บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

วัสดุ

1. น้ำทิ้ง

ตัวอย่างน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ (decanter effluent) ได้รับอนุเคราะห์จากบริษัทตรังน้ำมันปาล์ม จังหวัดตรัง เก็บตัวอย่างน้ำทิ้งจากท่อน้ำทิ้งของเครื่องดีแคนเตอร์โดยตรง ใส่ภาชนะบรรจุขนาด 60 ลิตร แบ่งน้ำทิ้งใส่ขวดขนาด 1.5 ลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้

2. จุลินทรีย์

เชื้อรา *Rhizopus* sp. ST 29 ที่แยกได้จากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม (บริษัททักษิณปาล์ม จำกัด จังหวัดสุราษฎร์ธานี) โดยวิภูมิ แก้วทอง (2539) ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ ส่วน *Humicola insolens* และ *Thermomyces lanuginosus* ได้จากการแยกเชื้อจากวัสดุท้องถิ่น (น้ำอบไม้ยาง และแกลบ ตามลำดับ)

เก็บรักษาเชื้อทั้งหมดในหลอดอาหารวุ้นเอียง PDA (Potato Dextrose Agar : PDA) เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส สำหรับ *Rhizopus* sp. ST 29 ส่วน *H. insolens* และ *T. lanuginosus* เลี้ยงที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ถ่ายเชื้อใหม่ทุกครั้งก่อนการทดลองเพื่อให้เป็นเชื้อเริ่มต้น

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ

Potato Dextrose Agar (PDA) ประกอบด้วย น้ำสกัดมันฝรั่ง (200 กรัม) น้ำตาล dextrose 20 กรัม ผงวุ้น 13 กรัม และน้ำกลั่น 1 ลิตร

4. สารเคมี

สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ COD น้ำตาลรีดิวซ์ โปรตีน แสดงในภาคผนวก ส่วนสารเคมีสำหรับวิเคราะห์แอคตีวิตี้ของเอนไซม์ดูรายละเอียดในวิธีการ

อุปกรณ์

1. เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่น U – 2000 บริษัท Hitachi
2. เครื่องหมุนเหวี่ยง รุ่น Universal 32/32R บริษัท Universal 32 R
3. เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ บริษัท Lab – Line Instruments Inc.
4. ตู้อบ (Hot air oven) รุ่น MOV 212 บริษัท Sanyo
5. เครื่องชั่ง รุ่น BP 21005 บริษัท Sartorius
6. เครื่อง Larminar air flow รุ่น 527044 บริษัท Hot pack
7. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น SS-325 บริษัท TOMY
8. เครื่องวัดพีเอช (pH meter) รุ่น CG825 บริษัท Schott
9. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ของบริษัท Memmert จำกัด
10. เครื่องวิเคราะห์โปรตีน ซึ่งประกอบด้วย เครื่องย่อย (รุ่น 2006 บริษัท FOSS TECATOR) เครื่องกลั่น (รุ่น 2200 บริษัท FOSs TECA TOR) และตู้ระบายควัน Super Flow
11. อุปกรณ์ชุดสกัดไขมัน (soxhlet apparatus) บริษัท Electrothermal
12. ชุดอุปกรณ์ถังปฏิกรณ์แบบ air – lift (air – lift type bio – reactor) ขนาด 3 ลิตร และ MDL – 6C control type บริษัท BEM B.E. Marubishi จำกัด

การวิเคราะห์

1. การนับจำนวนสปอร์ของเชื้อรา

เจือจางสปอร์ตัวอย่างเชื้อราเริ่มต้นด้วยน้ำกลั่นที่ผสม Tween 80 เข้มข้นร้อยละ 0.1 ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 10 มิลลิลิตร หยดตัวอย่างบนฮีมาไซโตรมิเตอร์ แล้วนับจำนวนสปอร์จากกล้องกำลังขยาย 10 เท่า ปรับความเข้มข้นของสปอร์ให้ได้ 2.4×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร (Karim and Kamil, 1989)

2. น้ำหนักเส้นใยแห้ง หรือปริมาณมวลชีวภาพ (Mycelia dry weight)

กรองตัวอย่างน้ำทิ้งและเส้นใยของเชื้อราปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผ่านผ้าขาวบาง ซึ่งทราบน้ำหนักแน่นอน ล้างเส้นใยด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง จากนั้นนำเส้นใยบนผ้าขาวบาง วางบนจานแก้วเลี้ยงเชื้อที่ทราบน้ำหนักแน่นอน อบให้แห้งในตู้อบอุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส จนแห้งหรือประมาณ 5-6 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบ ใส่ในโถดูดความชื้น ตั้งทิ้งไว้จนเย็นเท่าอุณหภูมิห้อง แล้วชั่งน้ำหนักที่แน่นอน

3. การวัดปริมาณผลผลิตของพอลิเมอร์ชีวภาพที่ยังไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ ตามวิธีของ Juan และคณะ (2001)

หมุนเหวี่ยงแยกตะกอนเซลล์ออกจากตัวอย่างน้ำทิ้งที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที นำเซลล์ที่ได้ไปทำแห้งด้วยเครื่อง freeze dryer จนแห้ง ใช้ตัวอย่าง 40 กรัม เติมร้อยละ 1 ของ sodium dodecyl sulfate (SDS) 500 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ข้ามคืนภายใต้สภาวะที่มีการกวน นำเซลล์ที่ได้ไปหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นอีก 3 ครั้ง นำเซลล์ที่ได้ไปทำ freeze dry ใช้ตัวอย่าง 10 กรัม เติม 1 M NaOH 300 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 2-3 ชั่วโมง โดยภายใต้สภาวะที่มีการกวน นำเซลล์ที่ได้หมุนเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ล้างด้วย 1 M NaOH 3 ครั้ง นำส่วนใสที่ได้มาตกตะกอนด้วยเอทานอลที่เย็น (-20 องศาเซลเซียส) ปริมาณ 4 เท่าของปริมาตรน้ำหมัก ทิ้งไว้ค้างคืนแล้วนำมาหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำตะกอนที่ได้มาอบที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง และชั่งหาน้ำหนักที่ได้

4. แอคติวิตี้ของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส (Carboxymethylcellulase : CMCase ตามวิธีของ Mandels และ Weber (1969)

สารละลายเอนไซม์ที่เจือจางอย่างเหมาะสม 0.5 มิลลิลิตร. ผสมกับ 0.5 มิลลิลิตร Carboxymethylcellulose (CMC) เข้มข้นร้อยละ 1.0 ในซิเตรตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที แล้วหาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่เกิดขึ้นโดยวิธี Nelson–Somogyi (Nelson, 1944 ดูรายละเอียดในภาคผนวก)ในการวิเคราะห์แอคติวิตี้ของเอนไซม์ จะมีชุดควบคุม ซึ่งเติมสารละลายต่างๆเช่นเดียวกับที่กล่าวมาแล้ว แต่ไม่บ่ม นำค่าการดูดการกลืนแสงของชุดควบคุมไปหักออกจากค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการใช้สารละลายเอนไซม์ ก่อนการคำนวณหาแอคติวิตี้ของเอนไซม์ สำหรับ blank จะใช้น้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร แทนปริมาตรของตัวอย่างและสารละลาย CMC (ภาพประกอบภาคผนวกที่ 1)

แอคติวิตี้เอนไซม์ CMCase (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) $= \dfrac{C \times D}{MtV}$

เมื่อ C คือ ปริมาณน้ำตาลกลูโคส โดยเทียบจากกราฟมาตรฐาน

D คือ ค่าการเจือจางตัวอย่างของเอนไซม์

M คือ น้ำหนักโมเลกุลกลูโคส เท่ากับ 180 กรัมต่อโมล

t คือ ระยะเวลาบ่ม (นาที)

V คือ ปริมาตรเอนไซม์ (มิลลิลิตร)

1 ยูนิต หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาย่อยสลายสับสเตรทให้เป็นกลูโคส 1 ไมโครโมล ภายใน 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ทดลอง

5. แอคติวิตี้ของเอนไซม์ไซลาเนส ตามวิธีของ Tang และคณะ (1987)

สารละลายเอนไซม์ที่เจือจางอย่างเหมาะสม 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับ 0.5 มิลลิลิตรของสารละลายไซแลนเข้มข้นร้อยละ 1.0 ในซิเตรตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 บ่มที่อุณหภูมิ 50 องสาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วหาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่เกิดขึ้นโดยวิธี Nelson-Somogyi ในการวิเคราะห์แอคติวิตี้ของเอนไซม์จะมีชุดควบคุม ซึ่งเติมสารละลายต่างๆ เช่นเดียวกับที่กล่าวมาแล้ว แต่ไม่บ่ม นำค่าการดูดการกลืนแสงของชุดควบคุมไปหักออกจากค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการใช้สารละลายเอนไซม์ ก่อนการคำนวณหาแอคติวิตี้ของเอนไซม์ สำหรับ blank จะใช้น้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร แทนปริมาตรของตัวอย่างและสารละลายไซแลน (ภาพประกอบภาคผนวกที่ 2)

แอคติวิตี้เอนไซม์ไซลาเนส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) $= \dfrac{X \times D}{MtV}$

เมื่อ X คือ ปริมาณน้ำตาลไซแลน โดยเทียบจากกราฟมาตรฐาน

D คือ ค่าการเจือจางตัวอย่างของเอนไซม์

M คือ น้ำหนักโมเลกุลไซแลนเท่ากับ 150.13 กรัมต่อโมล

t คือ ระยะเวลาบ่ม (นาที)

V คือ ปริมาตรเอนไซม์ (มิลลิลิตร)

1 ยูนิต หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาย่อยสลายสับสเตรทให้เป็นไซแลน 1 ไมโครโมล ภายใน 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ทดลอง

6. แอคติวิตี้ของเอนไซม์เพคติเนส ตามวิธีของ Elegado และคณะ (1993)

มีการผสมระหว่างร้อยละ 1 polygalacturonic acid ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (ละลายใน acetate buffer, CH_3COONa - CH_3COOH, 0.1M, pH 4.5) และ 2.5 มิลลิลิตร ของสารละลายเอนไซม์ แล้วนำสารผสมบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วหาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่เกิดขึ้นโดยวิธี Nelson-Somogyi ก่อนทำการวัดค่าการดูดกลืนแสง ให้นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที แล้ววัดค่าดูดกลืนแสง 520 nm โดยกราฟมาตรฐานจะให้ α, D-galacturonic acid (ภาพประกอบภาคผนวกที่ 3) ในการวิเคราะห์แอคติวิตี้ของเอนไซม์จะมีชุดควบคุม ซึ่งเติมสารละลายต่างๆเช่นเดียวกับที่กล่าวมาแล้ว แต่ไม่บ่มนำค่าการดูดการกลืนแสงของชุดควบคุมไปหักออกจากค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการใช้สารละลายเอนไซม์ก่อนการคำนวณหาแอคติวิตี้ของเอนไซม์ สำหรับ blank จะใช้น้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร แทนปริมาตรของตัวอย่างและ

สารละลาย α,D-galacturonic acid

$$\text{กิจกรรมเอนไซม์เพคติเนส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)} = \frac{Z \times D}{MtV}$$

เมื่อ Z คือ ปริมาณน้ำตาล α,D- galacturonic acid โดยเทียบจากกราฟมาตรฐาน

D คือ ค่าการเจือจางตัวอย่างของเอนไซม์

M คือ น้ำหนักโมเลกุล α,D- galacturonic acid เท่ากับ 130.123 กรัมต่อโมล

t คือ ระยะเวลาบ่ม (นาที)

V คือ ปริมาตรเอนไซม์ (มิลลิลิตร)

1 ยูนิต หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาย่อยสลายสับสเตรทให้เป็น α, D-galacturonic acid 1 ไมโครโมล ภายใน 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ทดลอง

7. แอคติวิตี้ของเอนไซม์ไลเปส โดยดัดแปลงจากวิธีของ Lee และ Rhee (1993)

เตรียมสารละลาย cupric acetate เข้มข้นร้อยละ 5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในน้ำกลั่นแล้วกรองแยกส่วนไม่ละลายออก ปรับพีเอชเป็น 6.1 โดยใช้ pyridine และเตรียม assay mixture ต่อไปนี้ใส่ในหลวดฝาเกลียวขนาดเล็กประกอบด้วย palm oil solution (palm oil ร้อยละ 10 (w/v) ใน isooctane) 1 มิลลิลิตร, buffer (Tris/malate 100 mM pH 7.0 ที่ประกอบด้วย $CaCl_2$ 10 mM) 0.5 มิลลิลิตร และเอนไซม์ (ใช้สารละลายส่วนใส) 0.2 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส พร้อมเขย่าด้วยความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยเติม 6 N HCl 0.3 มิลลิลิตร. ผสมอย่างรวดเร็ว ทิ้งให้แยกชั้น ดูดชั้นของน้ำมันมาเจือจางกับ isooctane ให้ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติม cupric acetate-pyridine reagent 0.4 มิลลิลิตร ปั่นให้ผสมกันส่วนใสจะเปลี่ยนเป็นสีเขียวอ่อน ทิ้งให้แยกชั้นเอาไปวัดการดูดกลืนแสงที่ OD 715 nm เทียบกับกราฟมาตรฐานที่ใช้กรดปาล์มมิติกเป็นตัวอย่าง (ภาพประกอบภาคผนวกที่ 4)

$$\text{แอคติวิตี้เอนไซม์ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)} = \frac{\text{ปริมาณกรดไขมันอิสระที่เพิ่มขึ้น}}{\text{เวลา X ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้}}$$

1 ยูนิต หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาย่อยสลายสับสเตรทให้เป็นกรดปาล์มมิติก 1 ไมโครโมล ภายใน 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ทดลอง

8. โปรตีน ตามวิธีของ Lowry และคณะ (1951)

เติมสารตัวอย่างที่เจือจางอย่างเหมาะสม 0.5 มิลลิลิตร ในหลอดทดสอบ เติมสารละลาย alkali copper (เตรียมจากสารละลายร้อยละ Na_2CO_3 2 ใน NaOH 0.1 nm 50 มิลลิลิตรกับสารละลาย $CuSO_4 5H_2O$ ร้อยละ 0.5 ใน sodium potassium tartrate ร้อยละ 1.0 ควรเตรียมใน

วันที่ใช้) 3.0 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เติมสารละลาย Folin - ciocateus 0.3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้ววัดค่าดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร

9. ค่าซีโอดี ตามวิธีของ APHA, AWWA และ WPCF (1998)

10. น้ำมันและกรีสในน้ำทิ้ง ตามวิธี ดัดแปลงจาก กรรณิการ์ สิริสิงห (2522)

11. ของแข็งทั้งหมด (Total solid : TS) ตามวิธี APHA, AWWA และ WPCF (1998)

12. ของแข็งแขวนลอย (Suspended solid : SS) ตามวิธี APHA, AWWA และ WPCF (1998)

13. เจดาร์ลไนโตรเจนทั้งหมด ตามวิธี A.O.A.C (1990)

14. ฟอสฟอรัสทั้งหมด วิเคราะห์ตามวิธีมาตรฐาน DIN 38402 A51 ด้วยเครื่องยูวี-สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่น Spectrogant Nova 60 ส่งตัวอย่างวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การวิเคราะห์ข้อ 1-14 รายละเอียดแสดงในภาคผนวก

วิธีการ

1. การทดสอบคุณสมบัติทนร้อนของเชื้อราสายพันธุ์ต่างๆ

ใช้เชื้อที่กำลังเจริญบนอาหารพีดีเอ อายุ 5 วัน โดยตัดบริเวณขอบโคโลนีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร โดยเลี้ยงเชื้อราจำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Humicola insolens, Themomyces langinusus* และ *Rhizopus* sp. ST29 ในจานเพาะเชื้อที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ (PDA) บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส, ชุดควบคุม) และที่อุณหภูมิ 45, 55 และ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน สังเกตการเจริญของเชื้อ โดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี และคัดเลือกจุลินทรีย์ทนร้อนที่เจริญได้อย่างรวดเร็ว เพื่อศึกษาต่อไป

2. การคัดเลือกเชื้อราทนร้อนที่ผลิตพอลิเมอร์ในน้ำทิ้งของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

2.1 คุณลักษณะของน้ำทิ้งเครื่องดีแคนเตอร์

นำน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์จากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มมาวิเคราะห์ค่าซีโอดี, ปริมาณของแข็งทั้งหมด (Total solid : TS), ของแข็งแขวนลอย (Suspended solid : SS), น้ำมันและกรีส, ไนโตรเจน, ฟอสฟอรัส ตามวิธีการที่ระบุในภาคผนวก

2.2 ผลของความเข้มข้นของสารอินทรีย์ในน้ำทิ้งของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

เลี้ยงเชื้อราทนร้อน 3 สายพันธุ์ คือ *H. insolens, T. lanuginosus* และ *Rhizopus* sp. ST29 เตรียมได้จากนำสปอร์ตัวอย่างเชื้อราเริ่มต้นเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ผสม Tween 80 เข้มข้นร้อยละ 0.1 ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วหยดตัวอย่างบนฮีมาไซโตรมิเตอร์ แล้วนับจำนวนสปอร์จากกล้องกำลังขยาย 10 เท่า ปรับความเข้มข้นของสปอร์ให้ได้ 2.4×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยใช้ปริมาณร้อยละ 10 ลงในฟลาสก์ที่บรรจุน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ (หลังการฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในระดับความเจือจางที่ 1:0, 1:1 และ 1:2 และเติม NH_4NO_3 ร้อยละ 0.06 (อารี กังแฮ, 2536) วิเคราะห์ค่าซีโอดีที่ละลายน้ำได้ (Soluble COD) วางฟลาสก์บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิที่เหมาะสม (จากข้อ 1) เป็นเวลา 5 วัน แล้วนำมาวัดค่าพีเอช และการเจริญของเชื้อ โดยวัดในรูปปริมาณมวลชีวภาพ

2.3 เปรียบเทียบการบำบัด การผลิตเอนไซม์ และพอลิเมอร์ของเชื้อราทนร้อน 3 สายพันธุ์

เลี้ยงเชื้อราทนร้อน (จากข้อ 1) ในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิที่เหมาะสม สุ่มตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 5 วัน นำน้ำทิ้งที่ได้จากการเก็บตัวอย่างวัดพีเอช, หาน้ำหนักเซลล์แห้ง, ปริมาณพอลิเมอร์, ศึกษาลักษณะบางประการของพอลิเมอร์ที่ได้, วิเคราะห์แอคติวิตี้ของเอนไซม์ carboxymethylcellulase (CMCase), ไซลาเนส, เพคติเนส, ไลเปส และวิเคราะห์โปรตีนที่ละลายได้, COD, ของแข็งแขวนลอย และของแข็งทั้งหมด

ทดสอบการตกตะกอนของของแข็งทั้งหมด และสารแขวนลอยโดยนำน้ำหมักหลังจากการเก็บเกี่ยวเส้นใยโดยใช้การกรองด้วยผ้าขาวบาง ปล่อยทิ้งไว้เป็นเวลา 6 ชั่วโมง สังเกตและบันทึกการตกตะกอนของของแข็ง และทำการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ผลิตพอลิเมอร์ที่สามารถเก็บเกี่ยวของแข็งทั้งหมดในน้ำทิ้งได้ นำพอลิเมอร์ที่เก็บเกี่ยวของแข็งและสารแขวนลอยไว้ และสารละลายที่เหลือ (หลังการตกตะกอน) มาวิเคราะห์ปริมาณของแข็งทั้งหมด, ค่าน้ำมันและกรีส, ไนโตรเจน

3. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตพอลิเมอร์ของเชื้อราคัดเลือกไว้

เลี้ยงเชื้อราทนร้อนที่มีประสิทธิภาพการเก็บเกี่ยวของแข็ง, สารแขวนลอย และสามารถผลิตพอลิเมอร์จากน้ำทิ้งของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มได้สูงสุด บนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิที่เหมาะสม (จากข้อ 1) เป็นเวลา 4 วัน ตามสภาวะต่อไปนี้

3.1 ผลของแหล่งไนโตรเจน

เลี้ยงเชื้อราทนร้อนที่ได้ในน้ำทิ้งดีแคนเตอร์ ศึกษาการเติมไนโตรเจน ได้แก่ NH_4NO_3, ยูเรีย และปุ๋ย (N-P-K) โดยให้มีปริมาณไนโตรเจน ร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ลงในน้ำทิ้งดีแคนเตอร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตรบรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยงที่ 45 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน ชุดควบคุม คือ ชุดที่ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจน สังเกตและบันทึก เก็บตัวอย่างทั้งฟลาสก์ นำตัวอย่างไปวัดพีเอช, วิเคราะห์ค่าซีโอดี, การเจริญของเชื้อ และปริมาณพอลิเมอร์ คัดเลือกแหล่งไนโตรเจน 1 ชนิดที่เหมาะสมต่อการบำบัดน้ำทิ้งดีแคนเตอร์

3.2 ผลของความเข้มข้นของไนโตรเจน

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.1 แต่แปรผันความเข้มข้นของของแหล่งไนโตรเจนที่คัดเลือกได้เป็นร้อยละ 0, 0.01, 0.025, 0.050, 0.075, 0.1 และ 1 โดยวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 3.1 เปรียบเทียบผลการทดลองเพื่อคัดเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจน ซึ่งเหมาะสมต่อการบำบัดน้ำทิ้งดีแคนเตอร์

3.3 ผลของพีเอชเริ่มต้น

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.1 โดยมีการปรับพีเอชของน้ำทิ้งดีแคนเตอร์ ให้มีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 และ 6.5 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ หรือกรดไฮดรอคลอริก 6 นอร์มอล โดยใช้พีเอชของน้ำทิ้ง (พีเอช 4.5) เป็นชุดเปรียบเทียบ และวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 3.1

4. ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการบำบัดน้ำทิ้งโดยเชื้อราทนร้อนในถังหมัก

เลี้ยงเชื้อราทนร้อนที่คัดเลือกได้ในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม (ตามสภาวะข้อ 3.3) ในถังหมักชนิดต่างๆ เป็นเวลา 5 วัน สุ่มตัวอย่างและวิเคราะห์ผลตามที่ระบุในข้อ 2.3 และศึกษาปัจจัยดังนี้

4.1 ผลของอัตราการให้อากาศในถังหมักแอร์ลิฟท์

ทดสอบผลของการให้อากาศในถังหมักแอร์ลิฟท์ ขนาด 3 ลิตร ปริมาตรใช้งาน คือ 2.7 ลิตร เปรียบเทียบระดับการให้อากาศที่ 3.0, 1.5, 0.5 และ 0.025 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที (vvm) เก็บตัวอย่างครั้งละ 50 มิลลิลิตร ทุกวันและวิเคราะห์วัดพีเอช, มวลชีวภาพ, การตกตะกอน, ของแข็งทั้งหมด, ของแข็งแขวนลอยทั้งหมด, น้ำมันและกรีส, ซีโอดี, แอคติวิตี้ของเอนไซม์ CMCase, ไซลาเนสและเพคติเนส

4.2 ผลของการกวนในถังหมักที่มีการกวนอย่างต่อเนื่อง (CSTR)

ทดสอบผลของการให้อากาศในถังหมักแบบธรรมดา (CSTR)ขนาด 5 ลิตร ปริมาตรที่ใช้งาน คือ 2.7 ลิตร โดยมีการกวนอย่างเดียวที่ 200 รอบต่อนาที ไม่มีการเติมอากาศ เก็บตัวอย่างครั้งละ 50 มิลลิลิตร ทุกวันและวิเคราะห์วัดพีเอช, มวลชีวภาพ, การตกตะกอน, ของแข็งทั้งหมด, ของแข็งแขวนลอยทั้งหมด, น้ำมันและกรีส, ซีโอดี, แอคติวิตี้ของเอนไซม์ CMCase, ไซลาเนสและเพคติเนส

4.3 ผลของการให้อากาศแบบใช้เครื่องเขย่า

ทดสอบผลของการให้อากาศแบบใช้เครื่องเขย่า โดยใช้ฟลาสก์ ขนาด 1000 มิลลิลิตร ปริมาตรใช้งาน คือ 500 มิลลิลิตร ที่ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างครั้งละ 50 มิลลิลิตร ทุกๆวันและวิเคราะห์วัดพีเอช, มวลชีวภาพ, การตกตะกอน, ของแข็งทั้งหมด, ของแข็งแขวนลอยทั้งหมด, น้ำมันและกรีส, ซีโอดี, แอคติวิตี้ของเอนไซม์ CMCase, ไซลาเนสและเพคติเนส

5. การบำบัดน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในสภาวะไม่ปลอดเชื้อ

5.1 ผลของการฆ่าเชื้อและไม่ฆ่าเชื้อน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ใช้เลี้ยงเชื้อราทนร้อน

เลี้ยงเชื้อราทนร้อน *Rhizopus* sp. ST29 ในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ในอ่างแก้ว (ขนาด 24x49x20 เซนติเมตร) ในสภาวะที่ฆ่าเชื้อและไม่ฆ่าเชื้อน้ำทิ้งก่อนทำการเลี้ยง และเติมปุ๋ย (46-0-0) ในปริมาณที่เหมาะสม (จากผลการทดลองข้อ 3.3) โดยใช้น้ำทิ้งที่ไม่ฆ่าเชื้อและไม่เติมเชื้อเริ่มต้นแต่เติมปุ๋ย (46-0-0) ในความเข้มข้นดังกล่าว เป็นชุดควบคุม ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน สุ่มเก็บตัวอย่างและเก็บเกี่ยวของแข็งบนผิวหน้าเพื่อหาปริมาณมวลชีวภาพ (biomass) โดยนำตัวอย่างน้ำทิ้งหลังการบำบัดมาวิเคราะห์พีเอช, ซีโอดีที่ละลายน้ำ, ของแข็งทั้งหมด (total solid : TS), ของแข็งแขวนลอย (suspended solid: SS), น้ำมันและกรีส, ไนโตรเจน

5.2 เปรียบเทียบการบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มด้วยเชื้อราทนร้อนที่ผลิตพอลิเมอร์ในรูปอิสระและรูปที่ตรึงเซลล์ในอ่างแก้ว

การตรึงเซลล์ทำโดยนำ spore suspension ของเชื้อรา $2.4x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร (Karim and Kamil, 1989) เติมลงในอาหารพีดีบี (PDB) 100 มิลลิลิตร ที่มีตัวตรึงทางการค้า (Bio stage) (มีลักษณะเป็นวัสดุทรงกระบอก สีน้ำตาลอ่อน ผิวด้านนอกขรุขระ เส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร ความยาว 1 เซนติเมตร) (ภาพที่ 2 A) และฟองน้ำที่ตัดเป็นทรงลูกบาศก์ ขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร (วิธีการดัดแปลงจาก D'Anninale *et al.,* 1998) (ภาพที่ 2 B) จำนวน 50 ชิ้น ในฟลาส์กขนาด 500 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 45 องศเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน เมื่อครบ 2 วัน แล้วนำตัวตรึงทางการค้า (Bio stage) และฟองน้ำ เติมลงในน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มเจือจางที่ระดับ 1:1 (มีค่าซีโอดีที่ละลายน้ำ 22.4 กรัมต่อลิตร) ในสภาวะที่

ไม่ฆ่าเชื้อน้ำทิ้งก่อนทำการเลี้ยง และเติมปุ๋ย (46-0-0) ร้อยละ 0.025 โดยมีน้ำทิ้งที่ไม่ฆ่าเชื้อและไม่เชื้อเริ่มต้นแต่เติมปุ๋ย (46-0-0) ร้อยละ 0.025 เป็นชุดควบคุม เลี้ยงในอ่างแก้วเป็นเวลา 4 วัน ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส สุ่มตัวอย่างและเก็บเกี่ยวของแข็งบนผิวหน้าเพื่อหาปริมาณมวลชีวภาพ และเก็บตัวอย่างน้ำทิ้งหลังการบำบัดไปวัดค่าพีเอช และวิเคราะห์หาค่าซีโอดีที่ละลายน้ำ, ของแข็งทั้งหมด (TS),ของแข็งแขวนลอย (SS), น้ำมันและกรีส, ไนโตรเจน

5.3 เปรียบเทียบการบำบัดน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มด้วยเชื้อราทนร้อนที่ผลิตพอลิเมอร์ในรูปอิสระและรูปที่ตรึงเซลล์แบบกึ่งต่อเนื่อง

การตรึงเซลล์ในขั้นนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสามารถลดระยะเวลาในการเตรียมหัวเชื้อที่ใช้ในการบำบัดและให้เชื้อคงอยู่ในระบบน้ำเสียได้นานขึ้น โดยเลี้ยงเชื้อราทนร้อน *Rhizopus* sp. ST29 (ตามสภาวะข้อที่ 5.2) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน แล้วถ่ายน้ำทิ้งออกปริมาตรครึ่งหนึ่งของการเลี้ยง (5 ลิตร) และมีการป้อนน้ำทิ้งในปริมาตรเท่ากัน (5 ลิตร) เข้าสู่ระบบเพื่อให้เชื้อที่เหลือทำการบำบัดต่อไป หลังจากนั้นเมื่อครบ 4 วัน จึงถ่ายน้ำทิ้งออกปริมาตรครึ่งหนึ่งของการเลี้ยง (5 ลิตร) และมีการป้อนน้ำทิ้งในปริมาตรเท่ากับที่ถ่ายออกเป็นครั้งที่ 2 และทำการบำบัดต่อไปอีก 4 วัน สุ่มเก็บตัวอย่างและเก็บเกี่ยวของแข็งบนผิวหน้าเพื่อหาปริมาณมวลชีวภาพ และโดยนำตัวอย่างน้ำทิ้งหลังการบำบัดมาหาค่าพีเอช และวิเคราะห์ซีโอดีที่ละลายน้ำ, ของแข็งทั้งหมด (TS), ของแข็งแขวนลอย (SS), น้ำมันและกรีส,ไนโตรเจน

ทุกการทดลองใช้ทรีตเมนต์ละ 2-3 ครั้ง และทำการทดลอง 2 ครั้ง วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ (โดยเปรียบเทียบความแตกต่างหาค่าเฉลี่ยของแต่ละชุดการทดลอง)

(A) (B)

ภาพที่ 2 ลักษณะของวัสดุที่นำมาใช้ในการตรึงเซลล์ของเชื้อรา :วัสดุทางการค้า Bio stage (A), ฟองน้ำ (B)

Fig. 2 Materials used for immobilization of fungi (A) commercial material (Biostage), (B) Polyurethane sponge.