่าการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสจะผลิตได้ดีเมื่อทำการเลี้ยงใน

แหล่งไนโตรเจนจากพอลีเปบโตน, ยีสต์สกัด, แอมโมเนียมไนเตรทและไนโตรเจนจากทั้งสามแหล่งตามลำดับ มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 0.82, 0.82, 0.79 และ 0.76 ยูนิตต่อมิลลิลิตรตามลำดับ และมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสเท่ากับ 0.93, 0.90, 0.83 และ 0.77 ยูนิตต่อมิลลิลิตรตามลำดับ จากการทดลองพบว่าเมื่อ *Bacillus subtilis* AH73 เจริญในอาหารที่เตรียมจากน้ำทิ้งดีแคนเตอร์ที่มียีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนจะให้กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสดีที่สุดสอดคล้องกับรายงานของเชื้อ *Bacillus pumulus* MK001 (Kapoor *et al.*, 2008) และ *Bacillus subtilis* A-53 (Lee *et al.*, 2010)แต่ Ariffin และคณะ (2008) กล่าวว่าการเติมยีสต์สกัดลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อไม่ส่งเสริมให้เชื้อ *Bacillus pumilus* EB3 ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเพิ่มขึ้น ส่วน Shah และคณะ (1999) รายงานว่าแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อ *Bacillus* sp. SAM-3 คือแหล่งไนโตรเจนจากกากถั่วเหลือง ส่วน Dhillon และคณะ (2000) กล่าวว่าเชื้อ *Bacillus circulans* AB16 จะผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ดีในอาหารที่ใช้แหล่งไนโตรเจนจากทริปโตน

จากการทดลองพบว่าเชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 สามารถเจริญในทุกชุดการทดลองไม่แตกต่างกัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากมีปริมาณไนโตรเจนที่เพียงพอต่อการเจริญของแบคทีเรีย แต่สำหรับการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสนั้น พบว่าในชุดการทดลองที่มีการใช้แหล่งไนโตรเจนทั้งสามชนิดซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์และอินทรีย์ร่วมกันมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ไนโตรเจนเพียงชนิดเดียว ทั้งนี้ปริมาณของไนโตรเจนของชุดการทดลองที่เติมแหล่งไนโตรเจนจากทั้งสามชนิดนั้นอาจมีปริมาณของไนโตรเจนที่มากเกินไปจึงไม่ส่งเสริมการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 อย่างไรก็ตาม Battan และคณะ (2007) พบว่าการเติมแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์จากพอลีเปบโตนและยีสต์สกัดร่วมกับแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์คือ โพแตสเซียมไนเตรทส่งเสริมให้การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อ *Bacillus pumilus* ASH มากขึ้น

ชุดการทดลองที่เติมแหล่งไนโตรเจนจากแอมโมเนียมไนเตรทนั้นแม้จะมีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสต่ำกว่าชุดการทดลองที่เติมแหล่งไนโตรเจนจากยีสต์สกัดและพอลีเปบโตน (0.79 และ 0.83 ยูนิตต่อมิลลิลิตรตามลำดับ) แต่เมื่อทำการเปรียบเทียบราคาของแหล่งไนโตรเจนที่เติมพบว่าในชุดที่เติมแหล่งไนโตรเจนจากแอมโมเนียมไนเตรทจะมีต้นทุนในการทดลองต่ำที่สุด เพื่อเป็นการลดต้นทุนจึงเลือกใช้แหล่งไนโตรเจนจากแอมโมเนียมไนเตรทไปทำการทดลองต่อไป

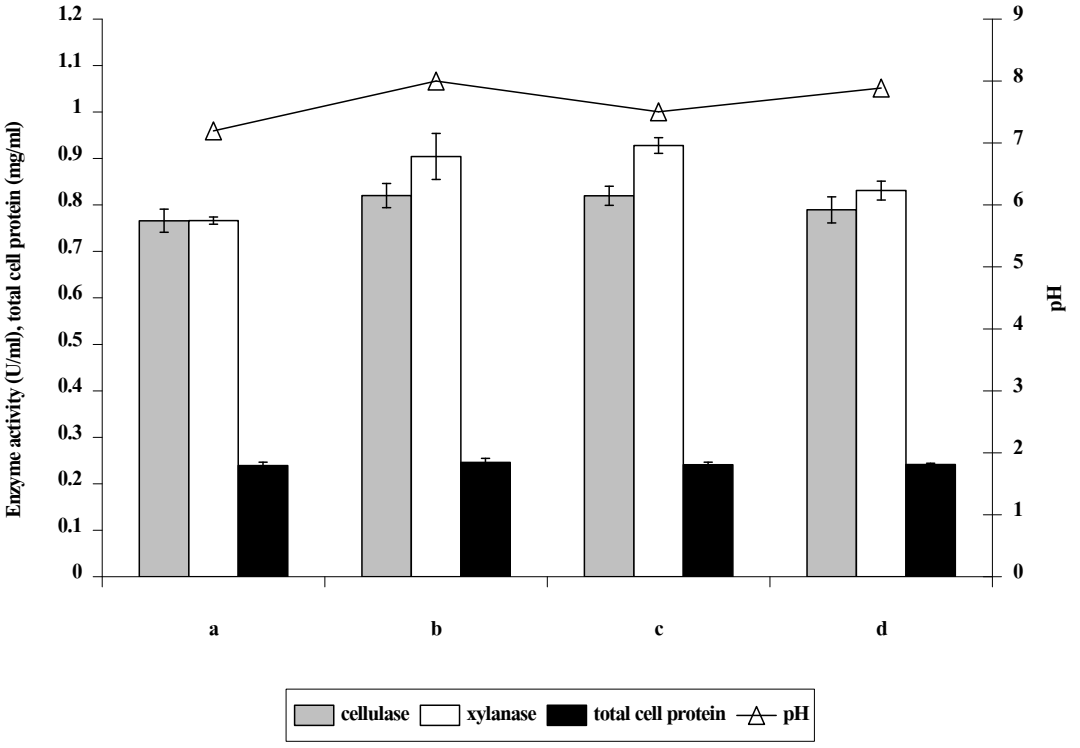


Figure 13. Effect of nitrogen sources on cellulase and xylanase productions by *Bacillus subtilis* AH73 cultivation at 200 rpm. and 45^{o}C for 12 h. (a: polypeptone + yeast extract + ammonium nitrate; control, b: polypeptone, c: yeast extract and d: ammonium nitrate)

3.1.4 ผลของการคัดเลือกแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์

เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* AH73ในอาหารที่เตรียมจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ไม่เจือจาง เติมแคลเซียมคลอไรด์, แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปปะไฮเดรต, โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต, ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตและซีเอ็มซี 0.3, 0.3, 1.0, 1.0 และ 15 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ทำการทดลองโดยเติมแหล่งไนโตรเจนจากแอมโมเนียมซัลเฟต, โซเดียมไนเตรท, แอมโมเนียมไบคาร์บอเนต, แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตและแอมโมเนียมไนเตรทปริมาณ 7.30, 9.40, 8.70, 12.00 และ 4.40 กรัมต่อลิตรตามลำดับ (เติมแหล่งไนโตรเจนโดยคำนวณจากปริมาณของไนโตรเจนที่เป็นองค์ประกอบในแหล่งไนโตรเจนนั้น โดยเปรียบเทียบกับไนโตรเจนที่มีอยู่ในแอมโมเนียมไนเตรทซึ่งมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบอยู่ร้อยละ 35) จากการทดลองพบว่า เชื้อเจริญได้ดีในชุดการทดลองที่เติมแหล่งไนโตรเจนจากแอมโมเนียมซัลเฟตและแอมโมเนียมไนเตรท มีค่าการเจริญโดยวัดจากโปรตีนภายในเซลล์เท่ากับ 0.26 มิลลิกรัม

ต่อมิลลิลิตร ซึ่งดีกว่าชุดการทดลองที่ใช้แหล่งไนโตรเจนจากโซเดียมไนเตรท, แอมโมเนียมไบคาร์บอเนตและแอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตที่มีค่าการเจริญเพียง 0.12, 0.11 และ 0.10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ (ρ<0.05) จากการทดลองพบว่าเชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสได้ดีในชุดการทดลองที่เติมแอมโมเนียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสเท่ากับ 0.79 และ 0.77 ยูนิตต่อมิลลิลิตรตามลำดับ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับชุดการทดลองอื่น (Figure 14) พบว่าเอนไซม์จากเชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 ที่เลี้ยงในอาหารที่เติมแหล่งไนโตรเจนจากแอมโมเนียมซัลเฟต, โซเดียมไนเตรท, แอมโมเนียมไบคาร์บอเนตและแอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตมีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 0.61, 0.51, 0.40 และ 0.28 ยูนิตต่อมิลลิลิตรตามลำดับ และมีกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสเท่ากับ 0.69, 0.10, 0.01 และ 0.00 ยูนิตต่อมิลลิลิตรตามลำดับสำหรับชุดที่เติมแหล่งไนโตรเจนจากแอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตไม่ส่งเสริมการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสในเชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 อีกด้วย

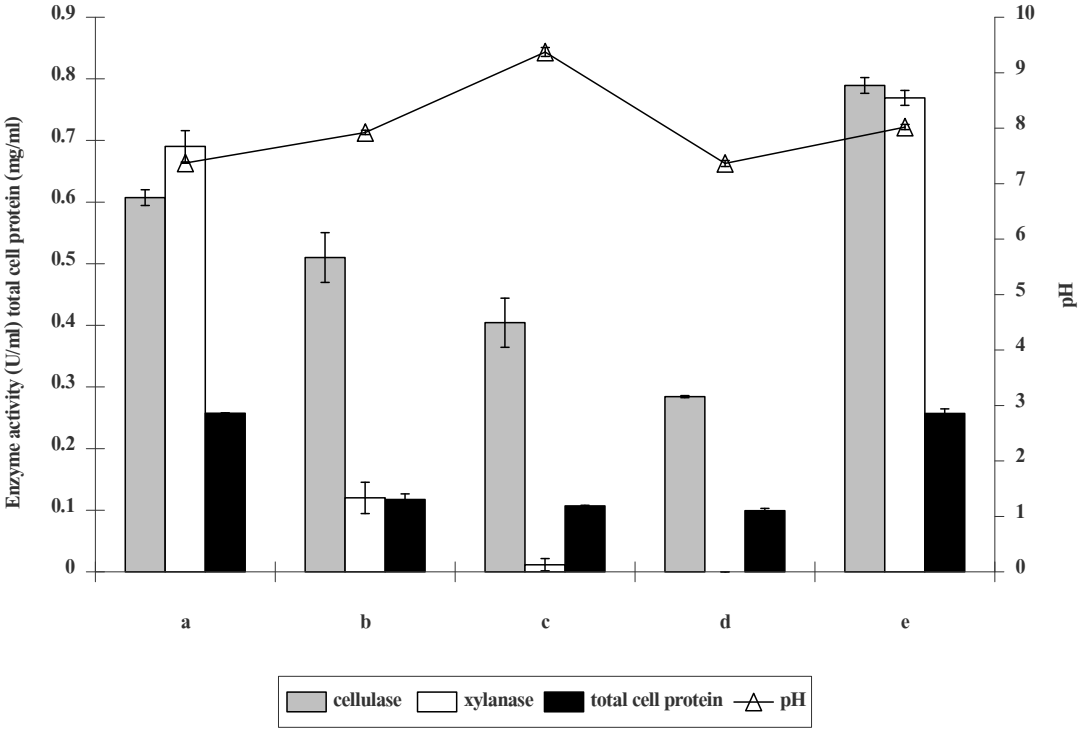


Figure 14. Effect of inorganic nitrogen on cellulase and xylanase productions by *Bacillus subtilis* AH73 after cultivation at 200 rpm and 45^{o}C for 12 h. (a: ammonium sulphate, b: sodium nitrate, c: ammonium bicarbonate, d: ammonium dihydrogen phosphate and e: ammonium nitrate)

จากการทดลองได้ทำการเติมปริมาณของไนโตรเจน โดยเปรียบเทียบกับแอมโมเนียมไนเตรท พบว่าเชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 เจริญได้ดีในอาหารที่เติมแหล่งไนโตรเจนจากแอมโมเนียมซัลเฟตและแอมโมเนียมไนเตรท ส่วนแหล่งไนโตรเจนจากโซเดียมไนเตรท แอมโมเนียมไบคาร์บอเนตและแอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตนั้นไม่ส่งเสริมการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 สำหรับการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสนั้นพบว่าแอมโมเนียมไนเตรทจะให้การผลิตเอนไซม์ของ *Bacillus subtilis* AH73 ดีที่สุดแตกต่างกับกับรายงานของ Kapoor และคณะ (2008) ที่ว่า เชื้อ *Bacillus pumilus* MK001 จะผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ไม่ต่างกันเมื่อทำการเลี้ยงโดยใช้แหล่งไนโตรเจนจากแอมโมเนียมซัลเฟต, โซเดียมไนเตรท, แอมโมเนียมไบคาร์บอเนต, แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตและแอมโมเนียมไนเตรทร้อยละ 0.55

พบว่าเชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 ผลิตเอนไซม์ได้ดีเมื่อใช้ไนโตรเจนจากแอมโมเนียมไนเตรท เช่นเดียวกับรายงานของ Battan และคณะ (2007) ที่ว่าเชื้อ *Bacillus pumilus* ASH จะใช้แอมโมเนียมไนเตรทในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ดีกว่าแอมโมเนียมซัลเฟต ต่างจากการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Bacillus pumilus* EB3 (Ariffin *et al*., 2008), *Bacillus* sp. XTR-10 (Saleem *et al*., 2009) และ *Bacillus subtilis* (Sa-Pereira *et al*., 2002) นั้น การใช้แอมโมเนียมซัลเฟตจะส่งผลให้เชื้อมีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสมากกว่า อย่างไรก็ตาม Leartslarus และคณะ (2002) พบว่าเชื้อ *Bacillus firmus* K-1 ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ดีเมื่อใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน แต่สำหรับเชื้อ *Aspergillus niger* USMA1 นั้น แหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสคือโซเดียมไนเตรทรองลงมาคือยูเรีย, ยีสต์สกัด, เปบโตน, แอมโมเนียมซัลเฟตและแอมโมเนียมไนเตรทตามลำดับ (Pang Pri Kheng and Ibrahim, 2005) ทั้งนี้แหล่งไนโตรเจนแต่ละชนิดก็มีความเหมาะสมต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์ของเชื้อแต่ละชนิดแตกต่างกัน

3.1.5 ผลของปริมาณแอมโมเนียมไนเตรท

เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 ในอาหารที่เตรียมจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ไม่เจือจาง ที่ได้จากสภาวะข้อ 3.1.4 ที่เติมแอมโมเนียมไนเตรตปริมาณ 0, 1.4, 2.4, 3.4 และ 4.4 กรัมต่อลิตร พบว่าให้ค่าของกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 0.97, 0.91, 0.86, 0.80 และ 0.79 ยูนิตต่อมิลลิลิตรตามลำดับและให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสเท่ากับ 0.98, 0.93, 0.87, 0.83 และ 0.78 ยูนิตต่อมิลลิลิตรตามลำดับ มีค่าการเจริญของเซลล์แบคทีเรียโดยวัดจากปริมาณโปรตีนทั้งหมดภายในเซลล์เท่ากับ 0.31, 0.29, 0.27, 0.27 และ 0.26 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ (Figure 15) จากการทดลองพบว่าแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* AH73 มีการเจริญและผลิต

เอนไซม์ได้น้อยในชุดการทดลองที่เติมแอมโมเนียมไนเตรทและลดลงเมื่อทำการเพิ่มปริมาณของแอมโมเนียมไนเตรท ทั้งนี้แอมโมเนียมไนเตรทที่เติมลงไปอาจทำปฏิกิริยากับสารประกอบที่มีอยู่ในน้ำทิ้งทำให้เอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสถูกยับยั้ง การเติมแอมโมเนียมไนเตรทรวมทั้งการเพิ่มปริมาณของแอมโมเนียมไนเตรทในอาหารเลี้ยงเชื้อจึงทำให้กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสมีค่าลดลง (Prasertsan *et al*., 1992)

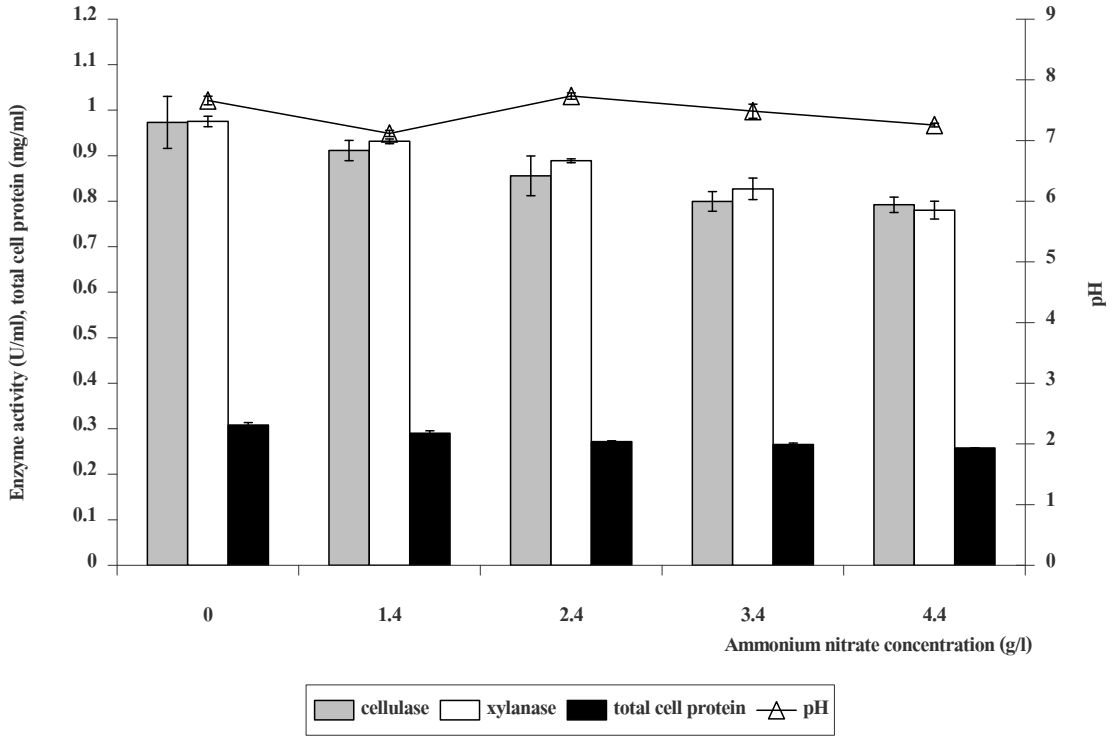


Figure 15. Effect of NH_4NO_3 concentration on cellulase and xylanase productions by *Bacillus subtilis* AH73 after cultivation at 200 rpm and 45°C for 12 h.

จากการวิเคราะห์คุณลักษณะน้ำทิ้งจากโรงงานน้ำมันปาล์มที่ใช้เตรียมอาหาร (Table 6 ในการวิเคราะห์องค์ประกอบน้ำทิ้งจาดเครื่องดีแคนเตอร์) พบว่าในน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ใช้ในการทดลองในครั้งนี้มีปริมาณของไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบอยู่ 1.30 กรัมต่อลิตร ซึ่งไนโตรเจนที่มีอยู่นั้นอาจจะเพียงพอต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์ของเชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 ดังนั้น การเติมแอมโมเนียมไนเตรทลงไปจึงไม่ส่งเสริมการเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อแบคทีเรีย สอดคล้องกับรายงานของ Leartslarus และคณะ (2002) ที่ว่าการเพิ่มปริมาณไนโตรเจนจะเป็นพิษต่อเซลล์ของเชื้อ *Bacillus firmus* K-1 ส่งผลให้เชื้อเจริญและผลิตเอนไซม์ได้น้อย แต่ Saleem และคณะ (2009) กล่าวว่าการเพิ่มปริมาณแหล่ง

ไนโตรเจนจะส่งเสริมการผลิตเอนไซม์ของเชื้อ *Bacillus* sp. XTR-10 สำหรับเชื้อรานั้น Pang Pri Kheng และ Ibrahim (2005) กล่าวว่าการเพิ่มไนโตรเจนไม่ส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อ *Aspergillus niger* USM A1 เช่นกัน จากการทดลองพบว่าการเติมแอมโมเนียมไนเตรทจะไม่ส่งเสริมการเจริญและผลิตเอนไซม์ของเชื้อ *Bacillus subtilis* AH73

3.1.6 ผลของอุณหภูมิ

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 ในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ เติมแคลเซียมคลอไรด์, แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปปะไฮเดรต, โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต, ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตและซีเอ็มซี 0.3, 0.3, 1.0, 1.0 และ 15 กรัมต่อลิตรตามลำดับ โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง, 37, 45, 55 และ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากการทดลองพบว่าเชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 มีค่าการเจริญโดยวัดจากโปรตีนทั้งหมดภายในเซลล์เท่ากับ 0.14, 0.16, 0.31, 0.30 และ 0.26 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับดี ที่สุดที่อุณหภูมิเท่ากับ 45 และ 55 องศาเซลเซียส (ρ>0.05) โดยที่อุณหภูมิห้อง, 37, 45, 55 และ 65 องศาเซลเซียส เชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 0.55, 0.62, 0.98, 1.06 และ 0.92 ยูนิตต่อมิลลิลิตรตามลำดับ และเอนไซม์ไซลาเนสเท่ากับ 0.53, 0.63, 0.98, 1.00 และ 0.89 ยูนิตต่อมิลลิลิตรตามลำดับ พบว่าการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 นั้นสูงที่สุดที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส (Figure 16) ทั้งนี้การเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ จะส่งผลต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของเชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 นั้นแตกต่างกัน โดยการเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนั้นอุณหภูมิที่ใช้อาจจะต่ำเกินไปส่งผลให้เชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 เจริญได้ไม่ดี การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสจึงมีค่าน้อย และเมื่อทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิเท่ากับ 45 องศาเซลเซียส พบว่าการเจริญและผลิตเอนไซม์ของเชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 นั้นเพิ่มขึ้นและมีค่ามากกว่าทุกชุดการทดลอง อาจเนื่องมาจากในการทดลองแยกเชื้อนั้นได้ใช้สภาวะที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 จึงเป็นเชื้อที่ชอบอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เมื่อทำการทดลอง เชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 จึงมีการเจริญและผลิตเอนไซม์ได้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ดีกว่าทุกชุดการทดลอง และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการเลี้ยงเป็น 55 และ 65 องศาเซลเซียสพบว่าเชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 มีการเจริญลดลง ทั้งนี้อุณหภูมิทั้งสองอาจจะสูงเกินไปทำให้ไม่เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 สำหรับกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสที่เชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 ผลิตนั้นพบว่ามีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิเท่ากับ 55 องศาเซลเซียสและลดลงที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ทั้งนี้อุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นจาก 45 องศาเซลเซียสเป็น 55 องศาเซลเซียส จะส่งผลให้เอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสที่เชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 ผลิตทำงานได้มากขึ้น เนื่องมาจากการเพิ่มอุณหภูมิจะเป็นการเร่งให้

เอนไซม์เกิดปฏิกิริยาจับกับสารตั้งต้นได้มากขึ้นนั่นเอง และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิการเลี้ยงเป็น 65 องศาเซลเซียส พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสองที่เชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 ผลิตมีค่าลดลงอาจเป็นเพราะอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสนั้นสูงเกินไป ส่งผลให้เอนไซม์ที่เชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 ผลิตเกิดการเสียสภาพหรือถูกทำลาย จากการทดลองพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 ผลิตออกมานั้นมีค่าสูงที่สุดที่อุณหภูมิในการบ่มเท่ากับ 45 และ 55 องศาเซลเซียส ไม่มีความแตกต่างกัน (ρ>0.05) ระหว่างชุดการทดลองแต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับชุดการทดลองอื่น

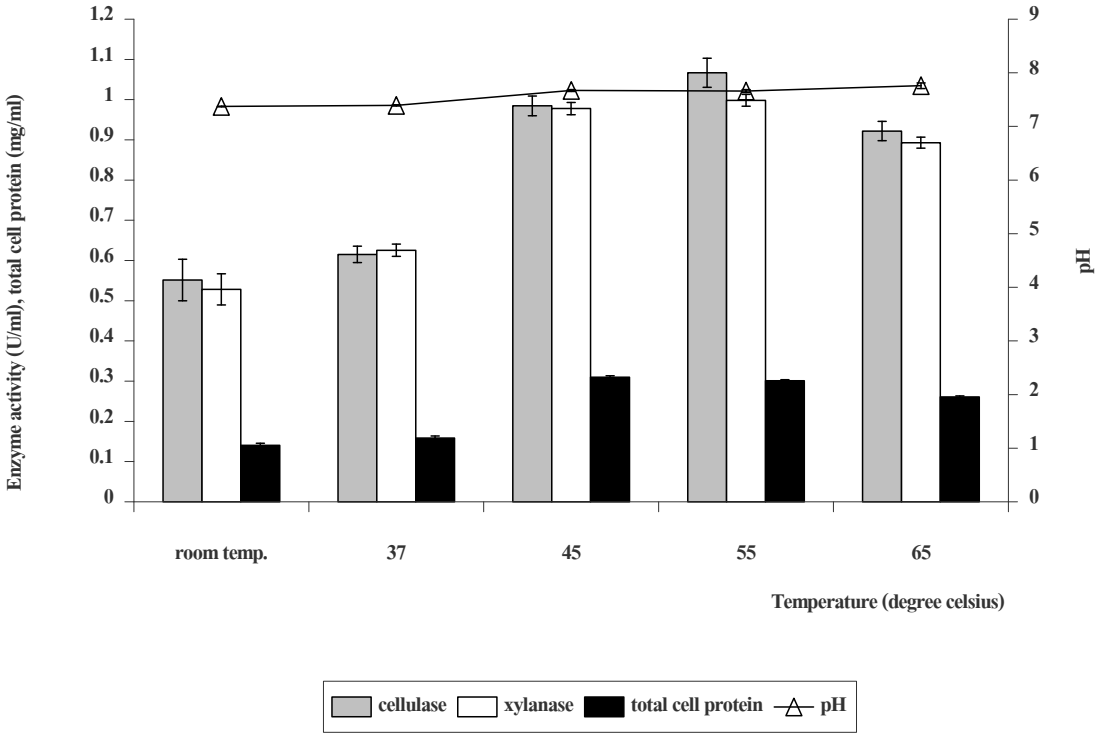


Figure 16. Effect of temperature on cellulase and xylanase productions by *Bacillus subtilis* AH73 after cultivation at 200 rpm for 12 h.

จากการทดลองพบว่าเชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสได้ที่อุณหภูมิสูง ซึ่งมีรายงานการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อสกุล *Bacillus* หลาย ๆ สายพันธุ์ เช่น เชื้อ *Bacillus subtilis* A-53 (Kim *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2010) มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 50 องศาเซลเซียส, เชื้อ *Bacillus* spp. LM01 และ *Bacillus* spp. LM04 (Mayende *et al.*, 2006) ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีที่อุณหภูมิเท่ากับ 60 องศาเซลเซียส, เชื้อ *Bacillus licheniformis* B-41361 (Bischoff *et al.*, 2007) ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสดีที่

อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ส่วนเชื้อ *Bacillus* spp. LM02 และ *Bacillus* spp. LM03 (Mayende *et al*., 2006) มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 70 องศาเซลเซียส สำหรับเอนไซม์ไซลาเนสนั้นมีรายงานการผลิตเอนไซม์ที่อุณหภูมิสูงเช่นกันโดย เชื้อ *Bacillus subtilis* (Sa-Pereira *et al*., 2002; Yuan *et al*., 2005), *Bacillus* sp. JB-99 (Virupakshi *et al*., 2005) และ *Bacillus licheniformis* A99 (Archana and Satyanarayana, 1997) ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ดีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส, เชื้อ *Bacillus coagulans* (Chauhan *et al*., 2006), *Bacillus pumilus* AJK (Kuar *et al*., 2010) และ *Bacillus* sp. XTR-10 (Saleem *et al*., 2009) ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสดีที่สุดเมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิเท่ากับ 55 องศาเซลเซียส, เชื้อ *Bacillus* sp. Sam-3 (Shah *et al*., 1999) และเชื้อ *Bacillus* sp. K-8 (Tachaapaikoon *et al*., 2006) สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสดีที่สุดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ส่วน Mamo และคณะ (2006) กล่าวว่า *Bacillus halodurans* S7 ผลิตเอนไซม์ได้ดีที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตาม Ariffin และคณะ (2008) กล่าวว่าเชื้อ *Bacillus pumilus* EB3 ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีที่ 37 องศาเซลเซียส

สำหรับการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 ในสภาวะการทดลองพบว่าพบว่าสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูง แม้ว่าเชื้อ *Bacillus subtilis* จะเป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ที่อุณหภูมิปานกลาง (Microbewiki, 2010) แต่สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิที่กว้าง มีรายงานสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* ในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 25-35 องศาเซลเซียส (Microbewiki, 2010), 50 องศาเซลเซียส (Kim *et al*., 2009; Lee *et al*., 2010) และ 60 องศาเซลเซียส (Sa-Pereira *et al*., 2002; Yuan *et al*., 2005) พบว่าเชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 เป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง จาก Figure 16 นั้นจะเห็นได้ว่าแม้จะเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 ที่อุณหภูมิสูงถึง 65 องศาเซลเซียสแบคทีเรียยังสามารถเจริญได้ดีกว่าเมื่อทำการเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ดังนั้นเชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 ที่ทำการคัดแยกมาจึงเป็นแบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิสูงในการเจริญ

3.1.7 ผลของพีเอชเริ่มต้น

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 ในอาหารที่เตรียมจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ไม่เจือจางปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมแคลเซียมคลอไรด์, แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปปะไฮเดรต, โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต, ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตและซีเอ็มซีปริมาณ 0.3, 0.3, 1.0, 1.0 และ 15 กรัมต่อลิตร ทำการปรับค่าพีเอชเริ่มต้นเป็น 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 และ 7.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์และสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 3 นอร์มอล (พีเอชเริ่มต้นของน้ำทิ้งเท่ากับ 4.32) ปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิเท่ากับ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบว่าเชื้อ *Bacillus subtilis* AH73

สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสได้ในทุกชุดการทดลอง แต่จะมีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสน้อยในอาหารที่ปรับค่าพีเอชเท่ากับ 3.0 และ 4.0 (Figure 17) โดยพบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสที่เชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 ผลิตนั้นมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ρ>0.05) เมื่อเลี้ยงในน้ำทิ้งที่ปรับพีเอชเริ่มต้นของน้ำทิ้งเท่ากับ 5.0, 6.0 และ 7.0 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 1.00, 1.02 และ 1.07 ยูนิตต่อมิลลิลิตรตามลำดับและมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสเท่ากับ 0.97, 0.98 และ 0.99 ยูนิตต่อมิลลิลิตรตามลำดับ สำหรับการเจริญของ *Bacillus subtilis* AH73 นั้นพบว่า *Bacillus subtilis* AH73 มีการเจริญได้ดีในชุดการทดลองที่ปรับพีเอชเริ่มต้นของน้ำทิ้งเท่ากับ 7.0 แตกต่างจากชุดการทดลองอื่น (ρ<0.05) มีค่าการเจริญโดยวัดจากปริมาณโปรตีนภายในเซลล์เท่ากับ 0.31 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสที่เชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 ผลิตไม่แตกต่างกับชุดการทดลองที่ทำการปรับพีเอชของน้ำทิ้งเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 และ 6.0 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสที่เชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 ผลิตนั้นสามารถทำงานได้ทั้งพีเอชเท่ากับ 5.0, 6.0 และ 7.0 จึงได้คัดเลือกชุดการทดลองที่ทำการปรับพีเอชของอาหารที่เตรียมจากน้ำทิ้งเท่ากับ 5.0 ไปทำการทดลองต่อไป

จากการทดลองพบว่าที่พีเอชเท่ากับ 5.0, 6.0 และ 7.0 นั้นการผลิตเอนไซม์ของ *Bacillus subtilis* AH73 มีค่าไม่แตกต่างกันสอดคล้องกับรายงานที่ว่าเชื้อ *Bacillus pumilus* EB3 (Ariffin *et al.,* 2008), เชื้อ *Bacillus subtilis* A-53 (Kim *et al.*, 2009) และเชื้อ *Bacillus firmus* (Tseng *et al.*, 2002) มีพีเอชที่เหมาะสมของการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 6.5 แต่ Lee และคณะ (2010) รายงานว่า *Bacillus subtilis* A-53 มีพีเอชที่เหมาะสมของการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 6.8 ส่วนเชื้อ *Bacillus coagulans* สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ที่พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.0 – 9.0 (Chauhan *et al.,* 2006) แต่แบคทีเรียจะผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ดีที่สุดที่พีเอชเท่ากับ 7.0 สำหรับเชื้อ *Bacillus subtilis* จะผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ดีที่พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 (Sa-Pereira *et al.,* 2002) แต่ Dhiman และคณะ (2008) รายงานว่าเชื้อ *Bacillus stearothermophilus* SDX จะไม่ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสเมื่อเลี้ยงในอาหารที่ปรับพีเอชเท่ากับ 5.0 แต่จะผลิตเอนไซม์ได้ดีที่พีเอชเท่ากับ 7.0 และเมื่อปรับพีเอชของอาหารเพิ่มขึ้นเชื้อจะผลิตเอนไซม์ลดลงเช่นเดียวกับ *Bacillus subtilis* (Yuan *et al*., 2005) ต่างจากเชื้อ *Bacillus pumilus* ที่ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้มากขึ้นเมื่อปรับพีเอชของอาหารเพิ่มขึ้น โดยเชื้อมีกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงที่สุดที่พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 9.0 (Kapoor *et al.,* 2008; Poorna and Prema, 2007) ส่วน Saleem และคณะ (2009)รายงานว่าเชื้อ *Bacillus* sp. XTR-10 ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสดีที่สุดที่พีเอชของอาหารเริ่มต้นเท่ากับ 8.0

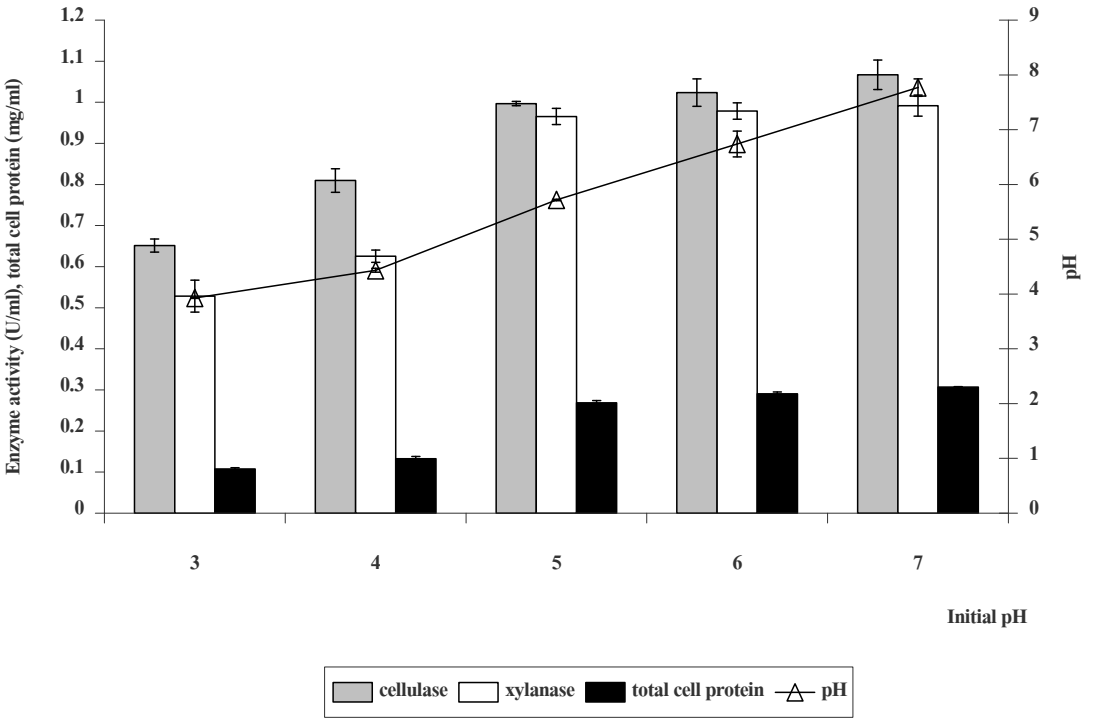


Figure 17. Effect of initial pH on cellulase and xylanase productions by *Bacillus subtilis* AH73 after cultivation at 200 rpm and 45°C for 12 h.

3.1.8. การเจริญและการผลิตเอนไซม์ในสภาวะที่เหมาะสม

เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 ในอาหารที่เตรียมจากน้ำทิ้งดีแคนเตอร์ที่ไม่ทำการเจือจางในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยเติมสารอาหารเหมือนกับสภาวะการทดลองจากข้อ 3.1.7 ปริมาตรน้ำทิ้งเท่ากับ 50 มิลลิลิตร ทำการปรับพีเอชเริ่มต้นของน้ำทิ้งให้เท่ากับ 5.0 เติมปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 โดยเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิเท่ากับ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากการทดลองพบว่าเชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 มีการเจริญและผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 ของการทดลอง โดยเชื้อมีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสเท่ากับ 0.75 และ 0.62 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (Figure 18) มีค่าการเจริญซึ่งทำการวัดจากปริมาณโปรตีนภายในเซลล์เท่ากับ 0.21 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อต่อไปพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสมีค่าเพิ่มขึ้น

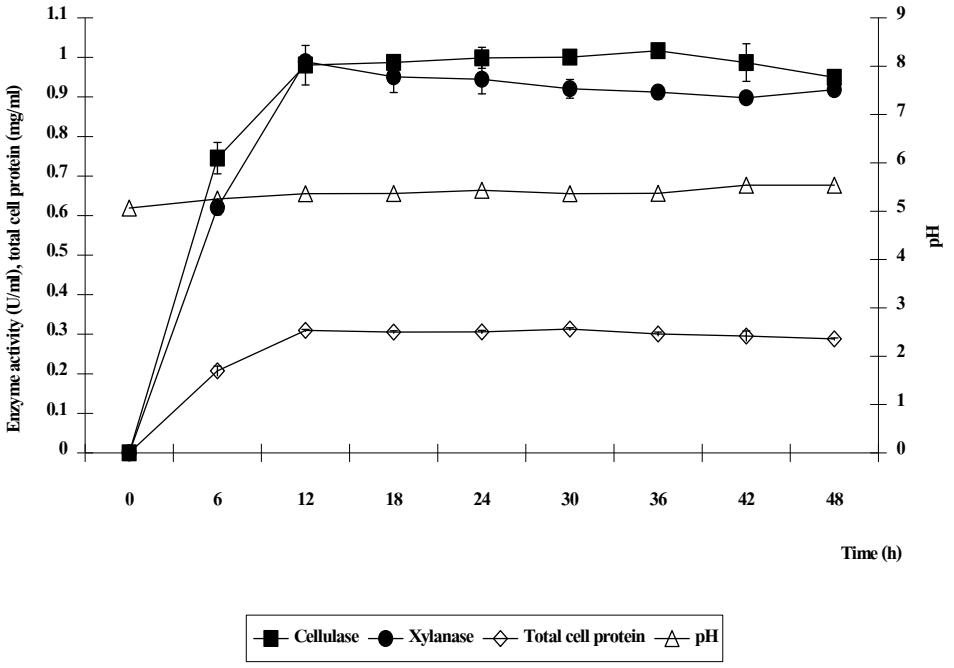


Figure 18. Time course of cellulase and xylanase productions by *Bacillus subtilis* AH73 in Erlenmeyer flasks contained POME (supernatant) medium with an initial pH 5.0 at 200 rpm and 45°C.

ที่ชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ และมีกิจกรรมมากที่สุดที่ชั่วโมงที่ 36 ของการเลี้ยงเชื้อ มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 1.02 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และลดลงเป็น 0.95 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่การเลี้ยงที่ 48 ชั่วโมง ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส พบว่ามีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่ 12 ชั่วโมงของการทดลอง มีกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสเท่ากับ 0.99 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* AH73 มีค่าลดลงเมื่อทำการเลี้ยงต่อไป ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสารตั้งต้นในอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อนั้นลดลงจึงทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสองลดลง นอกจากนี้ในการทดลองยังพบว่าค่าการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 มีค่าที่เพิ่มขึ้นและมีค่ามากที่สุดที่ชั่วโมงที่ 12 ของการทดลอง มีค่าการเจริญเท่ากับ 0.31 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่าลดลงเมื่อทำการเลี้ยงต่อไป สำหรับสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อแต่ละชนิดนั้นก็จะแตกต่างกันโดย Kim และคณะ (2009) กล่าวว่าสภาวะที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์ที่เหมาะสมของเชื้อ *Bacillus subtilis* A53 คือเลี้ยงในอาหารที่เตรียมจากซีเอ็มซีที่อุณหภูมิเท่ากับ 50 องศาเซลเซียส พีเอชเท่ากับ 6.5 จากการทดลองเมื่อทำการ

เลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 ที่เวลา 48 ชั่วโมง พบว่าเชื้อไม่มีการเจริญและผลิตเอนไซม์ได้เพิ่มขึ้นการทดลองในขั้นต่อไปจึงทำการทดลองโดยใช้เวลาเลี้ยงเชื้อเพียง 24 ชั่วโมง

3.2 การเลี้ยงเชื้อในถังหมัก

3.2.1 ผลของการกวน

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่มีน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่มีการเติมแคลเซียมคลอไรด์, แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต, โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต, ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตและซีเอ็มซีปริมาณ 0.3, 0.3, 1.0, 1.0 และ 15 กรัมต่อลิตร พีเอชของอาหารเท่ากับ 5.0 ปริมาณ 1 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิของถังหมักที่ 45 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที โดยใช้อัตราการกวนที่ 50, 100, 150, 200 และ 250 รอบต่อนาที จากการทดลองพบว่าเชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสได้ตั้งแต่ 6 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยงเชื้อ (Figure 19) เช่นเดียวกับการเลี้ยงเชื้อในฟลาสก์ (Figure 18) โดยเชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสดีที่สุดเมื่อใช้อัตรากวนที่ 100 รอบต่อนาที (1.30 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ρ>0.05) กับชุดการทดลองที่ใช้อัตราการกวน 150 รอบต่อนาที (1.23 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) แต่แตกต่างกันกับชุดการทดลองอื่น ส่วนค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสพบว่าที่ชั่วโมงที่ 6 นั้นมีค่าไม่ต่างกันระหว่างชุดการทดลองที่ใช้อัตราการกวนที่ 50, 100 และ 150 รอบต่อนาที โดยที่อัตราการกวนของถังหมักเท่ากับ 100 รอบต่อนาทีมีกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงกว่าทุกชุดการทดลอง (0.64 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) เมื่อทำการเลี้ยงต่อไปพบว่าค่ากิจกรรมของทั้งสองเอนไซม์มีค่าเพิ่มขึ้นและมีค่าสูงที่สุดที่ 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อมีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 1.30, 1.46, 1.37, 1.17 และ 1.20 ยูนิตต่อมิลลิลิตรและกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสเท่ากับ 0.77, 0.95, 0.71, 0.59 และ 0.55 ยูนิตต่อมิลลิลิตรในอัตรากวนที่เท่ากับ 50, 100, 150, 200 และ 250 รอบต่อนาทีตามลำดับ โดยในชุดการทดลองที่ใช้อัตราการกวนที่ 100 รอบต่อนาทีนั้นการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 มีค่าสูงสุดและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับการทดลองอื่น ๆ (ρ<0.05)

จากการทดลองพบว่าเมื่อเพิ่มอัตราการกวนในถังหมักในช่วง 50 และ 100 รอบต่อนาทีนั้นจะส่งผลให้การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสนั้นเพิ่มขึ้นอาจเป็นเพราะการเพิ่มอัตราการกวนจะไปเพิ่มการสัมผัสระหว่างตัวเซลล์แบคทีเรีย, เอนไซม์และอาหารในถังหมัก ทำให้เชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 ผลิตเอนไซม์ออกมามากขึ้นและเอนไซม์ที่เชื้อผลิตทำงานได้ดีขึ้น แต่เมื่อเพิ่มอัตราการเป็น 150, 200 และ 250 รอบต่อนาทีพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์มีค่าลดลงทั้งนี้อาจเป็นเพราะเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสที่เชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 ผลิตนั้นไม่คง

ตัวต่ออัตราการกวนของถังหมักที่เพิ่มมากขึ้น จึงส่งผลทำให้การผลิตเอนไซม์ของแบคทีเรียลดลงเมื่อเพิ่มอัตราการกวน (Weber and Agblevor, 2005) และการเพิ่มอัตราการกวนในถังหมักนั้นอาจเป็นการเพิ่มแรงเฉือน ทำให้เชื้อแบคทีเรียเจริญและผลิตเอนไซม์ได้ไม่ดีรวมทั้งอัตราการกวนที่เพิ่มขึ้นอาจก่อให้เกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในถังหมัก (Ganesh *et al*., 2000) แตกต่างจาก Ghadge และคณะ (2005) ที่ว่าการเพิ่มอัตราการกวนจะไม่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แต่อย่างใด การทดลองพบว่าอัตราการกวนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 คือที่ 100 รอบต่อนาที แตกต่างจากรายงานของ Kapoor และคณะ (2008) ที่พบว่าเชื้อ *Bacillus pumilus* MK001 ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ดีเมื่อใช้อัตราการกวนที่ 200 รอบต่อนาที ส่วน Techapun และคณะ (2003) รายงานว่าอัตรากวนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสคือ 150 รอบต่อนาที ส่วน Lee และคณะ (2010) กล่าวว่าการกวนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของ *Bacillus subtilis* A-53 คือ 300 รอบต่อนาที

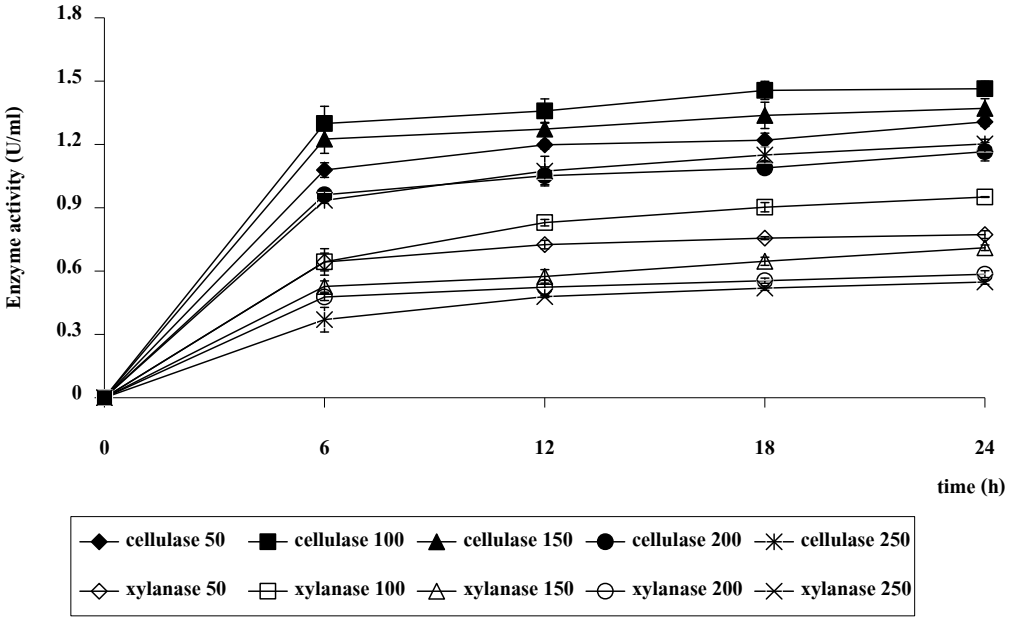


Figure 19. Effect of agitation on cellulase and xylanase productions by *Bacillus subtilis* AH73 in the fermentor with an initial medium pH at 5.0, at aeration rate 1 vvm and 45^{o}C.

จากการทดลองพบว่าการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 ในถังหมักนั้นมีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มเวลาในการเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้น (Figure 20) โดยมีค่าการเจริญสูงที่สุดที่ 24 ชั่วโมงของทุกชุดการทดลอง มีค่าการเจริญโดยการวัดค่าโปรตีนของเซลล์ทั้งหมดเท่ากับ 0.18,

0.27, 0.25, 0.17 และ 0.16 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับในอัตราการกวนที่เท่ากับ 50, 100, 150, 200 และ 250 รอบต่อนาทีตามลำดับ โดยอัตราการกวนที่เพิ่มขึ้นมีผลต่อการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 กล่าวคืออัตราการกวนที่ 50 และ 100 รอบต่อนาทีจะส่งผลในการเพิ่มการเจริญของแบคทีเรีย ทั้งนี้อัตราการกวนที่เพิ่มขึ้นจะช่วยให้อาหาร อากาศและแบคทีเรียกระจายสัมผัสกันมากขึ้น (Lee *et al*., 2010) โดยการกวนจะทำให้อาหารมีขนาดโมเลกุลที่เล็กลงและยังเป็นการลดความหนืดของอาหารเลี้ยงเชื้อส่งผลให้แบคทีเรียรับสารอาหารและเจริญได้มากขึ้น (Hsu *et al*., 2007) อย่างไรก็ตามจากการทดลองพบว่าเมื่อเพิ่มอัตราการกวนของถังหมักเป็น 150, 200 และ 250 รอบต่อนาทีจะส่งผลให้การเจริญของแบคทีเรียนั้นมีค่าลดลงทั้งนี้อัตราการกวนที่สูงขึ้นอาจจะไปชะลอการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 สอดคล้องกับ Potumarthi และคณะ (2007) ที่ว่าการเพิ่มอัตราการกวนจะเป็นการเพิ่มแรงเฉือนในถังหมักและเกิดความเสียหายให้แก่เซลล์ทำให้เชื้อเจริญได้น้อยลง (Feng *et al*., 2003) แต่ Syu และ Chen (1997) ทำการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus amyloliquefaciens* ในถังหมักพบว่าเมื่อเพิ่มอัตราการกวนในถังหมักจะส่งผลให้เชื้อเจริญได้ไม่แตกต่างกัน เช่นเดียวกับ Lee และคณะ (2010) ที่ว่าการกวนที่เพิ่มขึ้นจะเพิ่มการเจริญของเซลล์แต่อาจจะยับยั้งการผลิตเอนไซม์ของแบคทีเรีย

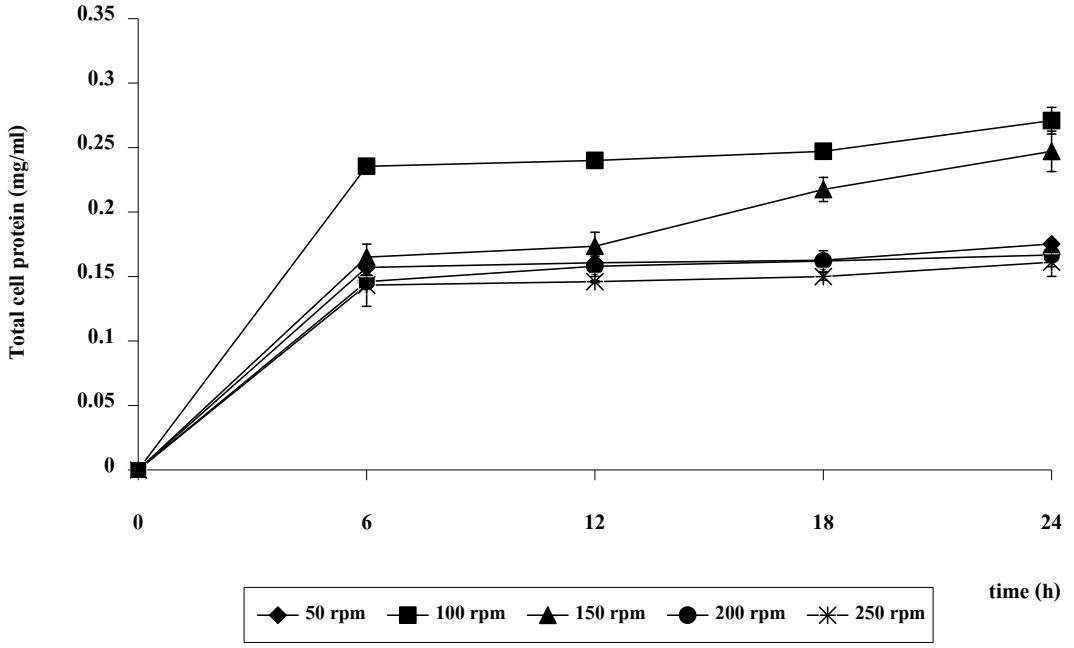


Figure 20. Effect of agitation on growth of *Bacillus subtilis* AH73 in the fermentor with an initial medium pH at 5.0, at aeration rate 1 vvm and 45^{o}C.

3.2.2 ผลของการให้อากาศ

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 ในอาหารที่เตรียมจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในสภาวะข้อ 3.2.1 ใช้อัตราการกวนที่ 100 รอบต่อนาทีและอัตราการให้อากาศที่ 1, 2 และ 3 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที จากการทดลองพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสที่เชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 ผลิตมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นเมื่อเพิ่มเวลาในการเลี้ยงและเพิ่มอัตราในการให้อากาศ (Figure 21) จากการทดลองพบว่าที่ 6 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ อัตราการให้อากาศที่ 1, 2 และ 3 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสเท่ากับ 1.29, 1.33 และ 1.39 ยูนิตต่อมิลิลิตรและ 0.68, 0.79 และ 0.84 ยูนิตต่อมิลลิลิตรตามลำดับ และเมื่อทำการเลี้ยงต่อไปที่ 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ พบว่า *Bacillus subtilis* AH73 มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสเพิ่มขึ้นเป็น 1.46, 1.56 และ 1.72 ยูนิตต่อมิลลิลิตรและ 0.93, 0.94 และ 1.09 ยูนิตต่อมิลลิลิตรตามลำดับ พบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 ที่อัตราการให้อากาศในถังหมักเท่ากับ 3 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาทีดีที่สุดแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ρ<0.05) กับชุดการทดลองอื่น เมื่อทำการวัดค่าการเจริญของเซลล์แบคทีเรีย (Figure 22) โดยการวัดค่าโปรตีนภายในเซลล์พบว่าการให้อากาศที่ 1, 2 และ 3 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที จะส่งผลให้เชื้อเจริญได้มากขึ้นเมื่อเพิ่มเวลาในการเลี้ยงแต่การให้อากาศในอัตรา 1, 2 และ 3 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาทีให้ผลการเจริญไม่แตกต่างกันระหว่างชุดการทดลอง (ρ>0.05) โดยพบว่าค่าโปรตีนภายในเซลล์ของการเลี้ยงเชื้อที่ 6 ชั่วโมงของการทดลองนั้น *Bacillus subtilis* AH73 มีค่าการเจริญเท่ากับ 0.24, 0.24 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับและการเจริญของเชื้อที่ 24 ชั่วโมง มีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 0.30, 0.31 และ 0.31 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ

จากการทดลองเมื่อทำการเพิ่มอัตราการให้อากาศพบว่าเชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 มีการผลิตเอนไซม์มากขึ้น อาจเนื่องมาจากอากาศที่เพิ่มขึ้นจะไปช่วยกระจายอาหารในถังหมักให้สัมผัสกับเอนไซม์ได้มากขึ้น การให้อากาศเท่ากับ 3 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาทีจะให้กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตโดย *Bacillus subtilis* AH73 ดีที่สุด แตกต่างจาก Lee และคณะ (2010) ที่ว่า *Bacillus subtilis* A-53 จะผลิตเอนไซม์เซลลูเลสดีที่สุดเมื่อใช้อัตราการให้อากาศที่ 1 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที และการเพิ่มอากาศจะไม่ส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์ แต่จากการทดลองนั้นการเพิ่มอัตราการให้อากาศจะส่งเสริมให้เชื้อมีการผลิตเอนไซม์มากขึ้น (Techapun *et al*., 2003; Weber and Agblevor, 2005)

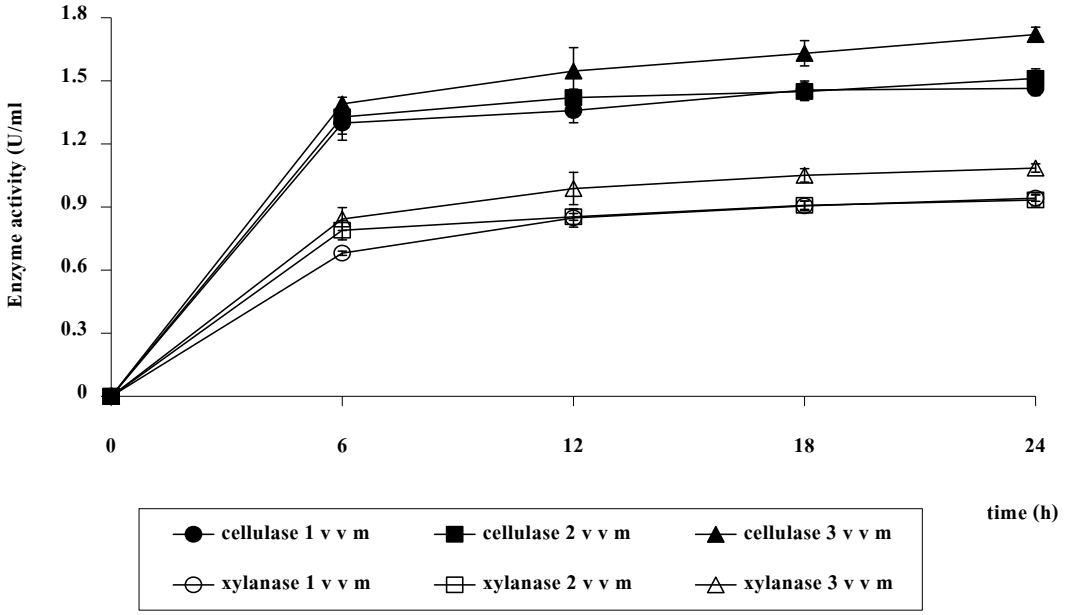


Figure 21. Effect of aeration on cellulase and xylanase productions by *Bacillus subtilis* AH73 in the fermentor with an initial medium pH 5.0, agitation rate at 100 rpm and 45°C.

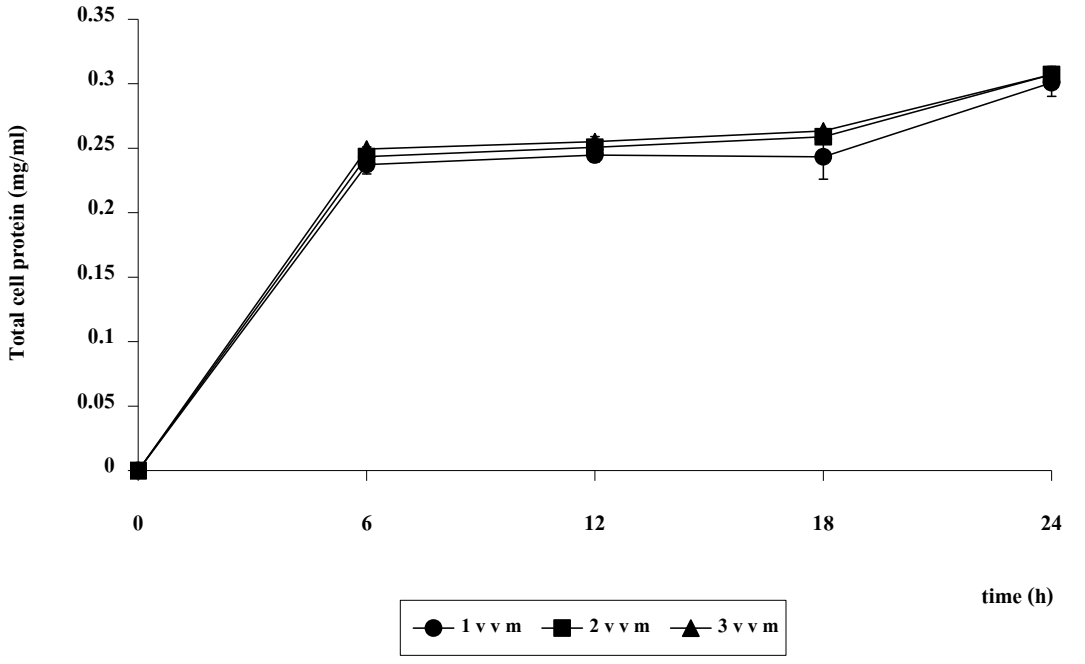


Figure 22. Effect of aeration on growth of *Bacillus subtilis* AH73 in the fermentor with an initial medium pH 5.0, agitation rate at 100 rpm and 45°C.

สำหรับการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 นั้นพบว่าเชื้อแบคทีเรียมีค่าการเจริญที่ไม่แตกต่างกันในทุกชุดการทดลองทั้งนี้การเพิ่มอัตราการให้อากาศในถังหมักจะช่วยให้เชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 เจริญได้รวดเร็วในชั่วโมงแรกของการทดลอง และเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อต่อไปพบว่าการเพิ่มอัตราการให้อากาศนั้นไม่ส่งเสริมต่อการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 สอดคล้องกับ Syu และ Chen (1997) ที่กล่าวว่าการเพิ่มอัตราการให้อากาศจะทำให้เชื้อ *Bacillus amyloliquefaciens* ในถังหมักเจริญได้เร็วในช่วงแรก แต่เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อผ่านไปพบว่าการเจริญของเชื้อไม่แตกต่างกันเนื่องมาจากอัตราการให้อากาศที่สูงอาจจะส่งผลให้เกิดอันตรายแก่เซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย แต่ Demirtas และคณะ (2003); Lee และคณะ (2010) กล่าวว่าการเพิ่มอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศจะช่วยเพิ่มปริมาณเซลล์ของแบคทีเรียให้มีจำนวนมากขึ้น

4. ผลการแยกน้ำมันออกจากน้ำทิ้งของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยใช้แบคทีเรียที่คัดเลือกและเอนไซม์ที่ผลิตได้

4.1 เปรียบเทียบการแยกน้ำมันออกจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยใช้เอนไซม์หยาบและอาหารที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อ

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 ในอาหารที่เตรียมจากน้ำทิ้งดีแคนเตอร์เป็นเวลา 12 ชั่วโมง (มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสเท่ากับ 0.98 และ 0.99 ยูนิตต่อมิลลิลิตรตามลำดับ) แล้วนำมาศึกษาการแยกน้ำมันออกจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ผ่านการฆ่าเชื้อและปรับพีเอชเท่ากับ 5.0 ปริมาตร 45 มิลลิลิตรในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยเติมส่วนใสที่แยกเชื้อออกและอาหารที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร (วิธีการในบทที่ 2 หัวข้อ 4.1) พบว่าชุดการทดลองที่ใช้ส่วนใสและใช้อาหารที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 12 ชั่วโมง สามารถลดน้ำหนักแห้งของตะกอนได้ดีกว่าชุดควบคุม ให้ผลแตกต่างกันที่ 96 ชั่วโมงของการทดลอง (ρ>0.05) สามารถลดน้ำหนักแห้งของตะกอนจากน้ำทิ้งได้ร้อยละ 18.70 และ 17.88 ในชุดการทดลองที่ใช้เฉพาะส่วนใสและอาหารผ่านการเลี้ยงเชื้อตามลำดับ (Table 10) สำหรับการลดลงของน้ำมันในตะกอนพบว่า ชุดที่ใช้อาหารที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 12 ชั่วโมง สามารถลดน้ำมันในตะกอนได้ร้อยละ 43.33 ที่ 96 ชั่วโมงของการทดลอง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับชุดการทดลองที่ใช้ส่วนใสซึ่งลดน้ำมันในตะกอนได้ร้อยละ 37.18 สำหรับชุดควบคุมซึ่งเติมเพียงน้ำกลั่นลงในน้ำทิ้งปริมาณเท่ากันลดน้ำหนักแห้งของน้ำทิ้งได้ร้อยละ 5.47 และลดน้ำมันในตะกอนได้ร้อยละ 16.61 เนื่องจากในชุดการทดลองที่เติมเฉพาะส่วนใสจะมีเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนส ส่วนชุดการทดลองที่ใช้อาหารที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 12 ชั่วโมง จะมีเซลล์ของ *Bacillus subtilis* AH73 ร่วมกับเอนไซม์ ซึ่งจะย่อยเซลลูโลสและไซแลนในน้ำทิ้งและปลดปล่อยน้ำมันออกมาได้

Table 10. Oil separation from palm oil mill effluent in various conditions at 200 rpm and 45°C.

Conditions	Incubation time (h)	Quantity of oilin the		% Reduction of oil in the bottom layer	Dry weight of bottom layer *	% Reduction of dry weight in bottom layer
		Top layer*	Bottom layer**			
Control	0	0.24	0.43	0.00	35.97	0.00
	24	0.34	0.39	$8.88^{C,c}$	35.09	$2.45^{C, b}$
	48	0.75	0.38	$11.50^{B,c}$	34.29	$4.68^{BC, b}$
	72	1.01	0.36	$14.30^{A,c}$	34.11	$5.18^{BC, b}$
	96	1.22	0.35	$16.61^{A,c}$	34.01	$5.47^{A, b}$
Bacillus	0	0.24	0.42	0.00	35.99	0.00
culture	24	1.52	0.26	$37.82^{B,a}$	32.48	$9.75^{C, a}$
	48	2.16	0.25	$40.75^{A,a}$	32.08	$10.85^{C, b}$
	72	2.44	0.24	$42.04^{A,a}$	30.75	$14.56^{B, a}$
	96	2.65	0.24	$43.33^{A,a}$	29.55	$17.88^{A, a}$
Cell free	0	0.24	0.41	0.00	36.04	0.00
supernatant	24	1.52	0.28	$34.42^{B,b}$	33.96	$5.78^{C, ab}$
	48	2.16	0.27	$35.83^{AB,b}$	32.78	$9.05^{BC, b}$
	72	2.44	0.28	$33.59^{B,b}$	31.00	$13.99^{AB, a}$
	96	2.65	0.26	$37.18^{A,b}$	29.30	$18.70^{A, a}$

Note: *parameters in g/l

** parameters in g/g of sludge

ทำให้มีการลดลงของน้ำมันและน้ำหนักแห้งของตะกอน และเมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันที่มีในส่วนใสพบว่ามีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับชุดควบคุม (Figure 23) อย่างไรก็ตาม พบว่าชุดการทดลองที่ใช้ส่วนใสและอาหารที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 12 ชั่วโมงให้ค่าการลดลงของน้ำหนักแห้งของตะกอนและปริมาณน้ำมันในตะกอนแตกต่างกัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการย่อยสลายสารประกอบในน้ำทิ้งของชุดการทดลองที่ใช้ส่วนใสนั้น เกิดจากเอนไซม์ที่เติมลงไปเพียงอย่างเดียว ต่างจากชุดการทดลองที่ใช้อาหารที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 จะมีการเจริญและผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสออกมาย่อยสารประกอบในน้ำทิ้ง ส่งผลให้การลดลงของน้ำมันในตะกอนของชุดการทดลองที่มีเชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 ดีกว่าชุดการทดลองที่ใช้เพียงส่วนใส จากการทดลองยังพบว่าในชุดควบคุมนั้นมีการลดลงของน้ำหนักแห้งของตะกอนและ

ปริมาณน้ำมันในตะกอนได้เล็กน้อยแม้ว่าจะไม่มีการเติมเอนไซม์หรือเติมเชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 ลงไปในน้ำทิ้ง อาจเนื่องมาจากสภาวะการทดลองมีการเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาทีและใช้อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ซึ่งทั้งการเขย่าร่วมกับอุณหภูมิที่ใช้อาจจะช่วยให้น้ำมันที่เกาะอยู่กับเส้นใยในน้ำทิ้งแยกหลุดออกมาได้เช่นกัน (Laohaprapanon *et al.*, 2005) สำหรับการแยกน้ำมันออกจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มนั้นนอกจากการใช้เชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 แล้ว พบว่ามีเชื้ออีกหลายชนิดที่มีคุณสมบัติในการแยกน้ำมันได้เช่นเชื้อสายพันธุ์ ST29 (Muneesri, 1996), *Rhizopus* sp. (Pechsuth *et al*., 2001; Binmaeil, 2005) เชื้อสายพันธุ์ SU5 และเชื้อสายพันธุ์ SU9 (Udomsil and Prasertsan, 2009) ซึ่งเชื้อแต่ละชนิดก็จะมีความสามารถในการแยกน้ำมันออกจากน้ำทิ้งได้แตกต่างกันขึ้นอยู่กับความสามารถของเชื้อและสภาวะที่ใช้

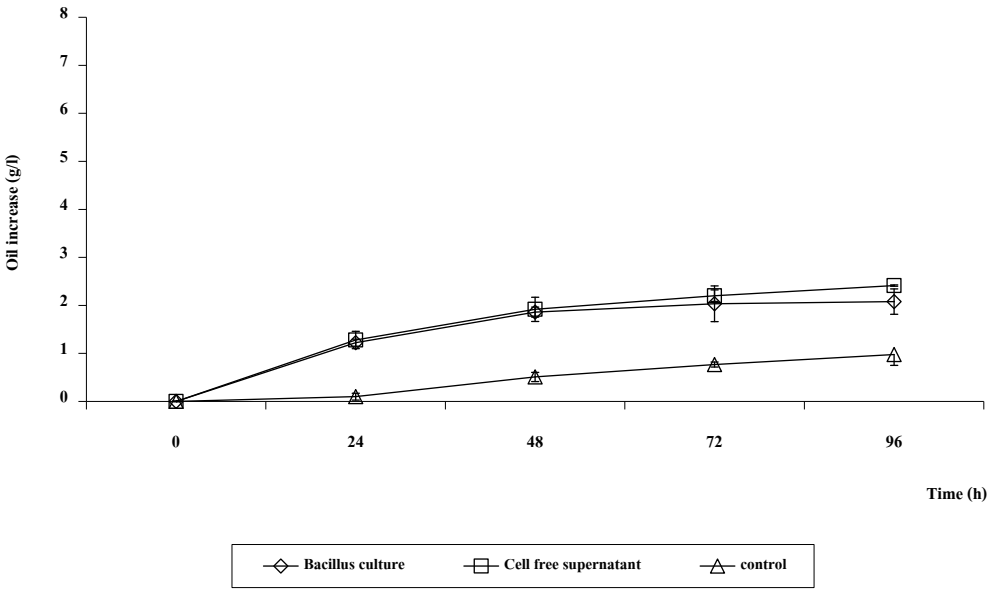


Figure 23 Oil increasing after separated oil from palm oil mill effluent in various conditions.

4.2 ผลของพีเอช

จากการศึกษาผลของพีเอชต่อการแยกน้ำมันออกจากตะกอนน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยใช้อาหารที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 ที่เวลา 12 ชั่วโมง ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติมลงในน้ำทิ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 45 มิลลิลิตร ที่ปรับพีเอชเริ่มต้นของน้ำทิ้งเท่ากับ 4.0, 5.0, 6.0 และ 7.0 บ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พบว่าที่ 96 ชั่วโมง สามารถลดน้ำหนักแห้งของตะกอนจากน้ำทิ้งได้ร้อยละ 27.66, 25.97, 35.76 และ 34.35 ตามลำดับ (Table 11) ชุดการทดลองที่ทำการปรับพีเอชของน้ำทิ้งเท่ากับ 6.0 ให้ผล

ดีที่สุดและไม่แตกต่างกับชุดการทดลองที่ปรับพีเอชเริ่มต้นของน้ำทิ้งเท่ากับ 7.0 (ρ>0.05) แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับชุดการทดลองที่ที่ปรับพีเอชเริ่มต้นของน้ำทิ้งเท่ากับ 4.0 และ 5.0 สำหรับในชุดควบคุมพีเอชของน้ำทิ้งเท่ากับ 4.0, 5.0, 6.0 และ 7.0 มีการลดน้ำหนักแห้งของตะกอนน้ำทิ้งได้ร้อยละ 4.04, 4.85, 7.36 และ 10.38 ตามลำดับ สำหรับปริมาณน้ำมันในตะกอน พบว่าการปรับเพิ่มพีเอชของน้ำทิ้งและเวลาบ่มที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ปริมาณของน้ำมันในตะกอนมีค่าลดลง โดยที่ 96 ชั่วโมง ชุดการทดลองที่ปรับพีเอชเท่ากับ 4.0, 5.0, 6.0 และ 7.0 มีปริมาณน้ำมันในน้ำทิ้งเท่ากับร้อยละ 22.06, 43.68, 56.67 และ 63.71 ตามลำดับ ดีที่สุดในชุดทดลองที่ปรับพีเอชของน้ำทิ้งเท่ากับ 7.0 แตกต่างกับชุดการทดลองอื่น ในขณะที่ชุดควบคุมมีการลดลงของปริมาณน้ำมันในตะกอนเท่ากับร้อยละ 11.32, 19.57, 22.26 และ 23.40 ตามลำดับ พบว่าพีเอชของน้ำทิ้งที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้น้ำหนักแห้งของตะกอนและปริมาณน้ำมันในตะกอนมีค่าลดลงรวมทั้งการเพิ่มขึ้นของน้ำมันในส่วนใส (Figure 24) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสภาวะดังกล่าวคือพีเอชเท่ากับ 7.0 นั้นมีความเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 (Figure 17) และอาจจะส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ที่เชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 ผลิตออกมา จึงส่งผลให้สามารถลดน้ำหนักของตะกอนแห้งและปริมาณน้ำมันในน้ำทิ้งของชุดการทดลองที่ปรับพีเอชของน้ำทิ้งเท่ากับ 7.0 ได้มากขึ้น และจากการทดลองยังพบว่าพีเอชของน้ำทิ้งที่เพิ่มขึ้นนั้นมีผลต่อการแยกน้ำมันออกจากตะกอนน้ำทิ้งรวมทั้งการลดลงของน้ำหนักแห้งของตะกอนได้เช่นกัน เมื่อทำการวัดปริมาณน้ำมันในส่วนใสพบว่าชุดการทดลองที่ปรับพีเอชของน้ำทิ้งเท่ากับ 7.0 มีปริมาณน้ำมันในส่วนใสมากที่สุด อาจเป็นเพราะในการเตรียมน้ำทิ้งเพื่อนำมาทดลองนั้นมีการปรับพีเอชของน้ำทิ้งด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ซึ่งอาจจะส่งผลให้น้ำมันในน้ำทิ้งที่จับอยู่กับสารประกอบจำพวกเซลลูโลสและไซแลนหลุดออกได้ง่ายขึ้น (Binmaeil, 2005) ส่งผลให้ชุดการทดลองที่ปรับพีเอชของน้ำทิ้งเท่ากับ 7.0 นั้น แยกน้ำมันออกจากตะกอนน้ำทิ้งและลดน้ำหนักแห้งของตะกอนได้มากที่สุด

Table 11. Effect of pH on oil separation from palm oil mill effluent by *Bacillus subtilis* AH73 at 200 rpm and 45°C.

Conditions	Incubation time (h)	Quantity of oil in the		% Reduction of oil in the bottom layer	Dry weight of bottom layer*	% Reduction of dry weight in bottom layer
		Top layer*	Bottom layer**			
pH4	0	0.24 (0.24)	0.36 (0.43)	0.00 (0.00)	39.35 (39.35)	0.00 (0.00)
	24	0.56 (0.34)	0.29 (0.41)	$18.89^{B,d}$ (3.43)	38.06 (38.43)	$3.28^{D,d}$ (1.02)
	48	1.85 (0.75)	0.29 (0.40)	$19.76^{AB,d}$ (7.28)	34.30 (38.34)	$12.84^{C,d}$ (2.28)
	72	2.41 (0.90)	0.28 (0.40)	$21.88^{A,d}$ (9.33)	34.86 (37.96)	$11.42^{B,d}$ (2.79)
	96	2.81 (1.02)	0.28 (0.39)	$22.06^{A,d}$ (11.32)	28.47 (37.45)	$27.66^{A,d}$ (4.04)
pH5	0	0.36 (0.36)	0.40 (0.37)	0.00 (0.00)	36.71 (36.71)	0.00 (0.00)
	24	1.61 (0.36)	0.25 (0.34)	$38.3^{C,c}$ (7.28)	36.10 (36.10)	$1.66^{D,c}$ (2.36)
	48	2.19 (0.76)	0.24 (0.33)	$40.50^{BC,c}$ (12.33)	33.60 (34.29)	$8.47^{C,c}$ (2.58)
	72	2.63 (1.03)	0.23 (0.32)	$41.53^{AB,c}$(14.99)	33.27 (34.11)	$9.37^{B,c}$ (3.55)
	96	2.87 (1.26)	0.23 (0.30)	$43.68^{A,c}$ (19.57)	27.18 (34.01)	$25.97^{A,c}$ (4.85)
pH6	0	0.95 (0.95)	0.41 (0.39)	0.00 (0.00)	34.74 (35.09)	0.00 (0.00)
	24	2.62 (1.07)	0.25 (0.36)	$39.58^{C,b}$ (9.33)	28.00 (34.74)	$19.38^{D,b}$ (1.66)
	48	3.27 (1.09)	0.22 (0.35)	$46.54^{B,b}$ (11.89)	27.13 (34.29)	$21.89^{C,b}$ (6.59)
	72	3.76 (1.50)	0.19 (0.33)	$54.27^{A,b}$ (16.97)	26.43 (34.11)	$23.91^{B,b}$ (7.07)
	96	4.23 (1.86)	0.17 (0.31)	$56.67^{A,b}$ (22.26)	22.32 (33.67)	$35.76^{A,a}$ (7.36)
pH7	0	0.92 (0.68)	0.42 (0.42)	0.00 (0.00)	34.59 (34.90)	0.00 (0.00)
	24	3.80 (0.92)	0.24 (0.38)	$44.14^{D,a}$ (11.32)	25.29 (33.87)	$26.89^{D,a}$ (2.95)
	48	5.88 (1.77)	0.20 (0.37)	$52.03^{C,a}$ (14.50)	24.54 (32.81)	$29.06^{C,a}$ (6.00)
	72	6.25 (1.79)	0.17 (0.35)	$59.55^{B,a}$ (18.55)	23.28 (32.28)	$32.70^{B,a}$ (7.49)
	96	7.51 (3.27)	0.15 (0.33)	$63.71^{A,a}$ (23.40)	22.71 (31.28)	$34.35^{A,a}$(10.38)

Note: *parameters in g/l

** parameters in g/g of sludge

In parenthesis: control without *Bacillus subtilis* AH73 addition.

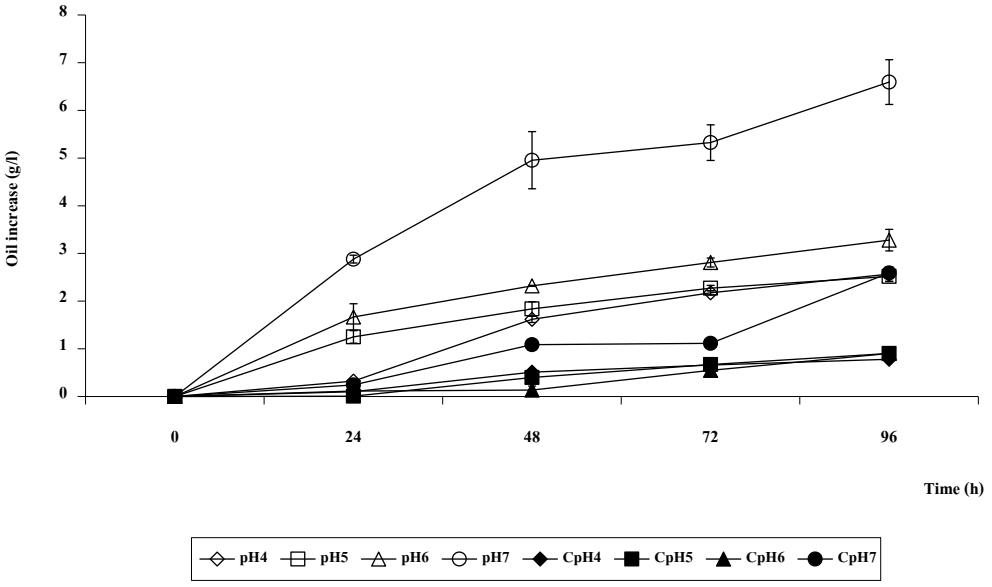


Figure 24 Effect of pH on oil increasing from palm oil mill effluent by *Bacillus subtilis* AH73.

4.3 ผลของอุณหภูมิ

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการแยกน้ำมันออกจากตะกอนน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยใช้อาหารที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 ที่เวลา 12 ชั่วโมง ปริมาตร 5 มิลลิลิตรลงในน้ำทิ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 45 มิลลิลิตร และปรับพีเอชเริ่มต้นของน้ำทิ้งเท่ากับ 7.0 บ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37, 45 และ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง พบว่าอาหารที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 สามารถลดน้ำหนักแห้งของตะกอนจากน้ำทิ้งได้ร้อยละ 17.61, 35.53 และ 28.30 ตามลำดับ (Table 12) ชุดการทดลองที่ใช้อุณหภูมิเท่ากับ 45 องศาเซลเซียส ให้ผลการลดน้ำหนักแห้งของตะกอนได้ดีที่สุดและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับชุดการทดลองอื่น (ρ<0.05) ส่วนการลดลงของน้ำมันในตะกอนที่ 96 ชั่วโมงนั้น พบว่าการบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส สามารถลดน้ำมันได้ดีที่สุด (ร้อยละ 62.79) ดีกว่าที่อุณหภูมิ 37 (ร้อยละ 24.99) และ 55 (ร้อยละ 51.85) องศาเซลเซียส ดังนั้นที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสจึงเหมาะสมต่อการแยกน้ำมันออกจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มและทำให้ได้ปริมาณน้ำมันในส่วนใสเพิ่มขึ้นมากกว่าชุดการทดลองอื่น (Figure 25)

การที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสส่งผลให้การใช้อาหารที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 สามารถลดน้ำมันในตะกอนและน้ำหนักแห้งของตะกอนดีที่สุด อาจเนื่องมาจากที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสนั้นเป็นอุณหภูมิที่ใช้ในการเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นของการทดลอง ดังนั้นในชุดการทดลองที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ร่วมกับการปรับพีเอชของน้ำทิ้งเท่ากับ 7.0 จึงส่งผล

ให้เชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 ที่เติมลงไปทำงานได้ดีกว่าชุดการทดลองที่อุณหภูมิอื่น จากการทดลองยังพบว่าในชุดควบคุมซึ่งไม่มีการเติมเชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 นั้นสามารถลดน้ำหนักแห้งและลดน้ำมันออกจากตะกอนน้ำทิ้งได้เช่นกัน โดยในชุดควบคุมที่อุณหภูมิเท่ากับ 37, 45 และ 55 องศาเซลเซียสนั้นมีการลดลงของน้ำหนักแห้งเท่ากับร้อยละ 2.37, 8.77 และ 11.14 ตามลำดับ และสามารถลดน้ำมันในตะกอนได้ร้อยละ 14.93, 24.86 และ 26.75 ตามลำดับ ซึ่งอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นจะมีส่วนช่วยในการแยกน้ำมันออกเส้นใยที่มีอยู่ในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม (Laohaprapanon *et al.*, 2005) อีกทั้งในการทดลองได้มีการเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาทีซึ่งอาจส่งผลให้น้ำมันที่เกาะอยู่กับเส้นใยหลุดออกได้เมื่อเพิ่มอุณหภูมิและระยะเวลาการทดลอง

Table 12. Effect of temperature on oil separation from palm oil mill effluent by *Bacillus subtilis* AH73 at 200 rpm.

Conditions	**Cultivation time (h)**	**Quantity of oil in the**		**% Reduction of oil in the bottom layer**	**Dry weight of bottom layer ***	**% Reduction of dry weight in bottom layer**
		Top Layer*	**Bottom Layer****			
37 °C	0	0.80 (0.69)	0.43 (0.43)	0.00 (0.00)	33.69 (34.23)	0.00 (0.00)
	24	1.64 (0.68)	0.38 (0.41)	$10.96^{C,c}$ (3.12)	31.18 (33.70)	$7.45^{D,c}$ (0.82)
	48	1.80 (0.81)	0.36 (0.39)	$16.16^{C,c}$ (9.38)	30.35 (33.14)	$9.91^{C,c}$ (1.54)
	72	3.71 (0.82)	0.35 (0.37)	$18.94^{B,c}$ (12.13)	28.54 (33.95)	$15.29^{B,c}$ (3.19)
	96	4.72 (1.26)	0.32 (0.36)	$24.99^{A,c}$ (14.93)	27.76 (31.42)	$17.61^{A,c}$ (2.37)
45 °C	0	0.81 (0.69)	0.42 (0.43)	0.00 (0.00)	34.48 (34.23)	0.00 (0.00)
	24	3.80 (0.68)	0.24 (0.39)	$42.85^{D,a}$ (9.94)	28.54 (33.87)	$17.24^{D,a}$ (1.06)
	48	5.88 (0.81)	0.21 (0.37)	$49.85^{C,a}$ (14.17)	23.57 (32.81)	$31.66^{C,a}$ (4.17)
	72	6.25 (0.82)	0.17 (0.34)	$58.07^{B,a}$ (20.02)	22.55 (32.28)	$34.60^{B,a}$ (5.69)
	96	7.51 (1.26)	0.16 (0.32)	$62.79^{A,a}$ (24.86)	22.23 (31.23)	$35.53^{A,a}$ (8.77)
55 °C	0	0.52 (0.52)	0.43 (0.43)	0.00 (0.00)	33.92 (34.23)	0.00 (0.00)
	24	1.64 (0.68)	0.27 (0.38)	$37.39^{D,b}$ (11.53)	29.92 (33.14)	$11.81^{D,b}$ (3.19)
	48	2.77 (1.80)	0.25 (0.35)	$40.93^{C,b}$ (17.19)	27.76 (32.57)	$18.18^{C,b}$ (4.85)
	72	3.77 (1.78)	0.22 (0.32)	$49.40^{B,b}$ (25.26)	27.77 (32.95)	$18.14^{B,b}$ (3.74)
	96	4.71 (3.57)	0.21 (0.31)	$51.85^{A,b}$ (26.75)	24.32 (30.42)	$28.30^{A,b}$ (11.14)

Note: *parameters in g/l, ** parameters in g/g of sludge

In parenthesis: control without *Bacillus subtilis* AH73 addition.

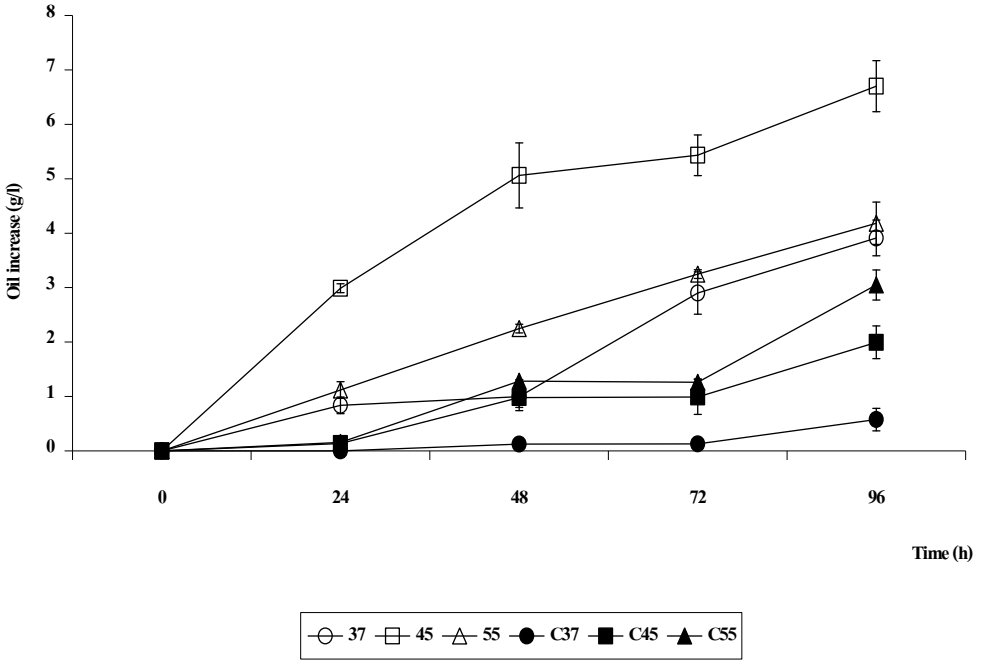


Figure 25. Effect of temperature on oil increasing from palm oil mill effluent by *Bacillus subtilis* AH73.

จากการทดลองพบว่าการลดลงของน้ำมันในตะกอนและน้ำหนักแห้งของตะกอนมีค่าน้อย อาจเนื่องมาจากในการทดลองครั้งนี้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์ที่น้อยและยังไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ จึงส่งผลให้การลดลงของน้ำหนักแห้งและการแยกน้ำมันออกจากตะกอนน้ำทิ้งเกิดได้ไม่ดี อีกทั้งในน้ำทิ้งที่ทำการทดลองนั้นอาจจะมีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบในปริมาณที่สูงซึ่งปริมาณน้ำตาลที่เพิ่มขึ้นจะมีผลไปยับยั้งการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (เบญจวรรณ ชิตมณี, 2534; Archana and Satyanarayana, 1997; Chandra *et at.*, 2009) พบว่า *Bacillus subtilis* AH73 มีความสามารถในการแยกน้ำมันออกจากน้ำทิ้งดีแคนเตอร์และลดน้ำหนักแห้งของตะกอนดีที่สุดเมื่อใช้อุณหภูมิเท่ากับ 45 องศาเซลเซียส (ร้อยละ 35.53 และร้อยละ 62.79 ตามลำดับ) และปริมาณน้ำมันที่แยกได้มีปริมาณน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองที่ได้มีการรายงานไว้เช่น เชื้อ *Rhizopus* sp. สายพันธุ์ ST4 และ ST29 สามารถแยกน้ำมันและกรีสจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มได้ร้อยละ 84.2 และ 94.7 ตามลำดับ (Pechsuth *et al.*, 2001), เชื้อสายพันธุ์ SO1 สามารถลดน้ำหนักแห้งของตะกอนและน้ำมันในตะกอนได้ร้อยละ 64.66 และ 85.32 ตามลำดับ (Laohaprapanon *et al.*, 2007), เชื้อสายพันธุ์ SU5 และ SU9 ที่แยกน้ำมันออกจากน้ำทิ้งได้ 44.40 และ 49.50 ตามลำดับ (Udomsil and Prasertsan, 2009) อย่างไรก็ตามเชื้อบางสายพันธุ์ก็ไม่สามารถ

แยกน้ำมันออกจากน้ำทิ้งได้ ดังรายงานของ Kaewchai และ Prasertsan (2002) ที่ว่า *Bacillus subtilis* WD29, *Bacillus subtilis* SM29 และ *Enterobacter agglomerams* SM38 ไม่สามารถแยกน้ำมันออกจากน้ำทิ้งได้ สำหรับรายงานการแยกน้ำมันออกจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มจากแหล่งต่าง ๆ นั้นแสดงใน Table 13

Table 13. Comparison of POME pretreatment from various methods.

Methods	**Conditions**	**% Reduction of oil**	**References**
Bacillus subtilis AH73	pH 7.0 and 200 rpm at 45^{o}C	62.79	**This study**
Strain ST29	200 rpm at 45^{o}C	99.04	Muneesri (1996)
Enzyme from *Aspergillus*	pH 4.5 at 60^{o}C	95.00	Chantaphaso
niger ATCC 6275			(1999)
Rhizopus sp. ST24	45^{o}C and septic condition	84.20	Pechsuth *et al.*
Rhizopus sp. ST29	45^{o}C and aseptic condition	91.40	(2001)
Rhizopus sp. ST29	45^{o}C and septic condition	76.19	Binmaeil (2548)
Flotation	55^{o}C	~75.00	Laohaprapanon *et*
Centrifugation	7,000 rpm for 15 min	~94.00	*al.* (2005)
Chemical	$FeSO_4$	82.46	
Strain SU5 and SU9	pH 7.0 and 200 rpm at 30^{o}C	44.40 and 49.50	Udomsil and
Cellulase	100 U/ml 40^{o}C	41.30	Prasertsan (2009)
Strain SU9	100 l for 24 h	58.10	

บทที่ 4

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

1. ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์

จากการศึกษาองค์ประกอบของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มพบว่ามีอุณหภูมิเท่ากับ 63.70 องศาเซลเซียส, มีพีเอชเท่ากับ 4.32} มีปริมาณสารอินทรีย์สูงโดยมีค่าซีโอดีเท่ากับ 157.06 กรัมต่อลิตร, ปริมาณของแข็งทั้งหมด 40.29 กรัมต่อลิตร, ของแข็งแขวนลอย 29.85 กรัมต่อลิตร, น้ำมันและกรีส 15.96 กรัมต่อลิตร, น้ำตาลทั้งหมด 4.74 กรัมต่อลิตร, ไนโตรเจน 1.30 กรัมต่อลิตร, น้ำหนักแห้งของตะกอน 35.97 กรัมต่อลิตร, เถ้า 1.05 กรัมต่อลิตร, น้ำมันในตะกอน 0.41 กรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของตะกอนและปริมาณเซลลูโลสร้อยละ 27.02

2. ผลของการแยกและคัดเลือกแบคทีเรีย

จากการคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากตัวอย่างดินรอบ ๆ บ่อรวบรวมน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มบนอาหารแข็งซีเอ็มซี ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยวิธีการคองโกเรด พบว่าคัดแยกเชื้อแบคทีเรียได้ 84 สายพันธุ์ และมี 66 สายพันธุ์ที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส แบคทีเรียสายพันธุ์ AH14, AH64 และ AH73 มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (0.73, 0.71 และ 0.73 ยูนิตต่อมิลลิลิตรตามลำดับ) และเอนไซม์ไซลาเนส (1.24, 1.18 และ 1.21 ยูนิตต่อมิลลิลิตรตามลำดับ) ในอาหารเหลวซีเอ็มซีที่เติมแคลเซียมคลอไรด์ 0.3 กรัมต่อลิตร, แม็กนีเซียมซัลเฟตเฮปปะไฮเดรต 0.3 กรัมต่อลิตร,โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.0 กรัมต่อลิตร, ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.0 กรัมต่อลิตร, พอลีเปปโตน 2.0 กรัมต่อลิตร, ยีสต์สกัด 1.0 กรัมต่อลิตร, แอมโมเนียมไนเตรท 4.4 กรัมต่อลิตร และซีเอ็มซี 10 กรัมต่อลิตร แบคทีเรียสายพันธุ์ AH73 มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสดีที่สุดในอาหารที่เตรียมจากน้ำทิ้งดีแคนเตอร์น้ำทิ้งเจือจางต่อน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 ต่อ 4 และเติมสารอาหารทุกอย่างเหมือนอาหารเหลวซีเอ็มซี มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสเท่ากับ 0.55 และ 0.37 ยูนิตต่อมิลลิลิตรตามลำดับ มีค่าการเจริญวัดจากปริมาณโปรตีนทั้งหมดภายในเซลล์เท่ากับ 0.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เชื้อสายพันธุ์ AH73 มีลักษณะโคโลนีที่ใหญ่ มีสีขาว ขอบหยัก นูน หน้าด้าน ให้ผลคะตะเลสเป็นบวก มีรูปแท่ง สร้างสปอร์ ติดสีแกรมบวก เทียบเคียงสายพันธุ์ด้วยวิธี 16S rDNA เป็น *Bacillus subtilis*

3. ผลของการเจริญและการผลิตเอนไซม์ในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสในระดับ ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรของ *Bacillus subtilis* AH73 คือใช้อาหารจากน้ำทิ้งดีแคนเตอร์เติมที่แคลเซียมคลอไรด์ 0.3 กรัมต่อลิตร, แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปปะไฮเดรต 0.3 กรัมต่อลิตร, โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.0 กรัมต่อลิตร, ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.0 กรัมต่อลิตรและซีเอ็มซี 15 กรัมต่อลิตร ปริมาตรเลี้ยง 50 มิลลิลิตรเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5.0 อุณหภูมิเท่ากับ 45 องศาเซลเซียส เขย่าบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 1.02 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่ 36 ชั่วโมง มีกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสเท่ากับ 0.99 ยูนิต ต่อมิลลิลิตร ที่ 12 ชั่วโมง และมีค่าโปรตีนภายในเซลล์เท่ากับ 0.31 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ 30 ชั่วโมง ในระดับถังหมักขนาด 2 ลิตร ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มเท่ากับ 1 ลิตร โดยสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสของเชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 คือใช้อัตราการกวนเท่ากับ 100 รอบต่อนาทีและอัตราการให้อากาศเท่ากับ 3 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสเท่ากับ 1.72 และ 1.09 ยูนิตต่อมิลลิลิตร มีค่าการเจริญโดยวัดจากปริมาณโปรตีนภายในเซลล์เท่ากับ 0.31 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

4. ผลการแยกน้ำมันออกจากน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

การแยกน้ำมันออกจากน้ำทิ้งดีแคนเตอร์โดยใช้อาหารที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และสารละลายส่วนใสที่ได้จากปั่นเหวี่ยงอาหารที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที (มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสเท่ากับ 0.98 และ 0.99 ยูนิตต่อมิลลิลิตรตามลำดับ) พบว่าทั้งสองชุดการทดลองสามารถลดน้ำมันออกจากตะกอนน้ำทิ้งได้ร้อยละ 43.33 และ 37.18 ตามลำดับ (ρ<0.05) และลดน้ำหนักแห้งของตะกอนได้ร้อยละ 17.88 และ 18.70 (ρ>0.05) จึงเลี้ยง *Bacillus subtilis* AH73 ในอาหารจากน้ำทิ้งดีแคนเตอร์เป็นเวลา 12 ชั่วโมงเพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะในการแยกน้ำมันออกจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการแยกน้ำมันออกจากน้ำทิ้งดีแคนเตอร์โดย *Bacillus subtilis* AH73 คือ พีเอชเริ่มต้นของน้ำทิ้งเท่ากับ 7 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง น้ำหนักแห้งของตะกอนลดลงร้อยละ 35.53 น้ำมันในตะกอนลดลงร้อยละ 62.79

ข้อเสนอแนะ

1. เนื่องจากได้มีการนำเอาน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มมาใช้ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนส ดังนั้นในการศึกษาลักษณะของน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มควรวิเคราะห์หาองค์ประกอบอื่น ๆ ที่อาจจะมีผลต่อการผลิตเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียด้วย เช่น แร่ธาตุที่เป็นองค์ประกอบ, น้ำตาลชนิดต่าง ๆ และฟีนอล เป็นต้น

2. เนื่องจากมีเชื้อหลายสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสได้ ดังนั้นในการคัดแยกเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ควรจะใช้อาหารที่ส่งเสริมการผลิตเอนไซม์นั้น ๆ ด้วย เช่น เติมไซแลน อีกทั้งควรวิเคราะห์ความสามารถของเชื้อที่คัดแยกว่าผลิตเอนไซม์อะไรและชนิดใดบ้าง เช่น เอนไซม์เซลลูเลสชนิดไหน เป็นต้น และควรแยกเชื้อที่ชนิดอื่นที่สามารถโตบนอาหารแข็งซีเอ็มซีด้วย เช่น เชื้อรา ทั้งนี้เพื่อให้ได้มาซึ่งเชื้อที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ที่สนใจดีที่สุด

3. ในการศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ควรศึกษาเพิ่มในปัจจัยของปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น การควบคุมพีเอช และปริมาณคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็นต้น

4. ในการใช้เชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 เพื่อแยกน้ำมันออกจากน้ำทิ้งนั้น ควรจะวัดกิจกรรมของเอนไซม์ วัดการเจริญของเชื้อและปริมาณน้ำตาลที่เพิ่มขึ้น

5. ควรทำบริสุทธิ์เอนไซม์ที่ได้จากการทดลองและควรวัดความคงตัวของเอนไซม์ที่ผลิตได้

เอกสารอ้างอิง

กูนูรหายาม ยามิรูเด็ง. 2551. การบำบัดน้ำเสียเบื้องต้นจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยใช้วิธีโอโซเนชั่น. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการจัดการสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

จิตรลดา กาญจนสาวิตรี และชญานุตม์ ศรีพิทักษ์. 2547. การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสเพื่อแยกน้ำมันจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม. โครงงานนักศึกษา คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ซีหย๊ะ จันทอง และฮาราตี รอนิง. 2548. การบำบัดเบื้องต้นของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม โดย *Bacillus* sp. A2. โครงงานนักศึกษา คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

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

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจและปรีชา สุวรรณพินิจ. 2552. จุลชีววิทยาทั่วไป. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ

เบญจวรรณ ชิตมณี. 2534. การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในน้ำทิ้งของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยเชื้อราที่แยกได้. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

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

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

พูนสุข ประเสริฐสรรพ์, อรัญ หันพงศ์กิตติกูล และโสภา จันทภาโส. 2544. เปรียบเทียบการกำจัดสีของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มด้วยวิธีทางชีวภาพ ทางเคมี และทางกายภาพ. ว. สงขลานครินทร์ (ฉบับพิเศษ). 23 : 807-819.

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล. 2539. จุลินทรีย์ที่มีความสำคัญทางด้านอาหาร. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2552. ข้อมูลการผลิตสินค้าการเกษตรที่สำคัญ (ออนไลน์). สืบค้นจาก : http://www.oae.go.th/ewt_news.php?nid=7769. (20 สิงหาคม 2553)

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2552. สถานการณ์สินค้าเกษตรที่สำคัญและแนวโน้มปี 2553 (ออนไลน์). สืบค้นจาก : http://www.oae.go.th/ewt_news.php?nid=7769. (20 สิงหาคม 2553)

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

อรัญ หันพงศ์กิตติกุล, พูนสุข ประเสริฐสรรพ์, เสาวลักษณ์ จิตรบรรเจิดกุล และวีรศักดิ์ ทองลิมป์. 2537. การศึกษาการแยกน้ำมันจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม: เอกสารประกอบ การประชุมสัมมนาการลดการสูญเสียน้ำมันในอุตสาหกรรมน้ำมันปาล์ม ณ ห้องเทพธานี โรงแรมสยามธานี สุราษฎร์ธานี. 7 เมษายน 2537.

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.

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

Ahmad, A. L., Ismail, S. and Bhatia, S. 2005. Membrane treatment for palm oil mill effluent : effect of transmembrane pressure and crossflow velocity. Desalination. 179 : 245-255.

Ahmad, A. L., Ismail, S. and Bhatia, S. 2005. Ultrafiltration behavior in the treatmant of agro-industry effluent : pilot scale studies. Chem. Eng. Sci. 60 : 5385-5394.

Ahmad, A. L., Sumathi, S. and Hameed, B.H. 2006. Coagulation of residue oil and suspended solid in palm oil mill effluent by chitosan, alum and PAC. Chem. Eng. J. 118 : 99-105.

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

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

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

Bataillon, M., Cardinali, N. A-P., Castillon, N. and Duchiron, F. 2000. Purification and characterization of a moderately thermostable xylanase from *Bacillus* sp. strain SPS-0. Enzyme. Microb. Tech. 26 : 187-192

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

Battan, B., Sharma, J., Dhiman, S. S. and Kuhad, R. C. 2007. Enhanced production of cellulase-free thermostable xylanase by *Bacillus pumilus* ASH and its potential application in paper industry. Enzyme. Microb. Tech. 41 : 733-739.

Backer, P., Köster, D., Popov, M. N., Markossian, S., Antranikian, G. And Märkl, H. 1999. The Biodegradation of olive oil and the treatment of lipid-rich wool scouring wastewater under aerobic thermophilic conditions. 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.

Bhatia, S., Othman, Z. and Ahmad, A. L. 2007. Pretreatment of palm oil mill effuent (POME) using *Moringa oleifera* seeds as natural coagulant. J. Hazard. Mat. 145 : 120-126.

Binmaeil, H. 2005. Treatment of palm oil mill effluent by thermotolerant polymer-producing fungi. Master of Science Thesis in Biotechnology, Prince of Songkla University.

Bischoff, K. M., Lui, S. and Hughes, S. R. 2007. Cloning and characterization of a recombinant family 5 endoglucanase from *Bacillus licheniformis* strain B-41361. Process. Biochem. 42 : 1150-1154.

Breccia, J. D., Siñeriz, F., Baigorí, D., Castro, G. R. and Hatti-Kaul, R. 1997. Purification and characterization of a thermostable xylanase from *Bacillus amyloliquefaciens.* Enzyme. Microb. Tech. 22 : 42-49.

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.). p. 421-442. American ChemicalSociety, Washington D.C.

Chandra, M., Kalra, A., Sangwan, N. S., Gaurav, S. S., Darokar, M. P. and Sangwan, R. S. 2009. Development of a mutant of *Trichoderma citrinoviride* for enhanced production of cellulases. Bioresource. Technol. 100 : 1659-1662.

Chaplin, M. F. 1986. Monosaccharides. In Carbohydrate Analysis : A Practical Approach (Chaplin, M.F. and Kennedy, J.F., eds). P. 1-6. IRL Press, Washington DC.

Chaisri, R., Boonsawang, P., Presertsan. P. and Chaiprapat, S. 2007. Effect of organic loading rate on methane and volatile fatty acids productions from anaerobic treatment of palm oil mill effluent in UASB and UFAF reactors. Songklanakarin J. Sci. Technol. (suppl.). 2 : 311-323.

Chantaphaso, S. 1999. Factors influencing on the separation of suspended solids and oil from palm oil mill effluent by enzymes and decolorization. Master of Science Thesis in Biotechnology, Prince of Songkla University.

Chauhan, S., Choudhury, B., Singh, S. N. and Ghosh, P. 2006. Application of xylanase enzyme of *Bacillus coagulans* as a prebleaching agent on non-woody pulps. Process. Biochem. 41: 226-231.

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

Demirtes, M. U., Kolhatkar, A. and Kilbane II, J. J. 2003. Effect of aeration and agitation on growth rate of *Thermus thermophilus* in batch mode. J. Biosci. Bioeng. 2 : 113-117.

Dhiman, S. S., Sharma, J. and Battan, B. 2008. Pretreatment processing of fabrics by alkalothermophilic xylanase from *Bacillus stearothermophilus* SDX. Enzyme. Microb. Tech. 43 : 262-269.

Dhillon, A., Gupta, J. K., Jauhari, B. M. and Khanna, S. 2000. A cellulase-poor, thermostable, alkalitolerant xylanase produced by *Bacillus circulans* AB 16 grown on rice straw and its application in biobleaching of eucalyptus pulp. Bioresource. Technol. 73 : 273-277.

Feng, Y., He, Z., Ong, S. L., Hu, J., Zhang, Z. and Ng, W. J. 2003. Optimization of agitation, aeration, and temperature conditions for maximum β-mannanase production. Enzyme. Microb. Tech. 32 : 282-289.

Ganesh, K., Joshi, J. B. and Sawant, S. B. 2000. Cellulase deactivation in a stirred reactor. Biochem. Eng. J. 4 : 137-141.

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.

Ghadge, R. S., Patwardhan, A. W., Sawant, S. B. and Joshi, J. B. 2005. Effect of flow on cellulase deactivation in stirred tank bioreactors. Chem. Eng. Sci. 60 : 1067-1083.

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.

Hsu, C. A., Yu, R. C., Lee, S. L. and Chou, C. C. 2007. Cultural condition affecting the growth and production of β-galactosidase by *Bifidobacterium longum* CCRC 15708 in a jar fermenter. Int. J. Food. Microbiol. 116 : 186-189.

Hurst, C. J., Crawford, R. L., Knudsen, G. R., Mcinerney, M. J. and Stetzenbach, L. D. 2002. Manual of Environmental Microbiology. Press American Society for Microbiology.

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.

Ismail, I., Hassan, M. A., Rahman, N. A. A. and Soon, C. S. 2010. Thermophilic biohydrogen production from palm oil mill effluent (POME) using suspended mixed culture. Biomass. Bioenerg. 34 : 42-47.

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.

Kapoor, M. Nair, L. M. and Kuhad, R. C. 2008. Cost-effective xylanase production from free and immobilized *Bacillus pumilus* strain MK001 and its application in saccharification of *Prosopis juliflora*. Biochem. Eng. J. 38 : 88-97.

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.

Kaur, A., Mahjan, R., Singh, A., Garg, G. and Sharma, J. 2010. Application of cellulase-free xylano-pectinolytic enzymes from the same bacterial isolate in biobleaching of kraft pulp. Bioresource. Technol. 101 : 9150 – 9155.

Khalid, K., Ratnam, C. T., Chuah, T. G., Ali, S. and Choong, T. S. Y. 2008. Comparative study of polypropylene composites reinforced with oil palm empty fruit bunch fiber and oil palm derived cellulose. Mater. Design. 29 : 173-178.

Kim, B. K., Lee, B. H., Lee, Y. J., Lin, I. H., Chung, C. H. and Lee, J. W. 2009. Purification and characterization of carboxymethylcellulase isolated from a marine bacterium, *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* A-53. Enzyme. Microb. Tech. 44 : 411-416.

Kim, C. H. and Kim, D. S. 1995. Purification and specificity of a specific endo-β-1,4-D-glucanase (Avicelase II) resembling exo-cellobiohydrolase from *Bacillus circulans*. Enzyme. Microb. Tech. 17 : 248–254.

Krishna, C. 1999. Production of bacterial cellulase by solid state bioprocessing of banana waste. Bioresource. 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.

Kunghae, A. 1993. Production of cellulase and xylanase from palm oil mill wastes by *Aspergillus niger* ATCC 6275. Master of Science Thesis in Biotechnology, Prince of Songkla University.

Lam, M. K. and Lee, K. T. 2011. Renewable and sustainable bioenergies production from palm oil mill effluent (POME): Win–win strategies toward better environmental protection. Biotechnol. Adv. 29 : 124-141.

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 and Environment. 6 : 39-55.

Laohaprapanon, T., Prasertsan, P. and H-Kittikun, A. 2007. Screening of thermotolerant microoganisms and application for oil separation from palm oil mill wastewater. Songklanakarin J. Sci. Technol. 29(3) : 801-808.

Leartslarus, C., Ratanakhanokchai, K. and Kyu, K. L. 2002. Optimization of extracellular cellulase-free xylanase production by alkaliphilic *Bacillus firmus* K-1. KMUTT Research and Development Journal. 25 : 3-13.

Lee, B. H., Kim, B. K., Lee, Y. J., Chung, C. H. and Lee, J. W. 2010. Industrial scale of optimization for the production of carboxymethylcellulase from rice bran by a marine bacterium, *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* A-53. Enzyme. Microb. Tech. 46 : 38-42.

Lee, Y. J., Kim, B. K., Lee, B. H., Jo, K. I., Lee, N. K., Chung, C. H., Lee, Y. C. and Lee, J. W. 2008. Purification and characterization of cellulase produced by *Bacillus amyoliquefaciens* DL-3 utilizing rice hull. Bioresource. Technol. 99 : 378-386.

Li, W., Huan, X., Zhou, Y., Ma, Q. and Chen, Y. 2009. Simultaneous cloning and expression of two cellulase genes from *Bacillus subtilis* newly isolated from Golden Takin (*Budorcas taxicolor Bedfordi*). Biochem. Bioph. Res. Co. 383 : 397-400.

Lonsane, B. K., Ghildyal, N. P., Budiatwan, S. and Ramakrishna, S. V. 1985. Engineering aspects of solid state fermentation. Enzyme. Microb. Tech. 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.

Mamo, G., Hatti-Kaul, R. and Mattiasson, B. 2006. A thermostable alkaline active endo- -1-4-xylanase from *Bacillus halodurans* S7: Purification and characterization. Enzyme. Microb. Tech. 39 : 1492 -1498.

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

Maneesri, J. 1994. Production and applications of xylanase and cellulase from palm cake and sludge by *Aspergillus niger* ATCC 6275. Master of Science Thesis in Biotechnology, Prince of Songkla University.

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.

Mayende, L., Wilhelmi, B. S. and Pletschke, B. I. 2006. Cellulases (CMCases) and polyphenol oxidases from thermophilic *Bacillus* spp. isolated from compost. Soil. Biol. Biochem. 38 : 2963-2966.

Microbewiki. 2010. *Bacillus subtilis*: A Microbial Biorealm page on the genus *Bacillus subtilis* (Online). Available http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/*Bacillus_subtilis* (25 December 2010)

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.

Muneesri, P. 1996. Treatment of palm oil mill effluent using microorganism. Master of Science Thesis in Biotechnology, Prince of Songkla University.

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.

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.

Noparat, P. 2009. Optimization for production of ethanol from palm oil mill effluent using *Themoanaerobacterium themosaccharolyticum* PSU-2. Master of Science Thesis in Biotechnology, Prince of Songkla University.

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.

O-Thong, S., Prasertsan, P., N., Intrasungkha, Dhamwichukorn, S. and Birkeland, N. K. 2008. Optimization of simultaneous thermophilic fermentative hydrogen production and COD reduction from palm oil mill effluent by *Thermoanaerobacterium*-rich sludge. Int. J. Hydrogen. Energ. 33 : 1221-1231.

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. Bioresource. Technol. 85 : 35-37.

Panda, T. 1989. Simulation of shake condition in bioreactor for the biosynthesis of cellulase and xylanase by a mixed culture of *Trichoderma reesei* D1-6 and *Aspergillus wentii* PT2804. Process. Biochem. 104-108.

Pang Pri Kheng and Ibrahim, C. O. 2005. Xylanase production by a local fungal isolate, *Aspergillus niger* USM AI1 via solid state fermentation using palm kernel cake (PKC) as substrate. Songklanakarin J. Sci. Technol. 27 : 325-336.

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.

Piarpuzán, D., Quintero, J. A. and Cardona, C. A. 2011. Empty fruit bunches from oil palm as a potential raw material for fuel ethanol production. Biomass. Bioenerg. 35 : 1130-1137.

Ponpium, P., Ratanakhanokchai, K., and Kyu, K. L. 2000. Isolation and properties of a cellulosome-type multienzyme complex of the thermophilic *Bacteroides* sp. strain P-1. Enzyme. Microb. Tech. 26 : 459-465.

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.

Poorna, C. A. and Prema, P. 2007. Production of cellulase-free endoxylanase from novel alkalophilic thermotolerent *Bacillus pumilus* by solid-state fermentation and its application in wastepaper recycling. Bioresource. Technol. 98 : 485-490.

Potumarthi, R., Subhakar Ch. and Jetty, A. 2007. Alkaline protease production by submerged fermentation in stirred tank reactor using *Bacillus licheniformis* NCIM-2042: Effect of aeration and agitation regimes. Biochem. Eng. J. 34 : 185-192.

Prasertsan, P., H-Kittikul, A. and Chitmanee, B. 1992. Isolation and selection of cellulolytic fungi from palm oil mill effluent. World. J. Microb. Biot. 8 : 614-617.

Prasertsan, P. and Oi, S. 2001. Enzymatic saccharification of hemicellulose extract from palm oil mill wastes. Songklanakarin J. Sci. Technol. (suppl.). 23 : 789-795.

Prasertsan, S. and Prasertsan, P. 1996. Biomass residues from palm oil mills in Thailand : an overview on quantity and potential usage. Biomass. Bioenerg. 5 : 387-395.

Rahman, S. H. A., Choudhury, J. P. and Ahmad, A. L. 2006. Production of xylose from oil palm empty fruit bunch fiber using sulfuric acid. Biochem. Eng. J. 30 : 97-103.

Rani, D. S. and Nand, K. 2000. Production of thermostable cellulase-free xylanase by *Clostridium absonum* CFR-702. Process. Boichem. 36 : 355-362.

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.

Saleem, M., Tabassum, M. R., Yasmin, R. and Imran, M. 2009. Potential of xylanase from thermophilic *Bacillus* sp. XTR-10 in biobleaching of wood kraft pulp. Int. Biodeter. Biodegr. 63 : 1119-1124.

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.

Samain, E., Debeire, Ph. and Touzel, J. P. 1997. High level production of a cellulase-free xylanase in glucose-limited fed batch cultures of a thermophilic *Bacillus* strain. J. Biotechnol. 58 : 71-78.

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*. Bioresource. Technol. 68 : 133-140.

Shah, A. R. and Madamwar, D. 2005. Xylanase production by a newly isolated *Aspergillus foetidus* strain and its characterization. Process. Boichem. 40 : 1763-1771.

Subramaniyan, S. and Prepa, P. 2000. Cellulase-free xylanase from *Bacillus* and other microoganisms. FEMS. Microbiol. Lett. 183 : 1-7.

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.

Syu, M. J. and Chen, Y. H. 1997. A study on the a-amylase fermentation performed by *Bacillus amyloliquefaciens*. Chem. Eng. J. 65 : 237-247.

Tachaapaikoon, C., Kyu, K. L. and Ratanakhanokchai, K. 2006. Purification of xylanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. K-8 by using corn husk column. Process. Boichem. 41 : 2441-2445.

Tajuddin, R. M., Ismail, A. F. and Salim, M. R. 2002. Oxygen enriched air using membrane for palm oil wastewater treatment. Songklanakarin J. Sci. Technol. (suppl.). 24 : 989-998.

Teather, R. M. and Wood, P. J. 1982. Use of Congo Red-Polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rument. Appl. Environ. Microb. 43 : 777-780.

Techapun, C., Charoenrat, T., Watanabe, M., Sasaki, K. and Poosaran, N. 2002. Optimization of thermostable and alkaline-tolerant cellulase-free xylanase production from agricultural waste by thermotolerant *Streptomyces* sp. Ab106, using the central composite experimental design. Biochem. Eng. J. 12 : 99-105.

Techapun, C., Poosaran, N., Watanabe, M. and Sasaki, K. 2003. Optimization of aeration and agitation rates to improve cellulase-free xylanase production by thermotolerant *Streptomyces* sp. Ab 106 and repeated fed-batch cultivation using agricultural waste. J. Biosci. Bioeng. 95 : 298-301.

Trivedi, N., Gupta, V., Kumar, M., Kumari, P., Reddy, C. R. K. and Jha, B. 2011. An alkali-halotolerant cellulase from *Bacillus flexus* isolated from green seaweed *Ulva lactuca*. Carbohyd. Polym. 83 : 891-897.

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.). p. 296-326. New York : John Wiley & Son Inc.

Tseng, M. J., Yab. M. N., Ratanakhanokchai, K., Kyu, K. L. and Chen, S. T. 2002. Purification and characterization of two cellulase free xylanases from an alkaliphilic *Bacillus firmus*. Enzyme. Microb. Tech. 30 : 590-595.

Udomsil, S. and Prasertsan, P. 2009. Separation of oil and solids from palm oil mill effluent by biological method using enzyme and microorganism. Srinakharinwirot. J. Sci. Technol. 1(2) : 125-134.

Van Dyk, J. S., Sakka, M., Sakka, K. and Pletschke, B. I. 2009. The cellulolytic and hemi-cellulolytic system of *Bacillus licheniformis* SVD1 and the evidence for production of a large multi-enzyme complex. Enzyme. Microb. Tech. 45 : 372-378.

Van Dyk, J. S., Sakka, M., Sakka, K. and Pletschke, B. I. 2010. Identification of endoglucanase, pectinase and mannanases in the multi-enzyme complex of *Bacillus licheniformis* SVD1. Enzyme. Microb. Tech. 47 : 112-118.

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.

Wah, W. P., Sulaiman, N. M., Nachiappan M. and Varadaraj, B. 2002. Pre-treatment and membrane ultrafiltration using treated palm oil mill effluent (POME). Songklanakarin J. Sci. Technol. (suppl.). 24 : 891-898.

Wang, C. Y., Hsieh, Y. R., Ng, C. C., Chan, H., Lin, H. T., Tzeng, W. S. and Shyu, Y. T. 2009. Purification and characterization of a novel halostable cellulase from *Salinivibrio* sp. strain NTU-05. Enzyme. Microb. Tech. 44 : 373-379.

Weber, J. and Agblevor, F. A. 2005. Microbubble fermentation of *Trichoderma reesei* for cellulase production. Process. Biochem. 40 : 669-676.

Wong, P. W., Sulaiman, N. M., Nachiappan, M. and Varadaraj, B. 2002. Pre-treatment and membrane ultrafiltration using treated palm oil mill effluent (POME). Songklanakarin J. Sci. Technol. 24 : 891-898.

Wong, Y. S., Kadir, M. O. A. B. and Teng, T. T. 2009. Biological kinetics evaluation of anaerobic stabilization pond treatment of palm oil mill effluent. Bioresource. Technol. 100 : 4969-4975.

Wu, T. Y., Mohammad, A. W., Jahim, J. Md. and Anuar, N. 2007. Palm oil mill effluent (POME) treatment and bioresources recovery using ultrafiltration membrane: Effect of pressure on membrane fouling. Biochem. Eng. J. 35 : 309-317.

Yejian, Z., Li, Y., Lina, C., Xiuhua, L., Zhijian, M. and Zhenjia, Z. 2008. Startup and operation of anaerobic EGSB reactor treating palm oil mill effluent. J. Environ. Sci. 20 : 658–663.

Yuan, X., Wang, J., Yao, H. and Venant, N. 2005. Separation and identification of endoxylanases from Bacillus subtilis and their actions on wheat bran insoluble dietary fibre. Process. Biochem. 40 : 2339-2343.

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

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

1. กราฟมาตรฐานน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี Phenol sulfuric method ตามวิธีการของ Chaplin (1986)

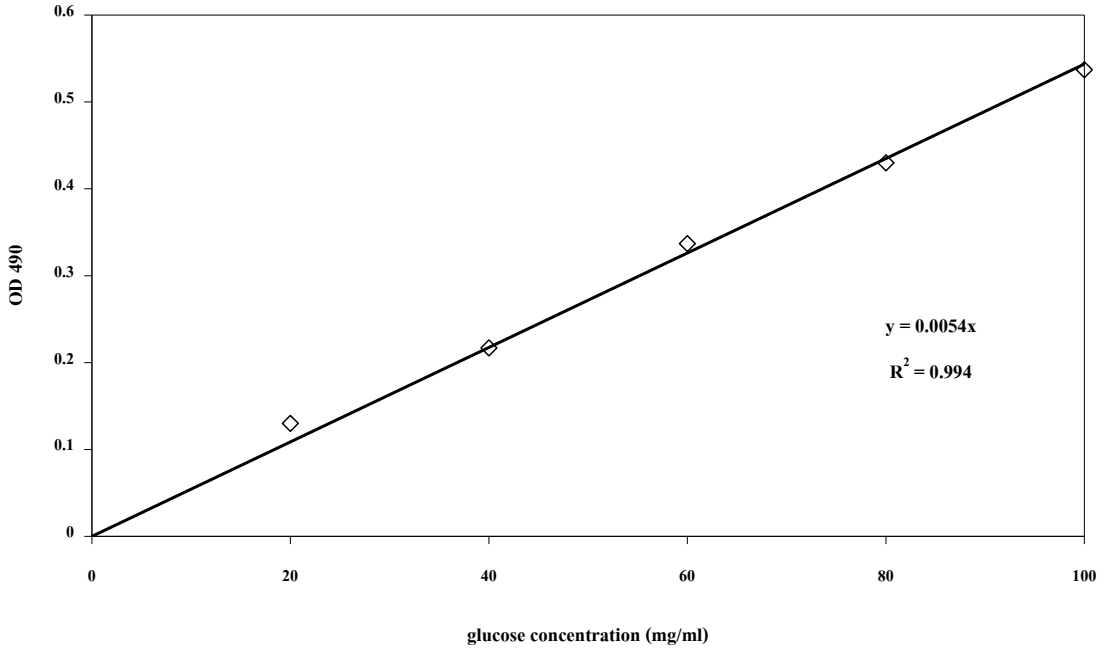


Figure 26. Standard curve of glucose for total sugar.

การคำนวณ

สมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานกลูโคสมีค่าเท่ากับ y = 0.0054x

โดยที่ y คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

x คือ ปริมาณน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานเทียบเป็นปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม (กรัมต่อลิตร)

เพราะฉะนั้นปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในน้ำทิ้ง = 0.0054 / ค่าดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร

จากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม (กรัมต่อลิตร)

2. กราฟมาตรฐานโปรตีนตามวิธีการของ Lowry (1951)

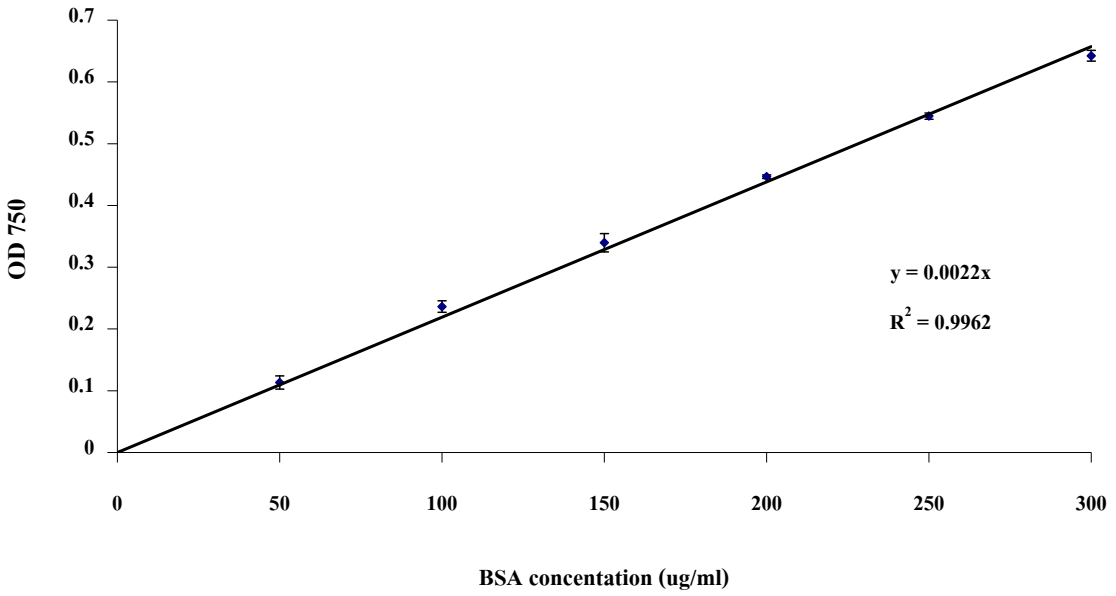


Figure 27.Standard curve of bovine serum albumin (ug/ml)

3. กราฟมาตรฐานน้ำตาลตามวิธีการดีเอ็นเอส (DNS method) (Miller, 1959)

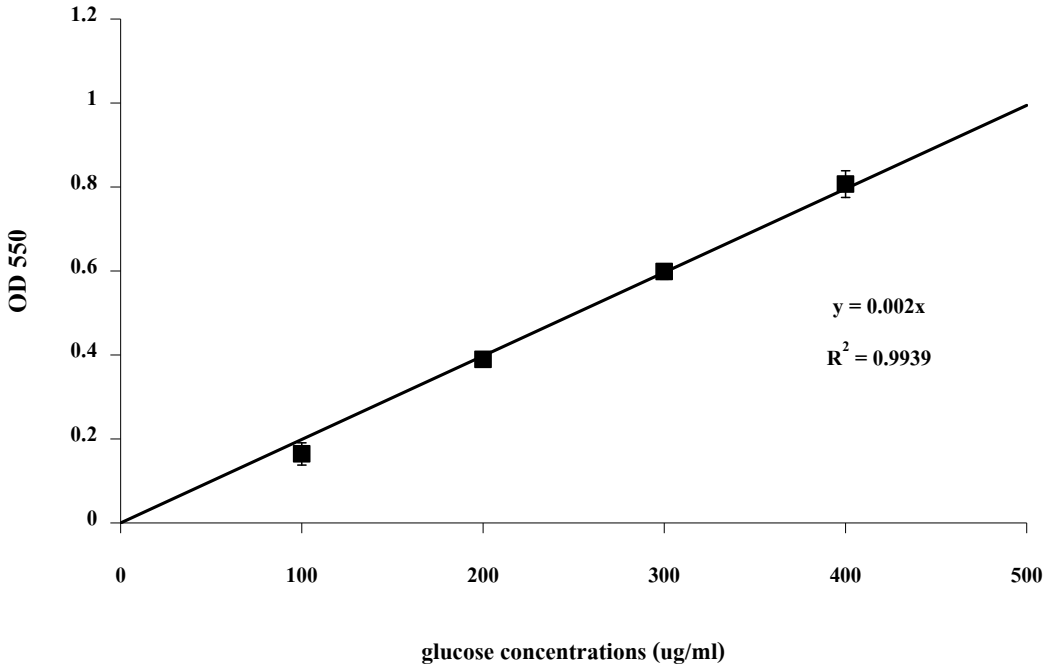


Figure 28. Standard curve of glucose (ug/ml)

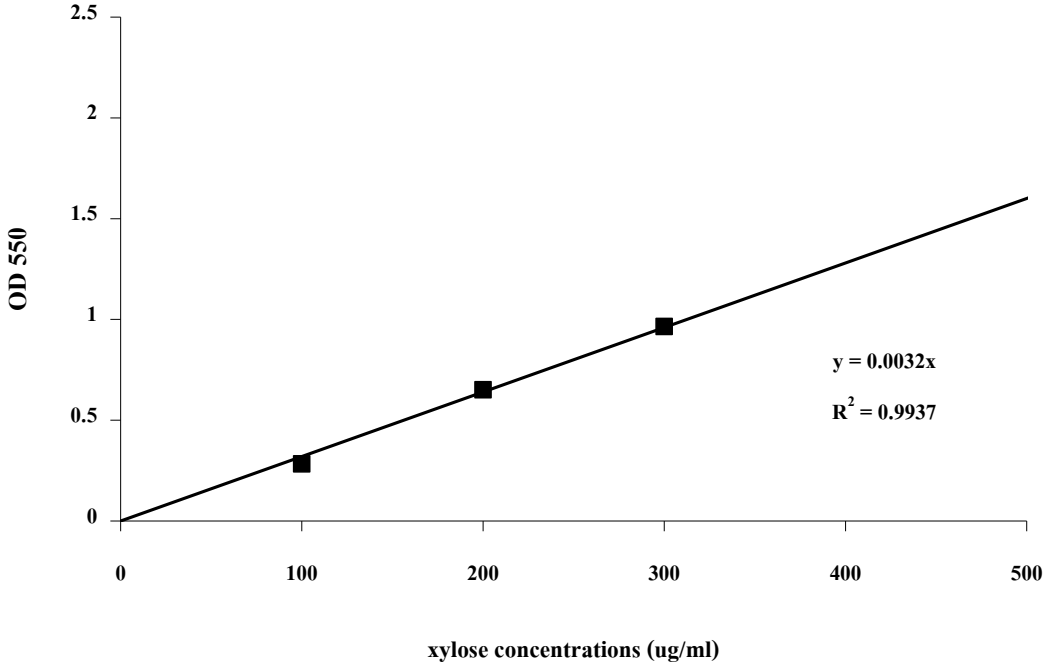


Figure 29. Standard curve of xylose (ug/ml)

ภาคผนวก ข

วิธีการวิเคราะห์

1. ซีโอดี (APHA, AWWA and WPCF, 1985)

อุปกรณ์

1.อุปกรณ์กลั่นไหลกลับ

1.1 ขวดก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตร

1.2 เครื่องควบแน่น

1.3 เตาให้ความร้อน

2. บิวเรต

สารเคมี

1. สารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมตเข้มข้น 0.025 นอร์มอล

สารละลายโพแทสเซียมไดโครเมตซึ่งอบแห้งที่ 103 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จำนวน 12.259 กรัมในน้ำกลั่น เติมกรดซัลฟามิก 0.12 กรัม แล้วเจือจางจนมีปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

2. สารละลายกรดซัลฟูริก (Sulfuric acid reagent)

สารละลายซิลเวอร์ซัลเฟต 22 กรัม ในกรดซัลฟิวริกเข้มข้นบรรจุขวดขนาด 1 ปอนด์ (2.56 ลิตร) เนื่องจากซิลเวอร์ซัลเฟตละลายน้ำยากมากอาจใช้เวลา 1-2 วัน จึงจะละลายหมด

3. สารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต (ferrous ammonium sulphate)

3.1 การเตรียมสารละลาย

ละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตจำนวน 39 กรัม ในน้ำกลั่น เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 20 มิลลิลิตร ทำให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

3.2 การหาความเข้มข้นของสารละลาย

ปิเปตสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมต จำนวน 10 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติม Sulfuric acid reagent 30 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้เย็นไทเตรตด้วยสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต เติมเฟอร์โรอิน 2-3 หยด เป็นอินดิเคเตอร์

ความเข้มข้น (นอร์มอล) = (ปริมาณสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต (มิลลิลิตร)) / (ปริมาณสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต (มิลลิลิตร))

4. สารละลายเฟอร์โรอิน

ละลาย 1-10 ฟีแนนโทรลีนโมโนเดรตจำนวน 1.485 กรัม และเฟอร์รัสซัลเฟตจำนวน 0.695 กรัม เติมน้ำจนปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

5. ซิลเวอร์ซัลเฟตชนิดผง

6. เมอคิวรี่ซัลเฟตชนิดบริสุทธิ์หรือผงใช้เป็นตัวกำจัดอนุภาคคลอไรด์ในอัตราส่วน $HgSO_4$ ต่อ Cl- เท่ากับ 10:1

7. กรดซัลฟามิก ใช้ในกรณีที่กำจัดไนเตรตเท่านั้น

วิธีการ

1. เติมเมอคิวรี่ซัลเฟต 0.4 กรัม ลงในขวดกลม

2. เติมตัวอย่าง 20 มิลลิลิตรหรือส่วนของตัวอย่างที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 20 มิลลิลิตร

3. เติมสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมต 10 มิลลิลิตร และลูกแก้ว 3-5 เม็ด

4. ค่อย ๆ เติมกรดซัลฟูริกปริมาณ 30 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันเพื่อละลายเมอคิวรี่ซัลเฟต ควรทำให้เย็นขณะเขย่า เพื่อหลีกเลี่ยงการสูญเสียของสารที่เป็นไอในตัวอย่าง (อาจแช่ในอ่างน้ำ)

5. กลั่นด้วยอุปกรณ์กลั่นไหลกลับประมาณ 2 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็น

6. ไทเตรตสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมตที่เกินพอด้วยสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต ใช้เฟอร์โรอินเป็นอินดิเคเตอร์เมื่อถึงจุดยุติสีจะเปลี่ยนจากสีเขียวไปเป็นสีน้ำตาลปนแดง

7. ทำแบลงค์โดยใช้น้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร แทนตัวอย่างน้ำทำเช่นเดียวกับตัวอย่าง (ข้อ 1-6)

การคำนวณ

ซีโอดี (กรัมต่อลิตร) = $[(A-B) \times N \times 8 \times 1000] /$ ปริมาณตัวอย่าง (ลิตร)

A คือ ปริมาณสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ไทเตรตแบลงค์

B คือ ปริมาณสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ไทเตรตตัวอย่าง

N คือ ความเข้มข้นของสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต (นอร์มอล)

2. ของแข็งทั้งหมด (Total solids) (APHA, AWWA and WPCF, 1985)

อุปกรณ์

1. ถ้วยกระเบื้องสำหรับระเหย
2. ตู้อบที่ควบคุมอุณหภูมิได้
3. อ่างไอน้ำ
4. โถดูดความชื้น
5. เครื่องชั่งน้ำหนัก

วิธีการ

1. นำถ้วยระเหยล้างให้สะอาด อบให้แห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำให้เย็นในโถดูดความชื้นแล้วชั่งน้ำหนักที่แน่นอน
2. ตวงตัวอย่าง 50 มิลลิลิตร หรือน้อยกว่าใส่ลงในถ้วยระเหยที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอน
3. นำไประเหยให้แห้งในอ่างไอน้ำ
4. อบให้แห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
5. ทำให้เย็นในโถดูดความชื้น
6. ชั่งน้ำหนัก

คำนวณ

ของแข็งทั้งหมด = ([น้ำหนักของแข็ง (กรัม)] / ลิตรของตัวอย่าง)

3.ของแข็งแขวนลอย (Total Suspended Solids) (APHA, AWWA and WPCF, 1985)

อุปกรณ์

1. Glass filter disks (What man GF/C, 5.5 cm)
2. Filter holder อาจใช้ Membrane filter holder หรือ gooch crucible
3. เครื่องดูดอากาศ
4. ตู้อบที่ควบคุมอุณหภูมิได้ที่ 105 องศาเซลเซียส
5. โถดูดความชื้น
6. เครื่องชั่งละเอียด

วิธีการ

1. เอา gooch ซึ่งเตรียมใส่ในที่ดูดอากาศ ทำกระดาษกรองให้เปียกด้วยน้ำกลั่นเปิดเครื่องดูดอากาศ

2. วัดปริมาตรตัวอย่าง 10 มิลลิลิตรแล้วกรองล้าง 3 ครั้งด้วยน้ำกลั่นครั้งละประมาณ 10 มิลลิลิตร

3. ใช้เครื่องดูดอากาศดูดจนแห้ง นำไปอบให้แห้งที่ 105 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง ทำให้เย็นในโถดูดความชื้นและชั่งน้ำหนัก

การคำนวณ

ของแข็งแขวนลอย (กรัมต่อลิตร) = ([น้ำหนักของแข็งแขวนลอย(กรัม)] / ลิตรของตัวอย่าง)

4. น้ำหนักแห้งของตะกอน (ดัดแปลงจาก A.O.A.C., 1990)

วิธีการ

1. นำถ้วยระเหยล้างให้สะอาด อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำให้เย็นในโถดูดความชื้นแล้วชั่งน้ำหนักที่แน่นอน

2. นำน้ำทิ้งไปหมุนเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที 4 องศาเซลเซียส 15 นาที

3. เทน้ำทิ้งส่วนบนออก

4. ใส่น้ำกลั่นในหลอด centrifuge เขย่าจนไม่มีตะกอนติดที่ก้นหลอด

5. เทลงในถ้วยกระเบื้องที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอน

6. อบให้แห้งในตูอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส

7. ทำให้เย็นในโถดูดความชื้นประมาณ 45 นาที

8. ชั่งน้ำหนัก

การคำนวณ

น้ำหนักแห้งของตะกอน (กรัมต่อลิตร) = ([น้ำหนักของตะกอน (กรัม)] / ลิตรของตัวอย่าง)

5. ปริมาณน้ำมันและกรีส (Oil and Grease) (APHA, AWWA and WPCF, 1985)

อุปกรณ์

1. เครื่องมือที่ใช้สำหรับสกัดไขมัน

2. เครื่องชั่งละเอียด

3. โถดูดความชื้น

4. ตู้อบที่ควบคุมอุณหภูมิได้ 105 องศาเซลเซียส

5. เครื่องดูดอากาศ

6. Buchner funnel

7. ผ้าขาวบาง

สารเคมี

1. ปิโตรเลียมอีเทอร์

2. กระดาษกรอง

3. Diatomaceous-silica filter suspension (10 กรัมต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร)

4. ผ้าขาวบาง

วิธีการ

1. วางกระดาษกรองใน Buchner funnel แล้วเทสารละลาย Diatomaceous-silica filters suspension 100 มิลลิลิตร ใช้เครื่องดูดอากาศดูด ล้างด้วยน้ำกลั่นประมาณ 10 มิลลิลิตรจนกระทั่งแห้ง

2. กรองตัวอย่างที่เตรียมไว้และดูดให้แห้ง

3. ใช้ปากคีบหยิบกระดาษกรองออกมา ม้วนกระดาษกรองเข้าด้วยกันแล้วห่อด้วยผ้าขาวบางนำไปอบที่ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

4. ใส่ลงในซอคเลต

5. เติมสารตัวทำละลายปิโตรเลียมอีเทอร์ลงในขวดสกัดไขมัน 150 มิลลิลิตรแล้ววางบนเตา

6. ประกอบอุปกรณ์ชุดสกัด พร้อมทั้งเปิดน้ำหล่ออุปกรณ์ควบแน่นและปิดสวิตซ์ให้ความร้อน

7. ใช้เวลาในการสกัด 4 ชั่วโมง เมื่อครบแล้วกลั่นเก็บสารละลายจนเหลือสารละลายในขวดกลมเพียงเล็กน้อยนำหลอดใส่ตัวอย่างออกจากซอคเลต

8. นำขวดสกัดไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส จนแห้งใช้เวลาประมาณ 30 นาที

9. ชั่งน้ำหนัก

การคำนวณ

ปริมาณน้ำมันและกรีส (กรัมต่อลิตร) = ([น้ำหนักของสารที่สกัดได้ (กรัม)] / ลิตรของตัวอย่าง)

6. น้ำมันในตะกอน (ดัดแปลงจาก A.O.A.C., 1990)

อุปกรณ์

1. เครื่องมือที่ใช้สำหรับสกัดไขมัน
2. เครื่องชั่งละเอียด
3. โถดูดความชื้น
4. ตู้อบที่ควบคุมอุณหภูมิได้ 105 องศาเซลเซียส

สารเคมี

1. ปิโตรเลียมอีเทอร์
2. กระดาษกรอง

วิธีการ

1. ม้วนกระดาษกรองที่มีตะกอนจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มเข้าด้วยกัน
2. ใส่ลงในซอคเลต
3. เติมสารตัวทำละลายปิโตรเลียมอีเทอร์ลงในขวดสกัดไขมัน 150 มิลลิลิตรแล้ววางบนเตา
4. ประกอบอุปกรณ์ชุดสกัด พร้อมทั้งเปิดน้ำหล่ออุปกรณ์ควบแน่นและปิดสวิทซ์ให้ความร้อน
5. ใช้เวลาในการสกัด 4 ชั่วโมง เมื่อครบแล้วกลั่นเก็บสารละลายจนเหลือสารละลายในขวดกลมเพียงเล็กน้อยนำหลอดใส่ตัวอย่างออกจากซอคเลต
6. นำขวดสกัดไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส จนแห้งใช้เวลาประมาณ 30 นาที
7. ชั่งน้ำหนัก

การคำนวณ

ปริมาณของน้ำมันในตะกอน = ([น้ำหนักของน้ำมัน (กรัม)] / ลิตรของตัวอย่าง)

7.เถ้า (A.O.A.C., 1990)

อุปกรณ์

1. เตาเผา
2. ถ้วยกระเบื้องเคลือบ
3. โถดูดความชื้น

4. เครื่องชั่งไฟฟ้า

วิธีการ

1. เผาถ้วยกระเบื้องเคลือบในเตาเผาที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 3 ชั่วโมง ปิดสวิทซ์เตาเผาแล้วรอประมาณ 30-45 นาที เพื่อให้อุณหภูมิภายในเตาเผาลดลงก่อน แล้วนำออกจากเตาเผาใส่โถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้องแล้วชั่งน้ำหนัก

2. เผาซ้ำอีกครั้งละประมาณ 30 นาที และกระทำเช่นข้อ 1 จนได้ผลต่างของน้ำหนักของทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

3. ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักแน่นอนประมาณ 1-2 กรัม ใส่ในถ้วยกระเบื้องเคลือบซึ่งทราบน้ำหนักแล้ว นำไปเผาในตู้ควันจนหมดควัน แล้วจึงนำเข้าเตาเผา ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 600 องศาเซลเซียส และกระทำเช่นเดียวกับข้อ 1-2

การคำนวณ

ปริมาณเถ้าคิด (กรัมต่อลิตร) = ([น้ำหนักตัวอย่างหลังเผา (กรัม)]/ลิตรของตัวอย่าง)

8. ไนโตรเจน

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ย่อยโปรตีน ประกอบด้วยเตาย่อยและเครื่องดักจับไอกรด
2. อุปกรณ์กลั่นโปรตีน (Markham Scmi-micro Kjedahl Distillation Apparatus
3. ขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตรและขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร
4. ปิเปตขนาด 5 และ 10 มิลลิลิตร
5. บิวเรตต์ขนาด 25 มิลลิลิตร
6. ลูกแก้ว
7. เครื่องชั่งไฟฟ้า

สารเคมี

1. สารผสมระหว่างคอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) และโพแทสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4) อัตราส่วน 1:10
2. กรดซัลฟูริกเข้มข้น
3. โซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้นร้อยละ 60
4. กรดบอร์ริกที่มีความเข้มข้นร้อยละ 4
5. กรดเกลือที่มีความเข้มข้น 0.02 นอร์มอล
6. อินดิเคเตอร์ เป็นสารผสมระหว่าง เมทิล เรด เมทิลีนบลู และโบรโมครีซอลกรีน

วิธีการ

1. ปิเปตตัวอย่าง 15 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดย่อยโปรตีนและทำแบลงค์ด้วย

2. ใส่สารผสม $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ และ K_2SO_4 ปริมาณ 5 กรัม

3. เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นปริมาณ 20 มิลลิลิตร

4. วางหลอดย่อยในเตาเผาแล้วประกอบสายยางระหว่างสายครอบขวดใส่ด่างและเครื่องดักจับไอกรดให้เรียบร้อย

5. เปิดสวิทซ์เครื่องดักจับไอกรดและเตาย่อย ตั้งอุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที จากนั้นปรับเพิ่มอุณหภูมิเป็น 400 องศาเซลเซียส ย่อยต่ออีก 60 นาที จนได้สารละลายใส

6. ปล่อยทิ้งให้เย็น

7. นำมาถ่ายลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร และใช้น้ำกลั่นล้างหลอดย่อยให้หมดสารละลายตัวอย่าง แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร เก็บไว้กลั่นต่อไป

ขั้นตอนการกลั่นและไทเทรต

1. จัดอุปกรณ์ แล้วเปิดสวิทซ์ให้ความร้อน และเปิดน้ำหล่อเย็นเครื่องควบแน่นด้วย

2. นำขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุกรดบอร์ริก (เข้มข้นร้อยละ 4) ปริมาณ 5 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ซึ่งเติมอินดิเคเตอร์เรียบร้อยแล้วไปรองรับของเหลวที่กลั่นได้ โดยให้ส่วนปลายของอุปกรณ์ควบแน่นจุ่มลงในสารละลายกรดนี้

3. ดูดสารละลายตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในช่องตัวอย่าง แล้วเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ลงไป 20 มิลลิลิตร

4. กลั่นประมาณ 10 นาที ล้างปลายอุปกรณ์ควบแน่นด้วยน้ำกลั่นลงในขวดรองรับ

5. ไทเทรตสารละลายที่กลั่นได้ด้วยกรดเกลือที่มีความเข้มข้น 0.02 นอร์มอล จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีม่วง

การคำนวณ

ไนโตรเจน = [(ปริมาตร HCl ที่ใช้ไทเทรตตัวอย่าง) – (ปริมาตร HCl ที่ใช้ไทเทรต)

$\times 0.02 \times 14.007] /$ ลิตรของตัวอย่าง

9. การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี Phenol sulfuric method ตามวิธีการของ Chaplin (1986)

สารเคมี

1. สารละลายฟีนอลร้อยละ 5 (น้ำหนักต่อปริมาตร)

2. กรดซัลฟูริกเข้มข้น

วิธีการ

1. วิธีการเตรียมกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส

1.1 เตรียมสารละลายของน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 0, 10, 20, 40, 60 และ 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในน้ำกลั่น

1.2 ปิเปตสารละลายในข้อ 1.1 มาความเข้มข้นละ 200 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง (สำหรับแบลงค์ใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายน้ำตาลกลูโคส)

1.3 เติมสารละลายฟีนอลปริมาณ 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

1.4 เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 1 มิลลิลิตรอย่างรวดเร็วโดยเติมให้สัมผัสสารละลายโดยตรง (ไม่สัมผัสข้างหลอด)

1.5 ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที เขย่าแรง ๆ และตั้งทิ้งไว้ 30 นาที ผสมให้เข้ากันจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร

1.6 นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสและค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

2. วิธีการวิเคราะห์ตัวอย่าง

2.1 ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่ผ่านการเจือจางแล้ว ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองแล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดตามวิธีการข้อ 1 (Figure 26 ในภาคผนวก ก)

10. ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry และคณะ (1951)

สารเคมี

1. สารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ร้อยละ 2 ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 0.1 นอร์มอล (สาร A)
2. สารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$) ร้อยละ 0.5 (สาร B)
3. สารละลายโซเดียมโปแตสเซียมทาร์เทรตร้อยละ 1 (สารC)
4. สารผสมระหว่างสาร A : B : C ในอัตราส่วน 98 : 1 : 1 (สาร D, ผสมก่อนใช้)
5. สารผสมระหว่าง Folin-ciocateau reagent และน้ำในอัตราส่วน 1 : 1 (สาร E ผสมก่อนใช้)

วิธีการ

1. ใช้สารละลายตัวอย่างที่ต้องการหาโปรตีน 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย D ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้นาน 10 นาที

2. เติมสารละลาย E ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร

3. เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้นาน 30 นาที

4. วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่เตรียมตัวอย่างเป็นแบล็งก์โดยทำตามขั้นตอน 1-4

5. คำนวณปริมาณโปรตีนโดยเปรียบเทียบกับกราฟโปรตีนมาตรฐาน

6. เตรียมกราฟโปรตีนมาตรฐานโดยใช้ BSA ความเข้มข้น 50 -300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และทำตามขั้นตอนข้อ 1-4 โดยใช้สารละลายโปรตีนแทนสารตัวอย่าง

7. นำข้อมูลที่ได้เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของปริมาณโปรตีน BSA ดังแสดงใน Figure 27 (ภาคผนวก ก)

11. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีการดีเอ็นเอส (DNS method) (Miller, 1959)

สารเคมี

1. สารละลายดีเอ็นเอส (Dinitrosalicylic acid reagent solution) ร้อยละ 1 ซึ่งประกอบด้วย

1.1 กรดไดไนโตรซาลิกไซลิก (Dinitrosalicylic acid) 10 กรัมต่อลิตร

1.2 ฟีนอล (Phenol) 2 กรัมต่อลิตร

1.3 โซเดียมซัลไฟต์ (Sodium sulfite) 0.5 กรัมต่อลิตร

1.4 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide solution) 10 กรัมต่อลิตร

1.5 โปแตสเซียมโซเดียมทาร์เทรต (Potassium sodium tartrate) 40 กรัมต่อลิตร

การเตรียมสารวิเคราะห์ (สารละลายดีเอ็นเอส)

ค่อย ๆ ละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิกในสารละลายไซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 1 เติม ฟีนอล โซเดียมซัลไฟล์ และโปแทสเซียมโซเดียมทาร์เทรต ตามลำดับ สารละลายที่ได้ให้เก็บไว้ในที่มืด (ในขวดสีชา) สารละลายนี้จะทำปฏิกิริยากับน้ำตาลรีดิวซ์หรือหมู่คาร์บอนิลอิสระ (C=O) ภายใต้อุณภูมิสูง (95 องศาเซลเซียส) เปลี่ยนสีของสารละลายจากสีเหลืองส้มเป็นสีน้ำตาลจนถึงสีน้ำตาลเข้ม ดัง Figure 30

oxidation

aldehyde group ----------> carboxyl group

reduction

3,5-dinitrosalicylic acid------- ----------> 3-amino,5-nitrosalicylic acid

ต้ม

สีเหลืองส้ม สีน้ำตาล

Figure 30. The reaction of dinitrosalicylic acid method

วิธีการ

1. นำสารละลายตัวอย่างที่เจือจางเหมาะสมปริมาณ 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายดีเอ็นเอสปริมาณ 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

2. นำสารละลายที่ผสมไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แช่น้ำเย็นทันที

3. เติมน้ำกลั่นปริมาณ 5 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่เตรียมตัวอย่างเป็นแบล็งก์โดยทำตามขั้นตอน 1-3

4. คำนวณปริมาณน้ำตาลโดยเปรียบเทียบกับกราฟน้ำตาลมาตรฐาน

5. เตรียมกราฟน้ำตาลมาตรฐานโดยใช้น้ำตาล (กลูโคสและไซโลส) ที่ความเข้มข้น 100 -500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และทำตามขั้นตอนข้อ 1-3 โดยใช้สารละลายน้ำตาลแทนสารตัวอย่าง

6. นำข้อมูลที่ได้เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของปริมาณน้ำตาลกลูโคสและไซโลสดังแสดงใน Figure 28 และ Figure 29 (ภาคผนวก ก)

12. วิธีการคองโกเรด (Congo red method) (ดัดแปลงตามวิธีการของ Shah *et al*., 1999 และ Teather and Wood, 1982)

สารเคมี

1. สารละลาย โพแตสเซียมไฮดรอกไซด์ ร้อยละ 1 ในแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 50
2. สารละลายคองโกเรดร้อยละ 1 ละลายในข้อ 1
3. สารละลายโซเดียมครอไรด์ในน้ำกลั่นเข้มข้น 1 โมลาร์

วิธีการ

1. เทสารละลายคองโกเรดลงบนจานอาหารที่ทดสอบ ทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที

2. เทสารละลายออก จากนั้นล้างด้วย สารละลายโซเดียมครอไรด์เข้มข้น 1 โมลาร์ 2-3 ครั้ง
3. สังเกตุวงใสรอบโคโลนีบนอาหารซีเอ็มซี

13. ปริมาณเซลลูโลส (A.O.A.C,1990)

สารเคมี

1. สารละลาย Acid detergent
2. decahydronapthalene
3. อะซิโตน
4. กรดซัลฟุริกเข้มข้นร้อยละ 72

วิธีการ

1. ชั่งกากตะกอนดีแคนเตอร์ซึ่งผ่านการสกัดไขมันออกแล้วปริมาณ 1.0 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ทรงสูงขนาด 600 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Acid detergent ปริมาณ 100 มิลลิลิตรและ decahydronapthalene ปริมาณ 2 มิลลิลิตร
2. ให้ความร้อนจนเดือดเป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นลดความร้อนลงให้เดือดเบา ๆ เป็นเวลา 60 นาที
3. กรองผ่านครูซิเบิลที่ทราบน้ำหนักแน่นอนแล้ว (W_1) โดยใช้แรงดูดสุญญากาศดูดเบา ๆ จากนั้นล้างตัวอย่างที่ติดอยู่ในบีกเกอร์ลงครูซิเบิลด้วยน้ำร้อน 3-5 ครั้ง
4. จากนั้นจึงดูดด้วยเครื่องดูดสุญญากาศ และล้างต่อด้วยอะซิโตนปริมาณเล็กน้อย 2-3 ครั้ง
5. ใช้เครื่องดูดสุญญากาศดูดให้แห้ง นำครูซิเบิลไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง หรืออบจนกระทั่งชั่งน้ำหนักได้คงที่ (W_2)
6. เติมกรดซัลฟุริกเข้มข้นร้อยละ 72 (แช่เย็นที่อุณหภูมิประมาณ 15 องศาเซลเซียส) ลงในครูซิเบิล 15 มิลลิลิตรเติมกรดเพิ่มลงไปทุก ๆ 1 ชั่วโมง พร้อมคนอย่างสม่ำเสมอเป็นเวลา 3 ชั่วโมง
7. นำครูซิเบิลไปกรองเอากรดออก โดยใช้เครื่องดูดสุญญากาศ แล้วล้างด้วยน้ำร้อนจนหมดกรด อบครูซิเบิลที่ได้ ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ตลอดคืน
8. ทำให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนัก (W_3) นำครูซิเบิลไปเผาที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง หรือจนกว่าไม่มีคาร์บอน ทำให้เย็นในโถดูดความชื้นแล้วชั่งน้ำหนัก (W_4)

การคำนวณ

$$\text{Acid detergent fiber (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{(W2-W1) \times 100}{\text{น้ำหนักของตัวอย่างเริ่มต้น(กรัม)}}$$

$$\text{ปริมาณลิกนิน (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{(W3-W4) \times 100}{\text{น้ำหนักของตัวอย่างเริ่มต้น(กรัม)}}$$

$$\text{ปริมาณเซลลูโลส (เปอร์เซ็นต์)} = \text{Acid detergent fiber-ปริมาณลิกนิน}$$

โดยที่

W1 =น้ำหนักครูซิเบิลเปล่า (กรัม)

W2 =น้ำหนักครูซิเบิลและตัวอย่างหลังผ่านสารละลาย Acid detergent (กรัม)

W3 = น้ำหนักครูซิเบิลและตัวอย่างหลังผ่านกรดซัลฟุริก (กรัม)

W4 =น้ำหนักครูซิเบิลและตัวอย่างหลังเผา(กรัม)

ภาคผนวก ค

1. การวิเคราะห์ลำดับเบสของแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus subtilis* AH73

GACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTT
GCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGA
CTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGT
TCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGC
TAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGT
GATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAG
GGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAG
GTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGC
GGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG
GTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGC
GGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAAC
TGGGGAACTTGAGTGCAAAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGC
GTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACTGACGC
TGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCG
TAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGC
ATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGAC
GGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACC
TTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGC
AGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAG
TCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACTCTAA
GGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCC
CCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAAC
CGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACT
CGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATAC
GTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAG
TCGGTGAGGTAACCTTTTAGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGACAGATGATGGGG

Job Title: AH73

BLASTN 2.2.18 (Mar-02-2008)
RID: XMW1WWZH016

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS,environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)
6,578,446 sequences; 23,201,445,566 total letters
Query=
Length=600

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AY162129.1	Bacillus subtilis strain WP1-21 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1109	1109	100%	0.0	100%
EU442611.1	Bacillus sp. CPIS4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1103	1103	100%	0.0	99%
EU442608.1	Bacillus sp. CPIS1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1103	1103	100%	0.0	99%
EU418600.1	Bacillus subtilis strain HOB2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1103	1103	100%	0.0	99%
EU366385.1	Bacillus subtilis strain IV8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1103	1103	100%	0.0	99%
EU370261.1	Bacillus subtilis strain YS45 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1103	1103	100%	0.0	99%
EU024822.1	Bacillus subtilis strain MJP1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1103	1103	100%	0.0	99%
EU360726.1	Bacillus subtilis strain BF20 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1103	1103	100%	0.0	99%
AM900349.1	Bacillus subtilis partial 16S rRNA gene, strain JC3	1103	1103	100%	0.0	99%
EU338361.1	Bacillus subtilis strain EAG-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1103	1103	100%	0.0	99%
EU332685.1	Bacillus sp. JP-D 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; plastid	1103	1103	100%	0.0	99%

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AB330409.1	Bacillus sp. BAM522 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	1103	1103	100%	0.0	99%
EU304935.1	Bacillus subtilis strain 3EC4A10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1103	1103	100%	0.0	99%
EU304927.1	Bacillus subtilis strain 3EC4A2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1103	1103	100%	0.0	99%
EU304917.1	Bacillus subtilis strain 3EC2A10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1103	1103	100%	0.0	99%
EU326481.1	Bacillus subtilis strain K22-13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1103	1103	100%	0.0	99%
EU271856.1	Bacillus sp. DN9(2007) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1103	1103	100%	0.0	99%
EU221345.1	Bacillus subtilis strain PAB1C8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1103	1103	100%	0.0	99%
EU221334.1	Bacillus subtilis strain JM1C6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1103	1103	100%	0.0	99%
EU221333.1	Bacillus subtilis strain JM1C5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1103	1103	100%	0.0	99%
EU221332.1	Bacillus subtilis strain JM1C1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1103	1103	100%	0.0	99%
EU262981.1	Bacillus subtilis strain XJPL-YB-50 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1103	1103	100%	0.0	99%
EU262980.1	Bacillus subtilis strain XJPL-YB-23 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1103	1103	100%	0.0	99%
EU281634.1	Bacillus sp. D4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1103	1103	100%	0.0	99%
EU281631.1	Bacillus sp. D1(2007) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1103	1103	100%	0.0	99%

gb|AY162129.1| Bacillus subtilis strain WP1-21 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=1468

Score = 1109 bits (600), Expect = 0.0
Identities = 600/600 (100%), Gaps = 0/600 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
Query  1    GCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGA  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  71   GCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGA  130

Query  61   AACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTT  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  131  AACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTT  190

Query  121  CGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCAC  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  191  CGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCAC  250

Query  181  CAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACG  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  251  CAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACG  310

Query  241  GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACG  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  311  GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACG  370

Query  301  GAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGA  360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  371  GAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGA  430

Query  361  ACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAA  420
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  431  ACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAA  490

Query  421  CTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCG  480
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  491  CTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCG  550

Query  481  TAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAG  540
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  551  TAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAG  610

Query  541  GGTCATTGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAAAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCG  600
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  611  GGTCATTGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAAAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCG  670
```

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นายสัญทัศน์ สินจรูญศักดิ์

รหัสประจำตัวนักศึกษา 4911020064

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2548

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Santat Sinjaroonsak, Poonsuk Prasertsan and Aran H-Kittikun. 2008. Selection of cellulase and xylanase producing thermophillic *Bacillus* sp. from soil samples around waste water pound of palm oil mill. The 9th National Grad Research Conference, Burapha University, Bangsaen Chonburi, Thailand, March 14-15, 2008.